

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

06.07 – МР. 216 «С». 2023.02.15. 04 ПЗОО
НУБІП України

КУШПІЙ ДІМИТРО СЕРГІЙОВИЧ

2023
НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 57.085.23

НУБІП України

ПОГОДЖЕНО
Декан факультету

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри

захисту рослин, біотехнологій та екології

екобіотехнології та біоіризоманіття

_____ Коломієць Ю.В.

_____ Кваско О.Ю.

« ____ » _____ 2023 р.

« ____ » _____ 2023 р.

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему _____ «Непрямий морфогенез хризантеми в культурі *in vitro*»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма Біотехнології та біоінженерія

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

НУБІП України

Гарант освітньої програми

д. с.-г. наук, професор

(науковий ступінь та вчене звання)

_____ Лісовий М.М.

(підпис)

(ПІБ)

НУБІП України

Керівник кваліфікаційної магістерської роботи

к. б. н. наук, доцент

(науковий ступінь та вчене звання)

_____ Лобова О.В.

(підпис)

(ПІБ)

НУБІП України

Виконав

(підпис)

_____ Кушній Д.С.

(ПІБ студента)

НУБІП України

КІЇВ-2023

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри

“ ” 2023 р.

ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Кушпія Дмитра Сергійовича
(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»
(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»
(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Непрямий морфогенез хризантеми в культурі *in vitro*»

Затверджена наказом ректора НУБіП України від 15.02.2023 р. №216 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 1 листопада 2023 р.

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи матеріали попередніх досліджень з хризантемами

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Підбір рослинних експлантів з різних сортів *C. morifolium* та *C. coccineum*;
2. Підбрати оптимальні умови для стерилізації експлантів;
3. Підбір оптимального складу живильного середовища для введення рослин у культуру *in vitro*;
4. Введення в культуру рослин хризантеми *C. morifolium* та *C. coccineum*;
5. Отримання калюсних тканин.

Дата видачі завдання 1 вересня 2022 року

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

Завдання прийняв до виконання

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Магістерська робота на тему «Непрямий морфогенез хризантеми в культурі *in vitro*» виконана на 62 сторінках друкованого тексту. Містить у собі 5 рисунків та 3 таблиці. Опрацьовано 43 літературних джерела.

Робота складається з таких розділів: зміст, вступ, огляд літератури, результатів дослідження, висновків та списку літературних джерел.

Дослідження проводилося в лабораторії тропічних та субтропічних рослин Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України.

Метою дослідження було дослідити прямий та непрямий морфогенез *C. morifolium* та *C. coccineum*, оздоровлення та розмноження сортів хризантеми..

Завдання роботи:

6. Підбір рослинних експлантів з різних сортів *C. morifolium* та *C. coccineum*;
7. Підібрати оптимальні умови для стерилізації експлантів;
8. Підбір оптимального складу живильного середовища для введення рослин у культуру *in vitro*;
9. Введення в культуру рослин хризантеми *C. morifolium* та *C. coccineum*;
10. Отримання калюсних тканин.

Предметом дослідження були асептичні культури сортів хризантеми корейської.

Об'єктом дослідження був непрямий морфогенез рослин хризантеми на різних культуральних середовищах.

Методами дослідження були методи мікроклонального розмноження рослин, мікрочеренкування

ЗМІСТ	
НУБІП України	
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	7
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	9
НУБІП України	
1.1. Біологія та морфологія хризантем.....	9
1.2. Методи введення експлантів в культуру <i>in vitro</i>	12
1.3. Методи мікроклонального розмноження.....	14
1.4. Основні етапи мікроклонального розмноження.....	15
1.5. Практичне значення мікроклонального розмноження.....	17
1.6. Культура калюсних тканин.....	19
1.6.1. Живильні середовища для отримання калюсу.....	20
1.6.2. Підбір експланту і формування первинного калюсу.....	20
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	22
НУБІП України	
2.1. Особливості оснащення лабораторії.....	22
2.1.1. Посуд, інструменти та матеріали.....	23
2.1.2. Асептичні умови роботи.....	24
2.2. Відбір експланта.....	26
2.3. Стерилізація рослинного матеріалу.....	28
2.3.1. Стандартні вимоги до стерилізуючих речовин.....	29
2.3.2. Стерилізуючі речовини.....	30
2.4. Принципи приготування живильних середовищ.....	32
2.4.1. Мінеральне живлення.....	32
2.4.2. Фітогормони і синтетичні регулятори росту рослин.....	33
2.4.3. Вітаміни.....	37
2.4.4. Приготування маточних розчинів та живильних середовищ.....	39
РОЗДІЛ 3. НЕПРЯМИЙ МОРФОГЕНЕЗ ХРИЗАНТЕМИ В КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i>	42
НУБІП України	
3.1. Вибір експланта.....	42
3.2. Вибір методу стерилізації.....	43

3.3. Прямий і непряий морфоногенез хризантеми.....	45
3.4. Результати дослідження.....	46
3.4.1. Індуція та проліферація ембріонального калюсу.....	50
3.4.2. Індуція соматичних ембріонів.....	54
3.4.3. Регенерація ембріонального калюсу.....	55
3.4.4. Акліматизація та укорінення.....	56
ВИСНОВОК	57
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	59

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

НУБІП України
МС – поживне середовище Мурасіге-Скуга
2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксіцтова кислота

НУБІП України
НОК – α -нафтилоцтова кислота
БАП – 6-бензиламінопурин

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВСТУП

Актуальність. Дослідження непрямого морфогенезу в Україні майже відсутні. Культура *in vitro* може використовуватися для збереження генофонду виду та збереження рідкісних чи вимерлих сортів хризантеми. Це особливо важливо для збереження біорізноманіття та відновлення популяції рослин у природному середовищі. Непрямий морфогенез у культурі *in vitro* дозволяє створювати клони рослин шляхом розмноження тканин для швидкого та масового виробництва рослин з визначеними властивостями. Вивчення непрямого морфогенезу хризантеми допомагає розуміти процеси ембріогенезу та мутагенезу, що має важливе значення для покращення сортів і розвитку біотехнології в галузі сільськогосподарського виробництва та медицини.

Мета. Дослідити прямий та непрямий морфогенез *C. morifolium* та *C. coccineum*, оздоровлення та розмноження сортів хризантеми.

Завдання :

11. Підбір рослинних експлантів з різних сортів *C. morifolium* та *C. coccineum*;
12. Підібрати оптимальні умови для стерилізації експлантів;
13. Підбір оптимального складу живильного середовища для введення рослин у культуру *in vitro*;
14. Введення в культуру рослин хризантеми *C. morifolium* та *C. coccineum*;
15. Отримання калосних тканин.

Предмет дослідження: асептичні культури сортів хризантеми.

Об'єкт дослідження: непрямий морфогенез рослин хризантеми на різних культуральних середовищах.

Методи дослідження: методи мікроклонального розмноження рослин, мікročеренкування.

НУБІП України

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

НУБІП УКРАЇНИ

1.1. Біологія та морфологія хризантем

Хризантема (*Chrysanthemum m.*) - відноситься до роду однорічних і багаторічних трав'янистих або напівчагарникових рослин сімейства Айстрові або складноцвіті (*Asteraceae, Compositae*). Ці декоративні квіти виростають переважно в Азії та широко використовуються для озеленення міст [16].

Однією з переваг хризантем як декоративних культур, є їх стійкість до знижених температур повітря, що забезпечує можливість їх висадки на початку весняного сезону та довге цвітіння, аж до кінця листопада.

Велика різноманітність представників цього роду рослин у природі зустрічається в помірних та субтропічних областях Південно-Східної частини Азії [13]. Зокрема, до районів широкого поширення хризантем можна віднести Китай та Японію [13].

Найвні в даний час гібридні садові хризантеми походження пов'язані з хризантемою дрібнокольковою (*C. indicum*) та хризантеми шовковинцелистої або крупноквіткової (*C. morifolium R.*). Крім того в процесі селекції були використані інші види [13].

Хризантема – широко поширена декоративна трав'яниста культура. Родова назва хризантеми походить від грецької мови з двох слів - "chrysos", що означає золотий і "anthesis" - квітка. Вперше воно було запропоновано в 1753 Карлом Ліннеєм [13].

Як декоративна рослина хризантема є однією з провідних культур у промисловому квітникарстві. По-перше, хризантеми мають своєрідну декоративність. По-друге, мають деякі біологічні особливості, що виділяють її з усіх інших культур. Хризантема - рослина короткого дня, внаслідок чого, регулюючи довготу дня, ці рослини можна вирощувати цілий рік, при цьому отримуючи по три врожаї на рік з одного і тієї ж площі [25].

НУБІП УКРАЇНИ

Хризантеми мають потовщене, більш менш розгалужене кореневища та столони. Стебла прямостоячі, їх висота може досягати 25-120 см. Іноді стебла можуть бути розгалужені. Листя має чергове розташування та значно варіює за формою. Верхня поверхня листя яскраво-зелена, має невелике опушення, нижня сторона листя - сірувато-зелена [25].

Суцвіття махрової хризантеми має язичкові квіти. А у напівмахрової язичкові квітки займають зазвичай п'ять крайніх рядів, решта квіток - трубчасті. У немахрової хризантеми лише 1-4 крайніх рядів - язичкові квітки, а весь диск складається з трубчастих квіток [18].

Залежно від розміру суцвіть сорту хризантеми прийнято поділяти на дрібноквіткові та великоквіткові. У дрібноквіткових сортів діаметр суцвіть зазвичай становить близько 2-9 сантиметрів. Таких суцвіть на кущі може бути від 10 до 20, вони зібрані в щиткоподібну волоть або пухкий складний щиток. У великоквіткових сортів зазвичай є від одного до восьми суцвіть на кущі, діаметр яких досягає 10-25 сантиметрів [18].

Найвні нині садові хризантеми є гібридами хризантеми дрібноцвітої (*C. indicum* L.) та хризантеми шовковицелистої або великоквіткової (*C. morifolium* R.) [18].

Вперше селекцією садових хризантем стали займатися у стародавньому Китаї. У минулому столітті почалося поширення хризантем у районах, де кліматичні умови сприяють дозріванню насіння у хризантем. До таких районів належать південь Франції, південь Англії, Каліфорнія (США), Японія. Саме селекціонерами цих країн було виведено більшість сучасних сортів. В даний час удосконалені методи селекції дозволяють вирощувати хризантеми і в більш північних районах [19].

Хризантеми є світлолюбивими рослинами. В умовах хорошої сонячної освітленості вони добре розвиваються з самого початку вегетації та до пори цвітіння. Тривалість та інтенсивність світла має важливе значення при вирощуванні хризантем, тому що впливає на правильний розвиток пагонів. При

його нестачі стебла витягуються і утворюються неправильні суцвіття у вигляді трубчастих квіток із жовтим диском на слабких квітконосах. Невелике затінення допустиме в перший тиждень після пересадки, а також у період укорінення живців [18].

Також великий вплив на інтенсивність розвитку хризантем впливає температура. При висадженні хризантем у ґрунт оптимальна температура – 17-18°C, а період вегетації 15-17°C. У період вегетації протягом першого місяця температура не повинна бути нижчою за 15°C. В іншому випадку порушується зростання та закладка бутонів [17].

Хризантеми також є вологолюбними рослинами. При своєчасному та досить рясному поливі, в період вегетативного зростання та на початку розвитку квіток, хризантеми швидко ростуть і формують велику листову поверхню [17].

Необхідність класифікації хризантем виникла у результаті появи великої морфологічної різноманітності сортів. У 1104 році в Китаї було зроблено першу спробу класифікувати хризантеми за сортами. Саме цього року було написано книгу «Цзюйцу» – Перелік найменувань хризантеми. У цій книзі було описано 36 сортів хризантем. Деякі описані в цій книзі сорти культивуються досі, наприклад, сорт "Фотоуцзюй" [15].

У Південно-Східній Азії нині прийнято кілька класифікацій, що включають китайські та японські сорти. В основі класифікації цих сортів лежать такі ознаки, як: форма віночка язичкових квіток, а також розмір та форма суцвіть. В даний час у Китаї вирощують близько 3000 сортів цих рослин [15].

Існує також японська класифікація імператорського парку «Синдзюку», згідно з якою хризантеми поділяють на дикорослі та культурні. Культурні поділяються на декоративні та харчові, які використовують для салатів. Декоративні, у свою чергу, класифікують за часом цвітіння на літні, осінні та зимові. Найбільш широко поширена та численна група осіннього цвітіння. Залежно від розміру суцвіть рослини цієї групи поділяють на дрібноквіткові, середні та великоквіткові [15].

Прийнята в Європі та США класифікація заснована на відмінностях форм суцвіть, розмірів, напрямку та форми віночків мовних квіток. Ця класифікація включає 15 класів хризантем [15].

Класифікація заснована на морфолого-систематичному принципі була розроблена в СРСР ботаніком В. С. Ябровою-Колаковською в ботанічному саду Сухумі. Ця класифікація широко застосовувалася під час науково-дослідницьких робіт з інтродукції та селекції [15].

В даний час завдяки тривалій роботі селекціонерів різних країн є величезна кількість сортів хризантем, що відрізняються висотою куща, формою суцвіть, їх забарвленням та розміром, а також термінами цвітіння. Кожна країна має свою специфіку в роботі селекціонерів. Так наприклад, в Америці поширені сорти з анемоновидними суцвіттями, в Японії та Китаї - з павукоподібними або променеподібними суцвіттями, а в Німеччині та Англії - з кулястими та напівкулястими. В Англії та Америці більшість квітів хризантем використовуються на зріз, а у Франції хризантеми вирощуються у горщиках [19].

Таким чином, підбиваючи підсумок можна сказати, що хризантема має багато переваг як декоративна рослина та може використовуватися для озеленення та комерції.

1.2. Методи введення експлантів в культуру *in vitro*

Перші спроби з вирощування ізолюваних частин рослин у штучних умовах було здійснено ще наприкінці XIX століття. Шматочки ізолюваних тканин рослин були культивовані на розчині сахарози німецькими вченими Хаберландтом, Рехінгером та Фехтингом. Хоч і деякий час експланти залишалися живими, отримати зростаючу культуру не вдалося [14].

Надалі неодноразово здійснювалися спроби вирощування окремих частин рослин у скляних колбах або чашках на штучних живильних середовищах, тобто *in vitro*. Але виникали проблеми з підбором поживних середовищ, придатних для вирощування ізолюваних тканин рослин. І лише у 1932-1934 роках французький вчений Готрі зміг ввести в культуру камбіальні тканини деревних рослин та

паренхіму м'ясистого коріння моркви. В свою чергу, американському вченому Вайту вдалося розробити методи тривалого вирощування у пересадочній культурі кореневої меристеми. З цього моменту почався розвиток методів культури тканин рослин. З тих пір, протягом наступних двадцяти років послідовники цих учених змогли запровадити в культуру *in vitro* десятки видів рослин [14].

Нині найбільш перспективні напрямки біотехнології пов'язані з вивченням біології культивованих клітин на молекулярному рівні. Велика увага дослідників у галузі біотехнології приділяється вивченню генетичної мінливості та механізмів регуляції морфогенезу [14].

Вирощування ізольованих клітин, тканин та органів рослин на штучному живильному середовищі в асептичних умовах прийнято називати культурою клітин рослин [8].

Для забезпечення асептичних умов ізолювання тканин із цілих рослин та їх висадку на живильні середовища здійснюють у ламінарному боксі. Фрагмент стерильної рослинної тканини поміщають у чашку Петрі або пробірку на живильне середовище. Далі в тканині починається процес розподілу клітин.

Збільшуючись, клітинна маса утворює калюс [20]. Калюс або калюсна тканина є неорганізованою масою клітин, які виникли внаслідок процесу проліферації. У свою чергу, проліферація це процес новоутворення клітин шляхом розподілу [14].

По мірі зростання калюсної тканини відбувається виснаження елементів живильного середовища. Тому для підтримки його зростання калюс періодично переносять на нове живильне середовище. Такий калюс, який постійно знаходиться в культурі *in vitro* називається пасером [23].

Процес отримання та подальшого культивування калюсу вимагає суворих асептичних умов. Для цього ізольовані частини рослин, тобто експланти, стерилізують. Як стерилізуючі речовини зазвичай використовують розчини, що

містять активний хлор або ртуть, спільно з детергентами для кращого змочування [23].

1.3. Методи мікроклонального розмноження

Швидкість мікроклонального розмноження залежить від видів та сорту рослин, що дозволяє одержати з єдиної бруньки кількох мільйонів рослин за рік.

Основні чинники, які впливають на процес мікроклонального розмноження: тип експланту, склад живильних середовищ та умови культивування.

Вихідним матеріалом для створення експлантів можуть служити будь-які частини рослини, зокрема верхівкові та пазушні меристеми стебла, елементи суцвіття та квітки, молоді листки, цибулини та бульбоцибулини. Для одержання численних пагонів найкраще підходять апікальні та пазушні бруньки здорових рослин, які активно ростуть [21].

Найчастіше для мікроклонального розмноження використовують різноманітні модифікації середовища Мурасіге-Скуга, проте деякі групи рослин потребують індивідуальних підходів для поживних середовищ. Культури поміщають як в агаризовані, так і рідкі поживні середовища на мостиках з фільтрувального паперу [21].

Комбінуючи між собою умови культивування вихідної тканини (склад поживних середовищ, температура, освітлення), можна викликати розвиток пазушних бруньок, індукувати появу адвентивних бруньок або пагонів безпосередньо з клітин експланта або каллосу.

Використовуючи верхівкові та пазушні бруньки як експлант, індукують численні пагони *in vitro*. Разом з тим, культура меристем набула все ширшого використання. Вчені Додс і Робертс у своїх дослідженнях (1985) зазначають відмінність понять «апикальна меристема» та «стебловий апекс», визначаючи апікальну меристему як ділянку стеблового апексу, що розташована дистально відносно наймолодшого листкового примордія і має довжину в середньому 80 мм. Не звертаючи уваги на труднощі в роботі (необхідність працювати з малими за розмірами експлантами, низький відсоток виживання *in vitro*), культури

апикальних меристем широко використовуються для створення рослинного матеріалу, незараженого патогенами [21].

Мікроклональне розмноження здійснюють шляхом виділення апікальної меристеми. Основою даного методу є здатність рослинних фрагментів, що мають точку росту, до відтворення материнського організму. В 1949 р. встановлено, що

апікальна частина точки росту (0,1 мм), що складається з ще недиференційованих клітин, тобто меристеми, несе генетичну інформацію організму, яка не містить вірусних залишків, які присутні в диференційованій

клітині дорослого організму. Меристема, поміщена на поживне середовище,

вирастає з утворенням нового організму рослини, який не містить вірусів. Таку

рослину можна швидко розмножити, розділивши на 4-6 пагонів, які містять точки росту. Клонуючи наступні покоління меристемних рослин отримують

клони материнського організму з ідентичною генетичною інформацією, але без залишків вірусів [21].

Ефективним способом культивування *in vitro* часто може служити соматичний ембріогенез, інакше кажучи, процес формування зародкоподібних структур (ембріодів), що розвиваються із соматичної клітини, і дають початок новій цілій

рослині. Соматичний ембріогенез індукується двома способами: прямим та

непрямим. Соматичні зародки під час прямого ембріогенезу формуються безпосередньо в тканині експланту без проліферації калусу. Новоутворені рослини ідентичні до батьківської форми. Непрямий соматичний ембріогенез

полягає у формуванні ембріодів з недиференційованих калусних клітин і

включає в себе індукцію проембріогенної калусної маси, розвиток ембріодів з

проембріогенних клітин, проростання ембріодів і формування рослин.

Серед рослин, які регенерували шляхом непрямого ембріогенезу, часто зустрічаються форми, що відрізняються від вихідних. Сомаклональні варіанти,

що виникли таким чином використовуються у подальшій селекційній роботі.

1.4. Основні етапи мікроклонального розмноження

Мікроклональне розмноження та вегетативний тип розмноження рослин майже не відрізняються між собою, окрім того, що воно протікає в асептичних умовах *in vitro*, де з клітин ізольованих тканин одержують велику кількість нових рослин. Ідентичність отриманого рослинного матеріалу вихідній материнській рослині є обов'язковою умовою мікроклонального розмноження. Не так давно цей метод розглядали як можливість прискореного клонування видів рослин, що розмножуються вегетативно, а також як один з методів оздоровлення рослин від вірусів [24].

Проте результати деяких експериментів показали, що значущість цього методу істотно зростає для клонування селекції рослин, що вегетативно розмножуються, а саме експериментальний мутагенез і розхимерювання, кріозбереження цінного вихідного матеріалу, а також вивчення індивідуальної генетики культур, що розмножуються генеративно.

Здатність до утворення великих кількостей соматичних зародків в умовах *in vitro*, що розглядається як один з шляхів практичного використання методу мікроклонального розмноження, використовується для розробки технології масового і безперервного одержання штучного насіння. Таким чином гетерозисна селекція деяких сільськогосподарських культур може стати ефективнішою. Крім того, даний метод можна успішно використовувати при створенні синтетичних сортів [24].

Нині вже більше тисячі видів рослин можна успішно клонувати в лабораторних умовах. Реальне комерційне застосування цей метод знаходить у більше, ніж ста видів рослин, серед яких декоративні, плодово-ягідні, технічні, деревні та інші види рослин. Основною перевагою методу мікроклонального розмноження в порівнянні з іншими класичними методами є значно вищий коефіцієнт розмноження. Якщо черешками, цибулинами і кореневищами від однієї рослини можна одержати 10-100 рослин за рік, то методом мікроклонального розмноження число нових рослин, в залежності від виду, може сягати від 50 тисяч до мільйона [24].

Отже, щоб забезпечити необхідний обсяг рослин будь-якої селекційної програми можуть бути використані одиничні і суперелітні рослини. Це і забезпечує високу економічність методу. На невеликій лабораторній площі, що може сягати не більше 200 м², одночасно може вирощуватись мільйони рослин, з меншими витратами енергоресурсів та праці. Можливість оздоровлення рослин від вірусів і інших патогенів є ще однією особливістю цього методу. Крім того, методом мікроклонального розмноження можна клонувати *in vitro* культури, які важко розмножувати класичними вегетативними методами, такі як цибулинні, деревні, овочеві й ін.

Серед факторів, що впливають на процес мікроклонального розмноження найбільш важливим моментом є вибір материнської рослини і експланту, а також стерилізація вихідного матеріалу.

1.5. Практичне значення мікроклонального розмноження

Для прискорення клонування плодкових, ягідних, декоративних видів рослин і деревних порід метод мікроклонального розмноження є досить важливим. У 1960 р. французький дослідник Ж. Морель вперше успішно застосував цей метод для розмноження орхідеї (*Cymbidium*). Йому вдалося протягом року одержати біля 4 мільйонів нових рослин, вільних від вірусної інфекції, всього лише з одного вихідного експланту. Позитивні результати були отримані при використанні цього методу для вегетативно розмножуваних рослин. Метод мікроклонального розмноження *in vitro* виявився ефективним для комерційного використання з декоративними рослинами. Цей метод також використовується для створення елітного і суперелітного матеріалу. Переважна більшість видів рослин здатна розмножуватися в умовах *in vitro*. Проте основною проблемою використання методу мікроклонального розмноження в промислових масштабах для деяких видів рослин залишається висока вартість отриманих клонів.

Для оздоровлення вихідного рослинного матеріалу широко застосовується метод мікроклонального розмноження. Одна з найбільш актуальних проблем рослинництва в усьому світі є боротьба з вірусними захворюваннями, які

призводять до великих втрат врожаїв та навіть знищення цінних сортів рослин. Для вегетативного розмноження багаторічних культур ця проблема є досить важкою.

Вперше чистий посадковий матеріал отриманий методом меристемних культур, очищений від вірусів, відкрили французькі вчені Морель і Мартен в 1952 р. Меристемні культури (розміром від 0,1 до 0,3 мм) є надійним методом оздоровлення від вірусів рослин, що вегетативно розмножуються, на відміну від грибних і бактеріальних хвороб, які усуваються хіміотерапією [20].

Також здоровий посадковий матеріал можна одержати шляхом регенерації рослин з калусних, суспензійних і протопластичних культур. Генетична стабільність отриманого матеріалу в цих методах не спостерігається. Наявність надійних методів тестування вірусів є важливим фактором одержання безвірусного посадкового матеріалу. Раніше для тестування використовували щеплення, дослідження на електронному мікроскопі листків і соку чутливих до вірусів рослин-господарів, а також різноманітні тести. Згодом з'явилися більш точні методи: ELISA і імунна електронна мікроскопія. Методи монокліональних антитіл і ДНК-зондів є більш чутливими, з їх допомогою можна діагностувати вірусні та віроїдні патогени. В Україні дослідження з розробки методів тестування вірусів, а також методів оцінки звільнення меристемних культур від вірусних інфекцій проводяться в НУБІП.

Виробництво здорового посадкового матеріалу, а також його підтримка в процесі розмноження, забезпечується введенням нових надійних, швидких і дешевих методів тестування. Необхідною ланкою в отриманні якісної продукції є поєднання мікророзмноження та методів діагностики.

Варто підкреслити потужні можливості мікрокліонального розмноження з точки зору практичного прискорення селекції, підтримки і зберігання цінних генотипів, а також для посилення мутагенезу, дегімеризації тканин і добору цінних мутантних форм в умовах *in vitro*. Широко поширений і визнаний метод селекції рослин, що вегетативно розмножуються це застосування

мутаногенезу. Використання мікроклонального розмноження у формі прямого органогенезу з цілих експлантів є більш надійним методом відтворення бажаних генетичних змін у рослин, що вегетативно розмножуються, ніж традиційні методи.

Основною перешкодою при виявленні і застосуванні мутагенних змін у рослинах є химерність, що виникає після обробки органів рослин мутагенами. Мікроклональне розмноження рослин *in vitro* можна розглядати як найефективніший метод розхимерювання соматичних клітин. У залежності від генетичної ознаки його можна розглядати як інструмент переходу з однієї форми химерності в іншу або її зберігання.

Химери розділяють на три групи, в залежності від фенотипового прояву та розташування змінених тканин у рослині: меріклональні, періклональні і секторіальні. Мікророзмноження способом верхівкових меристем в основному проявляється утворенням пазушних бруньок.

У селекційній діяльності дослідники зіштовхуються з проблемою збереження і швидкої репродукції одержаних цінних генотипів. Застосування генотипів, пов'язаних з певними біологічними та генетичними перешкодами, у селекції практично неможливе.

1.6. Культура калюсних тканин

Калюс – тканина, що виникла шляхом неорганізованої проліферації клітин органів рослин, що висаджуються на живильний субстрат. Калюсна культура формується, як відповідь на поранення біологічного матеріалу в результаті якого паренхімні клітини переходять до активного поділу і формують недиференційовану тканину (калюсну тканину).

Культура калюсних тканин використовується для вирішення теоретичних питань фізіології і біохімії клітин та вивчення їх біосинтетичних потенцій. Калюсна культура є вихідним матеріалом для отримання суспензійної культури.

ізольованих протопластів, отримання сполук вторинного метаболізму, для ведення клітинної селекції з метою отримання нових рослинних форм.

Калюсна тканина має вигляд аморфної маси тонкостінних паренхімних клітин без визначеної анатомічної структури. Клір біомаси може бути білим, жовтим, коричневим, зеленуватим, червонуватим, що залежить від виду рослин, типу експланту, умов культивування, складу живильного середовища. Консистенція щільна, розпушена клітина калюсу які мають велике ядро, високий вміст ДНК і РНК. Клітини деяких біовидів здатні накопичувати крохмаль і речовини вторинного метаболізму.

1.6.1. Живильні середовища для отримання калюсу

Для отримання калюсу рослин в культурі *in vitro* найчастіше використовують середовища Уайта, Мурасіге-Скуга. До основного складу вносять також вітаміни, регулятори росту, 20–40 г/л сахарози або глюкози. Успіх калюсоутворення значно залежить від правильного підбору рiстактивуючих речовин, що індукують клітинний поділ. Для індукції калюсних тканин експланти поміщають на середовища з високими концентраціями ауксинів. Серед ауксинів найдійовішими є 2,4- дихлорфеноксоцтова (2,4-Д) та індолілоцтова (ІОК) кислоти. Для формування з експланту первинного калюсу необхідно вводити до складу субстрату в 10 разів вищі концентрації речовин ауксинової природи, ніж до складу середовищ з розмноження калюсної тканини і отримання вторинного чи третинного калюсу. В окремих випадках для індукції калюсогенезу до живильного середовища необхідно внести складніші компоненти такі, як гідролізатор казеїну (200–500 мг/л), дріжджовий екстракт (50–100 мг/л).

1.6.2. Підбір експланту і формування первинного калюсу

Для отримання калюсної тканини *in vitro* простерилізований рослинний матеріал надрізають в декількох місцях і переносять на живильне середовище.

Розмішують експлант на субстраті таким чином, щоб ушкоджені ділянки контактували з компонентами агаризованого середовища. Калюс можна отримати із будь-яких органів і тканин рослини (листок, живці, стебло, корінці, зародки тощо). Формування калюсу проходить в місцях первинних або вторинних меристем, а також із паренхіми, що межує з цими меристемами.

Інтенсивність формування калюсних тканин залежить від розмірів експланту. Для більшості біовидів первинний експлант повинен мати розмір 5–10 мм³ / вагу 20–50 мг. Чим більший експлант тим складніший і різноманітніший набір клітин,

тим складніший процес формування калюсної маси. Окрім того, більшість

рослин має властивість фізіологічної полярності (фізіологічна нерівноцінність протилежних полюсів певної клітини, органа або цілої рослини). У зв'язку з цим

калюс інтенсивніше утворюється на боці експланту, який на материнській рослині обернений до кореня, тому при отриманні калюсу на фрагментах стебла,

шматочках кореня, черешка експланту поміщають на агар апікальною стороною. У разі ізолювання експлантів із бульб (топінамбур, картопля)

полярність не має суттєвого значення. Для повного виключення впливу полярності, біоматеріал можна поміщати на середовище тангентально. При

невеликих розмірах експлантів дотримання умов полярності стає не важливим.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

НУБІП України

2.1. Особливості оснащення лабораторії

Для проведення біотехнологічних досліджень необхідно мати спеціалізовану лабораторію, яка складається з кількох приміщень:

– кімнати для миття посуду з холодною та гарячою водою, одистилятором, сушильними шафами для посуду з режимом роботи 150 – 170°C (наприклад, ШСС – 80);

– приміщення для стерилізації середовищ (з горизонтальними і вертикальними автоклавами класу “В”, наприклад, АВ – 75), інструментів, посуду (сухожарові стерилізатори), в якому обов'язково повинна бути вентиляція;

– лабораторної кімнати з технічними, аналітичними, торсійними і демпферними вагами, рН-метром, холодильником, електроплитками, водяною банею, лабораторними столами, центрифугою, витяжною шафою, термостатами з заданими режимами роботи (температурою, вологістю), гойдальними пристроями ролерного чи шейкерного типу, шафами для зберігання чистого посуду, реактивів, живильного середовища;

– стерильного приміщення (боксу, операційної кімнати) для введення органів, частин або тканин рослин в асептичні умови *in vitro*. Дана кімната повинна мати підлогу з кахелю чи лінолеуму для запобігання пошкодження та руйнування внаслідок регулярного миття дезінфікуючими розчинами (хлораміну, хлорного вапна, іншими засобами промислового виробництва). Найзручніше для проведення робіт в асептичних умовах користуватися ламінар-боксами

(камерами, у яких повітря проходить через бактерицидні фільтри). Стерилізують бокс за допомогою бактерицидних ламп типу ОБП – 300, БУФ – 15, БУФ – 30 або альтернативних іноземних марок;

– культуральної кімнати з термостатованими умовами (строго регульованою температурою, у більшості випадків 25 – 27°C; відносною вологістю повітря (ВВП) 70 – 80%; встановленою тривалістю світлового дня), де на спеціальних

НУБІП України

стелажах і полицях розміщують ізолювані культури. З метою кондиціонування повітря використовують різної потужності промислові кондиціонери залежно від об'єму приміщення.

Для культивування суспензій використовують кругові або еліпсоїдні шейкери з гніздами для колб різного об'єму (0,1 л; 0,25 л; 0,5 л) зі швидкістю 90

– 100 об/хв.;
 – кімнати для цитологічних досліджень з мікроскопами і очокулярами (МБИ – 3, МБИ – 15, МБС – 9), предметними та покривними скельцями.

2.1.1. Посуд, інструменти та матеріали

Робота з культурою ізолюваних клітин і тканин вимагає посуду, кількість й розмаїтість якого залежить від мети та завдань досліджень, прогнозованих об'ємів, сезонності тощо.

Для приготування живильних середовищ потрібні:

- мірні колби (0,05 – 3 л.);
- хімічні склянки (0,05 – 1 л.);
- мірні циліндри (10 – 100 мл.);
- піпетки Мора (1 – 10 мл.);
- мікропіпетки градуйовані (0,01 – 2 мл.);
- самплери (автоматичні піпетки або дозатори на 0,05; 0,2; 0,5; 0,005 мл.);
- скляні палички різного розміру;
- лійки різного розміру;
- скляні бактеріальні фільтри або фільтри Зейтца з прокладками з мембранних фільтрів “Сінпор”.

Посуд для зберігання живильних середовищ та вирощування ізолюваних експлантатів:

- колби плоскодонні;
- флакони (25 – 500 мл.);
- чашки Петрі (скляні і разові пластикові);

– пробірки біологічні.

Інструменти:

– пінцети анатомічні різного розміру;

– скальпелі;

– мікробіологічні голки;

– ножиці медичні або загальнохірургічні;

– пальники спиртові;

– настільний стерилізатор для дотримання стерильності інструментів під час роботи.

Матеріали:

– негігроскопічна вата і марля з метою виготовлення ватно – марлевих пробок, ватних тампонів для піпеток й скляних трубок, дезинфекції та

стерилізації робочих поверхонь, інструментів, рук. Марлю

використовують також для фільтрування середовищ, під час стерилізації дрібного насіння (виготовляють мішечки).

Для запобігання висихання середовищ використовують ватні пробки, алюмінієву фольгу, парафілм, клейкі стрічки.

Пробірки з культивованими експлантатами і рослинами-регенерантами розміщують для зручності перенесення в штативи різних типів та розмірів.

2.1.2. Асептичні умови роботи

Біотехнологічні операції потребують асептичних умов, які створюють використанням ламінар-боксів або операційних боксів мікробіологічного типу з

попередньою стерилізацією ультрафіолетовими лампами, спеціальною підготовкою посуду

Для біотехнологічних досліджень використовують жаро- і кислотостійкий посуд із скла типу “Пірекс”, що характеризується стійкістю до підвищених

температур та механічних пошкоджень. Посуд для приготування, збереження живильних середовищ і культивування експлантатів ретельно миють.

Найпоширенішим і найнадійнішим способом очищення скляного посуду є його обробка концентрованою сірчаною кислотою з біхроматом калію протягом 4–6 год з наступним промиванням значною кількістю проточної води протягом 5–10 хв та дворазовим споліскуванням дистильованою.

Приготування хромової суміші: 9,2 г розтертого кристалічного біхромату ($K_2Cr_2O_7$) поміщають в 100 мл концентрованої сірчаної кислоти (H_2SO_4) обережно помішують і нагрівають у фарфоровій чашці (склянці) на водяній бані до розчинення.

Після споліскування дистильованою водою посуд висушують у сушильній шафі при $130^\circ C$ і закривають ватними або целофановими ковпачками.

Основною умовою успішного культивування ізолюваних культур є дотримання стерильності живильного середовища, посуду, матеріалів, інструментів, посадкового матеріалу, приміщення для ізоляції і субкультивування.

Стерилізацію досягають наступними методами:

- вологим жаром (автоклавуванням, тиндалізацією, кип'ятінням, пастеризацією);

- сухим жаром (нагріванням за допомогою гарячого повітря у спеціальних шафах при температурі $+120$ – $180^\circ C$);

- з допомогою хімічних речовин, фільтруванням, опроміненням, ультрафіолетовими променями.

Стерилізують також ламінарну кімнату, в якій проводять ізоляцію і посадку культур, одяг й руки персоналу, посуд, який використовується для культуральних робіт, необхідні інструменти та матеріали, живильні середовища, об'єкти культивування.

Стерилізація посуду і матеріалів. Посуд перед стерилізацією ретельно миють і висушують. Культуральний посуд (колби, пробірки, чашки Петрі, флакони і т. п.) перед заповненням їх живильним середовищем попередньо

стерилізують сухим жаром у сушильних шафах. Тривалість стерилізації: при $+150^{\circ}\text{C}$ – 2,5 год., $+160^{\circ}\text{C}$ – 2, $+170^{\circ}\text{C}$ – 1 год.

Слід зазначити, що вологий жар, порівняно із сухим, ефективніше вбиває мікроорганізми та їх спори. Автоклавування здійснюють при 0,2 МПа ($+133^{\circ}\text{C}$) протягом 25 – 30 хв.

Стерилізація інструментів. Стерилізацію інструментів попередньо здійснюють нагріванням сухим жаром у сушильній шафі при $+140^{\circ}\text{C}$ протягом 2 год або кип'ятінням у воді.

У ламінарному боксі попередньо і в процесі роботи інструменти ще раз стерилізують і поміщають у фарфорову склянку із 96% етиловим спиртом з наступним фламбуванням у полум'ї пальника. Стерильний інструмент використовують лише для одноразової маніпуляції.

Стерилізація ламінарної кімнати. Стерилізація операційної кімнати або ламінарного боксу є обов'язковим процесом, в результаті якого повинні бути усунені джерела можливої інфекції рослинних культур – бактерії, гриби тощо.

Стерилізація складається з двох етапів. На першому етапі приміщення повинно утримуватися в належному порядку, тому його в першу чергу очищають від пилу і бруду та дезинфікують.

Другим етапом обробки є стерилізація ультрафіолетом, для чого використовують кварцові бактерицидні лампи з експозицією від 1 до 3 години.

2.2. Вибір експланта

Щоб забезпечити максимальну генетичну стабільність клонованого матеріалу і уникнути появи можливих різного роду аномалій у рослин, у якості вихідного експланту краще використовувати молоді, слабо диференційовані тканини. Для цього найбільш придатними є кінчики стебел, бічні (пазушні) міжвузля, які інкубуються визначений час (частіше усього 4 год. при температурі 30 або 37°C), після чого надлишки видаляються, а заглиблення тричі промивається буферним фізіологічним розчином з TWEEN-20. Другим компонентом є зразки, у котрих необхідно визначити вірус, для якого отримана

антисироватка (це можуть бути сік з листків, насіння, бульби, цибулин і навіть переносників вірусів – попелиць або нематод). До буферного розчину, як правило, додають розчини нікотину, альбуміну, сульфату натрію, діетилдитіокарбамату натрію й інших стабілізаторів. Екстракти розміщують за попередньо підготовленою схемою в кількох повторностях і інкубують протягом

12 год. При температурі 4°C, після чого заглиблення тричі добре промивають фосфатним буфером. Третім основним компонентом є мічений фермент IgG. Широко застосовують ферменти лужна фосфатаза і пероксидаза. Останнє розведення маркованого ферментом IgG або кон'югата визначається оптимізацією і проводиться у фосфатному буфері з додаванням 2% альбуміну.

Реакція визначається за відповідним субстратом в безперервному буферному розчині. При позитивній реакції утворюється зафарбований продукт, що гідролізується у тих зразках, де відбувалося зв'язування. Крім візуального обліку, проводиться і фотометричний, при цьому щільність адсорбції пропорційна концентрації вірусів [24].

Метод ELISA в Україні використовується для визначення вірусних захворювань винограду, картоплі, гвоздики та інших. Він є чутливим, порівняно дешевим та піддається до автоматизації [22].

Адвентивні бруньки утворюються з меристемних зон, сформованих вторинно з тканин калюсу. Особливістю адвентивних бруньок є здатність утворюватися як з меристеми, так і немеристемних тканин (листіків, стебел, луски цибулин і т. д.).

Співвідношення цитокінінів до ауксинів у живильному середовищі значно індукує процес утворення адвентивних бруньок у більшості рослин. Проте спостерігаються різні варіації в концентрації цих фітогормонів у деяких рослин.

Завдяки здатності адвентивних бруньок утворюватися з клітин як зовнішнього епідермісу, так і внутрішніх тканин стебла і листків, здійснюється розхимерювання тканин, які формуються з генетично неоднорідних клітин. Але через це зберігання ідентичності вихідного генотипу та фенотипу не

відбувається в таких випадках. Одночасне формування пазушних і адвентивних бруньок у меристемі верхівок спостерігається нерідко.

Повторна диференціація адвентивних бруньок з калюсних тканин є частиною непрямого морфогенезу. Калюс – це недиференційована маса клітин, що діляться, регенерована на ізольованих експлантах. Для індукування росту калюсу необхідні комбінації ауксинів і цитокінінів. Утворення первинного та пасажованого (періодично переносного на свіже середовище) калюсу не потребує особливих зусиль, чого не скажеш про повторну диференціацію адвентивних бруньок і ембріодів, тому що не всі тканини й органи рослин можуть індукувати спроможний до регенерації рослин калюс [22].

Це пов'язано з утворенням аберантних поліплоїдних і анеуплоїдних клітин з генетичною перебудовою на рівні хромосом і ДНК. У вихідних тканинах експланту вже наявна частина цих відхилень, інша частина виникає знову під впливом фітогормонів. Найбільш придатними експлантами для вторинного утворення адвентивних паростків є молоді ембріональні тканини. Завдяки емпіричному добору оптимальних співвідношень концентрації ауксинів і цитокінінів досягаються успішні результати досліджень. Генетична нестабільність даної системи провокує відхилення, тому вона не може бути рекомендована для мікроклонального розмноження. Проте вона має певне значення для клітинного мутагенезу, добору на селективних середовищах, а також соматклональної мінливості.

2.3. Стерилізація рослинного матеріалу

Поверхні органів рослин як правило контаміновані спорами різних мікроорганізмів і грибів (ендогенною та епіфітною мікрофлорою, вірусами). Проте внутрішні тканини вважаються стерильними, хоч і в них можуть знаходитись непатогенні бактерії, котрі не завжди виявляються.

Основною вимогою до отримання калюсних і суспензійних культур є стерилізація рослинних об'єктів, яка полягає в знешкодженні екзогенної

мікрофлори без пошкодження внутрішніх тканин. Вид стерилізуючих речовин, концентрація і тривалість дії залежать від щільності та чутливості тканини, яку стерилізують.

2.3.1. Стандартні вимоги до стерилізуючих речовин

Правильний добір стерилізуючої речовини полягає в тому, щоб вона вбивала патогенну мікрофлору і якомога менше шкодила рослинним тканинам. Труднощі полягають у стерилізації об'єктів з тріщинами, заглибинами, пошкодженнями (насіння, плоди, стебла листяних та хвойних порід дерев). У цьому випадку не лише поверхнева стерилізація, але і проникання всередину стерилізуючого розчину може в подальшому негативно впливати на ріст тканини в умовах *in vitro*. Тому стерилізуючий розчин повинен легко вимиватись з тканини дистильованою водою або розкладатись, щоб не отруювати тканину.

Користуються уже відомою технікою стерилізації або ж розробляють її експериментально для кожного конкретного об'єкту, оскільки один і той же орган у різних рослин вимагає різних умов стерилізації. За правильного вибору стерилізуючої речовини інфікування тканин не перевищує 1 – 3%.

Перед стерилізацією тканини попередньо очищають. Для цього запасуючі органи (коренеплоди, бульби), товсті стебла рослин, деяке насіння деревних порід:

- ретельно миють з милом в проточній воді, при цьому попередньо прочищають щіткою;
- знімають верхній епідерміс (у корене- та бульбоплодів);
- промивають дистильованою водою, в ламінар-боксі одускають на кілька секунд у абсолютний спирт.

Поверхню пагонів і листків деревних порід протирають ватою, змоченою етанолом (спиртом), а насіння й плоди споліскують етанолом. Обробка 70% етанолом покращує дію стерилізуючих розчинів.

З метою повнішого змочування поверхні опушених чи восковидних поверхонь стерилізуючими розчинами в останні додають детергенти –

поверхнево-активні речовини, миючі засоби (мило, порошок, тощо)
4–5 крапель на 1 л води.

2.3.2. Стерилізуючі речовини

Для поверхневої стерилізації рослинних тканин використовують значну кількість хімічних речовин, як правило тих, що містять активний хлор (гіпохлорид натрію, хлорне вапно, гіпохлорид кальцію, хлорамін), двохлористу ртуть (сулема), перексид водню. Рідше використовують бром, сірчану кислоту, в особливих випадках антибіотики.

Гіпохлоридом натрію (NaClO) стерилізують насіння та інші рослинні тканини (0,5–5,0% розчином протягом) 1–20 хв. Річні стебла деяких хвойних дерев стерилізують 5% розчином 30–60 с.

Стерилізацію ніжних тканин (листки та стебла сукулентів, поверхневі меристеми) проводять слабким розчином (0,5%) протягом 5 хв. Пиляки після полоскання у 95% етанолі стерилізують в 10% (за об'ємом) розчині NaClO протягом 10–15 хв.

Гіпохлорид кальцію [$\text{Ca}(\text{ClO})_2$] менш токсичний для тканин, ніж NaClO .

У концентрації 90 г/л застосовують для стерилізації бульбо- і коренеплодів (протягом 20–25 хв), пагонів деревних (15–30 хв), пагонів та стебел трав'янистих культур (10–15 хв).

Хлорамін діє на рослинні тканини слабше, ніж NaClO та $\text{Ca}(\text{ClO})_2$.

Всі розчини з активним хлором використовують один раз і готують безпосередньо перед вживанням. Об'єкти після стерилізації промивають 2–3 рази стерильною дистильованою водою.

Двохлориста ртуть (сулема) HgCl_2 надзвичайно токсична, яку використовують в низьких концентраціях та в оптимально вентильованому приміщенні. В основному застосовують 0,1% розчин HgCl_2 , а також інші її сполуки, зокрема мергіолят, діацид та фамосепт.

Після стерилізації у розчинах ртуті тканини промивають 4 – 5 разів дистильованою H_2O у кожній порції впродовж 10 – 15 хв. Розчин сулеми можна використовувати кілька разів.

Етиловий спирт (C_2H_5OH) застосовують у концентрації 70 – 95% для стерилізації і покращення дії інших стерилізуючих розчинів. Рослинні об'єкти занурюють на кілька секунд у спирт, обпалюють у полум'ї спиртівки (даний прийом застосовують кілька разів залежно від щільності покривних тканин) і поміщають у стерильну чашку Петрі.

Бром (Br) у вигляді 1% розчину застосовують для стерилізації лише сухого насіння, оскільки бром токсичний і пошкоджує зародки, якщо вони мало захищені (наприклад, у злакових). Після стерилізації бромною водою промивають дистильованою.

Фенолом (C_6H_5OH) стерилізують плоди і кісточки плодкових порід дерев (персика, сливи, вишні) у вигляді 5% розчину протягом 5 хв.

Антибіотики порівняно нетоксичні для рослин, проте їх мало використовують внаслідок обмеженої бактеріологічної активності. Додавання розчинів антибіотиків у живильне середовище ефективно у випадках, коли тканини неможливо простерилізувати звичайними засобами внаслідок інфікування їх внутрішніх областей спорами бактерій або грибів. З цієї метою частіше використовують пеніцилін, стрептоміцин, біоміцин, тетрациклін, окситетрациклін, тераміцин, бацитрацин, ауреоміцин та ін. Оскільки антибіотики є термолабільними речовинами, їх стерилізують лише методом фільтрування і додають до охолодженого середовища. При використанні антибіотиків для стерилізації необхідно ретельно підібрати концентрацію, яка б достатньо глибоко діяла на мікроорганізми, але не була токсичною для тканин (антибіотики в різних концентраціях можуть стимулювати або пригнічувати ріст ізольованих культур).

Рослинні тканини після стерилізації тричі промивають у стерильній дистильованій воді 10 – 20 хв у кожній порції і поміщають на живильне

середовище для рослин (насіння) або калусогенезу (фрагменти стебла, листків, бульб, коренеподів). У деяких випадках, особливо при роботі з деревними культурами, рекомендують попередню перевірку експлантата на інфікування сапрофітною мікрофлорою. Для цього після стерилізації експлантанти поміщають на безгормональне живильне середовище, яке містить лише мінеральні складові, вітаміни, сахарозу і агар. Через 8 – 10 днів оцінюють стан тканини, відбирають неінфіковані експлантанти і переносять їх на середовище з регуляторами росту. Цей захід дозволяє культивувати лише стерильний матеріал і економити дефіцитні складові середовища.

2.4. Принципи приготування живильних середовищ

Основою створення живильних середовищ для вирощування культур тканин рослин є суміші мінеральних солей (макро- і мікроелементів) і, оскільки живлення культивованих тканин є гетеротрофним, джерело вуглецю вводять в склад середовища у вигляді сахарози або глюкози.

Крім вуглецю, кисню і водню, для росту тканин необхідний азот у вигляді нітратної або амонійної солі, фосфор – фосфату, сірка – сульфату та іони K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Загальна концентрація мінеральних елементів найбільш висока у середовищах Мурасіге і Скуга, Ніча, Гамборга та Шенка.

2.4.1. Мінеральне живлення

Азот. У складі більшості живильних середовищ азот представлений у вигляді нітрату і лише в деяких середовищах (Мурасіге і Скуга, Гамборга), крім нітратів, додають солі амонію. Нітрати, як основне джерело азоту, вводять в середовище в концентрації від 2 до 25 мМ. У деяких випадках для інтенсивного росту калусних та суспензійних культур сумарну концентрацію нітрату і аміаку збільшують до 60 мМ.

Існує чітка кореляція між збільшенням сирової маси суспензії клітин рослин і використанням нітратів із середовища, що свідчить про значне перетворення

нітратів в органічні сполуки. Заміна 10 – 20% нітратів на солі амонію сприяє оптимальнішому росту тканини.

Фосфор. Для росту калюсних тканин та ізолюваних органів необхідним компонентом є фосфор, який використовують у вигляді ортофосфату. Крім цього, джерелом фосфорного живлення можуть бути фосфати цукрів. Іони Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} потрібні для культивування тканин у невеликих кількостях і важливі для регулювання рН середовища.

Сірка. Цей елемент вносять до складу середовища у вигляді сульфату, сульфіту, цистеїну, глутатіону або метіоніну.

Іони заліза вводять у вигляді неорганічних солей (FeCl_2 , $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$) і солей органічних кислот (цитрат заліза). Доцільно вводити хелатуючі реагенти, такі як етилендіамінтетраоцтову кислоту, наявність якої в середовищі покращує доступ заліза в широкому діапазоні рН.

Крім основних макроелементів, до складу більшості середовищ входять мікроелементи.

2.4.2. Фітогормони і синтетичні регулятори росту рослин

Фітогормони – органічні сполуки природного або штучного походження, які беруть активну участь в регулюванні фізіологічних та морфогенетичних процесів росту і розвитку рослинного організму. Гормони, які синтезуються безпосередньо самою рослиною, називають фітогормонами.

За характером дії на процеси в рослині фітогормони поділяють на стимулятори та інгібітори. Але, оскільки фітогормони можуть стимулювати деякі процеси в невеликих концентраціях або навпаки, у великих концентраціях стимулювати певні процеси, такий поділ є не зовсім точним [20].

Фітогормони постійно транспортуються рослиною і, в залежності від потрапляння в певний орган чи тканину, впливають на їх ріст. Отже, фітогормони – речовини, за допомогою яких здійснюється взаємодія клітин, тканин і органів рослин. Хоча вони і синтезуються і перебувають в рослинах в

дуже малих кількостях, фітогормони викликають морфогенез на відміну від інших біологічно активних речовин.

До основних фітогормонів належать такі групи: ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизова кислота, етилен, брієностероїди. Вчені й надалі продовжують пошуки нових рослинних активних речовин, які можна було б віднести до фітогормонів. За останні кілька роки до фітогормонів приєдналися жасминова кислота, олігосахариди, фузікокцин.

Кожна група фітогормонів має власні специфічні хімічні властивості, які по різному впливають на ріст та диференціацію клітин, що використовується при мікроклональному розмноженні. Важливим сегментом використання фітогормонів є те, що вони не впливають на генотип експлантів. Також важливим доповненням є те, що вони не взаємодіють з елементами поживного середовища, а лише допомагає рослині саме розкрити генотипний потенціал.

Серед синтетичних регуляторів росту варто виділити: емістим, дипромол, івін, фарбізол, метиур. Вони застосовуються в рослинництві для підвищення енергії проростання, приживання саджанців, запобігання вилягання злакових.

Ауксини. Дана група фітогормонів вперше була відкрита британським вченим Чарльзом Дарвіном. Під час його дослідів над фототропізмами він встановив, що колеоптілі вівса показують ріст проростків в бік світла. Це обумовлено тим, що від верхівки стебла передається якийсь вплив на зону росту внизу. Свою назву ауксин отримав в 1934 році та був визначений як індол-3-оцтова кислота. Ауксини – група фітогормонів, які впливають на процеси поділу та розтягнення клітин і сприяють формуванню коренів, провідних пучків. Синтез ауксинів відбувається у верхівці рослин, а транспорт відбувається низхідним шляхом. Найпоширенішим ауксином є індол-3-оцтова кислота. Відомо багато речовин індольної природи з ауксиною дією, які синтезовані лабораторним шляхом: індоліламеяна, нафтілоцтова кислоти. Існують ауксини неіндольної природи: 2,4-D; 2,4,5-трихлорфеноксоцтова кислота; 2,3,6-трихлорбензойна

кислота. У високих концентраціях неіндоліні ауксини застосовують як гербіциди. Ауксини синтезуються лише в молодих частинах рослин, які перебувають в активній фазі росту: в точках росту стебла, верхівках коренів, молодих листках, бруньках, квітках і плодах. Транспортування ІОК по рослинних тканинах відбувається полярно – від верхівки пагона до кореня. В тканинах рослин вона знаходиться в двох формах: вільній і зв'язаній. Біологічна активність притаманна тільки вільним формам ІОК. Тропізми рослин пояснюються нерівномірним поділом ауксинів в осьових органах. Основними діями ауксинів є стимуляція росту, розтягнення клітин, посилення пластичності клітинних стінок за рахунок зниження рН позаклітинного середовища. Явище апікального домінування виникає за стимулювання ІОК, коли апікальна меристема гальмує ріст бічних меристем [20].

Цитокініни. Вперше цитокініни були виявлені в молоці кокосового горіха як інгредієнт, який спричиняв поділ дозрівших серцевин клітин тютюну в культурі, в 1955 р. Скугом. Вчені визначили, що активний компонент по хімічній будові схожий з аденіном однією із основ, яка входить до складу ДНК. Він отримав назву кінетин. А вже згодом його перейменували в нинішній цитокінін. Вперше цитокінін отримали в 1963 р. із молодих зерен кукурудзи і отримав назву зеатин. До найрозповсюдженіших цитокінінів відноситься кінетин, зеатин, бензиламінопурін. Цитокініни виконують багато функцій в процесах росту і розвитку рослин. До основних функцій цитокінінів відноситься стимулювання процесів поділу клітин та їх диференціації та затримка процесів старіння відокремлених органів. Цитокініни стимулюють розвиток латеральних точок росту (бокових бруньок), тобто беруть участь у подоланні апікального домінування. Цитокініни синтезуються у коренях та транспортуються висхідним шляхом до листків, підтримуючи їх структурно-функціональну життєдіяльність. На практиці за допомогою цитокінінів можна продовжити тривалість зрізаних рослин [20].

Гібереліни. Найрозповсюдженішим представником гіберелінів є гіберелінова кислота. Вперше гібереліни було зафіксовано 20-х роках групою японських вчених, яка працювала в Токійському університеті, при дослідженні захворювання проростків рису, яке викликав гриб *Giberella* (під *Fusarium*).

Заражені сіянці витягувались в довжину, втрачали колір, гинули або не давали врожай. Першу активну речовину було синтезовано в 1935 р. Саму гіберелінову кислоту вперше синтезували британські вчені в 1954 р. Рослини, в яких висока концентрація гіберелінів швидко починають рости молоді апікальні листки,

бруньки, незріле насіння, плоди. Гібереліни транспортуються по флоемі та ксилемі уверх-вниз, тому полярність руху в них не спостерігається. Синтез

гіберелінів залежить від освітленості, оскільки він залежить від біосинтезу в хлоропластах. Гібереліни – компоненти систем, які регулюють ріст і розвиток

рослин. Основними функціями гіберелінів є стимулювання ріст, подовження стебла за рахунок розтягнення клітин, а не їх поділу. Гібереліни використовують

для нормалізації росту карликових сортів гороху та кукурудзи. Також гібереліни пов'язані зі збудженням насіння злакових. Насіння, поміщене у воду, починає її поглинати, після чого зародок починає синтезувати гібереліни, які стимулюють

утворення гідролітичних ферментів. Ферменти розщеплюють запасний крохмаль ендосперму на прості цукри, які використовуються для розвитку зародка.

Процеси яровизації та цвітіння не відбуваються без участі гіберелінів. У ході яровизації підвищується рівень гіберелінів, що дозволяє холодову обробку

замінити обробкою неярованих рослин гіберелінами. Екзогенно введений гіберелін у багатьох дворічних рослин виключає потребу в яровизації і викликає

їх цвітіння. Гібереліни викликають партенокарпію – процес, при якому плоди розвиваються без запліднення. Для цього квітки рослин обробляють розчином

гібереліну, що практично використовується у виноградарстві. Процес регуляції росту проходить лише за участі обох компонентів: стимуляторів та інгібіторів

[20].

2.4.3. Вітаміни

Як відомо, більшість вітамінів, що входять до складу живильних середовищ, є коферментами, які каталізують важливі реакції. Зокрема, тіамін (вітамін B₁) входить до складу піруватдекарбоксілази і відіграє важливу роль у перетворенні вуглеводів, а також в окиснювальному декарбоксілюванні кетокислот. До складу середовищ тіамін вводять в кількості 0,1 – 10 мг/л. До складу багатьох середовищ входить піридоксин (вітамін B₆), який бере участь у процесах декарбоксілювання та переамінування амінокислот. Нікотинова кислота у вигляді амідів входить до складу окиснювально-відновних ферментів

дегідрогеназ. У живильні середовища нікотинову кислоту вводять в концентрації 0,5 – 1 мг/л.

Агар-агар. Для приготування живильних середовищ як ушільнюючу речовину використовують агар-агар. Це полісахарид, який отримують із морських водоростей і виготовляють у вигляді пластин, зерен або жовтувато-білого порошку. Агар-агар утворює з водою гель, який плавиться за температури +100°C і твердне – +45°C.

pH середовища. В нативних умовах рослинна клітина функціонує у вузьких межах коливань концентрації водневих іонів. Відносна стабільність величини pH всередині клітини та середовищі, яке її оточує, підтримується буферними системами, в яких важливу роль відіграють білкові молекули як амфоліти. Відносно стабільне значення pH у середовищі підтримується за рахунок хелатуючих реагентів або відповідних сполук. Більшість стаціонарних культур ізольованих тканин росте на середовищах з pH 5,6 – 5,8.

Таким чином, успіх в культивуванні культур клітин, тканин та органів рослин визначається складом живильних середовищ.

Таблиця 1

Основні компоненти найвживаніших живильних середовищ

Компоненти, мг/л	MS	WPM
Макроелементи		
NH_4NO_3	1650	400
KNO_3	1900	—
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	440	96
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	370	370
KH_2PO_4	170	170
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	—
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	—	—
$(\text{CaNO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	—	556
KCl	—	—
Na_2SO_4	—	—
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	—	—
K_2SO_4	—	990
Мікроелементи		
KJ	0,83	—
H_3BO_3	6,3	6,2
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	22,3
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	8,6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25
MoO_3	—	—
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,25
$\text{CoSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	—
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	—	—
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	—	—

Na ₂ EDTA	37,3	37,3
Fe-хелат		
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8	27,8

2.4.4. Приготування маточних розчинів та живильних середовищ

Для економічного використання часу та зусиль готують концентровані розчини макро-, мікросолей, вітамінів, гормонів (маточні розчини), які зберігають в холодильнику при температурі +4°C не більше місяця. Розчини вітамінів можна заморожувати і зберігати у невеликих кількостях протягом 2 тижнів.

Розчини ауксинів 2,4-Д, НОК, ІОК, ІМК і їх аналогів (наприклад, концентрацію 1мг/мл) готують шляхом розчинення 100мг речовини в 0,5–2 мл спирту, підігрівають та додають води до 100 мл. Кін, Зеа, 6-БАП розчиняють попередньо у невеликій кількості 0,5н НСІ і при нагріванні додають потрібну кількість води.

Якщо у середовище необхідно внести абсцизову кислоту (АБК), то її розчиняють в 70% етанолі і доводять до потрібного об'єму. Гіберелову кислоту розчиняють безпосередньо у воді і додають у живильні середовища і простерилізують через мембранні фільтри. Кокосове молоко додають у живильні середовища і попередньо підігрівають протягом 30 хв. при +60°C і простерилізують фільтруванням (діаметр мембранного фільтра 0,2 – 0,45 мкм).

Антибіотики, гербіциди та інші речовини, які повністю або частково розкладаються при автоклавуванні, додають до живильних середовищ (40 – +50°C) у вигляді профільтрованого (стерильного) розчину, попередньо довівши рН до 5,6 – 5,8.

Після приготування маточних розчинів готують живильні середовища, приготування яких потребує особливої ретельності, для запобігання помилок необхідно дотримуватись певної послідовності в роботі.

1. В мірну колбу (циліндр) наливають 250 – 300 мл дистильованої води і додають точно відмірену кількість кожного розчину макро- й мікроелементів, вітамінів, регуляторів росту.

2. Зважують необхідну кількість вуглеводів, гідролізату казеїну, пептона і т.

п.

3. Наважку агару поміщають в термостійку склянку і заливають холодною дистильованою водою для набухання, через 15 – 20 хв нагрівають її помішують до повного розчинення агару (90 – 100°C).

4. Зливають обидва розчини, профільтровують через два шари марлі і доводять до необхідного об'єму.

5. рН середовища встановлюють на рН-метрі, доводять його до потрібного значення і додають (краплями) 0,1н КОН, 0,1н NaOH, або 0,1н HCl.

6. Розливають тепле середовище в простерилізовані сухим жаром колби чи пробірки, закривають ватними пробками або фольгою і ретельно обгортають навколо горловини склянки.

7. Стерилізують середовище в автоклаві під тиском 0,08 – 0,1 МПа (t = 115 – 120°C) протягом 20 – 25 хв. Отримані таким шляхом живильні середовища бажано використати протягом 7 – 12 діб.

8. У робочих зошитах записують склад і приготування живильного середовища, роблять висновок щодо впливу живильного середовища на ростові процеси *in vitro*.

Таблиця 2

Маточні розчини для приготування поживних середовищ

Вихідний компонент	Наважка за Мурасіге-Скугом	за Уайтом	Необхідний об'єм розчину для приготування 1 л середовища

Макроелементи, г/л			
NH_4NO_3	16,5		
KNO_3	19,0	0,8	
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	–	2,0	
CaCl_2 б/в	3,3	–	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7	3,6	
KH_2PO_4	1,7	–	100мл
Na_2EDTO	0,37	0,37	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,28	0,28	
KCl	–	0,65	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	–	0,165	
Na_2SO_4 б/в	–	2,00	
Мікроелементи, мг/100мл			
H_3BO_3	620	150	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2230	–	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	–	150	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	860	–	
KJ	83	–	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25	25	1 мл
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5	4	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5	–	
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	–	530	
Вітаміни, мг/л			
Тіамін HCl (B_1)	10	10	
Нікотинова к-та (PP)	50	50	1 мл
Піридоксин HCl (B_6)	50	10	

РОЗДІЛ 3. НЕПРЯМИЙ МОРФОГЕНЕЗ ХРИЗАНТЕМИ В КУЛЬТУРІ *IN*

VITRO

3.1. Вибір експланта

На першому етапі виконання експериментальної частини роботи нами проведено вибір можливих об'єктів досліджень, а також вибір експлантів із цілих рослин. У цій роботі були опрацьовані дослідження із сортами хризантеми корейської «Наталі», «Мішаль» та дикорослої *Crysanthemum coccineum*.

«Наталі» - має помпонні суцвіття, які розквітають у вересні. Висота куща може сягати 70 см заввишки, а діаметр суцвіть від 4 до 6 см. Суцвіття білого кольору з жовтою серединкою. (Рис. 1а)

«Мішаль» - особливістю цього сорту є раннє цвітіння, яке може початися в серпні. Ростуть пишними кущами, які можуть бути до 50 см заввишки. Має один з найяскравіших жовтих кольорів квітки. (Рис. 1б).

Crysanthemum coccineum - росте до 60 см заввишки, колір квітів: рожевий, червоний, білий. Основний час цвітіння: початок літа, кінець весни. Форма: прямостояча (Рис. 1в).



Рисунок 1 – *C. morifolium* та *C. coccineum*

а – хризантема корейська сорту Наталі

б – хризантема корейська сорту Мішаль

в – *Crysanthemum coccineum*

Важливе значення має етап вибору експлантів. Необхідно, щоб клітини експланту мали хорошу швидкість росту, тотипотентність і виживання. Найкраще використовувати меристематичні тканини [6].

Як рослинні експланти для введення в культуру *in vitro* в дослідженні були використані верхівки пагонів та листя з укорінених живців, вирощених в тепличних умовах [1].

3.2. Вибір методу стерилізації

При роботі з культурою ізольованих клітин та тканин необхідним умовою є дотримання суворої стерильності. Ізольовані з рослин експланти можуть бути схильні до зараження мікроорганізмами. Зазвичай стерилізацію експлантів проводять різними стерилізуючими агентами, з подальшим промиванням рослинних частин стерильною водою для запобігання пошкодженню клітин хімічними агентами.

Об'єктами дослідження служили 2 інтродукованих сорти хризантеми корейської «Наталі», «Мішаль» та *C. fosciniem*.

Як стерилізуючі сполуки для перерахованих сортів випробовували 0,1% розчини сулеми, азотнокислого срібла та діациду у поєднанні з обробкою 70% етанолом. Час експозиції для етанолу становив 5 сек, діациду, сулеми та азотнокислого срібла – 6 хв. Після стерилізації матеріал промивали у трьох змінах стерильної бідистильованої води по 15 хв в кожній, потім висаджували на модифіковане агаризоване середовище MS. Пробірки з висадженими експлантами поміщали на стелажі, де температура повітря становила 24 ° C, освітленість - 4000 лк, відносна вологість повітря - 70%, фотоперіод - 16 годин. Облік інфікованих, окислених та життєздатних експлантів проводили щодня протягом 2 тижнів. Експериментальні дані наведено у таблиці 1.

Цифри в таблиці свідчать про залежність виходу життєздатних експлантів від типу стерилізуючого з'єднання, сортової та видової приналежності рослини. Високий вихід (100%) життєздатних експлантів відзначений у сорту хризантеми

корейської «Наталі» та *C. coccineum*, незалежно від типу стерилізуючого з'єднання. Дещо нижчий цей показник у сорту «Мінчаль» (95%).

На підставі аналізу отриманих результатів експериментальних досліджень, значення впливу стерилізуючих сполук на вихід життєздатних експлантів у інтродукованих сортів хризантеми корейської, можна констатувати, що вихід життєздатних експлантів залежить як від типу стерилізуючого з'єднання, так від сортової приналежності рослини. Оптимальним стерилізуючим з'єднанням для пагонів і листя сорту хризантеми корейської «Наталі» та *C. coccineum* слід вважати 0,1% розчин азотнокислого срібла, сулеми та діациду при експозиції 6 хв, для експлантів сорту 'Мінчаль' — 0,1%-ний розчин сулеми та діациду.

Отже, з метою запобігання інфікуванню інтродукованих сортів хризантеми корейської та *C. coccineum* при введенні їх у культуру *in vitro* слід проводити стерилізацію експлантів у 0,1% розчині сулеми, азотнокислого срібла та діациду.

З усіх випробуваних нами стерилізуючих сполук, високий вихід життєздатних експлантів інтродукованих сортів корейської хризантеми отримано при використанні трьох видів стерилізуючих сполук: сулеми, азотнокислого срібла та діациду в концентрації 0,1%;

Сорт	Експлант	Концентрація розчину стерилізуючого розчину		
		Сулема-0,1	Азотне срібло – 0,1	Діацид – 0,1
Хризантема корейська				
Час експозиції, хв.				
6				
I C O Ж I C O Ж I C O Ж				

Наталі	Пагін, листя	0	0	20	0	0	20	0	0	20
Мішаль	Пагін, листя	0	0	20	0	1	19	0	0	20
<i>C. coccineum</i>	Пагін, листя	0	0	20	0	0	20	0	0	20

Таблиця 3. Життєздатність експлантів інтродукованих сортів хризантеми корейської в залежності від стерилізуючих розчинів. Примітка: І – інфіковані; О – окислені; Ж – життєздатні.

3.3. Прямий і непрямий морфоногенез хризантеми

Для індукції прямого або непрямого органогенезу у *C. morifolium* та *C. coccineum* експланти кінчиків пагонів культивували на середовищі MS, доповненому 0, 1, 2 та 3 мг л⁻¹ БАП та 0, 0,05, 0,1 та 0,3 мг л⁻¹ НОК, окремо або в поєднанні. Експланти щотижня пересівали на свіже середовище з відповідними регуляторами росту та концентраціями. Через 9 тижнів реєстрували кількість адвентивних пагонів, відсоток регенерації, довжину пагонів (см) та кількість днів, необхідних для розвитку регенерованих пагонів.

Для індукції ембріональних калюсів у обох видів листові експланти інкубували на середовищі MS, що містило різні концентрації 2,4-Д (0, 1, 2 і 3 мг/л та БАП (0, 1, 2 і 3 мг/л-1), окремо або в комбінації. Після 4-6 тижнів інкубації реєстрували утворення калюсу (%), кількість соматичних ембріонів та відсоток

соматичного ембріогенезу. Збільшення маси калюсу реєстрували як приріст маси після 8 тижнів інкубації.

Для вивчення простого та інтерактивного впливу БАЦ (0 і 2 мг л^{-1}) і НОК (0 , $0,05$ і $0,1 \text{ мг л}^{-1}$) на проліферацію калюсу та регенерацію пагонів калюси з соматичними ембріонами (жовтуваті та компактні калюси, диференційовані на різних стадіях ембріогенезу) на поверхні, отримані з листкових експлантів, ділили на невеликі шматочки розміром приблизно $0,5 - 0,75 \text{ см}$ і культивували їх на середовищах, до яких додавали вищезгадані фітогормони.

Всі пагони, отримані в результаті прямого або непрямого органогенезу з експлантів кінчиків пагонів та листків, а також пагони, отримані з ембріональних калюсів, пересаджували на напіврідке живильне середовище МС для подальшого росту та розвитку. Для ініціювання вкорінення у *C. morifolium* регеновані пагони середньою довжиною 2 см відокремлювали від декількох пагонів, а потім безпосередньо пересаджували в горщики з перлітом і кокосовим торфом в об'ємному співвідношенні $1:1$. Горщики були накріті прозорим покриттям, щоб запобігти зневодненню рослин. Горщики поступово відкривали через $12-14$ днів після укорінення рослин у живильному середовищі. Через $3-4$ тижні саджанці, що вижили, послідовно переносили до теплиці.

У випадку *C. coccineum* коренеутворення було індуковано перенесенням пагонів (середньою довжиною $4-6 \text{ см}$ і з однією або двома придатковими бруньками) на безгормональне середовище МС. З іншого боку, ми змогли отримати рослини через $8-9$ тижнів після культивування колишніх рослин.

3.4. Результати дослідження

У обох досліджуваних видів ініціація пагонових примордіїв спостерігалася протягом $4-8$ тижнів на поверхні або зі зрізаних країв верхівок пагонів (рис. 2 b-c; рис. 3 c-d). Розвиток пагонів відбувався через три тижні після їх ініціації.

Регенерацію адвентивних пагонів з експлантів кінчиків пагонів у досліджуваних сортів *C. morifolium*, а також у *C. coccineum* показано на рис. 2 і 3. Виявлено

відмінності у здатності до регенерації адвентивних пагонів з експлантатів кінчиків пагонів серед досліджуваних сортів. У цьому дослідженні пряму регенерацію пагонів було отримано з експлантатів кінчиків пагонів усіх сортів *C. morifolium* та рослин *C. coccineum* без проміжної калюсної фази. Регенерація шляхом непрямого морфогенезу була досягнута у обох сортів *C. morifolium* та у рослин *C. coccineum*, де кількість регенерованих пагонів на експлантат була вищою, ніж при прямій регенерації пагонів.

У обох досліджуваних видів спостерігали, що в середовищі, вільному від регуляторів росту, розвивається лише 1-2 пагони на експлант. На регенерацію адвентивних пагонів у хризантеми *in vitro* значною мірою впливає взаємодія фітогормонів, генотип рослини та тип експланта [10]. У *C. morifolium* найвища середня кількість пагонів (8,89) та відсоток індукції пагонів (34,33%) шляхом прямого органогенезу спостерігалися у сорту «Наталі» з експлантатів кінчиків пагонів, оброблених 2 мг л^{-1} БАП та $0,05 \text{ мг л}^{-1}$ НОК, за яким слідував сорт «Мішаль» (27% індукції пагонів та 6,01 пагонів на експлант). Результати показують, що сорт «Мішаль» мав меншу середню довжину пагона, ніж сорт «Наталі». Крім того, «Мішаль» показав гіршу індукцію пагонів через непряму і пряму регенерацію порівняно з «Наталі». Різноманітність в утворенні додаткових пагонів у різних сортів хризантеми вже повідомлялося для інших сортів хризантем [18].

Щодо непрямого морфогенезу *C. coccineum*, то максимальна регенерація пагонів (93%), кількість пагонів на експлант (19,66) та найдовші пагони (7,47 см) спостерігалися у рослин, оброблених 2 мг л^{-1} БАП та $0,1 \text{ мг л}^{-1}$ НОК, за якими слідували рослини, оброблені 2 мг л^{-1} БАП та $0,05 \text{ мг л}^{-1}$ НОК з регенерацією пагонів 79,04%, 14,33 пагонів на експлантаті пагонами довжиною 4,30 см.



Рисунок 2. Різні стадії прямого органогенезу з експланта кінчиків пагонів *C.*

rossinense. а: кінчики пагонів через три доби після культивування; б і с:

Бруньки та пагони, регенеровані зі зрізаних кінців верхівок пагонів через 2-3 тижні на середовищі MS, що містить 2 мг^{-1} БАП та $0,05 \text{ мг}^{-1}$ НОК; d:

Розмноження пагонів через 5-6 тижнів на середовищі $MS+2 \text{ мг}^{-1}$ БАП та

$0,05 \text{ мг}^{-1}$ НОК; е: Укорінення пагонів на безгормональному живильному середовищі MS; f: Пагони, акліматизовані в теплиці.



Рисунок 3. Різні стадії прямого органогенезу з експланта кінчиків пагонів

Chrysanthemum morifolium. а: кінчики пагонів через три доби після

культивування; б: кінчики пагонів через 10-12 діб після культивування; с і d:

кінчики пагонів через 10-12 діб після культивування; бруньки та пагони, регенеровані зі зрізаних кінців верхівок пагонів через 3-4 тижні на $MS+3 \text{ мг}^{-1}$

¹ БАП та $0,05 \text{ мг л}^{-1}$ НОК; e, f та g: Розмноження пагонів через 4-6 тижнів на МС+2 мг л^{-1} БАП та $0,05 \text{ мг л}^{-1}$ НОК; h: Укорінення пагонів у живильному середовищі, що містило суміш перліту та кокосового торфу (1:1); i: Пагони акліматизовані в теплиці.

Що стосується прямої регенерації, то окреме застосування БАП на середовищі призвело до відносно слабкої індукції пагонів, тоді як його комбінація з НОК (зокрема, 2 мг л^{-1} БАП і $0,5 \text{ мг л}^{-1}$ НОК, що забезпечило найбільший потенціал для регенерації та подовження пагонів) збільшила кількість пагонів у всіх досліджуваних сортів *C. morifolium*, а також у *C. coelestem*. Отже, додавання екзогенних ауксинів або інших рослинних регуляторів може призвести до зміни та синтезу ферментів [17], що, в свою чергу, призводить до регулювання концентрації ендogenous гормону та утворення пагонів.

Однак спостерігається значна різниця у швидкості регенерації між різними сортами хризантем. Баланс цитокінінів та ауксинів, очевидно, є фундаментальним для ефективного органогенезу пагонів [22], і вищі рівні цитокінінів, ніж ауксинів, є більш ефективними для прямого органогенезу на листових експлантатах хризантеми [23]. Наші результати також узгоджуються з попередніми дослідженнями [23]. Схоже, що вміст ендogenous цитокініну в листках хризантеми недостатній для індукції регенерації пагонів *in vitro*.

У нашому дослідженні присутність БАП у культуральному середовищі була необхідною для регенерації пагонів, хоча збільшення концентрації БАП з 2 до 3 мг л^{-1} призвело до зменшення середньої частоти регенерації пагонів, кількості пагонів та довжини пагонів як у *C. morifolium*, так і у *C. coelestem*. Цей дестимулюючий ефект також був виявлений у інших видів хризантем, і його пов'язують з небажаним впливом БАП на синтез білка [16].

Як у хризантеми, так і у піретруму перського, $0,2 \text{ мг л}^{-1}$ НОК у поєднанні з БАП може індукувати непрямий морфогенез, тоді як вищі концентрації НОК

(0,05-0,1 мг⁻¹) призводили до прямого морфогенезу. Ці результати узгоджуються з попередніми дослідженнями [21], в яких повідомлялося, що для регенерації пагонів у хризантеми підходить нижча концентрація ауксину. Утворення пагонів вимагає відновлення поділу клітин шляхом додавання відповідної концентрації регуляторів росту рослин до живильного середовища [2]. Це може свідчити про те, що рівень ендогенних гормонів або чутливість до них може бути різною в різних органах рослини [23].

Хоча було успішно розроблено кілька різних методів регенерації пагонів хризантем *in vitro*, вони в основному залежали від непрямих шляхів морфогенезу. Про пряму регенерацію пагонів у *C. coccineum* досі не повідомлялося. Найкращим середовищем для індукції прямого морфогенезу як у *C. morifolium*, так і у *C. coccineum* було середовище МС, збагачене 0,05 мг/л⁻¹ НОК та 2 мг/л⁻¹ БАП (рис. 3 і 5).

3.4.1. Індукція та проліферація ембріонального калюсу

Як у *C. morifolium*, так і у *C. coccineum* на індукцію калюсу суттєво впливав сорт і регулятор росту рослин. «Наталі» та *C. coccineum* показали найперші ознаки калюсоутворення через 10-15 днів після культивування колишніх рослин, тоді як «Місаль» почав ініціювати калюсоутворення з поверхні зрізу листка на 20-25 днів пізніше. Через 28-31 день на деяких калюсах несподівано утворилися корені, а в кількох випадках пагони з калюсів утворилися приблизно через 40-43 дні.

Калюси спостерігали на листкових експлантатах обох видів лише тоді, коли до середовища МС додавали 2,4-Д окремо або в комбінації з БАП. Таким чином, додавання 2,4-Д до середовища було необхідним для індукції калюсу.

Порівняно з *C. morifolium*, *C. coccineum* показав вищу здатність індукувати калюс, і в цей термін як БАП, так і 2,4-Д були ефективними для індукції калюсу. Відсоток утворених калюсів на листкових експлантах значно збільшувався зі

збільшенням концентрації 2,4-Д (від 1 до 2 мг л⁻¹). В обох видів найвища частота калусоутворення була отримана на середовищі МС, що містило 2 мг л⁻¹ 2,4-Д та 2 мг л⁻¹ БАП. Відповідно до наших результатів, середовище МС, доповнене 2,0 мг л⁻¹ 2,4-Д, було оптимальним для індукції калусу у хризантеми.

Серед сортів хризантеми «Наталі» та «Мішаль» найвищий рівень індукції калусу (96,95%) спостерігали на середовищі МС, доповненому 2 мг л⁻¹ БАП та 2 мг л⁻¹ 2,4-Д, доданих сортом «Мішаль» (83,66%), тоді як найвищий рівень індукції калусу впродовж експерименту було отримано для *C. cossetium* (98,16%). Ми виявили, що додавання 1-2 мг л⁻¹ БАП до середовища для індукції калусу було ефективнішим, ніж середовище без БАП, але подальше збільшення концентрації 2,4-Д призводило до зниження індукції калусу та утворення побурілих калусів. Цей ефект також спостерігався і для інших сортів хризантеми, де БАП індукував індукцію калусу [17].

Морфологія отриманих калусів варіювала залежно від сорту, а також від природи та концентрації регуляторів росту, які використовували в середовищі. У цьому дослідженні спостерігали два типи калусів: тип А – пухкі, білі, білувато-зелені, зелені та зеленуваті калуси, які легко ламалися на дрібні частини (рис. 4а і 5b); тип В - компактні жовті калуси з гладенькою поверхнею і сферичною структурою (рис. 4b і 5c). У середовищі, що містило різні концентрації 2,4-Д (1-3 мг л⁻¹) без БАП, переважно утворювалися калуси типу А, які не вступали у фазу ембріогенезу (рис. 4а і 5b), тоді як за різних концентрацій 2,4-Д + БАП (зокрема, 2 мг л⁻¹ 2,4-Д у присутності 2 мг л⁻¹ БАП) часто розвивалися калуси типу В, що є типовим для ембріональних калусів (рис. 4b і 5c, близько 55-60%). У хризантеми «Мішаль» часто спостерігалося побуріння калусів, а коли за високих концентрацій 2,4-Д (3 мг л⁻¹) утворювалися пухкі та коричневі калуси, вони ставали темно-коричневими після 2 субкультивувань і врешті-решт гинули. Загалом, наші результати показали, що присутність 1-2 мг л⁻¹ 2,4-Д у культуральному середовищі є критично важливою для утворення ембріональних калусів. Певний діапазон концентрацій 2,4-Д (0,1-2,0 мг л⁻¹) необхідний для

утворення ембріональних калюсів з листкових і вузлових експлантів у *Cardiospermum halicacabum*. Щодо впливу БАП то нижчі концентрації, як правило, індукували утворення зелених, зернистих і компактних калюсів, тоді як вищі концентрації призводили до утворення значно більшої кількості м'яких, водянистих і крихких калюсів. Через більшу чутливість тканини до ауксину, ніж до цитокиніну, цитокиліни можуть призводити до індукції дедиференціації клітин, а для переходу від соматичного стану клітин до ембріонального необхідна диференціація.

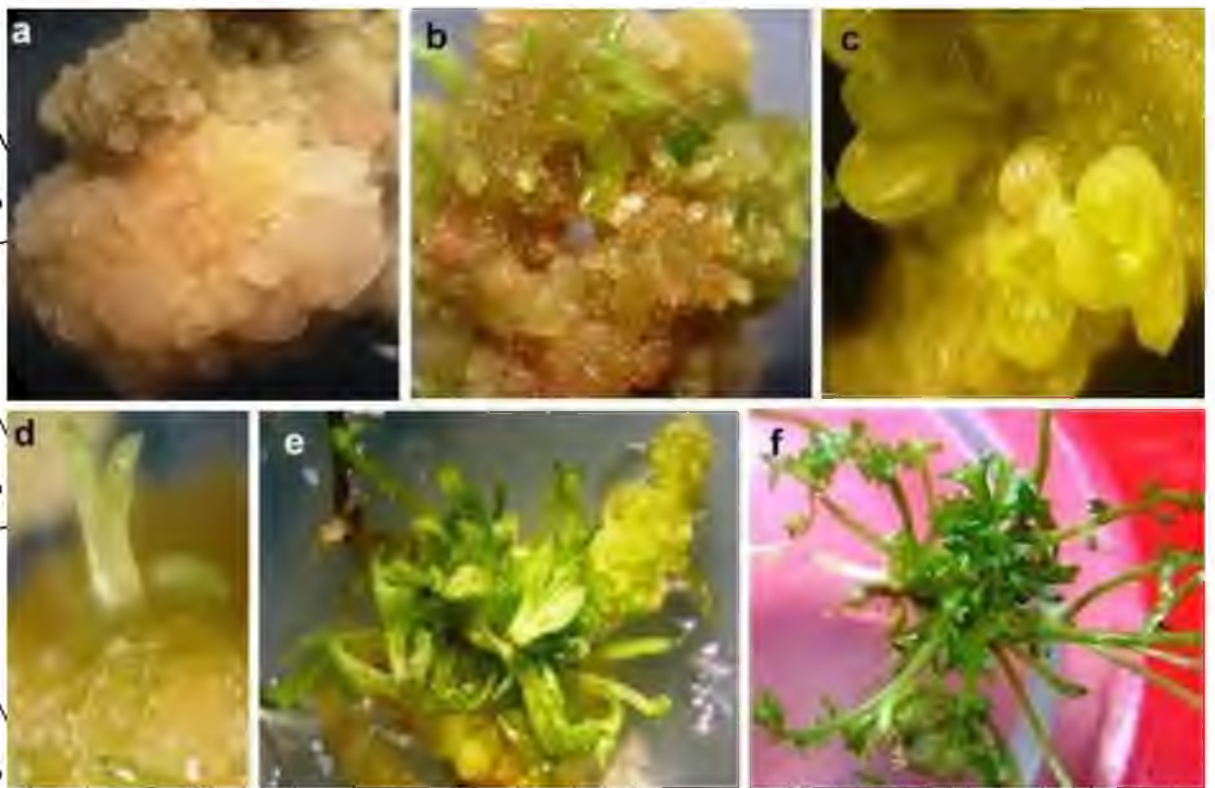


Рисунок 4. Різні стадії індукції калюсу, соматичні зародки та регенерація рослин з листкових експлантів *C. coccineum*. а: білі та пухкі ділянки калюсу; б: компактні яскраво-жовті ембріональні ділянки калюсу з зародками на стадії глобули через чотири тижні культивування (2 mg l^{-1} 2,4-D та 2 mg l^{-1} БАП); с: серцеподібна стадія; d: торпедоподібна стадія; е та f: сім'ядольна стадія вздовж пагонів-примордіїв та розмноження пагонів через 6-8 тижнів культивування (2 mg l^{-1} БАП

та $0,05 \text{ mg l}^{-1}$ НОВС)

Швидкість росту та проліферації калюсів сильно залежала від типу сорту, фітогормонів та їх рівнів, використаних у середовищі. Максимальну масу калюсу було отримано на середовищі MS з 2 mg l^{-1} 2,4-Д та 2 mg l^{-1} БАП, де сорт «Наталі» утворив найбільшу масу калюсу (0,62 г/рослину), а сорт «Мішаль» мав найменшу масу калюсу (0,44 г/рослину). Присутність БАП у суспензійних культурах була бажаною для росту калюсу хризантеми. Крім того, 2,4-Д є ефективним синтетичним ауксином, який може індукувати і підтримувати високорегенеративний ріст калюсу [15]. Ці результати показали, що швидкість росту калюсу залежить від генотипів та регуляторів росту рослин, що застосовуються. Ауксини використовуються в культуральне середовище для індукції утворення калюсу і росту клітин, тоді як цитокініни використовуються в мікроклональному розмноженні для індукції поділу і організації клітин [10]. Це означає, що і 2,4-Д, і БАП необхідні для утворення калюсу та морфогенезу.

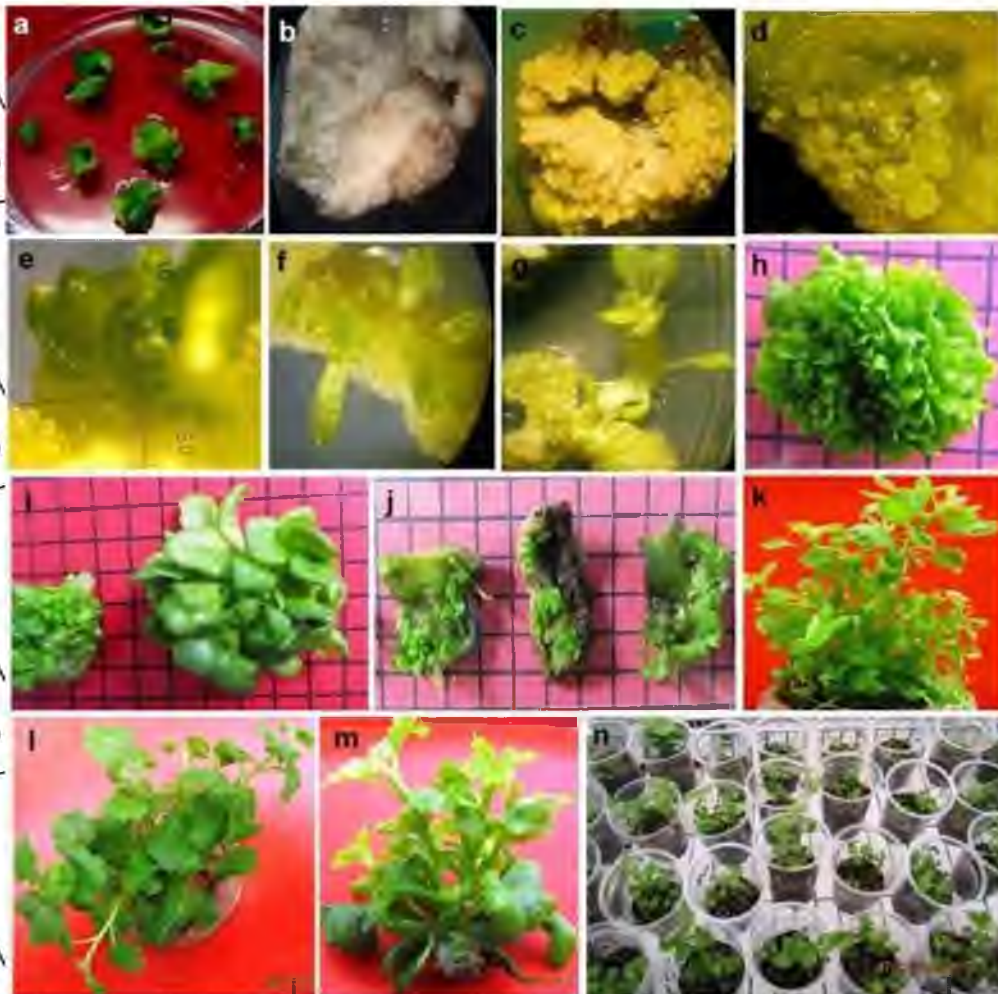


Рисунок 5. Різні стадії індукції калюсу, соматичні зародки та регенерація рослин з листкових експлантів *C. morifolium*. а: листкові експланти через 10-12 діб після культивування; б: білі та пухкі ділянки калюсу; с: компактні яскраво-жовті ембріогенні ділянки калюсу; д: зародки на глобулярній стадії через чотири тижні культивування (2 мг л^{-1} 2,4-Д та 2 мг л^{-1} БАП); е: серцеподібна стадія; ф: торпедоподібна стадія; г: сім'ядольна стадія; h, і та j: пагони-примордії та пагони, що розрослися, через 6-8 тижнів культивування за умов «Наталі» та «Мішаль», відповідно (2 мг л^{-1} БАП та $0,05 \text{ мг л}^{-1}$ НОК). к, l та m: перенесення на середовище 1/2 МС для подальшого росту та розвитку (к: «Наталі» та l і m: «Мішаль»); n: Акліматизовані рослини для підготовки до перенесення в теплицю.

3.4.2. Індукція соматичних ембріонів

Процес соматичного ембріогенезу є сприятливим способом регенерації рослин зі стабільною регенераційною здатністю, а також необхідною умовою для високоефективного мікророзмноження та генетичного поліпшення хризантем. Соматичний ембріогенез може бути ініційований у *C. morifolium* безпосередньо з епідермальних клітин експлантних тканин [9] або опосередковано за допомогою калюсних клітин [20]. У нашому дослідженні соматичний ембріогенез індукували з утворених калюсів на сегментах листків у обох досліджуваних видів. Різні стадії розвитку соматичних зародків були виявлені на поверхні експлантів через 30-35 днів від початку культивування. Залежно від різних концентрацій БАП та 2,4-Д на поверхні калюсу одночасно спостерігали глобулярну (рис. 4б та 5д), серцеподібну (рис. 4с та 5е), торпедоподібну (рис. 4е, 5е) та сім'ядольну (рис. 4е та 5г) стадії розвитку соматичних зародків. Соматичні зародки розвивалися за додавання БАП у присутності 2,4-Д, тоді як на середовищі, що містило 2,4-Д без цитокініну, соматичний ембріогенез не відбувався. Крім того, співвідношення 2,4-Д/БАП

суттєво впливало на відсоток і кількість соматичних ембріонів. У цьому дослідженні найвища реакція ембріогенезу з максимальною кількістю соматичних ембріонів на один експлант спостерігалася при застосуванні $2,0 \text{ мг л}^{-1}$ БАП і $2,0 \text{ мг л}^{-1}$ 2,4-Д для обох досліджуваних видів. Нижчі або вищі співвідношення БАП/2,4-Д помітно знижували частоту ембріогенезу та кількість соматичних ембріонів на експлантат. Аналогічно, комбінація 2 мг л^{-1} 2,4-Д і 2 мг л^{-1} кінетину виявилася оптимальною для індукції соматичних ембріонів у хризантеми [20]. Згідно з отриманими результатами, найкращу реакцію ембріогенезу виявив сорт «Наталі» з максимальним значенням 44,33% ембріогенезу та 12 соматичних ембріонів на експлант, тоді як у «Мішаль» та *C. coccineum* було отримано лише 23,67% та 29,00% ембріогенезу та 8,76 і 7,87 соматичних ембріонів на експлант, відповідно.

3.4.3. Регенерація ембріонального калюсу

Регенерацію ембріонів спостерігали в середовищі індукції пагонів протягом 15-20 днів після розвитку ембріонів. Більшість ембріонів перетворилися на видимі пагони на поверхні калюсу (рис. 4f та рис. 5h-i). Колір калюсу змінився на темно-зелений і, ехоже, що на цій стадії ембріони мали більшу здатність ініціювати зачатки листків і подальшу поживу пагона (рис. 4 і 5), особливо в середовищі, що містило 2 мг л^{-1} БАП + $0,05 \text{ мг л}^{-1}$ НОК.

БАП відіграє ключову роль у регенерації пагонів з калюсу в умовах *in vitro* [23]. У нашому експерименті індивідуальне застосування БАП (2 мг л^{-1}) могло призвести до індукції адвентивного пагона у всіх сортів. Результати показали, що 2 мг л^{-1} БАП з $0,05 \text{ мг л}^{-1}$ НОК є оптимальною комбінацією для досягнення найвищої частоти регенерації у сортів «Наталі» (49,99%) та «Мішаль» (73,57%).

У *C. coccineum* близько 77,11% калюсів успішно дали пагони на середовищі MS з 2 мг л^{-1} БАП і $0,05 \text{ мг л}^{-1}$ НОК, а 47% - на середовищі з 1 мг л^{-1} БАП і $0,1 \text{ мг л}^{-1}$ НОК. Середнє число пагонів на калюс становило 19 за використання 2 мг л^{-1} БАП

та $0,05 \text{ мг л}^{-1}$ НОК. Загалом, вищі концентрації НОК ($0,1 \text{ мг л}^{-1}$) запобігали утворенню пагонів і сприяли калусоутворенню. Ауксини та цитокініни є важливими факторами в ембріональних реакціях завдяки всебічному та ефективному втручанню в регуляцію клітинного циклу та поділ клітин [7]. У зв'язку з цим, швидкість розмноження пагонів є генотип-залежним явищем у *C.*

morifolium. Для цілей генетичної модифікації зазвичай потрібні певні сорти рослин з високою здатністю до регенерації. Тому індукція ембріональних калусів і регенерація пагонів є значною мірою генотипово залежними процесами [3]. Зрештою, здатність регенерувати пагони з калусів і соматичних ембріонів

має важливе значення для успіху більшості біотехнологічних методів, таких як мутагенез *in vitro* і перенесення генів [20].

3.4.4. Акліматизація та укорінення

Оскільки більшість мікропагонів, що утворилися з калусів, були дуже маленькими і крихітними (1 або 2 см) і не підходили для вкорінення (рис. 5.14і), їх виділяли і переносили в живильне середовище (напіврідкий МС), вільне від будь-яких регуляторів росту рослин, для подальшого росту і розвитку. Стадію

вкорінення окремих пагонів проводили без використання зовнішніх регуляторів росту в середовищі *in vivo* (суміш перліту та кокочату) або в умовах культури *in vitro*. Через 2 тижні у всіх пагонів спостерігалось ясне укорінення. Що

стосується виду *C. morifolium*, то з 778 мікропагонів, отриманих шляхом прямого і непрямого морфогенезу, а також соматичного ембріогенезу, 734,55 саджанців успішно вкоренилися. У нашому дослідженні понад 94,33% регенерованих рослин/сортів *C. Morifolium* вижили і досягли стадії зрілості. У випадку *C. coccineum* через 3 тижні укорінення спостерігалось у більшості саджанців. В умовах *in vitro* укорінилося близько 165,75 саджанців із загальної кількості 221

саджанця. Загалом, після місячного періоду акліматизації рівень приживлюваності становив 75%

ВИСНОВОК

У цьому дослідженні ми представили способи досягнення як прямого пагоноутворення за допомогою експлантатів кінчиків пагонів, так і соматичного ембріогенезу та проліферації за допомогою листкових експлантатів *C. morifolium* та *C. coccineum*.

Отримані результати:

1. Підібрані способи стерилізації експлантів кінчиків пагонів та листя хризантем. Встановлено, що оптимальним способом стерилізації експлантів міжвузлів є всі три варіанти: 0,1% розчини сулеми, азотнокислого срібла та діациду у поєднанні з обробкою 70% етанолом.

2. Регенерація шляхом непрямого морфогенезу була досягнута у обох сортів *C. morifolium* та у рослин *C. coccineum*, де кількість регенерованих пагонів на експлантат була вищою, ніж при прямій регенерації пагонів.

Максимальна регенерація пагонів (93%), кількість пагонів на експлант (19,66) та найдовші пагони (7,47 см) спостерігалися у рослин, оброблених 2 мг л⁻¹ БАП та 0,1 мг л⁻¹ НОК.

3. З'ясовано, що додавання екзогенних ауксинів або інших рослинних регуляторів може призвести до зміни та синтезу ферментів, що, в свою чергу, призводить до регулювання концентрації ендогенного гормону та утворення пагонів.

4. Наші результати показали, що присутність 1-2 мг⁻¹ 2,4-Д у культуральному середовищі є критично важливою для утворення ембріональних калусів.

5. Було доведено, що швидкість росту калусу залежить від генотипів та регуляторів росту рослин, що застосовуються.

6. У нашому дослідженні понад 94,33% регенерованих рослин сортів *C. Morifolium* вижили і досягли стадії зрілості. У випадку *C. coccineum* через 3 тижні укорінення спостерігалося у більшості саджанців. В умовах *in vitro*

укорінилося близько 165,75 саджанців із загальної кількості 221 саджанця. Загалом, після місячного періоду акліматизації рівень приживлюваності становив 75%.

На нашу думку, дослідження з хризантемами в Україні будуть проводитися й надалі, що в майбутньому може створити потужну сортову базу, яка замістить імпорт даної рослини, що може позитивно вплинути на економічну складову ринку декоративних рослин нашої держави.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Andrews C. Low-temperature stress in field and forage crop production / Can. journal of plant science. – 1987. – 67, №4. – P. 1121 – 1131.
2. Benson, E.E. 2000. In vitro plant recalcitrance: An introduction. In vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 36: 141-148.
3. Chalinee T., Kamnoon K. Regeneration of Chrysanthemum plants (Chrysanthemum× Grandiflorum (ramat.) kitam.) by callus derived from ray floret explants. Propagation of Ornamental Plants Vol. 11, № 4, 2011: 204-209.
4. Delogu C., Yatti A., Ferri Z., Firelli J. Il ristagno dell'acqua e la produttività nell'orzo // L' informatore agrario. – 1988. – 33. – P. 31 – 33.
5. Jin L., Yang Y., Gao W., Gong M., Wang J., Anderson N.O., He M. Establishment of callus induction and cell suspension cultures of Dendratherma Indicum var. Aromaticum a scented Chrysanthemum. Journal of plant studies. Vol. 6, № 2, 2017.
6. Keresa S., Mihovilovic A., Baric M., Zidovec V., Skelin M. The micropropagation of Chrysanthemum via axillary shoot proliferation and highly efficient plant regeneration by somatic embryogenesis. African Journal of Biotechnology Vol. 11(22), pp. 6027-6033, 15 March, 2012
7. Labade G.B., Dale N.S., Umbarkar R.B., Gadhe S.K., Rote V.N. In vitro regeneration of Chrysanthemum (Chrysanthemum morifolium L.) International Journal of Information Research and Review, Vol. 03, Issue 11, pp. 3043-3045, November 2016
8. Lim, K.B., Kwon, S.J., Lee, S.I. and Hwang, Y.J. 2012. Influence of genotype, explant source, and gelling agent on in vitro shoot regeneration of chrysanthemum. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 53: 329-335.
9. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Plant Physiol. – 1962. – V. 15. - № 95. – P. 473-497.

10. Nahid, J.S., Shyamali, S. and Kazumi, H. 2007. High frequency shoot regeneration from petal explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *in vitro*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10. 3356-3361.

11. Nalin R., Anjana J.M., Arathy C.S., Aswathy M., Ayana B., Bhuvanewari R. Effect of growth regulators on micropropagation of *Chrysanthemum* L. SIRJ-APBBP Volume 3 Issue 4 (August 2016).

12. Nasri F., Zakizadeh H., Vafae Y., Mozafari A.A. *In vitro* propagation of *Chrysanthemum*: an Overview on its Utility in Mutagenesis and Genetic Transformation Techniques. Agricultural Research & Technology Open Access Journal, April 25, 2018.

13. O. M. Oseni, V. Pande, T. K. Nailwal. A Review on Plant Tissue Culture, A Technique for Propagation and Conservation of Endangered Plant Species. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. ISSN: 2319-7706, Volume 7, Number 07 (2018).

14. Reid W.J. Biotechnology an breeding team up in agriculture / Biotechnology 1987. - 5, № 9. - P. 899 - 906.

15. Shinoyama, H., Nomura, Y., Tsuchiya, T. and Kazuma, T. 2004. A simple and efficient method for somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflora* (Ramat.) Kitamura). Plant Biotechnology, 21: 25-30

16. Teixeira da Silva, J.A. 2004. Ornamental chrysanthemums: Improvement by biotechnology. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 79: 1-18

17. Teixeira da Silva, J.A. 2014. Organogenesis from chrysanthemum (*Dendranthema x grandiflora* (Ramat.)) 'Kitamura' petals (disc and ray florets) induced by plant growth regulators. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 22 (1): 145-151.

18. Teixeira da Silva, J.A., Shinoyama, H., Aida, R., Matsushita, Y., Raj, S.K. and Chen, F. 2013. Chrysanthemum biotechnology: Quo vadis? Critical Reviews in Plant Sciences, 32 (1): 21- 52.

19. Yesmin S., Hashem A., Das K.S., Hasan M.M., Islam M.S. Efficient *in vitro* regeneration of Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* R.) through nodal explants culture. Nuclear science and applications. Vol. 23, № 1&2. 2014.

20. Y. Sidhu. *In vitro* micropropagation of medicinal plants by tissue culture. The Plymouth Student Scientist, 2010, 4, (1): 432-449.

21. Waseem K., Jilani M. S., Khan M.S., Kiran M., Khan G. Efficient *in vitro* regeneration of Chrysanthemum (*Chrysanthemum moriflorum* L.) plantlets from nodal segments. African Journal of Biotechnology Vol. 10(8), pp. 1477-1484, 21 February, 2011.

22. Waseem K., Jilani M. S., Khan M.S. Rapid plant regeneration of Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* L.) through shoot tip culture. African Journal of Biotechnology Vol. 8(9), pp. 1871-1877, 4 May, 2009.

23. Waseem, K., Jilani, M.S. and Khan, M.S. 2009. Rapid plant regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* L.) through shoot tip culture. African Journal of Biotechnology, 8. 1871-1877.

24. Адрианов В.Н., Хризантемы. -М.: Агрпромиздат, 1990. – 110с.

25. Биотехнология растений: культура клеток // Под ред. Р.Г. Бутенко // Пер. с англ. Негрука В.И. – М. – 1989. – 274 с.

26. Валиханова Г.Ж. Биотехнология растений: учебное пособие / Г.Ж.Валиханова – Павлодар: Кереку, 2009. – 272 с.

27. Висящева Л.В., Соколова Т.А. Хризантема // Промышленное цветоводство. – М.: Агрпромиздат, 1991. – С.136-156.

28. Глеба Ю.Ю., Бутенко Р.Г., Сытник К.М. Слияние протопластов и парасексуальная гибридизация у *Nicotiana tabacum* L. // ДАН СССР. 1975. – 221, № 6. – С.1196 – 1198.

29. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. – К.: Наук. думка, 1984. – 160 с.

30. Грандо Р. Микроклональное размножение хризантем. Известие ТСХА, 2009, 1:146-148

31. Дворянинова К.Ф. Хризантемы (інтродукція, біологія і агротехніка). – Кишинів «Штінца», 1982. – 167.

32. Звірзгднія В.Я. Хризантемы в Латиській ССР (інтродукція і агротехніка). – Рига «Зинатне», 1973. – 188 с.

33. Кабанцева И. Н. Хризантемы. — М.: АСТ:Артель, 2005. — 191 с.

34. Каргель Н.А., Кильчевский А.В. Биотехнология в растениеводстве – Минск: Тэхналогія, 2005. – 309 с.

35. Кушнір Т.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. – К.: Наук. думка, 2005. – 450 с.

36. Лутова Л.А., Проворов Н.А., Тиходеев О.Н. и др. Генетика развития растений. – СПб: Наука, 2000. – 359 с.

37. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин. – К.: Поліграфконсалтинг, 2003. – 520 с.

38. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Левенко Б.О. Основы біотехнології рослин. – К., 2000. – 248 с.

39. Назаренко Л.В., Долгих Ю.И., Загоскина Н.В., Ралдугина Т.Н. Биотехнология растений: учебник и практикум для бакалавриата и магистратуры / 2-е изд., испр. и доп. – М.: Издательство Юрайт, 2018. – 167 с.

40. Пирог Т.П., О.А. Ігнатова Загальна біотехнологія. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.

41. Пирузян З.С. Основы генетической инженерии растений. – М.: Наука, 1988. – 350 с.

42. Шамина З.Б. Мутагенез и селекция на уровне соматических клеток растений. Биотехнология. – М.: Мир, 1984. – С. 260–266.

43. Шмыгун В.Н. Хризантемы. – «Наука», 1972. – 116 с.

НУБІП України