

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
ННІ лісового і садово-паркового господарства

УДК 712.253: 635.9

ПОГОДЖЕНО ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Директор ННІ лісового і садово-паркового господарства

Завідувач кафедри ботаніки, дендрології та лісової селекції

Лакида П.І. Марчук Ю.М.
2021 р. 2021 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: «МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ТА АДАПТАЦІЯ
ПРЕДСТАВНИКІВ *DROSERА* L. ДО УМОВ ЗАКРИТОГО ҐРУНТУ»

Спеціальність – 206 «Садово-паркове господарство»

Освітня програма – «Садово-паркове господарство»

Орієнтація освітньої програми – освітньо-професійна

Гарант освітньої програми

док. с.-г. наук., професор

(науковий ступінь та вчене звання)

Ковалевський С.Б.

(ПІБ)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

канд. біол. наук., доцент

(науковий ступінь та вчене звання)

Білоус С.Ю.

(ПІБ)

Виконала

Гулько О.О.

(підпис)

(ПІБ)

Київ – 2021

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
ІНШ лісового і садово-паркового господарства**

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
ботаніки, дендрології та лісової селекції
канд. с.-г. наук, доц. Марчук Ю.М.
« » 2021 р.

ЗАВДАННЯ
ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ
СТУДЕНТУ
ГУНЬКО ОЛЕНІ ОЛЕКСАНДРІВНІ

Спеціальність – 206 «Садово-паркове господарство»

Освітня програма – «Садово-паркове господарство»

Орієнтація освітньої програми – освітньо-професійна

Тема магістерської роботи: «Мікроклональне розмноження та адаптація представників *Drosera* L. до умов закритого ґрунту» затверджена наказом ректора НУБІП України від «19» 11 2020 р.» № 1826 «С».

Термін подання завершеної роботи на кафедру: 13.11.2021 року.

Вихідні дані до випускної магістерської роботи: літературні джерела, електронні ресурси, нормативно-довідкові матеріали.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Ботанічна та морфологічна характеристика об'єктів дослідження.
2. Аналітичний огляд літератури з проблем мікроклонального розмноження представників *Drosera* L. й адаптації рослин до умов закритого ґрунту.
3. Узагальнення методичних підходів, використаних у роботі.
4. Введення в культуру *in vitro*, первинний морфогенез, безпосередньо мікроклональне розмноження *in vitro* *Drosera* L., адаптація, клонально розмножених рослин-регенерантів, до умов закритого ґрунту.
5. Індукція ризогенезу рослин-регенерантів.
6. Підбір умов для адаптації пробіркових рослин

Дата видачі завдання «08» вересня 2020 р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи _____ Білоус С.Ю.

Завдання прийнята до виконання _____ Гулько О.О.

РЕФЕРАТ

Збереження біорізноманіття є основною задачею в умовах швидких змін навколишнього середовища. Особливо гостро стоїть проблема збереження надзвичайно вразливих стенотопних видів флори. Саме види роду *Drosera* є індикаторами змін клімату, коливання рівня ґрунтових вод тощо. Усі представники роду *Drosera* є зникаючими видами крім видів роду *Drosera rotundifolia*, але за даними вчених [1, 2] їх занесено до нового видання Червоної книги України в категорії «вразливий».

На території України є три види росичок: круглолиста (*Drosera rotundifolia* L.), англійська (*Drosera anglica* Huds.) та росичка середня (*Drosera intermedia* Hayne).

D. rotundifolia поширена в арктичній та помірній зоні Євразії та Північної Америки. В Україні *D. rotundifolia* ще досить недавно відносно часто траплялась в піщій зоні на півночі лісостепової, зрідка на півдні лісостепу і в Карпатах та дуже рідко на півночі Лівобережного степу [2, 36, 55, 77]. За останніми спостереженнями, на сьогодні велика кількість місцезнаходжень *D. rotundifolia* втрачено, в результаті антропогенного впливу й через осушення боліт [2, 78].

Оптимальним напрямом для розробки стратегій збереження зникаючих видів є інтегрований науковий підхід, що поєднує застосування біотехнологічних прийомів для культури *in vitro*, раціональне управління рослинами-регенерантами колекції з метою ефективного відновлення зникаючих популяцій і видів, використання молекулярно-генетичних прийомів для документування та підтримки колекції, оцінки параметрів генетичного різноманіття природних й штучно створених популяцій, поповнення колекцій та їх обмін.

Використання методу культури *in vitro* є сучасним рішенням, що надає можливість:

- відновлення та розмноження цінних, рідкісних та зникаючих видів квіткових рослин, що важко розмножуються *in situ* і *ex situ*;

- створення колекції генетично-однорідних рослин в культурі *in vitro*;

- одержання оздоровленого, садивного матеріалу;

- масове виробництво цінних генотипів рослин з колекцій ботанічних садів.

Новизною даного напрямку, є створення банку ДНК зразків рослинної сировини, що є незамінним ресурсом для характеристики збереження та

сталого використання біорізноманіття рослинного з підвищеним адаптивним

потенціалом до зовнішніх факторів середовища, кількісної оцінки параметрів

генетичної різноманітності природних і штучно створюваних *ex situ*

популяцій, а також колекцій окремих таксонів.

Метою роботи є визначення особливостей прямої регенерації рослин

Drosera spatulate L. та *Drosera aliciae* L. на різних етапах мікроклонального розмноження й адаптація садивного матеріалу до умов закритого ґрунту.

Для досягнення мети було встановлено наступні завдання:

- здійснити відбір рослинного матеріалу *Drosera spatulate* L. та *Drosera*

aliciae L. для введення в культуру *in vitro*;

- визначити найбільш оптимальні типи експлантатів та умови стерилізації для отримання асептичної культури;

- встановити оптимальні час експозиції та концентрації стерилізуючих речовин для отримання життєздатної асептичної культури;

- підібрати основні складові живильних середовищ для мікроклонального розмноження рослин *in vitro*;

- встановити особливості укорінення рослин-регенерантів *in vitro*;

- підібрати умови для адаптації рослин до умов *ex vitro*.

Методика дослідження. Для виконання досліджень усі роботи з

культурою тканин та органів *in vitro* здійснювали за загальноприйнятими в

біотехнології методами. Географічне поширення видів роду *Drosera* на

території України виконані на основі аналізу літератури (гербарних даних

Национального ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України, Інституту ботаніки ім. М. П. Холодного.

У роботі проведено дослідження особливостей отримання садивного матеріалу рідкісних представників *Drosera spatulate* L. та *Drosera aliciae* L. з використанням мікроклонального розмноження з метою їх збереження й культивування в умовах *ex vitro*. Досліджено особливості органогенезу та регенерації цілого організму з культивованих тканин та органів представників *Drosera* L. Визначено оптимальні умови прямого морфогенезу тканин *Drosera spatulate* L. та *Drosera aliciae* L., що дало змогу масового отримання оздоровленого, генетично однорідного садивного матеріалу. Показано дію екзогенних регуляторів росту на різних етапах морфогенезу рослин в умовах *in vitro*. Удосконалено умови ризогенезу *in vitro* та здійснено адаптацію клонованих рослин до умов закритого ґрунту.

За результатами проведених досліджень розроблена методика мікроклонального розмноження, шляхом живцювання стеблової культури, яка дала можливість отримати генетично-стабільні, вільні від хвороб рослини-регенеранти *D. spatulate* та *D. aliciae* з оптимально сформованою кореневою системою та вегетативною масою. Отриманий однорідний садивний матеріал можна використовувати у квітництві, створенні флораріумів, для фармакологічних цілей та з метою інтродукції.

Загальна характеристика роботи: Результати наукової роботи за цією темою були представлені у другому турі Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт з природничих, технічних і гуманітарних наук у 2021 році. За темою наукової роботи опубліковано 3 тези доповідей на наукових конференціях всеукраїнського та міжнародного рівня та одна стаття у фаховому науковому журналі (категорії А).

Наукова робота виконана у співпраці з кафедрою екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України.

Ключові слова: *Drosera spatulate* L. та *Drosera aliciae* L., асептична культура, *in vitro*, мікроклональне розмноження, морфогенез, ризогенез.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	7
ВСТУП	8
1 РОЗДІЛ СУЧАСНИЙ СТАН ДОСЛІДЖЕНЬ КОМАХОЇДНИХ РОСЛИН РОДИНИ <i>DROSERA</i> L.	10
1.1 Основні морфологічні та фізіологічні характеристики <i>Drosera</i> L.	10
1.2. Способи розмноження <i>Drosera</i> L.	22
1.3. Використання в народному господарстві та озелененні	23
1.4. Сучасні підходи в розмноженні <i>in vitro</i> рослин родини <i>Drosera</i> L.	26
2 РОЗДІЛ МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ	33
2.1. Характеристика дослідних об'єктів й відбір експлантів	33
2.2. Отримання асептичної культури <i>Drosera</i> L.	34
2.3. Приготування живильного середовища для введення експлантів в культуру <i>in vitro</i> й первинного морфогенезу	37
2.4. Регулятори росту рослин для інтенсивності пагоноутворення та ризогенезу мікропагонів <i>Drosera</i> L.	40
2.5. Вимоги та методологічні підходи до адаптації рослин <i>in vitro</i> до умов <i>ex vitro</i>	45
3 РОЗДІЛ ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ <i>DROSERA</i> L. В КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i> ТА АДАПТАЦІЇ САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ <i>EX VITRO</i>	49
3.1. Особливості стерилізації експлантів й отримання асептичної культури тканин та органів <i>Drosera</i> L.	49
3.2. Індукція органогенезу з культури меристем <i>Drosera</i> L.	54
3.3. Вплив компонентів живильного середовища на укорінення рослин-регенерантів <i>Drosera</i> L. <i>in vitro</i>	59
3.4. Адаптація рослин-регенерантів <i>Drosera</i> L. до умов <i>ex vitro</i>	62
ВИСНОВКИ	68
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	70

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ СКОРОЧЕНЬ
І ТЕРМІНІВ

НУБІП України

МКР – мікроклональне розмноження

ЖС – живильне середовище

НУБІП України

МС – живильне середовище Мурасіге і Скуга

in vitro – спеціально створені асептичні умови

ex vitro – умови закритого ґрунту

РР – рослина-регенерант

НУБІП України

РРР – регулятори росту рослин

БАП – 6-бензиламінопурин

НОК – α -Нафтилоцтова кислота

ІОК – Індоліл-3-оцтова кислота

НУБІП України

ГК – Гіоберелова кислота

ТДЗ – Тідазурон

2,4 Д – 2,4 - дихлорфеноксі-оцтова кислота

2ip – 2-Ізопентеніладеніну

НУБІП України

кінетин – 6-Фурфуриламинопурин

NaHCIO – Гіпохлорид натрію

НУБІП України

НУБІП України

ВСТУП

В Україні в наш час через проведені ще у минулому столітті меліоративні роботи по осушенню, заболочені землі та болота зазнали значного зменшення. Крім того, зміни клімату також провокують висихання

боліт, від чого потерпають болотні рослини. На території водно-болотних комплексів суттєво зменшилась площа локалітетів червонокнижних видів рослин. Одним із таких видів є росичка – рослина хижак. Це багаторічна рослина з безлистим квітковим стеблом заввишки 10-20 см. Листя росички

вкрите віями. Якщо комаха сідає на листок, вії захоплюють її і листок загинається. Через декілька днів він розігнеться, вії випрямляться, а неперетравлені залишки комахи здує вітер. Так вони компенсують нестача фосфору, калію та інших речовин.

На території України є три види росичок: круглолиста (*Drosera rotundifolia* L.), англійська (*Drosera anglica* Huds.) та росичка середня (*Drosera intermedia* Hayne).

Для збереження цієї рослини у флорі України пропонується культивування в штучних умовах, зокрема, мікроклональне розмноження рослин *in vitro*, тобто в пробірці. За такого методу використовується стерильний посуд, живильне середовище, частинки вихідної рослини. А вирощування відбувається в лабораторних умовах за сталої температури, освітлення і вологості та умов повної стерильності.

Підсумовуючи все вищесказане, можна виокремити декілька головних причин, за яких технологія мікроклонального розмноження може бути корисною для вітчизняних аграріїв.

Метою роботи визначення особливостей прямої регенерації рослин *Drosera spatulate* L. та *Drosera aliciae* L. на різних етапах в культуру *in vitro* залежно від типу експланта, умов культивування й складу живильного середовища.

Об'єкт дослідження – рослина роду *Drosera spatulate* L. та *Drosera aliciae* L. в умовах *in vitro*.

Предмет дослідження – особливості морфогенезу рослин *Drosera spatulate* L. та *Drosera aliciae* L. в умовах *in vitro*.
Ключові слова: *Drosera spatulate* L. та *Drosera aliciae* L., асептична культура, *in vitro*, мікроклональне розмноження, морфогенез, ризогенез.

Структура та обсяг магістерської роботи

Робота складається зі вступу, 3 розділів, окрім текстової частини наведені 26 рисунків, 12 таблиць. Список використаних джерел складається з 71 джерела.

Загальний обсяг роботи складає 75 сторінок комп'ютерного тексту.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНИЙ СТАН ДОСЛІДЖЕННЯ КОМАХОЇДНИХ РОСЛИН
РОДИНИ *DROSERACEAE* L.1.1. Основні морфологічні та фізіологічні характеристики
Drosera L.

Рід Росичка (*Drosera* L.) у європейських країнах є свого роду символом комахоїдних рослин, нерідко вони характеризуються в шкільних підручниках.

Відомо, що верхній бік та краї кожного листка вкриті волосками – щупами, що мають червону залозисту голівку. Її оточує крапелька тягучого липкого слизу.

Саме ці, схожі на краплі роси, крапельки, дали назву видам цього роду.

Ще Карл Лінней, засновник ботанічної номенклатури, в своїй праці «Філософія ботаніки», відзначав, що назва роду *Drosera* (росичка) походить

від слова «роса». Раніше вважалось, що дрібні комахи гинуть в слизу тому, що прилипають до нього. Проте, згодом вченим вдалося виділити з соку росички

речовини, які мають на комах паралізуючу дію. Слиз залозистих волосків містить ферменти, які нагадують за складом травний сік тварин. В слизу

знайдена низка ферментів, а також полісахариди, під дією яких за порівняно короткий час комахи розкладаються і потроху всмоктуються залозками

всередину рослини. Професор М.Г. Холодний, який вивчав це питання, вважав, що рух залозистих волосків спостерігається тоді, коли слідом за

механічним подразненням листка настає його хімічне подразнення від речовин з тіла комахи. Лист росички не відчуває вагу того, що на нього впало, але

сприймає його запах. Оскільки здатність живитись тваринною їжею виробилась у росичок як своєрідне пристосування до бідних субстратів,

рослина отримує із пійманих комах насамперед солі натрію, калію, магнію, фосфору та азоту. Коли ж на листок росички впаде суха травинка або ще щось

неїстівне, волоски – щупи – тільки ледь здригнуться і знову лишаться нерухомими [13].

Знання про комахоїдні рослини збирали з давніх-давен, навіть у XVIII столітті були перші повідомлення про здатність цих рослин ловити комах, дрібних пташок та навіть мишей (рис 1.1.)



Рис 1.1. Вигляд росички [13]

У 1782 році німецький лікар А.В. Рол шляхом спостережень з'ясував, що рослини рухались, точніше листки росички (*Drosera*) робили свербідні рухи з допомогою яких вони не тільки ловили комах, вони їх поїдали (рис 1.2.).

Він висловив припущення, що спіймана здобич служить джерелом поживних елементів, які забезпечують ріст та розвиток рослини [16]. З того часу в народі рослини почали називати хижі. За чисельними спостереженнями з'ясувалось, що ці "хижі" рослини адаптувалися до росту в місцях з тонким шаром родючого ґрунту або невеликою кількістю поживних речовин, особливо азоту, таких як кислі болота й відслонення гірських порід [15].

У книзі У. Бертрама (1791) з'являється вперше термін "м'ясоїдні рослини".

Рослини-хижаки стали унікальною ланкою в харчовому ланцюзі. Ці рослини перетворили свої стеблинки і листочки в смертоносні пастки, в яких можна зустріти різну здобич, від планктонних ракоподібних до жаб, мишей та інших дрібних тварин, навчилися розчиняти і засвоювати свої жертви, а головне розробили унікальні способи заманювання дичини.



Рис 1.2. Поїдання комах представниками *Drosera L.* [18]

Зараз ні один сучасний біолог не сумнівається більше в тому, що всі фізіологічні і морфологічні особливості, які спостерігаються в цій групі є результатом розвитку та адаптацій закладених в кожному рослинному організмі. Це привабливості комах запахами, кольорами і смаковими речовинами, затримання здобичі виділеною липкою рідиною і різними хватними рухами, різні вияви "чутливості", виділення ендокринних речовин, що перетравлюють білкові речовини та ін. Все це такі риси організації, які в тому чи іншому ступені розвитку в тій чи іншій формі властиві всім або переважній більшості рослин. Змінюється тільки біологічне значення їх або роль в житті організму.

Відповідно до цих умов, в яких він живе, і залежно від усієї попередньої історії розвитку даного виду [75].

У складі родини росичкових 5 родів, які включають більше 100 видів.

У флорі України – 2 роди – альдрованда (*Aldrovanda* L.) та росичка (*Drosera* L.). Росичкові – багаторічні кореневищні болотні або водні трав'янисті рослини (дуже рідко – напівчагарники), які мають спеціальні пристосування для уловлювання комах [3].



Рис. 1.3. Представники *Drosera* L. [3]: а – *Drosera rotundifolia* L.; б –

Drosera anglica Huds.; в – *Drosera intermedia* Hayne

Листки у них чергові, прості, цілісні, як правило, вкриті залозистими волосками, чутливими щетинками (рис 1.4). Квіти у видів родини росичкових правильні (актиноморфні), зібрані у прості верхівкові суцвіття. Зав'язь верхня, плід – коробочка. У флорі України найбільшим в родині є рід росичка (*Drosera* L.), який включає три види і гібрид між двома видами.



Рис 1.4. Залозисті волоски [17]

Росичка круглолиста (*Drosera rotundifolia* L.) У цього виду листки розпростерті, з округлою платівкою, довгочерешкові, розміщені горизонтально (рис 1.5).



Рис 1.5. Росичка круглолиста (*Drosera rotundifolia* L.) [22]

Квіти з 5-ма білими пелюстками та 5-ма чашолистками, що складають дзвоникоподібну чашечку. Квіткові стрілки значно довші за листки, тонкі, червонуваті, інволи звивисті. Маленькі квіти, які лише при сонячній погоді розкриваються на декілька годин, рідко відвідують комахи. Частіше має місце самоопилення. Коробочка без бороздок, з численними дуже маленькими та легкими насіннями, які поширюються вітром. Ареал виду охоплює всю Європу (в південній Європі зрідка), північну частину Азії (весь Сибір та

північна частина Японії), арктичну та помірну частину Північної Америки. В Середній Європі вид трапляється зрідка [20, 27].

Зростає росичка практично на всіх континентах, за винятком Антарктиди. Найчастіше цю рослину можна зустріти на торф'яних болотах, а також на сирих пісках, тобто на найбідніших ґрунтах, де інші рослини просто не виживають [17].

Що стосується поширення в Україні, вже за життя одного покоління ми змушені міняти свої уявлення про поширення росички круглолистої. Більше 30 років поспіль в Українському Поліссі, не зустрічали такої території, де

росичка круглолиста траплялась би часто. Це пов'язано насамперед із специфічністю її екотопів. Вид зростає на мезотрофних та оліготрофних болотах – сфагнових та гіпновосфагнових. На Українському Поліссі нині осушено біля половини всіх боліт. Сфагнові болота осушені в меншій мірі, ніж евтрофні (низинні), але вони тепер часто межують із осушеними болотами.

Внаслідок цього тут знижується рівень ґрунтових вод. Хоча росичка круглолиста є найменш вологолюбною із всіх видів цього роду, вона мусить «рятуватись» із місць, де обводнення зменшилось. Цьому сприяє також потепління клімату, яке все більше відчувається на Поліссі. Тому нині цей вид

нерідко зростає не лише на мохових горбах, але й на краях меліоративних каналів при неінтенсивному осушенні. Слід відзначити, що, наприклад, у Волинській області та на Чернігівщині, північна частина території яких знаходиться на Поліссі, а південна – на Волинській височині або в Лісостепу, росичка круглолиста занесена до списку регіонально рідкісних видів. В Лісостепу вид трапляється дуже рідко в північних районах [12, 14].

Росичка середня, проміжна (*Drosera intermedia* Hayne) Назва виду пов'язана з формою листків – вони не видовжені, як у росички довголистої, і не округлі, як у росички круглолистої, а мають проміжну форму із клиновидною основою (рис 1.6.). Є певні інші відмінності від інших видів роду – стебельце росички середньої біля основи не пряме, а висхідне, а коробочка – борозенчаста.

За своїм ареалом росичка середня є диз'юнктивноареальним видом в ізольованій частині ареалу. Ареал виду розміщений навколо Атлантичного океану в Європі та у Північній Америці, в горах Турції та Кавказу, ізольовано на Кубі та на півночі Південної Америки [34].



Рис. 1.6. Росичка середня, проміжна (*Drosera intermedia* Haughe) [13]

Однак, росичка середня зайшла досить далеко вглиб континентів – окремі частини її ареалу досягли не лише Прибалтики, але й Білорусі та України. В Україні вид зростає переважно в північній частині Правобережного Полісся, переходячи через р. Дніпро до пониззя Остра. В Лісостепу зустрічався дуже рідко, в північних районах (рис. 1.7).

Росичка середня – багаторічна рослина заввишки 5-8 см з розеткою прикореневих листків, спрямованих догори. На поверхні листків – численні червоножовті залозисті клейкі волосинки. Квітки дрібні, білі, правильні та п'ятимірні, в негустих китицевидних суцвіттях. За своєю екологією росичка середня є степотопним видом, який пристосувався до едафотопії бідних на поживні речовини. Цей вид є більш вологолюбним, ніж росичка круглолиста – зростає на зниженнях та мочажинах серед сфагнових боліт – частіше олігомезотрофних та мезотрофних, рідше – оліготрофних.



Рис. 1.7. Поширення *Drosera* в Україні [2]

Уникає ділячок в пустим травостоєм. Вона може бути охарактеризована як вологолюбний та теплолюбний вид, мало конкурентоздатний. Поширюється насінням, яке розноситься водою і успішно проростає лише за наявності волого оголеного ґрунту. Популяції виду нечисельні, спостерігається їх скорочення і зменшення місцезнаходжень. Основною причиною зменшення кількості місцезростань та особин в них є осушення боліт (в тому числі і часткове), що призводить до зниження рівня ґрунтових вод [1, 16].

Дослідник комахоїдних рослин Т.Л. Андрієнко описував що, в Австралії зростає росичка гігантська (*Drosera gigantea*). Її висхідне стебло досягає в довжину 60–100 см. Нижні стеблові листки редуковані до жорстких шилоподібних лусок. Ця своєрідна рослина з розчепреними гілками, вкритими довгочерешковими уловлюючими листками, неначе павутинням, має велику уловлюючу поверхню [4, 23].

Він також зазначав, що у колекціях та оранжереях ботанічних садів найчастіше зустрічається два субтропічних види роду росичка – кашська

НУБІП УКРАЇНИ

(*Drosera capensis*) (рис. 1.3.) та лопатчаста (*Drosera spatulata*). Росичка капська має густу розетку з червонуватих віїчастих листків. Її квітконос до 20 см заввишки, має 20 червоних квітів. Зростає на заболочених місцях, нерідко на глинистих ґрунтах, які періодично пересихають, по берегах річок в Капській провінції (ЮАР) [23, 24].

НУБІП УКРАЇНИ

Drosera spatulata характеризується довгасто-лопатчастими листками, які утворюють щільну розетку, густо вкриті залозами. Квіти дуже дрібні, зібрані по 10–15 у невеликі китиці, червоного кольору. Зростає переважно на болотах або біля берегів річок [41].

НУБІП УКРАЇНИ

Загалом комахоїдний рід *Drosera* є різноманітним за кількістю видів. В частині Австралії на півдні та південному заході навколо Аделаїди, яка належить до області зимових опадів, виявлено 75 видів роду росичка, в Іспанії, Португалії та Марокко, переважно на сухих кам'янистих ґрунтах, трапляється напівчагарник росолит луситанський (*Drosophyllum lusitanicum*), який відомий також як «португальська мухоловка».

НУБІП УКРАЇНИ

Росичка довголиста, (англійська) (*Drosera longifolia* L. (*Drosera anglica* Huds.)). Є північним циркумполярним видом, льодовиковим реліктом.

НУБІП УКРАЇНИ

Її ареал охоплює північну частину Євразії та Північної Америки. В Україні вид знаходиться на південній межі ареалу (рис 1.8.). Росичка довголиста зростає переважно на Поліссі, здебільшого Правобережному, рідше на півночі Лісостепу. За гербарними даними початку ХХ ст. вид зустрічався в околицях міст Києва та Харкова. Сучасними зборами вони не підтверджуються [13, 17].

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ



Рис. 1.8. Поширення росичка довголиста, (англійська) (*Drosera longifolia* L. (*Drosera anglica* Huds.) [2]

Росичка довголиста вища, ніж інші види росички – заввишки 10–25 см (рис. 1.9.)

Листки її лінійно-клиновидні, зверху вкриті залозистими волосками, утворюють прикореневу розетку. Листки так само ловлять дрібних комах, як і в інших видів росичок. Квітки невеликі, білі, зібрані у китицю. Під яйцевидна одногніздна коробочка. Цвіте у липні–серпні, плодоносить у серпні [2, 13].

Розмножується насінням. Росичка довголиста найбільш вологолюбна із всіх росичок України. Вона обирає на сфагнових болотах місця близькі до обводнених знижень. Зростає звичайно під негустим ярусом осоки пухлятоплодої (*Carex lasiocarpa* Ehrh.), здутої (*Carex rostrata* Stokes), багнової (*Carex limosa* L.). Навіть при незначному зниженні рівня ґрунтових вод росичка довголиста «випадає» з травостою. Тому значна кількість відомих її місцезнаходжень, насамперед, у Придніпров'ї, дині вже не існує. Така ж ситуація в інших країнах, де зростає вид. В Чехії та Словаччині кількість втрачених місцезнаходжень значно перевищує кількість тих, що збереглися

(Червона книга Чехії та Словаччини). На жаль, значно гіршою є ситуація в інших природних регіонах України.



Рис 1.9. Росичка довголиста, (англійська) (*Drosera longifolia* L.

(*Drosera anglica* Huds.) [16]

Ще здавна вчені звертали увагу на рослини, які мають здатність житись комахами. Такі рослини були відомі ще у XVIII сторіччі. У XIX сторіччі була описана низка комахоїдних рослин, їх будова та функції.

Особливе значення мало дослідження цієї групи рослин відомим вченим Чарльзом Дарвіном. Він розпочав свої дослідження у 1860 році із

спостереження над росичкою. Протягом багатьох років вчений повторював та розмірював ці спостереження [2, 8].

Цікавий дослід було поставлено з росичкою у 1867 Чарльзом Дарвіном і його сином Френсісом. Френсіс описав:

«Рослини були зібрані і вирощені у звичайних глибоких ємкостях, кожна з яких була розділена тонкою перегородкою з однієї сторони рослину підживлювали, комахами, а з іншого рослина була позбавлена їжею та доглядом.

Вже через 2 тижні мали такі результати: рослину яку регулярно підживлювали підросла і цвіла, на відміну від непідживленої рослини мали тьмяне забарвлення [48].

Протягом деякого часу ряд учених теж проводили експерименти та спостереження над комахоїдними рослинами та продуктами які вони можуть споживати, акумулювати та синтезувати [47]. Проте лише у 1875 році було підведено перші офіційні підсумки англійський вченим у праці «Insectivorous Plants». Після цього на основі другого видання цієї праці (1888 р.) та аналізу работ Ч. Дарвіна про комахоїдні рослини академік М.Г. Холодний вказував, що робота Ч. Дарвіна була переломним пунктом в історії дослідження

комахоїдних рослин й дала поштовх до появи багатьох інших Комахоїдні рослини в Україні.

У своєму описі академік М.Г. Холодний навів короткий опис знань про комахоїдні рослини. Кількість видів комахоїдних рослин М.Г. Холодний оцінює близько 500, вони належать до 7 родин. М.Г. Холодний поділяє всі комахоїдні рослини за характером пристосувань для вловлювання комах на 3 групи. До першої належать ті, у яких для цього є просто клейка поверхня листків, або, точніше, розташованих на ній залозок. До другої групи – рослини, які мають пристосування, які заважають кохам або невеликим тваринкам

вibrатися назовні із пастки. Рослини третьої групи – мають пилки утворення типу ловушок, якими рослини здійснюють швидкі активні рухи, щоб піймати здобич [32, 42].

1.2. Способи розмноження *Drosera L.*

Вегетативне розмноження росянок в природі може відбуватися різними способами. Так, росички можуть вегетативно розмножуватися за допомогою бруньок, які утворюються на листових пластинках і черешках в результаті поділу однієї або декількох клітин епідермісу. Однак вегетативна рухливість росянок визначається також довжиною асептичних вегетативних пагонів. Ці пагони, завершуються бруньками відновлення, зимуючими під поверхнею сфагнового покриву. З них на наступний рік розвиваються генеративні або вегетативні комплекси, які з'єднані між собою торішньої частиною брунькової системи. Через рік цей зв'язок руйнується, що призводить до збільшення числа особин. При формуванні укорочених пагонів дочірні особини розташовуються в безпосередній близькості один до одного, якщо ж утворюються подовжені пагони, то відстані між дочірніми рослинами збільшуються [43, 46]. Оскільки у росянок зазвичай формуються короткі пагони, то їх можна віднести до вегетативно малорухливих рослин. Специфіка утворення пагонів у росички, яка нерідко мешкає в місцях з найбільш інтенсивним наростанням сфагнового покриву, полягає в тому, що в порівнянні з батьківськими видами у неї часто відсутня стадія розетки, а пагони досягають значної величини (до 5 см). За рахунок утворення цих пагонів росичка починає успішно розмножуватися вегетативним шляхом [2, 65].

Є велика кількість самозапильюючих видів росянок. Найчастіше їх квіточки самозапильюються під час закриття. Насіння в них чорне та дуже маленького розміру, його визріває дуже багато (рис. 1.10.). Висів проводять у зволожений субстрат, при цьому насіння повинні бути прямо біля самої поверхні (або на ній). Ємність з насінням необхідно накрити склом або плівкою, помістити у добре освітлене місце. Полив рекомендується проводити шляхом занурення ємності у воду. Перші сходи можуть з'явитися через 2-5 тижнів після посіву.



Рис. 1.10. Насіння росички

Також можна розмножити росичку дітками, які ростуть від кореня. А ще цілком можливо укоренити старі листочки дорослої рослини.

Це більш простий шлях. Листя, які більші за розміром, розрізають на маленькі живці та відразу укорінюють в субстрат. Листові живці з легкістю і швидкістю вкорінюються [31, 39].

1.3. Використання в народному господарстві та озелененні

Для лікарських потреб використовують траву росички, яку заготовляють в період цвітіння рослини. При цьому підземну частину рослини з декількома листочками необхідно залишити неушкодженою для відновлення популяції.

Рослини родини *Drosera* spp. можна вважати перспективними природними джерелами антиоксидантів з потенційним застосуванням у харчових чи фармацевтичних галузях для профілактики захворювань, пов'язаних з окислювальним стресом, спричиненим вільними радикалами [33]. Крім того, результати цієї роботи показали, що на кінцевий

вміст фенольних сполук та антиоксидантну здатність впливає використання відносно високих температур сушіння (75 °C), тому деякі дослідники пропонують проводити сушку.

Зібрану сировину використовують свіжою (у вигляді соку) або висушують, розкладаючи тонким шаром у затінку на вільному повітрі або в добре провітрюваному приміщенні [29].

Препарати росички круглолистої чинять спазмолітичну, антибактеріальну (особливо сильно діють проти стрептококів, стафілококів та збудників туберкульозу), болевтамувальну, відхаркувальну, потогінну, сечогінну та седативну дію [31, 33]. Плумбагін, фітохімічний препарат, синтезується рослинами *Drosera*, активно використовується для фармацевтичних препаратів через його спазмолітичну та антибіотичну активності [28].

Росичка є досить ефективним протиспазмолітичним і відхаркувальним засобом при захворюваннях верхніх дихальних шляхів, що супроводжуються кашлем (коклюш, фарингіт, ларингіт, бронхіт і бронхіальна астма). У народній медицині препарати з росички використовують як седативний (при надмірній збудливості нервової системи), протисудомний (при епілепсії), гіпотензивний та кровоспинний (при кровохарканні) засіб, при атеросклерозі, цукровому діабеті [31].

Використовують росичку круглолисту не тільки в медицині, застосовують її й в інших областях людської діяльності. Наприклад, в Італії виготовляють лікер на основі росички, який називається «Розоліт» [35]. Росичку застосовують і в косметології для боротьби з бородавками і для розм'якшення мозолів. З цієї ж рослини отримують червоний і жовтий харчові барвники [33]. А ще на Півночі традиційно ця рослина використовували для пропарювання глечиків – глиняних глечиків, в яких зберігали молоко. Справа

в тому, що через деякий час молоко починає в цих глечиках швидко киснути. І якщо помістити в цей глечик росичку з невеликою кількістю води і деякий час пропарити в печі, то ферменти, які входять до складу листа цієї рослини,

поступово розчиняють все органічні речовини, які не тільки осідають на стінках глечика, а й виявляються в найдрібніших глиняних порах. Після цієї процедури молоко в глечику починає довго зберігатися і не закисати [48].

Росичку можна використовувати і як кімнатна рослина. Посадити її можна за допомогою насіння, а можна перенести саму рослину безпосередньо з ділянкою ґрунту, на якому воно росте [53].

Вторинні метаболіти – сполуки, часто складного складу, які не є основними проміжними сполуками метаболізму клітини, утворюються в його тупикових гілках. Мікроорганізми росички утворюють вторинні метаболіти, як правило, в період уповільнення або припинення активного росту і розмноження культур. В якості вторинних метаболітів мікроорганізми утворюють деякі пігменти, антибіотики, вітаміни. Велике значення має синтез вторинних метаболітів мікроорганізмами в процесі формування гумусу ґрунту.

Вирощування і розведення хижої рослини в домашніх умовах дозволяє досягти ідеальних характеристик для комфорту росички. Такі рослини є дуже корисними в кімнатному застосуванні, вони приманюють та відловлюють комах, які залітають у кімнати через відчинені вікна. Для креативних людей

можна придбати або навіть виготовити самому кокедаму або терраріум (рис. 1.11.). Це надасть змогу виглядати їй природніше та привабливіше [80, 81].



Рис. 1.11. Композиції з використанням *Drosera* L. (кокедама, флораріум)

1.4. Сучасні підходи у розмноженні *in vitro* рослин родича *Drosera L.*

Сьогодні дедалі більшої популярності набувають сучасні біотехнологічні підходи, які швидко й ефективно допомагають вирішувати складні завдання, що виникають перед селекціонерами. Одним із таких методів є мікроклональне розмноження рослин.

Основною задачею методу культури тканин є мікроклональне розмноження генетично однорідних цінних видів, сортів і рослин-гібридів в цілях: збереження і розмноження генотипів в якості вихідних форм для селекційних цілей; швидкого і масового клонального мікро розмноження нових перспективних квіткових рослин вітчизняної і зарубіжної селекції; відновлення та розмноження рідкісних та зникаючих видів квіткових рослин; одержання вихідного безвірусного, а також вільного від грибних і бактеріальних збудників садивного матеріалу для потреб садово-паркового господарства та фармакології [7, 81].

Аби розмножити рідкісний садивний матеріал, щоб рослини були здоровими та ідентичними, слід використовувати вегетативні методи розмноження, серед яких найбільшу зацікавленість становить мікроклональне розмноження [10].

У основі мікроклонального розмноження рослин лежить принципово дуже важлива характеристика рослин, а саме явище тотипотентності рослинних клітин. Це означає, що за відповідних умов культивування (складу живильного середовища та штучно створеного мікроклімату) навіть з маленької частини органа рослини можна отримати повноцінний рослинний організм, і навіть не один.

Перші вдалі спроби вирощування повноцінних, здатних до нормального розвитку рослин у лабораторних умовах на штучному живильному середовищі (ЖС) було зроблено ще у другій половині XIX століття Кнопом. У подальшому дуже широко почали використовувались й методики вирощування цінних рослин з окремих ізольованих частин або

органів. Таким чином, у 50-60 роки ХХ століття було розроблено низку ЖС та підходів, зокрема середовища: Murasige & Skoog [62], D. White [56], W. Kruyt [60], A. Naagan-Skirm [57] тощо.

Нині майже всі ці ЖС за своїм складом є незмінними й часто використовуються для масового розмноження рослин у найрізноманітніших галузях. Більше того – вони є базовими для основної маси тих, що створюються та використовуються нині в рослинній біотехнології.

В Україні експериментальні роботи з культивування тканин рослин започатковані 1949 році в Інституті фізіології рослин АН УРСР. Активний розвиток різних напрямків біотехнології рослин припадає на 70-80 роки. У цей період в Інституті ботаніки імені М.Г. Холодного під керівництвом академіка К.М. Ситника проводились роботи з гібридизації протопластів та клітинної селекції. При виконанні лабораторних досліджень слід враховувати ряд чинників, як зовнішніх, так і внутрішніх, від яких залежить подальше мікроклональне розмноження. Найголовнішим із внутрішніх вважається генотип маточного матеріалу, що впливає на подальше вкорінення експлантів. Так, наприклад, успішність вкорінення представників роду *Drosera* залежно від генотипу може коливатися від 5 до 95 % [18, 33, 74].

Гетеротрофний стан рослин, висока відносна вологість і низька інтенсивність освітлення є основними факторами, що сприяють індукції змін у рослин, вирощених *in vitro*, порівняно з умовами *ex vitro* [26]. Подібні результати були отримані у *D. intermedia* [61], *D. burmanii* Vahl [63] та у *D. rotundifolia* [71]. Крім того, для досягнення виживання рослин роду *Drosera* в умовах *ex vitro*, необхідні низька температура і висока вологість, крім того, їх слід перенести в обмежене середовище проживання з ґрунтом, бідним поживними речовинами та кислотою природою [24].

Дослідники Мендес та ін. (1999), повідомляється, що при культивуванні живих рослин активно виділяються фенольні сполуки, флавоноїди та антоціани викликаючи обмеження синтезу поживних речовин у рослинах як в культурі так і в умовах *ex vitro*.

Росичка хижа належить до комахоїдних рослин які активно розмножують *in vitro*, оскільки можливо тримати велику кількість рослин за короткий час, з невеликої кількості тканини, тим самим мінімізуючи збір з природної популяції. Кілька видів комахоїдних рослин успішно розмножували в багатьох країнах, через отримання оздоровлених, безвірусних, асептичних рослин, матеріал яких використовують в озелененні, квітникарстві, фармакології тощо.

Надійним ефективним підходом у оздоровленні садивного матеріалу *Drosera L.* є культура апікальних меристем у поєднанні з термотерапією материнських рослин. Ці методи почали застосовувати з початку 60-х років минулого століття, і нині їх широко використовують у промисловому квітникарстві багатьох країн і в Україні також [34].

Однак, за даними багаторічних спостережень Т.Л. Андрієнко, нині велика кількість місцезнаходжень *D. rotundifolia* втрачено, в результаті антропогенного впливу, пов'язаного в першу чергу з осушуванням боліт.

Починаючи з 1982 року перед вченими постало питання вивчення складу ЖС, строків виділення експлантів, місце розміщення меристем на пагоні, вплив температурного і світлового режимів а також морфогенез меристемних рослин *Drosera L.* Дослідження показали, що для одержання вирощування нормальних рослин росички найбільш оптимальним є середовище з мінеральною основою за прописом МС з половинною концентрації макро- і мікроелементів (1/2) з послідуною заміною середовища на повний склад.

Зменшення концентрації макро- и мікросолей вдвічі проведено з метою зниження проценту скловидних рослин. У якості регуляторів росту краще додавати наступні компоненти: кінетин $1,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, гіберелін $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, НОК $1,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, гідролізат казеїн $500 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, але не для всіх представників. На середовищі такого складу вихід нормально регенованих рослин складає за

даними деяких дослідників 75% [2, 5, 38]. При вивченні розвитку експлантів в залежності від строків ізоляції найкращі результати одержані в осінній період (жовтень, листопад). Регенерація їх порівняно з літніми місяцями складає 85%.

При культивуванні найбільш оптимальним є освітленість 4-5 тис. лк, та температурний режим в межах 23-25°C [79].

Наступним етапом успішного розмноження *Drosera L.* є підбір умов адаптації та підбір оптимального складу грантових субстратів. Дослідження різних компонентів – піску, перліту, торфу та інших, що використовують як окремо так і в різних співвідношеннях. Часто в дослідження використовують ґрунтові суміші такого складу: чистий торф; торф + перліт (1:1); пісок + перліт + ґрунт (1:2:1); торф + перліт + пісок (1:1:1); торф + перліт (1:2); перліт + пісок + перліт (2:1:1); пісок + перліт + ґрунт (3:3:1); торф + перліт + пісок + перегній + ґрунт (1:2:1:2:1); чистий перліт [27].

Що стосується індукції та формування кореневої системи, то більшість досліджень відмічають непогані результати за використання сумішей з піском + перегній + ґрунт (3:3:1) [6, 30].

Для вирощування ізольованих апексів різних представників *Drosera L.* використовують рідкі та агаризовані ЖС МС [66], Буюса [25], Ван-Хофа [74], Мореля [54] в оригінальних прописах та модифікаціях із різними концентраціями та співвідношеннями регуляторів росту. Найчастіше застосовують середовище МС з додаванням 1,0 мг·л⁻¹ кінетину та 0,1 мг·л⁻¹ НОК. На таких середовищах найчастіше відмічають ріст меристем і нормальний морфогенез рослин [42]. На середовищі Буюса [25] скорочується тривалість росту експлантатів *Drosera L.*, збільшується вихід нормально розвинутих рослин і підвищується приживлюваність регенерантів у субстраті [9].

Важливим фактором, що впливає на морфогенез рослин, є розмір експлантатів. Для звільнення від вірусної інфекції використовують апікальні меристеми малих розмірів (90 – 100 мкм), що складаються з купола та ледь помітних листкових примордіїв. Такі апекси важко виділити, вони повільно ростуть, їх здатність до морфогенезу часто знижена. У разі збільшення розмірів експланту до 200 мкм за рахунок субапікальної тканини та листкових

примордіїв підвищується морфогенетична здатність, але при цьому зростає можливість переносу вірусної інфекції від материнської рослини [9, 45, 53].

Залежно від розміру експланту, складу живильного середовища і умов культивування можна отримати регенеранти з добре розвинутими листками і коренями, пагони з калусом або пагони без коренів. На рідкому середовищі ріст апексів активніший, ніж на агаризованому; додаванням $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ кінетину сприяє індукції численних пагонів. Для збільшення коефіцієнта розмноження оздоровлені регенеранти *Drosera L.* можна живцювати. Пагони з 4-5 парами листків розрізають на частини з однією парою листків і укорінюють на середовищі Уайта з мікроелементами за Хеллером [53], зниженим вмістом цукрози і $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ НОК або ІОК. Цей захід дає змогу збільшити вихід рослин-регенерантів у сотні разів [10].

Розмноження *Drosera L.* підвиду *Capensis* часто проводять на $\frac{1}{2}$ МС доповненого 3% цукрози, 0,8% агару, $50 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ мезоінозиту, $0,025 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ тіаміну, $0,125 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ нікотинової кислоти і $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ гліцину. Утворення бічних пагонів індукують за використання БАП і НОК. Кращі результати як правило отримують на середовищі з $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП і $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ НОК.

Укорінення успішно здійснили на безгормональному середовищі, а вихід акліматизовані регенеранти складають дуже часто 85-95% (залежно від підвиду [19, 44].

Іншим ефективним методом масового розмноження *Drosera rotundifolia L.* є культура калусної тканини. На середовищі МС із додаванням $2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ 2,4-Д або $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ кінетину і $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ НОК з апікальної тканини розростається калус, відбувається проліферація численних пагонів і коренів. Калусна тканина утворювалась у разі додавання до середовища $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ гумату натрію. Окремі частини калюсу або пагони з калусом переносять у колби з рідким живильним середовищем: $2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ кінетину і $0,002 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ НОК.

За тиждень маса тканини є більшості досліджуваних представників збільшується в 3-4 рази, а за 6-8 тижнів утворюються пагони. Корені

проліферуються. Як правило, спонтанно в рідкому середовищі або після пересадки пагонів на агаризоване середовище без фітогормонів [44, 47].

Найприйнятнішим методом, що дає змогу отримувати цитологічно і генетично стабільні регенеранти, є індукція соматичних ембріодів безпосередньо на тканинах рослин. На рідкому середовищі МС, яке містить $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ 2,4-Д і $0,2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП, відбувається утворення ембріодів (без калюсу) на експлантатах листків *Drosera rotundifolia* L. Перші глобулярні структури з'являлись через 20-40 діб культивування; подальший розвиток до стадії торпедо стимулювало додавання поліетиленгліколю (2,5%) (PEG 6000).

Морфогенез рослин відбувався при висесненні $1000 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ гідролізату казеїну і залежать від генотипу рослин [52].

Часто спостерігається утворення скловидних (сукулентних, вітрифікованих) рослин, у них порушена або повністю відсутня кутикула і епідерміс. Це призводить до швидкої гибелі меристем регенерантів або мікроживців при пересаджуванні їх в субстрат. Частина скловидних регенерантів гине ще в пробірці. Передбачають, що це явище може бути пов'язане з трофічними або фізіологічними факторами, але також і фізіологічними особливостями культивованих тканин. Для їх виявлення був

поставлений дослід в якому вивчали особливості утворення скловидних рослин із мікроживців *Drosera rotundifolia* L. [21]. Вчені виявили, що кількість скловидних регенерантів можна зменшити, змінюючи умови культивування. Так добавляючи в поживне середовище НОК $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ збільшили кількість нормально розвинених регенерантів на 8-10%. Заміна рідкого поживного середовища на агаризоване ($6 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ агару) знижувала кількість скловидних рослин вдвічі – в середньому від 40 до 20%. Збільшення концентрації агару в середовищі від 6 до 12% дає можливість отримати 90% регенерантів без ознак скловидності. Підсилення освітлення до 8 клк також

дало можливість одержати на 10-20 % більше рослин без ознак фізіологічних відхилень [19].

Також, щоб запобігти вітрифікації при вирощуванні на рідкому середовищі регенерантів *Drosera rotundifolia* L. багато авторів знижують концентрацію мінеральних компонентів у живильному середовищі (1/2 МС) і використовують кінетин (замість БАП) з НОК у таких концентраціях, мг·л⁻¹: 0,1-0,5; 0,2-2,2; 0,02-2,0; 0,09-2,9; 0,5-0,5 [40, 49].

НУБІП УкРАЇНИ

НУБІП УкРАЇНИ

НУБІП УкРАЇНИ

НУБІП УкРАЇНИ

НУБІП УкРАЇНИ

НУБІП УкРАЇНИ

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика дослідних об'єктів й відбір експлантів

Об'єктом дослідження були рослини *Drosera spatulate* L. та *Drosera aliciae* L. взяті з горщикової культури закритого ґрунту.

Вихідними експлантами були частини вегетативного та генеративного комплексу, яка формується з бруньки відновлення за один цикл видимого росту, та включає крім стебла, листя і бруньок ще й квітку (термінальну, пазушну) або суцвіття.

Найважливішим є відбір материнської рослини та первинних вихідних експлантів. Термін «експлант» застосовують для назви вихідного шматочка рослини, який вводять у культуру *in vitro*.

У якості експлантів використовують верхівки пагонів, бокові бруньки, частинки кореня або листка, черешок листка, суцвіття, пелюстки квітів, гіпокотиль проростаючого насіння та інші частини рослин [18, 35].

Вибір експланта залежить від виду, стану рослини-донора, фази її розвитку, сезону року. Значення має навіть положення експланта на рослині. Для успішного проведення робіт із регенерації рослин вибір експлантів відіграє першорядне значення. Краще всього використовувати матеріал, вилучений зі здорових, сильних рослин. Більшість експлантів добре вводяться в культуру у фазу активного росту рослини-донора. Проте є рослини, експланти з яких утворюють пагони лише у стані спокою. Більше того, при виборі експлантів слід віддавати перевагу меристематичним тканинам, оскільки вони легше виживають у культурі, мають більшу швидкість росту й здатність до морфогенезу [50]. Розмір експланта визначає ступінь виживання *in vitro* (крупніші за розміром верхівки пагона завжди краще виживають).

Важливими компонентами успіху є очистка і стерилізація рослинного матеріалу перед введенням його в культуру *in vitro*.

Таким чином, відібраний і простерилізований експлант вводить у культуру на спеціальне поживне середовище.

2.2. Отримання асептичної культури *Drosera L.*

Для знезараження вихідних експлантатів дотримувались загальноприйнятих методів та підходів [18].

У якості стерилізуючих речовин використовували 70 %-ний розчин C_2H_5OH , 1,0 %-ний $AgNO_3$, 12,5-25,0 %-ний розчин H_2O_2 різної концентрації та експозиції й гіпохлорид Na .

Експериментальна частина досліджень з мікробіологічного розмноження проводилася на базі науково-дослідної лабораторії біотехнології рослин ВП НУБіП України «Боярська лісова дослідна станція» упродовж 2021 р. й на базі навчально-наукової лабораторії біотехнології та клітинної інженерії НУБіП України у 2020-2021 рр.

Необхідним етапом, під час введення в культуру рослинного матеріалу, є стерилізація експлантів *Drosera spatulate L.* та *Drosera aliciae L.*, що сприяє вивільненню від епіфітних мікроорганізмів. Для вирішення цього питання потрібно провести підбір речовин стерилізаторів, а також визначити відповідні концентрації та експозиції [18, 22].

Загальноприйняті методики стерилізації передбачають промивання вихідного рослинного матеріалу водою з господарським або антибактерицидним милом, очищення експлантів від зайвих тканин і додаткове промивання дистильованою водою. Підготовлені таким чином експланти занурюють у стерилізуючі розчини (етанолу (70-96%), 0,1 %- нітрату срібла ($AgNO_3$), хлораміну (2-10%), гіпохлориду кальцію (7-10% $Ca(ClO)_2$) або натрію ($NaOCl$) та інших рекомендованих препаратів. Останнім та обов'язковим етапом стерилізації експлантів є їх багаторазове промивання в дистильованій воді. Метою стерилізації є не тільки отримання вільного від шкідливих мікроорганізмів, патогенів та вірусів експлантів, а і збереження їх здатності до морфогенезу та калусоутворення [4, 5].

Рослинні експланти *Drosera spatulate* L. та *Drosera aliciae* L. стерилізували наступними розчинами речовин:

- що містили активний хлор, гіпохлорид Na

- окисники – пероксид водню (H_2O_2);

- 0,8-1,0% нітратом срібла ($AgNO_3$). Антибіотики, ртутні і бромні препарати не використовували (рис. 2.1.).



Рис. 2.1. Початковий етап стерилізації експлантів *Drosera spatulate* L. та

Drosera aliciae L.: А – рослина донор; Б– вихідні експланти витримання

експлантів у мильному розчині

Гіпохлорид нагію ($NaClO$) використовували у вигляді 5% розчину для обробки будь-яких експлантів протягом 15-40 хв. Ця речовина є клітинною отрутою, тому час стерилізації й концентрацію підбирають експериментально.

Наприклад для листків використовували 2-3% розчин протягом 10-15 хв, а для пагонів 5% розчин протягом 30-40 хв. Для досягнення потрібної концентрації використовували стерильну воду, додаючи потрібний об'єм. Розчини з активним хлором готували безпосередньо перед роботою, використовували одноразово.

Пероксид водню (H_2O_2) використовували у концентрації 10,5-50% при експозиції 10-15 хв. Використання розчину H_2O_2 менше всього пошкоджувало рослинні тканини і не потребувало довгостривалої відмивки

Нитрат срібла (AgNO_3), використовували у 0,1%-ній концентрації, з різною експозицією у часі від 5 до 15 хв. Цей розчин також виявився придатним для отримання асептичної культури, оскільки пошкодження тканин спостерігалось мінімальне. Цей спосіб також не потребує довготривалого відмивання.

Як допоміжні речовини використовували розчин етанолу 70% і перманганат калію. Розчин етанолу 70% застосовували для попередньої стерилізації, занурюючи матеріал на кілька секунд це сприяє посиленню дії наступних стерилізуючих речовин [50].

У кімнаті для ламінар-боксів, перед роботою включали бокси і бактерицидні лампи на 1-2 год. Після чого роботу починали через 3-4 години. Для роботи в ламінар-боксі надягали стерильний халат, руки обробляли 96%-ним спиртом. Всі поверхні ламінар-боксу протирали 96%-вим спиртом, простерилізовані інструменти, чашки Петрі, матеріали, рослинні матеріали поміщали на стіл-боксу.

Стерилізацію інструментів проводили в сушильній шафі протягом 2-3 годин при температурі 160-180°C. У ламінарі попередньо перед роботою і в процесі посадки інструменти стерилізували 96%-вим спиртом з наступним «фламбуванням у полум'ї спиртівки». Після цього їх поміщали на підставку для охолодження і використовували тільки для однієї маніпуляції. Перед повторним використанням інструментів, повторювали їх стерилізацію в полум'ї спиртівки [55, 72].

Після кожної із стерилізацій експланти переносили стерильним пінцетом на чашку Петрі. Стерильним скальпелем розрізали на сегменти з однією брунькою. Якщо після стерилізації деякі пагони мали потемнілі кінчики (відмерлі тканини), їх підрізали, для кращої морфогенетичної здатності.

Перед відкриванням пробірки з ЖС протирали ватю, змоченою в спирті, горловину обпалювали над полум'ям спиртівки.

Проводивши посадку експлантатів, пробірку тримали під кутом поблизу полум'я спиртівки. Після посадки ковпачок із фольги обпалювали і швидко закривали ним пробірку.

Культивування меристемних ділянок здійснювали на модифікованих середовищах Мурасіге і Скуга додаючи до їх складу фітогормони різної концентрації [82].

Основним показником ефективності стерилізуючої речовини була кількість експлантатів, що нормально розвивались.

2.3. Приготування живильного середовища для введення експлантів в культуру *in vitro* й первинного морфогенезу

Для розмноження через культуру *in vitro* необхідно підібрати поживні середовища та необхідні стимулятори росту, які забезпечать найоптимальніше приживлення та розвиток експлантів.

Стимулювання пагоно- та коренеутворення досягають за рахунок встановлення необхідних співвідношень пітокінінів і ауксинів та їх концентрацій у живильному середовищі. Приготування їх здійснюють індивідуально для окремих рослин з урахуванням їх видових особливостей.

Живильне середовище – головний фактор, що обумовлює успіх мікроклонального розмноження на всіх етапах [5].

Основою живильних середовищ для культивування рослинних експлантатів була суміш мінеральних солей. Це сполуки азоту у вигляді нітратів, нітритів, солей амонію; фосфору – у вигляді фосфатів; сірки – у вигляді сульфатів; а також розчинних солей K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} . Залізо використовують у вигляді хелатів $[FeSO_4]$ або $[Fe_2SO_4 + EDTA]$ (етилендіамінтетраоцтова кислота) або її натрієва сіль Na_2EDTA (трилон Б) – найбільш доступній формі для засвоєння рослинними тканинами [7, 52].

У процесі приготування живильного середовища до його складу вносили відповідні солі, що є специфічними для кожного живильного середовища.

У якості базового поживного середовища (ПС) використовували середовище Мурасіге і Скуга (МС) з повним та половинним набором мікро- та макро елементів [22]. У процесі культивування використовували ЖС МС [13] (табл. 2.1.) з додаванням до їх складу різних груп регуляторів росту, як окремо, так і комбінуючи між собою.

Таблиця 2.1

Основні складові компоненти живильних середовищ Мурасіге і Скуга для введення в культуру *in vitro* *Drosera* L.

Складові ПС	МС, мг·л ⁻¹	МС ½, мг·л ⁻¹
<i>Макросолі</i>		
NH ₄ NO ₃	1650,0	708,0
KNO ₃	1900,0	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440,0	74,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370,0	370,0
KH ₂ PO ₄	170,0	132,5
Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O	-	984,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	0
K ₂ SO ₄	-	779,5
<i>Мікросолі</i>		
H ₃ BO ₃	6,20	2,4
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,30	16,75
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,125
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60	-
Na ₂ MnO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,195
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	-
KI	0,83	-
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	-	8,5
<i>Fe-хелат</i>		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,80	33,80
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,70	45,40

Murashige and Skoog (1969) [57]

Додатково до середовища додавали активоване вугілля (1 г·л⁻¹), у якості вуглеводневого живлення сахарозу (30 г·л⁻¹), мезоінозит (100 мг·л⁻¹), агар (0,7%) та дві хелатні форми заліза: етилендіамін-ді-2-гідроксифенілоцтової кислоти (Fe-EDDHA) і етилендіамінтетраоцтової кислоти (Fe-EDTA), рН середовища 5,6-5,7 [27].

Експлантати культивували при температурі 25 ± 2 °C 16-годинним фотоперіодом, при освітленні інтенсивністю 2000-3000 лк [58, 68].

При приготуванні макросолей кожну сіль розчиняли в окремій склянці при нагріванні. Після охолодження в розчин додавали солі магнію. Їх додають останніми для того, щоб попередити утворення осаду. Потім розчиняли й зливали в одну ємність та доводили до 1 л.

Для приготування мікросолей всі солі розчиняли в окремих склянках при нагріванні, зливали їх в одну ємність та доводили до 1 л. В охолоджену суміш останнім додавали розчин солі молібдену.

При приготуванні розчину Fe-хелату (200 мл), розчиняли послідовно 1,492 г $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ і 1,112 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Після чого доводили його до кипіння.

Концентровані розчини вітамінів готували наступним чином: 10-кратні наважки вітамінів розчиняли 10 мл дистильованої води.

Фітогормони погано розчиняються у воді. Тому попередньо 100-мг речовин розчиняли в 0,5-2,0 мл спирту, для ауксинів та гіберилінів і 0,5-1,0 мл HCl або KOH для цитокінінів, потім підігрівали до повного розчинення (окрім абсцизової кислоти і кінетину) і доводили до 100 мл об'єму (1 мл містив 1 мг

речовини) [18, 19].

Наступним був етап приготування живильного середовища. У хімічну стакан (1 л) поміщали магнітний змішувач, наливали 250-300 мл дистильованої води і додавали точно відмірену кількість маточного розчину макросолей, мікросолей, вітамінів, Fe-хелату, за допомогою сэмплера.

Доводили середовище до потрібного об'єму дистильованою водою за допомогою циліндра, виливали у колбу і додавали агар-агар 6,6 г/л та активоване вугілля 1 г/л.

Вимірювали рН середовища, якщо рН перевищувало 5,6-5,7 додавали декілька крапель 0,1N HCl, якщо нижче цього значення – 0,1N NaOH.

Ставили живильне середовище на плитку з магнітною мішалкою, і доводили до потрібного стану, коли агар-агар повністю розчинявся, а поверх розчину починала утворюватись пінка і він стає прозорий.

Готове живильне середовище розливали в завчасно простерилізовані сухим жаром пробірки на $\frac{1}{4}$ або $\frac{1}{5}$ об'єму, закривали фольгою або спеціальними кришками. Пробірки (баночки) з живильним середовищем автоклавували в автоклаві при тиску 1 атм (температура 1200°C) 15–40 хв. В залежності від об'єму [29] (табл. 2.2.).

Після проавтоклавоване живильне середовище поміщали на спеціальні стелажі в асептичних умовах або в кімнату де розташовані ламінар-боксы, для зменшення потрапляння інфекції з навколишньої мікрофлори [41].

Таблиця 2.2

Час стерилізації живильного середовища в залежності від об'єму

Об'єм на посудину, мл	Час стерилізації (121°C , 1 атм.), хв
20-50	15
75	20
150-500	25
1000	30
2000	40

2.4. Регулятори росту рослин для інтенсивність пагоноутворення

та ризогенезу мікропагонів *Drosera L.*

Утворення морфогенних структур є наступним етапом після отримання асептичної культури. При цьому використовують пазушні та верхівкові бруньки. Деякі з мікропагонів, що формувалися на цьому етапі, використовували як матеріал для подальшого отримання мікроклонів рослин та калюсу [35].

Після стерилізації з пагонів *Drosera L.* для прямого морфогенезу брали невеликі частини стебла.

Для стимуляції біохімічних реакцій у клітині використовують біологічні каталізатори – вітаміни групи В (В₁, В₆, В₁₂), С (аскорбінову кислоту), РР (нікотинову кислоту), мезоінозитол.

Тіамін (В₁) входить до складу піруватдекарбоксілази, бере участь у перетвореннях вуглеводів. Тіамініпрофосфат входить до складу ферментів окисного декарбоксілювання кетокислот (піровиноградної та кетоглутарової), є коферментом транскетолази.

Піридоксин (В₆) у вигляді фосфорнокислого ефіру входить до складу ферментів декарбоксілювання й переамінування амінокислот.

Нікотинова кислота (РР) у вигляді амідів входить до складу дегідрогеназ НАД і НАДФ, каталізуючих донорно-акцепторний ланцюг Н⁺ (відібрання Н⁺ від молекул органічних речовин).

Мезоінозитол – міститься в дріжджевому екстракті, невелика кількість – в агарі; у рослинах знаходиться у складі фосфатидилінозиту, який є компонентом клітинних мембран. Додавання до середовища невеликої кількості цього вітаміну стимулює клітинний поділ, мезоінозитол потрібен для культур тканин однодольних.

Аденін (вітамін В₄, аденінсульфат) – додають для стимуляції ембріогенезу в калюсних культурах в концентрації 40–80 мкг/л. Ця сполука підвищує ефективність цитокінінів при індукції адвентивних пагонів з калюсів чи експлантатів.

Для керування процесами формоутворення в культурі тканин необхідні регулятори росту. Їх традиційно прийнято виділяти шість груп: ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизини, етилен і брасіностероїди. Ці речовини впливають на диференціацію й дедиференціацію клітин і тканин, інціюють гістогенез, індукують розподіл і розтягування клітин, беруть участь у процесах старіння й дозрівання, а також стимулюють або пригнічують ріст і розвиток

клітинних культур. У біотехнологічних дослідженнях частіше використовують гормони, що стимулюють ріст і розвиток: ауксини, цитокініни, гібереліни [69].

Оскільки різні клітини і тканини в культурі значно відрізняються за здатністю до автономного синтезу та метаболізму окремих фітогормонів, їх ріст значною мірою залежить від екзогенних регуляторів росту. Відмінності у екзогенних ауксинах та цитокінінах дозволяють виділити декілька груп

тканин:

- тканини, які ростуть на середовищі з ауксинами (експлантати топінамбура, корені цикорію);

- тканин, для росту яких потрібні тільки цитокініни (культура кінчика корінця білого турнепса);

- тканини, для росту яких необхідні ауксини і цитокініни (культивовані первинні експлантати тююну, тканини кореня моркви);

- тканини, які ростуть на складних за вмістом компонентів середовищах;

регуляторів росту.

Умовні скорочення регуляторів росту, їх молекулярні маси та концентрації наведено в табл. 2.3.

НУБІП Україні

НУБІП Україні

НУБІП Україні

Таблиця 2.3

Регулятори росту, які використовують при культивуванні тканин та органів рослин

Клас	Назва	Скорочення	Мол. маса	Прийняті концентрації, М	Приготування вихідного розчину	Примітка
Ауксини	2,4 – Дихлорфенокси - оцтова кислота	2,4-Д	221,0	$10^{-7} - 10^{-5}$	Розчиняють в етиловому спирті і доводять до потрібного об'єму дистильованою водою	ІОК здатна легко окислюватись клітинами рослин; її рідко додають в середовище для культивування в якості єдиного ауксину
	β -індоліл – 3- оцтова кислота	ІОК	175,2	$10^{-7} - 10^{-5}$		
	Індоліл-3-масляна кислота	ІМК	203,2	$10^{-7} - 10^{-5}$		
	α – Нафтилоцтова кислота	НОК	186,2	$10^{-7} - 10^{-5}$		
Цитокініни	6 – Бензиламінопурин	БАП	225,2	$10^{-7} - 10^{-5}$	Розчиняють в 0,5 н. НСІ або 1н лузі і доводять дистильованою водою до потрібного об'єму	Зеатин термолабільний, неможна автоклавувати
	N ⁶ –(2-ізопентил)аденін	2 – іР	203,3			
	6 – Фурфуриламинопурин	кінетин	215,2	$10^{-7} - 10^{-5}$		
	4-окси-3-метил-транс-2-бутеніламінопурин	зеатин	219,3	$10^{-7} - 10^{-5}$		
	Підіазурон	ТДЗ	220,25	$10^{-7} - 10^{-5}$		
Гібереліни	Гіберелова кислота	ГК	346,4	$10^{-7} - 5 * 10^{-6}$	Легко розчиняються у воді	Термолабільні; неможна автоклавувати

Абсцизин: абсцизова кислота (АБК) – фітогормон з сильними інгібіторними властивостями, гормон стресу. Ініціює опадання листя, плодів; бере участь у фізіологічних реакціях дозрівання і старіння. Найбільший вміст цього фітогормону у хлоропластах старого листя, зрілих плодах, насінні і бруньках у стані спокою. В умовах *in vitro* стимулює дозрівання соматичних ембріодів.

Етилен – газоподібний фітогормон. Біосинтез етилена різко збільшується при травмах або стресах. Він викликає опадання листя, квітів, зав'язі і плодів, а також прискорює дозрівання плодів. Етилен може стимулювати ріст *in vitro* калюсів деяких видів рослин (тютюну, жоржин, томатів).

Брасиностероїди – це єдині з відомих гормонів рослин стероїдної природи. Подібно до ауксина, брасиностероїди стимулюють розтягнення клітин, подібно до гібереліна – посилюють ростові процеси цілої рослини, подібно до цитокініна – стимулюють ріст ізольованих сім'ядолей огірка.

В якості біологічних добавок для індукції первинного калюса можна використовувати рослинні екстракти (10–15 % від загального обсягу середовища): кокосове молоко (рідкий ендосперм кокосового горіха), витяжки з незрілих зерен кукурудзи (краще в період молочної стиглості), які містять

цитокініни – кінетин, зеатин і 1,3-дифеніл сечовину [72, 82].

На початковому етапі введення в культуру *in vitro* та регенерації використовували живильні середовища Мурасіге і Скуга (МС) з повним або зменшеним у половину вмістом мінеральних елементів [2]. Після отримання стерильних експлантів їх переносили на середовища МС доповнені окремими групами цитокінінів. Експланти вирощували в культуральній кімнаті при освітленні люмінесцентними лампами (4000 лк) на 16-годинному фотоперіоді при температурі 26°C [51].

На етапі власне мікроклонального розмноження важливим завданням є забезпечення швидкого розмноження експлантів протягом тривалого субкультування. Важливими особливостями роботи є підбір складу та співвідношення регуляторів росту у живильному середовищі. При додаванні в

живильне середовище речовин із цитокінніною активністю забезпечувалось зняття апікального домінування і формування пазушних бруньок [43, 44, 59]. Найпоширенішими цитокінінами, які використовували в даних дослідженнях на етапі масового розмноження були 6-бензиламінопурин (6-БАП) і кінетин (6-фурфуриламінопурин). Найчастіше до середовища додавали від 0,2 – 2,0 мг·л⁻¹ 6-БАП та 0,25–0,5 мг·л⁻¹ кінетину, всі концентрації встановлювали експериментально.

2.5. Вимоги та методологічні підходи до адаптації рослин *in vitro* до

умов *ex vitro*

Одним із проблемних етапів розмноження рослин методом культивування тканини є стадія адаптації, яка у рослин, отриманих *in vitro*, досить ускладнена порівняно із рослинами *in vivo*.

Рослини, які вирощені в умовах *in vitro*, відрізняються від рослин, отриманих в теплицях або у відкритому ґрунті багатьма анатомічними ознаками: тонкою кутикулою, яка містить мало воску і воскоподібних речовин; малою кількістю механічних тканин; тонким листям; провідні пучки розвинені дуже слабо; органи, які необхідні для фотосинтезу (продихи) функціонують обмежено [68].

Під час поступового зниження вологості повітря, за адаптації у рослин-регенерантів утворюються кутикули, які гальмують надмірне випаровування, утворюються нові фотосинтезуючі листки (листки, які утворені в умовах *in vitro*, здатні тільки в обмеженій мірі переходити з гетеротрофного до автотрофного способу живлення), змінюється склад пігментів [36].

Методологічні підходи, які використовують для покращення адаптації деревних рослин після культури *in vitro*:

- 1) зниження кількості вуглеводів і мінеральних речовин у живильному середовищі;
- 2) збільшення інтенсивності освітлення;
- 3) препарати для знешкодження патогенів;

4) інокуляцію мікоризними грибами.

5) укорінення *ex vitro*.

Розроблені способи об'єднання етапів укорінення і адаптації – так зване укорінення *ex vitro*. Процедура дозволяє виключити стадію укорінення *in vitro*, тим самим зменшивши часові затрати і знизити собівартість процесу мікро розмноження [76].

Упродовж адаптації рослин-регенерантів до умов *in situ* важливе значення має забезпечення відповідних рівнів живлення рослин: мінерального, повітряного, водного та дотримання поступової зміни температури та вологості повітря оточуючого середовища. Серед них істотне значення має субстрат.

Вимоги до субстрату:

- повинен містити достатньо елементів мінерального живлення;
- мати добру водо- та повітропроникність, теплопровідність;
- вологоємність, яка забезпечувала б достатню розчинність елементів мінерального живлення і сприяла їх рівномірному розміщенню;
- повинен бути зручним у роботі, доступним і відносно дешевим.

Як субстрати для адаптації рослин-регенерантів використовують: річковий пісок (рН майже 7,0), дерновий ґрунт (рН 7–7,5), торф (верховий рН 3,5–5,5), перліт, вермикуліт, суміш сфагнового моху, коковий субстрат та мінеральну вату. Як правило, для більшості рослин застосовують суміш субстратів. Вологість субстрату підбирають експериментально для кожного виду рослин [28].

Найсприятливішою порою для висаджування рослин з пробірки у ґрунт є весна або початок літа. Не слід тримати рослини без необхідності у стерильній культурі, бо це негативно впливає на їх приживлюваність і подальший ріст.

Методика ступінчастої адаптації рослин-регенерантів:

1) адаптація до умов закритого ґрунту (*in situ, ex vitro*);

2) адаптація до умов відкритого ґрунту (*in vivo*).

Рослини, що мають 2–3 листки і добре розвинену кореневу систему, обережно виймають з колб довгим пінцетом або спеціальним гачком, корені

відмивають від живильного середовища (для запобігання заселення бактеріями, які можуть спричинити її загнивання і відмирання), занурюють на кілька секунд у світло-рожевий розчин KMnO_4 та висаджують у стерильний субстрат.

Попередньо для отримання однорідного садивного матеріалу слід відсортувати рослини за розміром: великі, середні та невеликі. Режим адаптації для кожної конкретної рослини визначають експериментально з урахування біоекологічних особливостей рослин.

Культивують рослини-регенеранти у спеціальній теплиці, де можна регулювати температуру ($22\text{--}25^\circ\text{C}$) і вологість повітря ($65\text{--}80\%$). Для кращих приживлюваності й росту доцільно розміщувати їх в умовах підвищеної вологості, які забезпечують за допомогою туманоутворювальних пристроїв. Рослини-регенеранти слід підживлювати розчинами Кнудсона, Чеснокова, Ольсена (табл. 2.4.) або розчином $\frac{1}{2}$ концентрації мінеральних солей за МС.

Таблиця 2.4

Розчини призначені для підживлення рослин-регенерантів (мг/л)

Розчин	Чеснокова	Розчин Ольсена	Середовище Кнудсона
KNO_3	0,400	KNO_3	0,149
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,500	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,168
NH_4NO_3	0,160	KH_2PO_4	0,023
MgSO_4	0,280	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,101
FeCl_3	0,006	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0004
H_3BO_3	0,0007	H_3BO_3	0,0004
ZnSO_4	0,00006	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0002
MnSO_4	0,0005	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0001
CuSO_4	0,00002	$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$	0,00005
		Fe-цитрат 1%	5,0 (cm^3)
			$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
			0,331
			$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
			500,0
			$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
			694,4
			KH_2PO_4
			250,0
			MgSO_4 б/в
			122,125
			H_3BO_3
			0,056
			$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
			0,0624
			$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
			25,00
			MnSO_4 б/в
			5,078
			MoO_3
			0,016

Адаптація в умовах *in situ* проводиться протягом 2–8 тижнів. Після закінчення адаптації або через кожні 7 дб проводять оцінку інтенсивності росту та морфологічних особливостей за наступними показниками. Добре

адаптовані рослини-регенеранти можна висаджувати у відкритий ґрунт для створення розсадників, маточників, формування садово-паркових і ландшафтних насаджень або комерційної реалізації у контейнерах.

НУБІП У КРАЇНИ

НУБІП У КРАЇНИ

НУБІП У КРАЇНИ

НУБІП У КРАЇНИ

НУБІП У КРАЇНИ

НУБІП У КРАЇНИ

РОЗДІЛ 3

НУБІП України

ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ *DROSERA* L. В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* ТА АДАПТАЦІЇ САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ *EX VITRO*

Збереження біорізноманіття є основною задачею в умовах швидких змін навколишнього середовища. Один із способів досягнення цього є метод мікроклонального розмноження [70].

Біотехнологічні методи *in vitro* дають змогу швидко розмножити рослини, вивільнити їх від бактеріальних та вірусних інфекцій, збільшити коефіцієнт розмноження та отримати масовий, морфологічно та генетично-однорідний садивний матеріал незалежно від сезону, характеру і періодичності плодоношення, якості насіння та факторів навколишнього середовища [18].

3.1 Особливості стерилізації експлантів й отримання асептичної культури тканин та органів *Drosera* L.

Першим етапом біотехнологічних досліджень, пов'язаних з культурою тканин рослин *in vitro*, є добір ефективних способів стерилізації та отримання стерильно чистої культури, що є невід'ємною частиною на перших етапах стерилізації, від якої залежить подальший ріст і розвиток рослин-регенерантів та здатність їх до морфогенезу в подальшому розмноження.

У якості донорів рослинного матеріалу були використані рослини *Drosera spatulata* L. та *Drosera aliciae* L. ізольовані із природного ареалу та культивованих у закритому ґрунті (рис. 3.1.) Для отримання асептичної культури росички відбирали здорові візуально нормальні не ушкоджені бактеріальними, вірусними і грибними патогенами рослини. На початку стерилізації пагони *Drosera spatulata* L. та *Drosera aliciae* L. довжиною 3 см з двома – трьома міжвузлями обробляли розчином детергенту для видалення

поверхневих забруднень після чого промивали в проточній воді і ополіскували дистильованою водою [18, 70].



Рис 3.1. Рослина-донор *D. spatulata*

Результат отримання стерильних життєздатних рослин в культурі залежить від стериліанта, його концентрації та експозиції. Оптимальний добір стерилізуючої речовини полягає в тому, щоб вона знешкоджувала патогенну бактеріальну та грибну мікрофлору на поверхні рослин і якомога менше шкодила рослинним тканинам і органам всередині [67].

Під час експериментальних робіт підбирали стерилізуючий розчин, який легко вимивався з тканин дистильованою водою або розкладався, щоб не отруювати їх [2, 34]. З цієї метою для отримання стерильного вихідного матеріалу використовували загальноприйняті методи. У якості стерилізуючих речовин використовували 70% етиловий спирт, 1,7% та 1,25% розчин гіпохлориду натрію (NaClO) ("Domestos") (табл. 3.1.), розчини різної концентрації пероксиду водню – H_2O_2 12,5% та 25,0% та нітрату срібла – AgNO_3 1,0%. Для досягнення поставленої мети ці реагенти використовували як окремо, так і в комбінації. Кожен із стерилізуючих розчинів та час витримки, проявляв різну дію на експланти *Drosera L.*

Таблиця 3.1

Умови стерилізації експлантатів *Drosera L.* з використанням розчину NaClO

Стерилізуючі речовини	Концентрація, %		Експозиція, хв	
	1 варіант	2 варіант	1 варіант	2 варіант
Domestos (5%-й NaClO)	1,25	1,7	15	20
C ₂ H ₅ OH	70	70	1	1

Режим стерилізації з використання 70% етанол з часом експозиції 30 секунд і розчином "Domestos" у співвідношенні 1:3 – 20 хв й триразовим промиванням у стерильній воді – не пошкоджував тканин і не пригнічував розвитку рослин та забезпечував стерильність експлантатів 60%. Визначимо, що послідовність та експозицію використання різних стерилізуючих реагентів визначали у процесі роботи емпіричним методом залежно від типу експлантату та ступеню його інфікованості.

Упродовж 5-7 діб у кожному з варіантів визначали ефективність стерилізації, тобто частку стерильних та інфікованих об'єктів, а протягом 27-30 діб життєздатність введених експлантатів, яка становила 80% (табл. 3.2.).

Таблиця 3.2

Оцінка ефективності стерилізації експлантатів наприкінці першого тижня культивування з використанням NaClO

№п/п	Концентрація гіпохлориду натрію	Час стерилізації, хв.	Загальна кількість експлантатів, шт.	Кількість життєздатних експлантатів, шт.	Кількість інфікованих експлантатів, шт.	Кількість (вс) життєздатних експлантатів, шт.	Ефективність стерилізації, %
1	1,25%	15	10	9	10	1	-
2	1,7%	20	10	8	-	2	65%

Режим стерилізації з використання 70% етанол з часом експозиції 30 сек і розчином AgNO₃ 1,0% з експозицією 5-7-10 хв й триразовим промиванням у

стерильній воді (тричі по 10 хв впливав на рослини по різному). Витримування рослини 10 хвилин призвело до повної втрати рослинного матеріалу, в результаті всі рослини були стерильні, але не життєздатні (табл. 3.3.). в свою чергу 7 хв – дало змогу отримати 50% життєздатних експлантів, а використання розчину нітрату срібла з експозицією 5 хвилин виявився найбільш оптимальний. За таких умов кількість асептичних та здатних до регенерації рослин становила 80 %

Таблиця 3.3

Стерилізація експлантів *Drosera L.* з використанням розчину AgNO_3 1,0%

Час експозиції	Розчини для стерилізації	Кількість експлантів, шт	Кількість експлантів, шт				
			Перед стерилізацією	на 3 добу		на 7 добу	
				Ж	З	Ж	З
10 хв 5 хв 3 по 5 хв	детергент AgNO_3 H_2O	10	10	-	8	2	
10 хв 7 хв 3 по 5 хв	детергент AgNO_3 H_2O	10	2	7	5	5	
10 хв 10 хв 3 по 5 хв	детергент AgNO_3 H_2O	10	-	10	-	10	

Примітка* Ж – життєздатні; З – загиблі.

Для визначення найоптимальнішого способу стерилізації, також було проведено паралельно із двома попередніми схемами стерилізацію, стерилізацію із використанням 30% розчину пероксиду водню (концентрату) у двох варіантах співвідношення 1:1 та 1:2 з різним часом витримки (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Стерилізація експлантів *Drosera L.* з використанням 50% розчину H_2O_2

Концентрація	Р-н для стерилізації	Час експозиції, хв	Кількість експлантів, шт	Життєздатних на 3 добу, шт	Загиблих на 3 добу, шт
1:1	70% спирт H_2O_2 25,0% Відмивання	30 сек. 8 10	10	8	3
1:2	70% спирт H_2O_2 12,5% Відмивання	30 сек. 15 10	10	9	1

За даними таблиці видно, що використання схема забезпечує найбільший вихід асептичних експлантів на 3 добу після введення 80-90%. При цьому відмивання експлантів від залишків стерилізуючого розчину можна проводити одноразово. Такий спосіб найменш токсичний та найбільш дешевий [79].

У результаті дослідження з підбору оптимальних умов отримання асептичної та здатної до росту культури експлантів *Drosera L.* встановлено декілька схем стерилізацій із використанням різних за складом еполук:

1. Стерилізація в 0,1 % розчині $AgNO_3$ 5 хв та триразовим відмиванням по 5 хв;
2. Витримання у розчині 70 % спирт 30 сек.+ 12,5% р-н H_2O_2 з одноразовим відмивання 10 хв.

За таких умов вихід асептичних експлантів складав 80-90% й забезпечував максимальну життєздатність на наступних етапах.

Після стерилізації експланти культивували на безгормональному живильному середовищі МС в культуральній кімнаті при температурі 25-26° С, вологості 70-80% і 16 – ти годинному фотоперіоді

3.2. Індукція органогенезу з культури меристем *Drosera* L.

Зелені пагони асептичних рослин, отриманні після попередньої їх стерилізації, розрізали на живці довжиною 3-5 мм з однією пазушкою брунькою і верхівковою та поміщали в пробірки із середовищем МС без регуляторів росту.

Введення в культуру проводили пагонами, листками або їх частинами, розділеними на сегменти.

Культивування проводили в термальній (культуральній) камері при температурі 25⁰С, вологості 70-80% і 16 годинному фотоперіоді. На шостий день культивування прокидаються пазушні бруньки і 10-14 день мають розміри 0,2 – 0,3 мм (рис. 3.2).



Рис. 3.2. Первинні мікропагони *D. spatulata*

Вихід асептичних експлантатів становив 90-100%. Через 2-3 доби спостерігали виділення фенолів (рис. 3.3.), що негативно впливало на ріст і розвиток експлантатів. Щоб цього уникнути ми додали в живильного середовища МС активоване вугілля (1 г/л) адсорбційні властивості якого сприяють рівномірному розподілу поживних елементів у середовищі та видаленню продуктів метаболізму. Крім того, додавання вугілля забезпечує затемнення середовища, сприяє кращому розвитку коренів. На середовищі з активованим вугіллям концентрація водневих іонів за тривалого культивування тканин або рослин – регенерантів не змінюється [73].



Рис. 3.3. Виділення фенолів на мікропагонах *D. spatulate*

Для індукції морфогенезу пагони розділяли на сегменти і переносили на живильні середовища які містили різний склад і концентрацію фітогормонів (табл. 3.5.).

Таблиця 3.5

Склад компонентів живильного середовища для індукції органогенезу

№ п/п	Компоненти ЖС	Концентрація по варіантам середовища, мг·л ⁻¹				
		1	2	3	4	5
1	Макроелементи МС	100	100	30	100	100
2	Мікроелементи МС	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3	Вітаміни МС	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
4	Fe хелат	10	5	5	10	5
5	БАП	1,0	-	-	1,0	-
6	ГК	0,1	-	-	-	-
7	Гліцин	-	-	-	1,0	-
8	Кінегін	-	0,25	-	0,0	0,25
9	ЮК	0,5	-	-	-	-
10	Мезоінозит, г·л ⁻¹	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
11	Цукроза, г·л ⁻¹	30	20	20	30	20
12	Агар, г·л ⁻¹	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
13	Активоване вугілля, г·л ⁻¹	5	-	-	5	5
14	ІМК	-	-	0,1	0,2	-

pH 5,6-5,7

Індукція морфогенезу в значній мірі залежить від складу живильного середовища і проходила в основному на базових середовищах МС.

Культивування проводили протягом 21 дня (рис 3.4., 3.5., 3.6.). Результати обліку наведені в таблицях 3.6.



Рис. 3.4. Рослини-регенеранти *D. spatulate* на морфогенному середовищі на 14 день культивування



Рис. 3.5. Рослини-регенеранти *D. spatulate* на морфогенному середовищі на 21 день культивування



Рис. 3.6. Рослини-регенеранти *D. aliciae* на морфогенному середовищі на 21 день культивування

Таблиця 3.6
Результати спостережень за розвитком експлантів на різних варіантах середовища (21 день культивування)

№ п/п	Склад ЖС (PPP)	Концентрація гормонів, мг·л ⁻¹	Кількість експлантів, шт	Утворення пагонів		Утворення коренів	
				шт	см	шт	см
1	БАП ГК ЮК	1,0 0,1 0,5	2	2,7±0,9	0,5±1,3	-	-
2	Кін	0,25	2	3,8±0,56	2,3±1,1	2,5±4,3	1,6±3,2
3	ІМК	0,1	2	2,8±3,6	0,62±0,8	3,8±3,1	1,3±2,4
4	ІМК БАП	0,2 1,0	2	3,4±3,3	0,26±0,5	-	-
5	Кін АК	0,25 5,0	2	4,9±1,5	2,6±1,5	2,5±1,5	2,8±1,2

Примітка * АК- аскорбінова кислота; PPP – регулятори росту рослин: ЖС – живильне середовище

Аналізуючи дані 3.5. та 3.6. приходимо до висновку, що морфогенез *D. spatulate* та *D. aliciae* найінтенсивніше проходить на середовищі з

доповненням кінетином $0,25 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$, додаванням аскорбінової кислоти $5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$, експлантати мають розміри $2,5\text{-}2,8 \text{ см}$ насиченого зеленого забарвлення та утворення коренів $2\text{-}3$ шт на експлантаті по $3,5\text{-}4,9 \text{ см}$ на середовищі $\frac{1}{2}\text{МС}3$ без

додавання аскорбінової кислоти помітне виділення фенолів. При доповненні до середовища БАП $1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ + ГК $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ відмічали ослаблення експлантів, $0,4\text{-}0,6 \text{ см}$, тонкі листки деформовані, світлого забарвлення. На середовищі з додаванням $0,1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ІМК експланти також були тонкі, слабкі – $0,4\text{-}0,7 \text{ см}$, але спостерігається формування коренів (на одному експлантаті до $3\text{-}5$ штук).

На ЖС доповненого $0,2 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ІМК + $1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП не спостерігаємо суттєвої різниці в розмірах експлантів, корені значно менші за розмірів. Найоптимальнішим виявилася середовище з використанням $0,25 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ кінетину та додавання аскорбінової кислоти $5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$, а також безгормональне ЖС МЛ з вдвічі зменшеним складом макроелементів. На даному середовищі спостерігали активний ріст та індукцію ризогенезу (рис. 3.7.).



Рис. 3.7. Спонтанне формування коренів на безгормональному ЖС МС3 $\frac{1}{2}$ макро МС

На 19–20 добу культивування мали сформовані рослини-регенеранти з розвиненим пагоном висотою до 8 см з добре розвинутою кореневою системою. Одержані рослини є матеріалом для подальшого клонування.

3.3. Вплив складу живильного середовища на укорінення рослин-регенерантів *Drosera L. in vitro*

Після успішного отримання стерильних життєздатних рослин-регенерантів *D. spatulate* та *D. aliciae* проводили підбір середовищ для індукції ризогенезу. Для цього стерильні рослини розділяли на окремі субодиниці й висаджували на ЖС різні за складом: МС + ІОК ($0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$); МС + ІМК $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ + ІОК $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$; МС + ІМК $4 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ + $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП; $6/1$ МС та $1/2$ МС (табл. 3.7.).

Таблиця 3.7

Вплив різних регуляторів росту рослин на життєздатність, коефіцієнт розмноження та ризогенез мікропагонів *D. spatulate* та *D. aliciae*

Середовище	Життєздатні мікропагони		Коефіцієнт розмноження	Наявність кореневої системи
	шт	%		
Безгормональне МС	10	100	10	є
$1/2$ МС	10	100	8	є
МС + БАП $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$	2	20	2	відсутня
МС + БАП $1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$	3	30	3	відсутня
МС + БАП $1,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$	1	10	4	відсутня
МС + кінетин $1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$	2,5	25	4	відсутня
МС + кінетин $2 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$	3	30	8	відсутня
МС + кінетин $3 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$	8	80	6	відсутня
МС + ІМК + $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$	10	100%	5	є

Як видно з таблиці всі три варіанти є успішні, відрізняються вони лише за вмістом чи відсутністю гормонів. Із досліджуваних ауксинів позитивно впливав

на формування кореневої системи ІМК, при цьому розвиток рослин суттєво не змінювався.

У результаті досліджень найвищий коефіцієнт розмноження (1:8) та формування кореневої системи було отримано на безгормональному середовищі з вдвічі зменшеним вмістом макроелементів. Також на даному ЖС (1/2 МС) отримано 100% життєздатних мікропагонів з кореневою системою, а на інших спостерігався низький відсоток життєздатних мікроклонів, низький коефіцієнт розмноження та відсутність кореневої системи (рис. 3.8.).



Рис. 3.8. Формування розвиненої кореневої системи та індукція росту

мікропагонів на ЖС $\frac{1}{2}$ МС

Окрім екзогенного цитокініну вивчали, також речовини ауксинового типу дії ІМК + 0,5 мг·л⁻¹. При культивуванні на середовищі з ауксинами експланти

вже через два тижні утворили розвинену кореневу систему та вдвічі збільшився

їх лінійний приріст (рис. 3.9.).



Рис. 3.9. Формування кореневої системи на ЖС МС

доповнене $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ІМК

Підсумовуючи отримані результати, найефективнішим можна вважати ЖС $\frac{1}{2}$ МС, яке можна використовувати як і для культивування рослин так і для формування коренів, виключенням є лише вимушена індукція (рис. 3.10.).



Рис. 3.10. Формування розвиненої кореневої системи та індукція росту мікропагонів на ЖС $\frac{1}{2}$ МС

За необхідності швидкого коренеутворення з метою перенесення рослин у ґрунт за певний час краще використовувати ЖС з додаванням $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ІМК.

3.4. Адаптація рослин-регенерантів *Drosera L.* до умов *ex vitro*

Адаптація рослин до різноманітних, зокрема, стресових умов навколишнього середовища, є однією з ключових етапів та проблемних водночас, сучасної теоретичної і практичної біотехнології мікроклонального розмноження.

У сучасних дослідженнях з мікроклонального розмноження, процес перенесення рослин-регенерантів у природне середовище виділяють як окремий етап морфогенезу [77]. Це підкреслює його важливе значення для успішного

використання методу при розмноженні культур. Фізіологічний зміст процесів, які відбуваються у рослині на цьому етапі пов'язаний з адаптацією рослинного організму. Пересадка інтактних рослин *in vitro* в умови *ex vitro* призводить до

виникнення стресу, оскільки їх органи, сформовані за високої вологості повітря та низької інтенсивності освітлення, не можуть адекватно функціонувати у нових

умовах. Показано, що поглинання CO_2 після трансплантації рослин в умови *ex vitro* посилюється тільки в новоутворених листках, тоді як у листках, сформованих рослиною в умовах *in vitro*, інтенсивність поглинання майже не

змінюється [27]. У природних умовах рослини *in vitro* швидше втрачають вологу

через аномалію дихального апарату, також пов'язану з впливом культивування у закритих посудинах [54]. Очевидно, що для виживання на етапі *in vivo* рослина має проявити свій адаптаційний потенціал

Стійкість рослинного організму до несприятливих умов може проявлятися лише при наявності у нього певних адаптаційних можливостей,

сукупність яких складає адаптаційний потенціал рослини [78]. Відомо, що неспецифічна стійкість рослин до несприятливих чинників може бути індукована під впливом речовин з антистресовим ефектом [18].

Створення оптимальних умови адаптації до умов *ex vitro* рослин, отриманих в умовах *in vitro* є одним із найважливіших етапів.

При перенесенні рослин-регенерантів з стерильних умов культивування у нестерильні умови потребують попередньої підготовки, розробки основних підходів, догляду і регульованих умов культивування після адаптації.

Необхідність створення таких умов адаптації рослин до умов *ex vitro*, за яких можна отримати найбільший відсоток приживлення.

У дослідженнях основну увагу приділяли встановленню оптимального періоду для розвитку рослин-регенерантів, під час якої рослини найпристосованіші до перенесення у нестерильні умови. Також підбирали оптимальні суміші для адаптації й визначали впливу складу субстрату на приживлюваність рослин.

Протягом усього етапу рослин-регенерантів готували до пересадки в ґрунт.

Для адаптації отриманих рослин-регенерантів у дослідженнях було використано такі субстрати та їхні суміші (табл. 3.8., рис. 3.11.).

Таблиця 3.8

**Варіанти субстратів для адаптації рослин-регенерантів
D. aliciae, *D. spatulate***

Варіанти	Назви субстрату	Вміст компонентів у субстраті	Приживлюваність
1	кокосовий субстрат	100	75
2	кокосовий субстрат сфагнум	50 50	87
3	кокосовий субстрат	50	90
4	перліт субстрат для хижих рослин	50 50	90
5	terrawet	100	56
6	вермикуліт terrawet	50 50	40
7	перліт terrawet	50 50	36



Рис. 3.11. Субстрати для адаптації рослин

Під час підготовки до перенесення в умови *ex vitro* пробірки з укоріненими рослинами з добре розвиненим пагоном та 10–15 листками заливали дистильованою водою (1/3 банки води) та залишали на 1 годину відкритими. Після цього обережно, щоб не пошкодити кореневу систему, виймали з пробірок і промивали коріння від залишків агару. Після цього коріння занурювали у слабкий розчин перманганату калію ($KMnO_4$) й висаджували у контейнери, заповнені субстратом.

Об'єм контейнера підбирали залежно від розміру рослини-регенеранта.

Після висадки їх переносили в адаптаційну кімнату і розташовували у спеціально підготовлених камерах, де температура, освітлення, вологість ґрунту та повітря були регульованими.

За результатами експериментальних робіт оптимальний ріст рослин спостерігали на ґрунтосумішах такого складу: кокосовий субстрат, перліт у співвідношенні 2:1, ефективність адаптації була 90%. Такі ж результати зафіксовано на субстраті для хижих рослин. Достатньо гарні результати

отримали на суміші кокосовий субстрат сфагнум (1:1) – 87% проросли менші на кокосовому субстраті без додавання сфагнуму – 75%.

За результатами досліджень оптимальними є такі параметри рослин-регенерантів, коли корінь має довжину 3–5 см, а рослина розмір 2-4 см. Краще адаптовувати рослини на 3-4 пасажі (рис. 3.12.).



Рис. 3.12. Оптимальні рослини-регенеранти для адаптації в умовах ex vitro

Приживлюваність залежала від стійкості рослин до пониженої вологості.

Велике значення при адаптації рослин до умов ex vitro має вологоємність ґрунту.

Відмічали частковий відпад рослин, що було пов'язано із втратою ними води. Тому при перенесенні у нестерильні умови рослини необхідно розподіляти на невеликі партії і висаджувати кожну окремо. За результатами спостережень, рослини необхідно зволожувати, нечастіше ніж 1 раз тиждень.

Не менш важливим фактором, що впливає на адаптацію, є вологість повітря. Її підтримували у перші 4–6 діб у межах 80–90%. Через 7 діб вологість повітря поступово зменшували до 80–70%, даючи рослинам можливість

НУБІП УКРАЇНИ

пристосуватися до умов з меншою вологістю повітря. Після 14 днів культивування рослини відкривали повністю й адаптували до умов навколишнього середовища. Дотримання оптимальних умов вологості та відповідного субстрату дозволив досягти біля 95% приживлення рослин (рис. 3.13.).



Рис. 3.13. Адаптовані рослини-регенеранти *D. aliciae*, *D. spatulate*

НУБІП УКРАЇНИ

Багато ростових процесів у рослин відбувається під дією світла та температури. Від температурного режиму залежить перебіг основних процесів життєдіяльності, а біологічна дія світла на рослини зумовлена його спектральним складом, інтенсивністю, добовою і сезонною періодичністю. В адаптаційних умовах нормальний ріст і розвиток рослин спостерігали при інтенсивності освітлення 3–4 тис. люкс та 16-годинному фотоперіоді.

НУБІП УКРАЇНИ

Було встановлено, що коливання температури повітря негативно впливало на приживлення рослин. Одержані рослини-регенеранти утримували

при температурі $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$. Така температура була лише на 23°C нижча за ту, при якій їх культивували в культурі in vitro, і сприяла нормальному росту і розвитку рослин (рис. 3.14.)



Рис. 3.14. Рослини-регенеранти *DD. aliciae*, *D. spatulate* на 21 день

після адаптації

Процес адаптації рослин тривав 21 добу. У результаті адаптації від 5-15 % рослин гинуло. Рослини, які пристосувалися до нестерильних умов, переносили на стелажі, де регульованими були лише світло та температура. Вологість повітря була значно меншою за норму, проте у рослин відмічали позитивну динаміку, зокрема, наростання вегетативної маси та галуження кореневої системи.

У результаті, вдалося підібрати оптимальні умови для адаптації та дорощування рослин-регенератів *D. aliciae*, *D. spatulate* й одержання максимальної кількості адаптованих рослин в умовах закритого ґрунту.

ВИСНОВКИ

Проведені дослідження дозволили отримати життєздатні асептичні мікропагони *in vitro* *D. spatulate* та *D. aliciae*. Вивчено фактори, які впливають на регенерацію мікропагонів у вертикальній площині. Досліджено реалізацією морфогенетичного потенціалу експлантів на етапі введення в культуру, безпосередньо мікроклонального розмноження та укорінення.

У результаті проведених досліджень:

1. Відпрацьовано методику стерилізації експлантів *D. spatulate* та *D. aliciae* з 80-90 % отриманням асептичного матеріалу. Найкращим режимом стерилізації в 0,1% розчині AgNO_3 5 хв та триразовим відмиванням по 5 хв; та витримання у розчині 70 % спирт 30 сек + 12,5% р-н H_2O_2 з одноразовим відмивання 10 хв.

2. Вивчено вплив різних варіантів стерилізації на розвиток мікропагонів *D. spatulate* та *D. aliciae* й підбрано оптимальне живильне середовище на етапі введення у культуру *in vitro* *D. spatulate* та *D. aliciae* (МС з додаванням аскорбінової кислоти 5 мг·л⁻¹).

3. Досліджено регенерацію мікропагонів *D. spatulate* та *D. aliciae* (у залежності від того, яка частина пагона служила експлантатом та складу ЖС).

4. Встановлено, що для регенерації рослин з меристемних тканин експлантів найкраще використовувати ЖС МС+БАП 0,5 мг·л⁻¹+ІОК 0,5 мг·л⁻¹, де коефіцієнт розмноження становив 1:20 з частотою 70%.

5. Для закладання додаткових бруньок з метою отримання значної кількості мікропагонів оптимальним є ЖС доповнене 0,25 мг·л⁻¹ кінетину та просто 6/г МС дозволило отримати 100% регенерацію рослин на експлантах з коефіцієнтом розмноження 1:12.

6. Вивчаючи вплив цитокінінів на мікроклональне розмноження *D. spatulate* та *D. aliciae* було встановлено, що розвиток та індукція множинного пагоноутворення *in vitro* найкраще проходить на безгормональному середовищі МС після 4-5 пасажу.

7. Для збільшення коефіцієнту розмноження та утворення кореневої системи необхідно вводити в середовище ауксини. ІМК концентрації $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$

8. Найбільша частка укорінених мікро-рослин отримано на ЖС з додаванням ІМК у концентрації $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ та $\frac{1}{2}$ МС, де ефективність укорінення рослин-регенерантів становила 65-80 % з середньою довжина кореневої 2,0-4,5 см.

9. Встановлено найбільш сприятливі умови адаптації рослин-регенерантів *D. spatulate* та *D. aliciae in vitro* до умов *ex vitro*. Найкращим виявилась поступова адаптація рослин-регенерантів, що супроводжувались

втримуванням рослин упродовж 7-14 діб в умовах ступінчастої адаптації із зміною вологості, температури та освітлення й на 21 день, переведення в звичайні умови теплиці (кімнатні умови).

6. Оптимальним субстратом для адаптації рослин *D. spatulate* та *D. aliciae* до умов *ex vitro* є субстрат для хижих рослин та суміш кокосового субстрату з перлітом у співвідношенні 1:1, приживлюваності рослин становила 95%

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Андриенко Т. Л., Шеляг-Сосонко Ю. Р. Растительный мир Полесья в аспекте его охраны. Киев : Наук. думка, 1983. 216 с.

2. Андриенко Т. Л. Комахоїдні рослини України / за ред. В. В. Протопопової. К. : Альтерпрес, 2010. 80 с.

3. Барбарич А. П. Семейство Реслянковые (Росичкові) – *Droseraceae* / *Определитель высших растений Украины*. К. : Наук. думка, 1987. С. 156.

4. Бейдеман И.М. Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ. Новосибирск: Наука, 1974. –155 с.

5. Білоус С. Ю. Особливості отримання асептичної культури осики в умовах *in vitro* / Матер. Міжн. Конф. Наук.-педагог. прац., наук. співроб. та молод. вчених, 25 берез. 2011 р. К. 2011. С. 151-15.

6. Білоус С. Ю. Вплив складу живильного середовища на ризогенез у рослин в умовах *in vitro* / *Біоресурси і природокористування*. 2012. № 3-4. С. 94-98.

7. Білоус С. Ю., Олійник О.О., Гунько О.О. Збереження представників роду *Drosera* L. з використанням біотехнологічних методів «*Ukrainian Journal of Forest and Wood Science*». 2021. Vol. 11, № 2. С. 71-80.

<http://dx.doi.org/10.31548/forest2021.02.00>

8. Борділовський Є.І. Родина Росичкові – *Droseraceae* DC. *Флора України*. К. : Вид-во АН УРСР. 1953. Т. 5. С. 436-445

9. Бутенко Р. Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. М. : Наука, 1975. 51с.

10. Бутенко Р.Г. Клеточные и молекулярные аспекты морфогенеза растений *in vitro* / Чайлахан. Первое чтение. Пушкин : НИЦ, 1994. С. 7-26.

11. Быченкова Э. А., Давид А. А. Каллусообразование и органогенез в тканях листа, культивируемого *in vitro*. М. : Наука, 1978. 283 с.

12. Воршилов В. Н. Определитель растений советского Дальнего Востока. М. : Наука, 1982. 672 с.

13. Денисова Г. А. Семейство Росянковые (Droseraceae). *Жизнь растений*. 1981. Т. 5, ч. 2. М. : Просвещение. С. 171–175.

14. Денисова Г. А. Порядок росянковые. *Жизнь растений*. 1981. Т. 5, ч. 2. М. : Просвещение. С. 170–175.

15. Дубина Д. В. та ін. Дунайський заповідник. Рослинний світ. Київ : Фітосоціоцентр, 2003. –459 с.

16. Дубовик М. В. Київський Ботанічний сад ім. акад. О. В. Феміна. К. : Мистецтво, 1938. С. 43–52.

17. Иконников С. С. Семейство *Droseraceae* Salisb. Росянковые. Флора Восточной Европы. Т. 10. Спб., 2001. С. 302-305.

18. Калинин Ф. Л., Кушнир Г. И., Сарнацкая В. В. Технология микрклонального размножения растений. К. : Наукова думка, 1992. – 228 с.

19. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. К. : Наук. думка, 1980. 487 с.

20. Колдар Л. А. Інтродукція видів роду *Drosera* L. у Правобережному Лісостепу України та перспективи використання їх у зеленому будівництві. Умань : УВПІ, 2006. 158 с.

21. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. *Генетичні та фізіолого-біохімічні основи*. К. : Логос, 2005. 730 с.

22. Мусієнко М. М., Панюта О. О. Біотехнологія рослин: навчальний посібник. – К. : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. 114 с.

23. Мусієнко М. М. Фізіологія рослин. К. : Фітосоціоцентр, 2001. С. 53-58.

24. Определитель высших растений Украины. Киев: Наук. думка, 1987. 548 с.

25. Патент на корисну модель, Спосіб стерилізації експлантів *Populus tremula* L. зелені корої.; власник Національний університет біоресурсів і природокористування України : пат. № 94702 України : МПК (2014.01) А01Н 4/00; № u2014/06575; заявл. 12.06.14; опубл. 25.11.14, Бюл. № 22.

26. Чорній І. І., Буджак В. В., Андриєнко Т. Л. Болота Буковинських Карпат. *Укр. ботан. журн.* 2008. 65, №2. С. 180–189.

27. Якушкина, Н. И. Физиология растений: учеб. пособие для студентов биол. спец. высш. пед. учеб. Заведений, 2-е изд., перераб. М. : Просвещение, 1993. 335 с.

28. Andrus R. E. Some aspects of Sphagnum ecology. *Canadian Journal of Botany*. 1986, 64. P. 416-426

29. Ayuga C. E. Contribucion al estudio de flavonoides en *D. rotundifolia* L. *An R Acad Farm.* 1985, 51. P. 321–326.

30. Banasiuk R., Kawiak A., Króllicka A. *In vitro* cultures of carnivorous plants from the *Drosera* and *Dionaea* genus for the production of biologically active secondary metabolites. *BioTechnologia*, 2012. P. 87–96.

31. Baranyai B., Joosten H. Biology, ecology, use, conservation and cultivation of round-leaved sundew (*Drosera rotundifolia* L.) / A review. *Mires Peat*. 2016, 219 p.

32. Baranyai B., Bäcker C., Reich C. The production of 7-methyljuglone, plumbagin and quercetin in wild and cultivated *Drosera rotundifolia* and *Drosera intermedia*. *Mires Peat*, 2016. P. 1–8.

33. Babula P., Adam, V., Havel, L. Noteworthy secondary metabolites naphthoquinones – their occurrence, pharmacological properties and analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2009, 5(1). P. 47–68

34. Bekesiova I., Nap J.-P., Mlynarova L. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1999, 17. P. 269-277.

35. Brewer J.S. Effects of fire, competition and soil disturbances on regeneration of a carnivorous plant (*Drosera capillaris*). *American Midland Naturalist*. 1999, 141. P. 28-42.

36. Coňu C. Personal communication regarding *Drosera rotundifolia* genetics and habitat characteristics. 2004, 36-89.

37. Darwin F. Experiments on the nutrition of *Drosera rotundifolia*. *Journal of the Linnean Society Botany*. 1878, P.17-32.

38. Durechova D., Kacaniová M., Terentjeva M. Antibacterial activity of *Drosera rotundifolia* L. against gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2016, P. 202.

39. Egan, P.A., Van der Kooy F. Phytochemistry of the carnivorous sundew genus *Drosera* (Droseraceae) –future perspectives and ethnopharmacological relevance. *Chem. Biodivers.* 2013. P. 1774–1790.

40. Engelhardt T. L. Pollination ecology of the round-leaved sundew, *Drosera rotundifolia* L. (*Droseraceae*), in Sequoia National Park / California (California State University – Fullerton. Fullerton: CA, 1998 300 p..

41. Hamet-Ahti L., Suominen J., Ulvinen T. Field Flora of Finland (*Finnish Museums of Natural History, Botanical Museum: Helsinki*. Finland, 1998.

42. Heleno S.A., Martins A., Queiroz M.J.R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds / A review. *Food Chem.* 2015, P. 501–513.

43. Jadczyk, P., Kulpa D., Zbrojewska A. In Vitro Micropropagation of *Drosera rotundifolia*. *World Sci. News.* 2017, P.75–85.

44. Kacaniová M., Ďurechová D., Vuković N. Antimicrobial activity of *Drosera rotundifolia* L. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2015, P. 366–369.

45. Karak P. Biological activities of flavonoids / An overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2019, P. 1567–1574.

46. Marczak L., Kawiak A., Lojkowska E. Secondary metabolites in *in vitro* cultured plants of the genus *Drosera*. *Phytochem.* 2005, P. 143–149.

47. Matusikova I., Salaj J., Moraveskova J. Tentacles of *in vitro* grown roundleaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show induction of chitinase activity upon mimicking the presence of prey. *Planta.* 2005, P. 1020–1027.

48. Micropropagation of *Lysimachia laxabauda* / S. Gupta, S. Kaliamoorthy, D. Jayashankar, A. Mao, S. Soneswar. *Asian Journal of Science and Technology.* 2012, Vol.4, Is. 12. P. 024-027.

49. Miller D. R., Murashige T. Tissue culture propagation of tropical foliage plants. *In vitro*. 1976, 12. P. 797-813.

50. Millett J., R. Jones, and S. Waldron. The contribution of insect prey to the total nitrogen content of sundews (*Drosera* spp.) determined in situ by stable isotope analysis. *New Phytologist*. 2003, 158. P. 527-534.

51. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid, growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*. 1962. Vol. 15. № 3. P. 473-497.

52. Murza G., A. Davis. Comparative flower structure of three species of sundew (*Drosera anglica*, *Drosera linearis*, and *Drosera rotundifolia*) in relation to breeding system. *Canadian Journal of Botany*. 2003, 8. P. 1129-1142.

53. Oliver-Bever B. Plants in Tropical West Africa. Cambridge University Press: Cambridge, 1986. 129 P.

54. Pijut P. M. Micropropagation of *Juglans cinerea* L. (Butternut). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin : Springer-Verlag, 1997. V. 39. P. 345-357.

55. Sampara-Rumantir N. Rossoliside *Drosera rotundifolia*. *Pharm Weekbl.* 1971, 106. P. 653-664.

56. Schulze, W. and E.-D. Schulze. Insect capture and growth of the insectivorous *Drosera rotundifolia* L. *Oecologia*. 1990, 82. P. 427-429.

57. Stettler R. F. Bradshaw H.D., Jr. Hejman P.E. *Biology of Populus and Its Implications for Management and Conservation*. Research Press, Ottawa, Ontario, Canada, 1996. P. 539

[http://utgis.org.ua/journals/index.php/Factory/article/viewFile/657/](http://utgis.org.ua/journals/index.php/Factory/article/viewFile/657/Mayorova_et_al.pdf)

Mayorova et al.pdf

58. Stewart C.J., Nilsen E. *Drosera rotundifolia* growth and nutrition in a natural population with special reference to the significance of insectivory. *Canadian Journal of Botany*. 1992, 70. P. 1409-1416.

59. Svensson B. Competition between *Sphagnum fuscum* and *Drosera rotundifolia*: A case of ecosystem engineering. *Oikos*, 1995, 74. P. 205-212.

60. Swales D.E. An unusual habitat for *Drosera rotundifolia* L., its overwintering state, and vegetative reproduction. *Canadian Field-Naturalist*. 1975, 89. P. 143-147.

61. Thoren L., Tuomi J., Kaamaeraeinen T. Resource availability affects investment in carnivory in *Drosera rotundifolia*. *New Phytologist*. 2003, 159. P. 507-511.

62. Thum M. The significance of carnivory for the fitness of *Drosera* in its natural habitat 1. The reactions of *Drosera intermedia* and *Drosera rotundifolia* to supplementary feeding. *Oecologia*. 1988. 75. P. 472-480.

63. Thum M. The significance of opportunistic predators for the sympatric carnivorous plant species *Drosera intermedia* and *Drosera rotundifolia*. *Oecologia* 1989. 81. P. 397-400.

64. Tsvetkov I. Thidiazuron-induced regeneration in root segments of white poplar (*P. alba* L.) / I. Tsvetkov, J. F. Hausman, L. Jouve. *Bulg. J. Agric. Sci.* № 13. 2007 / P. 625-626.

65. Vichkanova S.A. Chemotherapeutic properties of plumbagin. *In: Aizerman BE, ed. Fitontsidy Mater Soveshch, 6th 1969*. Kiev: Naukova Dumka, 1972. P. 183-185.

66. Vinkenborg J. De aanwezigheid van hydroplumbagin-glucoside in *Drosera rotundifolia*. *Pharm Weekbl*. 1969, 104. P. 45-49.

67. Wagner H. Immunological investigations of naphthoquinone-containing plant extracts, isolated quinones and other cytostatic compounds in cellular immunosystems. *Phytochem Soc Eur Symp*. 1986, 43. P. 49-56.

68. Xu G.F. Physiological process of drought resistance of two *Lysimachias* species. *J. North west Forestry Univ*. 2007. V. 22. P. 12-14.

69. Zhang H.Z., J.Q. Jie, D. Lv. Tissue culture of *Lysimachia christinae*. *Hun. Agric. Sci.* 2005. V. 3. P. 83-85.

70. Биотехнология растений : веб-сайт. URL:http://fs.onu.edu.ua/clients/client11/web11/metod/bio/biotehnologiyagotova_u4.pdf

71. Микроклональное размножение растений : веб-сайт. URL: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=Клональное-razmnozhenie>