

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**Факультет агротехнологій та природокористування**  
**Кафедра біотехнології та хімії**

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

за першим рівнем вищої освіти  
на тему:

**«Проблеми постсептичної адаптації рослин»**

за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Виконав

**Чирва О. С.**

Група

БІО 2001

Науковий керівник

**Кравченко Н.В.**

Рецензент

**Скляр В.Г.**

**Суми – 2024**

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Факультет *агротехнологій та природокористування*

Кафедра *біотехнології та хімії*

Освітній рівень - «Бакалавр»

Спеціальність: 162 – «Біотехнології та біоінженерія»

**ЗАТВЕРДЖУЮ:**

**В.п.завідувач кафедри**

\_\_\_\_\_ **Коваленко В.М.**

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ **2024** р.

**ЗАВДАННЯ**

**на кваліфікаційну роботу**

Чирви Олега Сергійовича

1. Тема роботи: **«Проблеми постасептичної адаптації рослин»**

Затверджено наказом по університету від « \_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 р. № \_\_\_\_\_

2. Термін здачі студентом закінченої роботи на кафедру \_\_\_\_\_

3. Вихідні дані до роботи:

\_\_\_\_\_

*-місце проведення досліджень:* \_\_\_\_\_

*-методичне забезпечення:*

1. Перелік питань, які будуть виконуватись у роботі:

\_\_\_\_\_

Керівник кваліфікаційної роботи \_\_\_\_\_ (Кравченко Н.В.)

Завдання прийняв до виконання \_\_\_\_\_ (Чирва О.С.)

Дата отримання «01» \_\_ вересня \_\_ 2021 р.

## АНОТАЦІЯ

Чирва О.С. «Проблеми постасептичної адаптації рослин». Кваліфікаційна робота за першим рівнем вищої освіти, на правах рукопису. Спеціальність - 162 «Біотехнології та біоінженерія» – Сумський національний аграрний університет. – Суми, 2024.

У кваліфікаційній роботі представлено результати комплексних досліджень постадаптаційного періоду рослин та їх проблеми.

Зміна форми існування рослин, наприклад введення в культуру *in vitro*, або перенесення в інші умови: *ex vitro*, *in vivo* проявляється у вигляді стресу, що може закінчитись відмиранням рослин. Викладені специфічності переходу *in vivo* – *in vitro* в процесі введення рослинних об'єктів у штучні умови та зворотному: *in vitro* – (*ex vitro*), *in vivo*.

Особливістю рослин від інших організмів на Землі є нездатність змінювати середовище проживання.

В основі адаптації лежить виникнення процесів, що дозволяють рослинам адаптуватися до життя в сучасних умовах. Адаптація виникає з 2-х різних явищ: мінливості і екстернальності, або предадаптації. Перше обумовлено появою ознак, тобто виживанням і розмноженням організму, а також використанням колишніх функцій для вирішення нових завдань в умовах певних змін.

Адаптаційні процеси бувають: легка адаптація організму до нового природного середовища; первинне використанням ознак для нових функцій, кореляційний відбір, коли з'являється більше однієї ознаки, а це розширює здатність організму до адаптації на стадії *in vitro-ex vitro*.

**Ключеві слова:** рослини, мікроклональне розмноження, постасептичні умови, адаптація, фітогормони.

## ABSTRACT

Chirva O.S. "Problems of postaseptic adaptation of plants". Qualification work for the first level of higher education, on manuscript rights. Specialty - 162 Biotechnology and bioengineering. - Sumy National Agrarian University. – Sumy, 2024.

The qualification paper presents the results of complex studies of the post-adaptation period of plants and their problems.

A change in the form of plant existence, for example, introduction into culture *in vitro*, or transfer to other conditions: *ex vitro*, *in vivo* manifests itself in the form of stress, which can end in the death of plants. The specifics of the transition *in vivo* - *in vitro* in the process of introducing plant objects into artificial conditions and vice versa: *in vitro* - (*ex vitro*), *in vivo*.

A feature of plants from other organisms on Earth is their inability to change their habitat.

The basis of adaptation is the emergence of processes that allow plants to adapt to life in modern conditions. Adaptation arises from 2 different phenomena: variability and externality, or pre-adaptation. The first is due to the appearance of signs, that is, the survival and reproduction of the organism, as well as the use of former functions to solve new tasks in conditions of certain changes.

Adaptation processes are: easy adaptation of the body to a new natural environment; primary use of traits for new functions, correlational selection, when more than one trait appears, and this expands the organism's ability to adapt at the *in vitro-ex vitro* stage.

**Key words:** plants, microclonal propagation, postaseptic conditions, adaptation, phytohormones.

## ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ I. АДАПТАЦІЯ РОСЛИН НА ЕТАПІ <i>IN VITRO</i> – <i>EX VITRO</i> (Огляд наукової літератури)	9
1.1. Еволюція рослин та її особливість	9
1.2. Суть біотехнологічного методу	10
Розділ 2. ПОСТАСЕПТИЧНА АДАПТАЦІЯ РОСЛИН	13
2.1. Сутність постасептичної адаптації <i>in vitro</i>	13
2.2. Вплив умов вирощування на адаптивний процес	18
Розділ 3. МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	22
3.1. Матеріал дослідження	22
3.2. Методи дослідження	22
3.3. Підбір оптимального середовища для ризогенезу павлонії	31
3.4. Вплив віку рослин на приживлення регенерантів	32
3.5. Вплив глибини садіння на кількість живих рослин регенерантів	33
3.6. Постасептична адаптація рослин	34
3.7. Оптимізація живлення рослин <i>ex vitro</i>	35
3.8. Введення регенерантів павлонії у стан спокою	37
ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	42
ДОДАТКИ	49

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Рослинні клітини, тканини і органи сприяють успішному застосуванню мікроклонального розмноження рослин. Однак на етапах введення в асептичні умови, мультиплікації, ризогенезу й постасептичної адаптації існують постійні фізіологічні й технологічні проблеми, що і вимагають системного аналізу цього технологічного процесу [1-3,7], зокрема, напочатку це передбачає відбір донорів та отримання стерильної культури, важливими є вибір експлантів та застосування заходів, пов'язаних з адаптацією рослинних об'єктів до умов *in vitro*. Наступний етап – власне прискорене розмноження, щоб досягти максимально високих коефіцієнтів мультиплікації впродовж тривалого часу без втрат якостей матеріалу, що розмножується. Потім технологічно підготовлюють рослини *in vitro* для успішного розмноження *in vivo*. Кінцевий етап, тобто пересадка рослин у ґрунт, використовуючи всі можливі способи підвищення адаптивної здатності рослин у постасептичний період, а це потребує удосконалення прийому переходу зі стерильних умов живлення та адаптації асептичного матеріалу до нативних умов.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконувалася, згідно з планом науково-дослідної роботи кафедри біотехнології та хімії Сумського національного аграрного університету в межах виконання теми «Реакція вихідного селекційного матеріалу картоплі на адаптивність в умовах Північно-східного Лісостепу України» (номер держреєстрації 0123U100734).

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

Завдання:

1) проаналізувати та систематизувати результати досліджень та наукової літератури, щодо адаптації рослин в умовах *in vitro*, *ex vitro*;

2) описати стан рослин, а саме при мікроклональному розмноженні та їх постасептичної адаптації;

3) дослідити вплив застосування фітодетермінантів у біотехнологічному процесі та розроблення технологічних протоколів мультиплікації й адаптації рослин *in vitro*.

**Об'єкт дослідження:** технології мікроклонального розмноження і адаптації рослин в умовах *in vivo*.

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

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

**Наукова новизна** одержаних результатів полягає у теоретичному обґрунтуванні та вирішенні актуальної проблеми: специфічності прояву зв'язків між окремими органами рослин *in vivo*, *in vitro*, *ex vitro* через дослідження фізіолого-біохімічних, анатомо-морфологічних особливостей на кожному з етапів мікроклонального розмноження численних, систематично різноякісних ботанічних видів рослин, включаючи введення експлантів у

асептичні умови, ювенілізації та онтогенетичної різноякісності рослин *in vitro*, детермінації онтогенезу регенерантів і постасептичної адаптації. Проаналізовано наукову літературу, зформульовані висновки.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати даного дослідження показують ефективність постасептичної адаптації рослин та їх умови.

**Особистий внесок здобувача.** Дане наукове дослідження є результатом самостійної роботи автора, яке включає в себе ретельний аналіз наукових джерел та використання практичних методів.

**Структура та обсяг роботи.** Обсяг роботи складає 50 сторінок. Містить вступ та три розділи, матеріали і методи дослідження, аналіз експериментальних даних, за темою дослідження, пропозиції для практичного застосування та список використаних джерел, додатки; налічує 2 таблиці, 7 зображень.

## РОЗДІЛ 1

### АДАПТАЦІЯ РОСЛИН НА ЕТАПІ *IN VITRO* – *EX VITRO* (огляд наукової літератури)

#### 1.1. Еволюція рослин та її особливість.

Особливість рослин від інших організмів на землі - є нездатність змінювати середовище існування. Еволюція дозволила рослинам знаходити свою нішу в боротьбі за виживання, а саме - здатність рекомбінувати генетичні фактори, як наслідок гібридизації та мутацій. Інша – уміння адаптуватися до мінливих зовнішніх умов [1-3]. Обидва способи складні в реалізації і відрізняються один від одного.

Гетерозис змінює спадковість потомства, а тому деякі з новоутворених форм мають характеристики, які протилежні несприятливому середовищу.

Основа адаптації – це виникнення процесів, які дозволяють рослинам пристосуватися до життя в сучасних умовах. Адаптація виникає завдяки двом різним явищам: мінливості та зовнішньому, або преадаптації. Перша спричинена появою ознак, а саме виживанню та розмноженню організму, а також використанням попередніх функцій з вирішенням нових завдань в умовах специфічних змін.

Існує кілька типів адаптаційних процесів. Перший - це легке пристосування організму до нового природнього середовища. Другий - первинне використання ознак для нових функцій, що передбачає відбір нових ознак. Третій - корелятивний добір, коли замість однієї ознаки з'являються дві, або більше. [15] Це може значно розширити адаптивні можливості організму.

У нових умовах штучного культивування рослин *in vitro* у рослин змінюються анатомо-морфологічні структури, фізіологічні та біохімічні процеси, що вимагає адаптації на етапі *in vitro-ex vitro*. [17]

#### 1.2. Суть біотехнологічного методу.

Дослідження культури клітин та тканин рослин сприяють у впровадження у виробництво нового виду матеріалу, створеного на основі біотехнологічного методу. Наукові дослідження з мікроклонального розмноження (МКР) мають комерційне поширення. Завершальний етап – адаптація рослин-регенерантів, вирощених у асептичних умовах «під склом», *in vitro*, до не стерильних умов.

Чіткого твердження визначення процесу пристосування до нових умов серед дослідників досі немає. Цей етап має назву реадаптацією *in vitro*, або постасептичною адаптацією [4-7], деякі вчені приводять твердження «акліматизація рослин *in vitro*», це означає пристосування живих організмів до змінених природних умов.

Акліматизація тотожне поняття до адаптації щодо спектру зовнішніх чинників. «Аклімація», згідно з визначенням Р. Ріклефс, та англійських вчених М. Біган, Дж. Харпер та українських вчених І. В. Косаківська, І. В. Голов'янка аклімацією вважають процеси пристосування, зі «значними морфологічними або фізіологічними модифікаціями організму у відповідь на тривалу зміну середовища. Коли зміни відбуваються в природних умовах – це є акліматизація, а зміни у штучних лабораторних умовах – аклімація» [8, 9, 11]. Отже, все це стосуються одних і тих же процесів.

Використовуючи технологію СМР (діагностику), рослинний організм два рази змінює умови існування. По-перше, це адаптація *in vivo-in vitro*. Нарешті, при переході від *in vitro* до *in vivo (ex vitro)*, таким чином, відбувається постасептична адаптація і реадаптація повторно [10].

На початку адаптації рослини до умов *in vitro* (культивування та введення першого пасажу) рослині потрібне збільшення концентрації стимулюючих гормонів, порівняно з наступними пасаж-культурами: цитокіни (cytokines), цитотоксини (cytokines), відбувається процес дедиференціації та проліферації клітин, що призводить до перепрограмування геному, "ларвалізації" його стану [12, 14]. Цей стерильний матеріал можна вирощувати роками. Таким чином, ми

припускаємо, що регенеровані рослини в умовах *in vitro* (рис.1.) проходять тільки вегетативну стадію онтогенезу, на відміну від рослин при вегетативному розмноженні і при насіннєвому розмноженні *in vivo* [13].



Рис.1. Рослини в умовах *in vitro* [2, 18].

Багато дослідників вважають, що здатність активувати матеріали культури *in vitro* є однією з переваг [2, 18]. Гупта П. К. та співавтори [12] виявили, що після 3 пересадок некореневі частинки рослин, отримані з 20-річного дерева, виявляли здатність до утворення кореневищ, і вкорінення було більш успішним з кожною новою пересадкою.

При такому омолодженні йде посилення синтезу нуклеїнових кислот і білків, активація поділу клітин і їх росту, появу і накопичення ембріональних тканин, а також посилення важливих процесів, пов'язаних із загальною активацією фізіологічних дій [2]. У природних умовах ювенільний стан має швидке накопичення вегетативної маси. Воно підтримується в рослинах певним співвідношенням фітогормонів. Молоді рослини дуже чутливі до навколишнього середовища і знаходяться під сильним впливом її факторів. Крім того, зміни, викликані впливом умов навколишнього середовища, накладають відбиток на проходження подальших етапів онтогенезу[19].

Дозрівання і культивування рослин *in vitro* вимагає додавання екзогенних гормонів, інших біологічно активних речовин і гетеротрофного харчування, при цьому змінюється гормональний баланс культивованого об'єкта. Це впливає на кількість і активність ферментів, які впливають на перебіг метаболічних реакцій (рис. 2.)



Рис. 2. Дозрівання і культивування рослин *in vitro* [18].

## РОЗДІЛ 2. ПОСТАСЕПТИЧНА АДАПТАЦІЯ РОСЛИН

### 2.1. Сутність постасептичної адаптації *in vitro*

Розвиток науки в галузі культури клітин та тканин створили умови для масового поширення у виробництві нового виду посадкового матеріалу в сучасному розсадництві. Наукові розробки з мікроклонального розмноження (МКР) набувають масового комерційного поширення. Завершальним етапом МКР є адаптація рослин регенерантів вирощених в асептичних умовах *in vitro* до не стерильних умов *in vivo*.

Серед науковців універсального і прийнятого усіма фізіологами та біотехнологами визначення процесу пристосування до нових умов і досі немає. Цей етап називають реадаптацією *in vitro*, або постасептичною адаптацією [1, 2, 9]. Вказані терміни, на нашу думку, тотожні і передбачають комплекс процесів і заходів, спрямованих на відновлення втрачених, або ослаблених реакцій, анатомо-морфологічних особливостей рослин культивованих *in vitro*, що сприяє пристосуванню до умов *ex vitro* (після асептичних умов), також ще використовують термін «акліматизація рослин *in vitro*» [3, 4, 10], тобто пристосування організмів до нових умов існування. Хоча і в традиційному розумінні це є «лат. *ad* – до, для і грец. *klima* – клімат) -пристосування організмів до нових кліматичних, фізико-хімічних, ґрунтових та інших умов нового середовища існування та до нових біоценозів, в які вони потрапляють природним шляхом, або свідомо чи випадково переносяться людиною» [5,12]. Акліматизація є окремим випадком адаптації до комплексу зовнішніх чинників [4,12].

Умови, створені *in vitro*, обумовлені створенням біологічних систем зі специфічними молекулярно-біологічними особливостями та штучними специфічними культурними фенотипами рослин у пробірках [27] і вимагають

постасептичної адаптації. У цих рослин незріла провідна система, судини ксилеми скорочені, і існує інший спосіб, за допомогою якого клітини поглинають воду. Ці та багато інших анатомічних особливостей є перехідними від рослин *in vitro* до рослин *in vivo*, хоча вони адаптуються до певних умов культури тканин: "Вони піддаються глибокому стресу і продовжують це робити до тих пір, поки ці системи не придуть в норму, тобто до закінчення реадaptaції"[28, 19], Маккеланд М.Т. та співавтори [30]. Анатомічні та морфологічні відмінності *Acerrubrum L.* були встановлені шляхом порівняння коренів рослин цього виду, вирощених в умовах *in vitro* та *ex vitro*. Коріння *in vitro* мали великі кортикальні клітини. Однак їх судинна система була недостатньо розвинена: лише первинна судинна тканина порівняно з корінням *ex vitro*.

Після адаптації відмінності в будові коренів зникли недорозвинені, або відсутні кореневі волоски, слабкі судинні зв'язки між корінням і бруньками є причинами повільного поглинання і перенесення води і розчинених поживних речовин від перших до других [29].

Експерименти з *Populus tremula L. S.* Ковалевським В. З та співавторами [32] показали, що на ранніх стадіях адаптовані рослини характеризувалися дуже тонкою кутикулою, що містить мало воску та воскоподібних речовин, дуже слабо розвиненими механічними тканинами, тонкими листками та провідними пучками, що функціонували з обмеженими продихами, необхідними для фотосинтезу, і при перенесенні переходячи від умов *in vitro* до умов *ex vitro*, це призводило до зневоднення та загибелі регенерованих рослин".

Вважається, що хлорофіл у рослинах може фотосинтезувати *in vitro*. Ця здатність не реалізується через наявність низьких концентрацій CO<sub>2</sub> та сахарози [2, 21]. Відомо, що вміст сахарози в живильному середовищі збільшує інгібування фотосинтезу на 3-6%. Хайленброк і. М.В. та Дебер П. К. [31] на прикладі спатифілія виявили, що збільшення на ранніх стадіях адаптації регенеруючі агенти використовували його, як резервну поживну речовину для

гетеротрофного харчування. Повне відновлення фотосинтезу в регенераторах, вирощених на середовищі, що містить 3% сахарози, відбувалося через тиждень. Для рослин, вирощених у середовищі з 6%-ним вмістом сахарози, цей процес зайняв в два рази більше часу.



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

В умовах *in vitro* відмічені також зміни інтенсивності ризогенезу (Рис.3, 4). Регенеранти без сахарози в штучному живильному середовищі мали довшу кореневу систему, але кількість коренів була меншою. Найбільша кількість коренів зафіксовано за регенерації рослин картоплі обох сортів на середовищі з трьома відсотками сахарози.

Відомо, що молоді рослини більш вразливі до несприятливих умов. Таким чином, наприклад, на ранніх стадіях розвитку рослин пшениці (II-III етапи органогенезу) була виявлена більш висока чутливість пігментного комплексу до стресового впливу зневоднення.

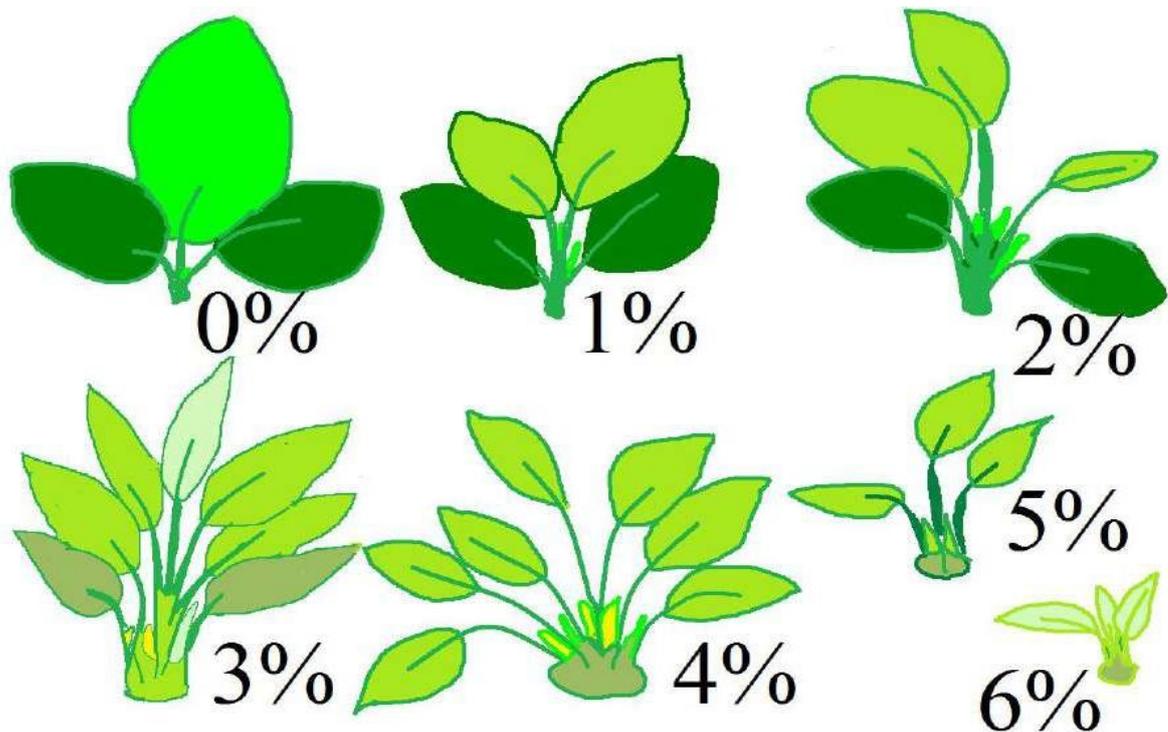


Рисунок 4. – Вплив концентрації сахарози в живильному середовищі на морфогенез регенерантів хости [35].

Окрім концентрації елементів мінерального живлення, гормонів, активованого вугілля під час культивування хости виявлений вплив на ріст рослин *in vitro* концентрації вуглеводів (сахарози). Отримання регенерантів на середовищах без сахарози та з додаванням її від 10 до 60 г/л виявлено наступне (рис. 4.): за автотрофного живлення регенеруються рослини з 2-3 листками і великими темно-зеленими листковими пластинками.

За нашими спостереженнями, такі листки регенеранти сформували під час живцювання від вихідних материнських

рослин, а розростання їх обумовлене автотрофним способом живлення. Із збільшенням концентрації сахарози, розміри листових пластинок зменшувались. Найсильніше це проявилось за концентрацій більше 4%.

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

На ранніх етапах онтогенезу система поглинання світла листям ще сформована і володіє ефективним механізмом протидії стресу, ступінь стійкості пігменту до дефіциту вологи знижується в наступному порядку: каротиноїди-хлорофіл в-хлорофіл, а слабше посуха-стійкі в умовах дефіциту води. Це пояснюється тим, що однією з функцій каротиноїдів є захист хлорофілу від руйнації та регулювання активності фотосинтезу їх розпаду [23].

Відома важлива інформація про хлорофіл, як носій адаптивних властивостей фотосинтетичних структур рослин у несприятливих умовах навколишнього середовища. Також були виявлені закономірні зміни кількості хлорофілу в листі на різних етапах розвитку листя і онтогенезу рослин по довжині листа [22-25]. Вважається, що співвідношення ауксину та абсцизину показує інтенсивність фотосинтезу в онтогенезі та динаміку фотохімічної активності хлоропластів рослин [26].

Антиоксидантна система працює в хлоропластах і пов'язана з фотосинтезом [29]. Активність і спрямованість процесів, що протікають у хлоропластах, показує розвиток життєдіяльності рослин, їх реакцію на вплив деяких факторів навколишнього середовища [28-31].

При переході від *in vitro* до *ex vitro* він індукує перебудову органел, ендогенну регуляцію різних рівнів росту і розвитку рослин від рівня клітин до рівня організмів, що забезпечує такі процеси, як перехід до повноцінного автотрофного харчування. Поліпшення системи водообміну (включаючи баланс

всмоктування і транспірації). Результатом перебудови регуляторних механізмів можуть бути не тільки метаболічні, а й морфологічні та анатомічні зміни. Наприклад, утворення нових типів клітин (кутикули), або нових тканин (вторинної ксилеми), тобто утворюються зворотні зміни в зв'язку з поверненням функціональних можливостей організму до нормального рівня, що виник в ході еволюції виду, тому такі пристосування ще називають компенсаторними.

Звикання регенеруючих агентів до певних комплексів факторів *in vitro* викликає відповідну адаптивну реакцію рослин. Однак у звичайних умовах така адаптація виявилася непрактичною, оскільки після трансплантації регенеруючих агентів *ex vitro* відбувається необоротне зневоднення рослин-регенерантів і зміна гормонального статусу.[34] Коли ауксин і цитокінін переважають над ювенільним абсцизином, вплив поганих умов *in vivo* збільшує кількість останнього [35],тому вважається, що абсцизова кислота (АВА) необхідна для підтримки оптимального водного балансу та запобігання надмірним втратам води [36]. Поступове зневоднення пагонів призводить до підвищення рівня АВА в коренях [37].

Було занотовано стимулюючу дію цього гормону на водну провідність коренів, крім впливу на продихи [38]. Накопичення АВА часто збігається зі зниженням вмісту цитокінінів. Ці гормони є суперечливими при регуляції інтенсивності транспірації [39].

## **2.2. Вплив умов вирощування на адаптивний процес**

Основа адаптивного процесу обміну речовин, анатомічної структури, морфологічних змін в окремих органах і організмі присутня в тканинах апікального поділу. Вони є результатом, викликаним умовами вирощування. Саме ці особливості стану меристем і швидкість їх зміни впливають на адаптацію в двох випадках адаптації: 1 - внесення в пробірки з нативних умов;

2-адаптація після асептики. У першому випадку, з невеликою частиною матеріалу, у другому випадку ефективність адаптації впливає на комерційний обсяг посадкового матеріалу. Технічно, активність меристеми (гормональний баланс, анатомічні та морфологічні особливості і т.д.) повинна бути "скинута".

Аналоги таких процесів відомі в природі. Це стан, при якому рослина переходить у стан спокою, долаючи несприятливі умови і дозволяючи почати життєвий цикл рослини з самого початку у вигляді нового організму – насіння, або органу вегетативного розмноження. Пошук способів використання сплячих регенерованих рослин для поліпшення адаптації після асептики часто є нагальною метою досліджень комерційних методів мікроклональної регенерації.

Проростання насіння, або бульб починається з першої стадії органогенезу, і протягом усього життєвого циклу рослина адаптується до умов навколишнього середовища. Ще в минулому столітті Ф.М. Куперман [40] підтвердив, що умови навколишнього середовища в ході онтогенезу визначають специфіку формування органів і тканин організму, в яких закладена адаптація до них, отже, організм, або насіння, або вегетативний орган дочірнього організму готується до дії факторів навколишнього середовища, навіть в період формування материнської рослини [41].

Посадка розсади картоплі після стану спокою в закритий ґрунт показала різницю в зростанні рослин. Розсаду висаджували в ґрунт в оточенні вже сформованих надземних частин (пагонів з листям), і у випадку з мікробульбами для появи перших сходів потрібно 18 днів. Висаджені рослини-регенеранти відрізняються кількістю основних стебел в кущі, а глибина пагонів нерівномірна. Посадка, сформована з розсади, являла собою одне стебло, а на кущах картоплі, вирощених з мікробульб, є два і більше стебел.

Менша кількість стolonів у насінневому матеріалі з розсади також пов'язано з можливістю постасептичної адаптації рослин, тому розсаді потрібен певний період часу для приживлюваності, протягом якого

зменшується тургор, а це сильний стресовий фактор. Стрес пригнічує ріст і, отже, перешкоджає утворенню більшої кількості вегетативних органів (у тому числі органів засвоєння світла, які залежать від продуктивності), скорочуючи вегетаційний період, що, в свою чергу, впливає на врожайність рослин. Згідно з нашого дослідження, сорти картоплі в природних умовах утворили більше мікробульб, ніж рослини, вирощені з мінібульб. У результаті, введення картоплі *in vitro* в стан спокою (утворення мікробульб) покращує адаптацію після стерилізації.

Крім морфогенезу бруньок і коренів, основним показником післяопераційної адаптації є приживлення рослин. У картоплі не було чіткої різниці в приживленні стерильних матеріалів між паростками та мікробульбами, але якщо була різниця в розвитку, то у господарів показники приживлення рослин *in vitro* були дуже різними у мутантів з індукцією кореневої системи ауксином, або без неї. Зокрема, у сорту *Рів'єра* прижилося 37,8% рослин з сіянців. Найвищий показник приживлюваності був у варіанту рослини, що пройшов період спокою - 87,2. Аналогічна картина була встановлена і у сорту "Щедрик".

В експериментах з рослинами картоплі було виявлено, що введення регенеруючих агентів *in vitro* покращує стан культури після стерильного культивування, тобто адаптація в таких умовах відбувається краще [41].

Отримані результати були підтверджені на рослинах малини *in vitro* (сорти "Ляшка", "Марабелла" температура +2-5°C), лохини (сорти "Патріот", температура +6-9°C) і фундука (сорт «Барселона», температурний режим +4-7°C). Пагони рослини міцніші, бруньки збільшилися в розмірах, вкрилися захисними покривними лусочками. При підвищенні температури відзначалося пробудження бруньок і спостерігався вирівняний ріст рослини після стану спокою.

М.Б.Гапоненко вважає, що асептична адаптація сіянців *Anacamptis morio* з сімейства орхідних *Іванникових (Orchidae)* почалася з перенесення колб з

регенераторами, вирощеними на живильному середовищі, в прохолодне місце, що імітує умови переходу до періоду спокою, і їх загартовування [44].

## РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 3.1. Матеріал дослідження.

Мікроклонального розмноження рослин (МКР) досліджували за чотирма напрямками, які відповідали складовим технологічного процесу: - відбір, введення та стабілізація розвитку експлантів в асептичних умовах; - мультиплікація; - індукція ризогенезу в регенерантів; - постасептична адаптація

### 3.2. Методи дослідження.

Дослідження проводили в навчально – науковій лабораторії біотехнологічних досліджень *in vitro* кафедри біотехнології та хімії Сумського національного аграрного університету 2022-2023рр.



Рис.5.Меристеми картоплі ( Фото Чирви О.)

Рослини культивували в біологічних пробірках, і в скляних банках місткістю 370 та 200 мл (рис.5) Середовища культивували в автоклаві ВК-75 за

температури 121 °С, за тиску 1,1 атм., застосовували модифіковане середовище за Мурасіге і Скугом.

Для ризогенезу регенерантів павловнії використовували чотири живильних середовища: Мак Коуна (WPM) [24], Куаріна і Лепуавра (QL) [3-4], Мурасіге і Скуга (MS) [36], Данстена і Шорта (BDS) [49].

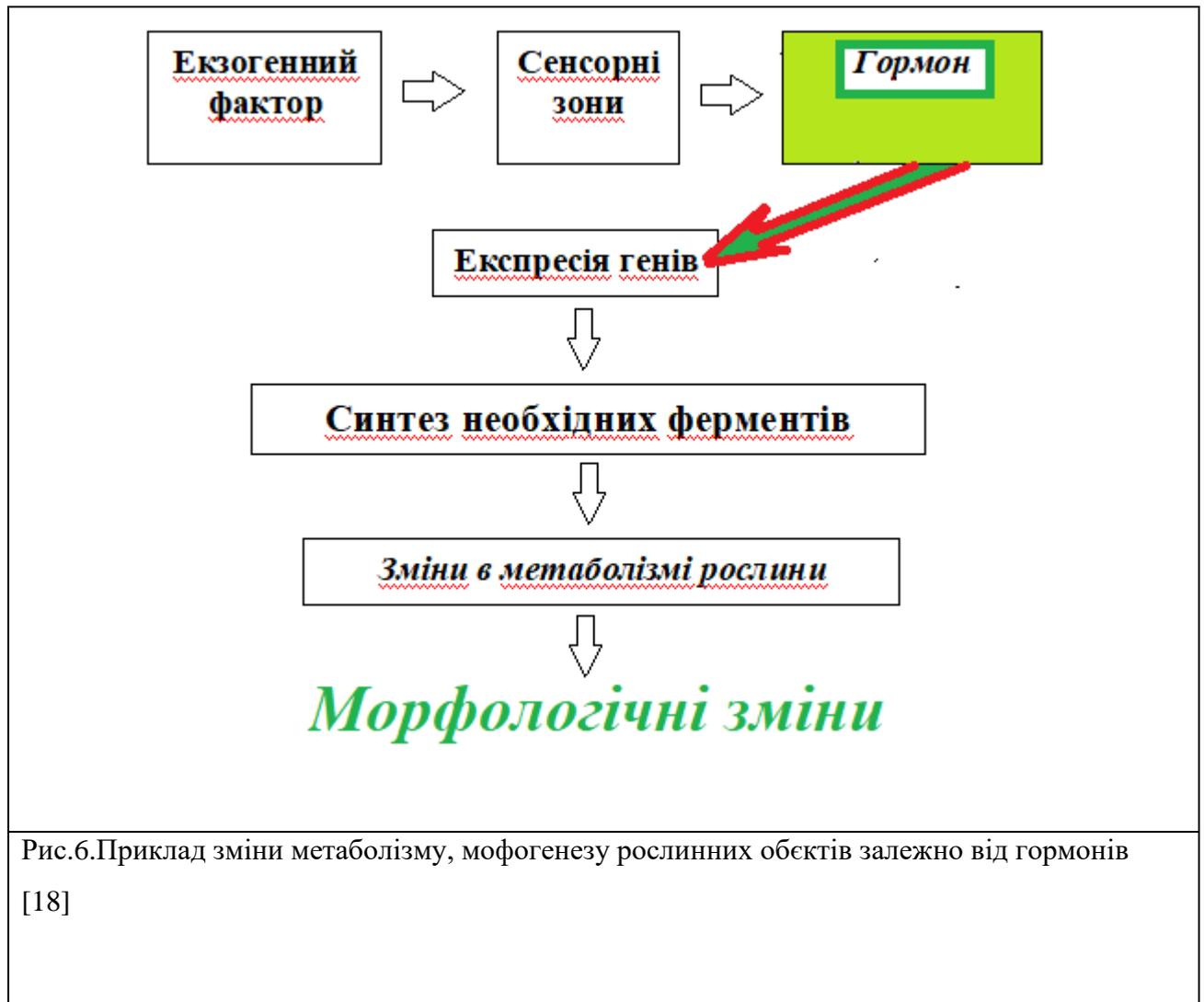
У складі живильних середовищ найбільш поширені групи гормонів, або їх синтетичних аналогів стимулюючої дії: ауксини, цитокініни та менш поширені гібереліни (табл.3.1, табл.3.2). Гормони інгібітори (абсцизини, етилен) рідко застосовували. Синтез регенерантами етилену може бути навіть шкодити технологічному процесу.

Таблиця 3.1

Регулятори росту, які використовуються за культивування тканин і клітин рослин

<b>Клас фітогормонів</b>	<b>Назва</b>	<b>Скорочена назва</b>
Ауксини	Індоліл-3-оцтова кислота	ІОК
	3-Індолілмасляна кислота	ІМК
	1-Нафтилоцтова кислота	НОК
	4-Дихлорфеноксоцтова кислота	2,4-Д
Цитокініни	6-Бензиламінопурин	БАП
	N-Ізопентениламінопурин	2-іР
	Кінетин (6-фурфуриламінпурин)	К
	Зеатин	
	Тідазурон	TDZ
Гібереліни	Гіберелова кислота 3	ГК3
	Гіберелова кислота 4	ГК <sub>4</sub>
	Гіберелова кислота 7	ГК <sup>7</sup>

Гормони здатні переміщуватися по рослині на далекі відстані, так і міжклітинні та внутрішні регулятори близької дії. Проте для індукції генетичних програм недостатньо наявності лише гормонів. Необхідно щоб у рослинному організмі були компетентні рецепторні ділянки (сенсорні зони та клітини мішені).



Таблиця 3.2.

Ефекти застосування окремих фітогормонів

Гормон	Ефект в культурі тканин
Ауксини	Формування меристем, адвентивних коренів
	Індукція ембріогенезу
	Поділ клітини
	Утворення та ріст калюсів.
	Пригнічення відростання пазушних бруньок.
Цитокініни	Формування придаткових пагонів
	Гальмування утворення придаткових коренів.
	Поділ клітини.
	Утворення та ріст калюсів.
	Стимуляція відростання пазушних бруньок.
	Гальмування розтягування пагонів.
	Гальмування старіння листя.
Гібереліни	Видовження пагонів
	Виходження від стану спокою в насінні, соматичних ембріонах, верхівкові бруньки і цибулини.
	Гальмування утворення придаткових коренів.
	Інгібітори синтезу сприяють коренеутворенню.
	Сприяють утворенню бульб, цибулин, клубнецибулин
Етилен	Старіння листя, бруньок.
	Дозрівання плодів
	Сприяння, або гальмування випадкових регенерація (в залежності від часу застосування, або генотипу).
Абсцизини	Дозрівання соматичних ембріонів.
	Полегшення акліматизації.
	Формування цибулин і бульб.
	Сприяння розвитку періоду спокою

МКР називають постасептична адаптація, аклімація, реадаптація. На цьому етапі відбуваються морфолого-анатомічні пристосувальні зміни задля виживання рослин *ex vitro*.

Технологічні завдання: досягти змін метаболізму, водного обміну та анатомічних утворень в рослин, також в окремих технологіях відбувається живцювання в постасептичних умовах завдяки ювенільному стану набутому *in vitro*.

Ювенілізація і культивування рослин в умовах *in vitro* зумовлює необхідність додавання екзогенних гормонів, інших біологічно активних речовин та гетеротрофного живлення, змінюється гормональний баланс об'єкту, який культивується. Це впливає на кількість та активність ферментів, що відбивається на проходженні метаболічних реакцій і, відповідно, морфогенезу і життєдіяльності рослинного організму.

Рослинним об'єктам за більшості технологій МКР властивий міксотрофний спосіб живлення з переважанням гетеротрофного, тобто в основі обміну речовин, синтезу молекул лежить перетворення органічних речовин, а не утворення їх з неорганічних як це відбувається за виключно автотрофного живлення. Автотрофність *in vitro* (фотосинтез) займає порівняно мізерну частину живлення. В “пробірці” рослини мають меншу кількість хлоропластів, а також в асептичних факторостатичних умовах змінюється, як поглинання водного розчину так і випаровування води.

Зазнають змін і клітини покривних тканин. Їм властиві порівняно тонші оболонки з меншим шаром захисних речовин (кутикула).

Регенеранти зі вказаними біохімічними і морфологічними змінами при перенесенні відразу у відкритий ґрунт, більшість з них загине від стресу, тому між “пробіркою” і “відкритим ґрунтом” рослини *in vitro* культивували в умовах за котрих відбувається цикл пристосувальних змін організму *ex vitro*.

Водообмін: рослини *in vitro* поміщають у “вологі камери” із поступовим зниженням вологості із 100-90 до 60-70%.

Ризогенез: висадка регенерантів проводиться на субстрати, які відповідають за показником рН ботанічному виду. Підбирають субстрати в котрих одночасно забезпечується коренева система, як вологою так киснем. Адже відомо, що життєдіяльність кореня можливо лише в умовах аеробного (кисневого) дихання.

Освітлення: протягом періоду освітлення збільшували від розсіяного до типового для відкритого ґрунту.

Рослини *in vitro* особливо в умовах стресу сприйнятливі до ураження збудниками хвороб та шкідниками, тому проводять ряд профілактичних заходів. Це зокрема, обробка фунгіцидами, передпосадкова стерилізація субстратів, використання субстратів, які унеможливають розвиток патогенів (наприклад, гриби не можуть накопичуватися на перлітовому субстраті).

#### **Проведення дослідження.**

Дослідження проводилося в стандартних лабораторних умовах. Обсяг вибірки склав 70 рослин ( додаток А) Етапи серій експериментів наступна: найкращим варіантом попереднього досвіду був наведений нижче контроль. Було вивчено вплив таких факторів на стадії індукції формування кореневища: гормон, середовище, температура культивування.

Відповідно до постасептичної адаптації, під час посадки *in vitro* увага була зосереджена на віці рослини, наявності агару на кореневій системі, глибині посадки та кількості асептичних живців рослини *in vitro* - *ex vitro*. При посадці у вологу камеру на торф'яної субстрат враховувалася крайня крихкість стебла регенеранта, що вимагає ретельного поливу. В якості оптичних носіїв ми використовували світлодіодні лампи Velson потужністю 20 Вт, розташовані поруч на установках, потужність 1 лампи становила 20 Вт, а світловий потік - 1780 Лм (аналог LB-36).

Протягом двох тижнів освітленість поступово збільшувалася з 1500 до 3000 люкс. Для захисту від грибкових інфекцій використовувалися фунгіциди Previcur ® Energy840SL, V. R. K., які були протестовані при постасептичному

вирощуванні інших культур. Однак культивування регенеруючих агентів на середовищах з низьким вмістом цитокинінів, за нашими спостереженнями, технічно нездійсненно з кількох причин. Зокрема, знижується швидкість регенерації і старіння втрачається прискорення культури, тобто активність на відміну від сходів,

Цитокинін пригнічує активність, особливо в надмірних кількостях, а ауксин в тканинах верхівкового поділу коренів [11,17], тобто проходить активне формування кореневища, є одним з основних компонентів успішної асептичної постадаптації.

У листках регулююча дія цитокиніну не обмежується контролем. Органогенез перешкоджає закриттю пір під час випаровування при цьому випадку цитокинін діє, як протидія АВС[14,17],

Зміна балансу рослинних гормонів, перехід на раціон зі змішаним вмістом поживних речовин. Переважання автотрофних процесів викликає відмінності в обміні речовин, анатомічні та морфологічні зміни. Перш за все, це стосується активності зменшує кількість пір у рослині та кількість воску для кутикули [21], а також обмежує і збільшує поглинання води корінням

Випаровування води вологи після перенесення в умови з більш низькою вологістю, що є причиною, швидкої втрати води. У більшості випадків вищевказані причини є тривалими, культивування в середовищі з високим вмістом цитокиніну. Для багатьох рослин потрібно 10-14 днів, щоб "перебудуватися" [23].

У лабораторних умовах вони містять меншу кількість основних клітин епідермісу поверхню листя, також у рослин є продихи: вони округлі, а у дорослих - овальні.

Молекулярно-біологічні характеристики та особливі умови та фенотип досліджуваної рослини [26], який вимагає догляду.

**Адаптація рослин після асептики.**

У цих рослин нерозвинена провідна система, ксилема скорочена, і це ще один спосіб поглинання води клітинами. разом з цими.

Багатьма іншими анатомічними і морфологічними особливостями відбувається адаптація до специфічних умов культивування тканин, які переходять від *in vitro* до *in vivo*

Рослина веде себе так "...Вони піддаються глибокому стресу, і це триватиме до тих пір, поки ці системи повертаються до нормального стану, тобто до тих пір, поки ці системи не повернуться до нормального стану, повторна адаптація закінчується " [27], *Populus tremula L.S.*В.експеримент з Ковалевським та співавторами [28, 121]. Встановив "що"... У перші дні рослини, які пройшли адаптацію відрізнялися високою чутливістю тонка кутикула, що містить невеликі кількості восків і воскоподібних речовин, невеликі. Кількість механічних тканин, тонких листків, провідних пучків. Рослина розвивалася слабо, і продихи, працювали повільно, а вони необхідні для фотосинтезу, і як висновок - зневоднення та загибель рослин- регенерантів при перенесенні зі стерильних умов в умови не стерильні.

Вважається, що хлорофіл у рослинах здатний до фотосинтезу *in vitro*, але ця здатність. Через наявність низьких концентрацій CO<sub>2</sub> та сахарози це не реалізується [34]. Виходить збільшення вмісту поживних середовищ від трьох до шести відсотків сахарози викликають пригнічення фотосинтезу уперші дні адаптації регенеруючі агенти використовували його наступним чином запасали поживні речовини для гетеротрофного харчування. Повне відновлення фотосинтезу регенератор, вирощений в середовищі з вмістом сахарози 3%, повинен був з'явитися через тиждень. Для рослин, вирощених в середовищі з 6%-ним вмістом сахарози, цей процес зайняв в 2 рази більше часу.

При мікроклональній регенерації регенеруючими агентами є: молоді рослини, які є більш вразливі[15].

Ступінь стійкості пігменту до дефіциту вологи. Вона знижується в наступному порядку: каротиноїди → хлорофіл в → хлорофіл а. в умовах дефіциту води було зафіксовано збільшення кількості каротиноїдів.

Одна з функцій каротиноїдів пов'язана з тим, що вони захищають хлорофіл від:руйнуються їм продуктів фотосинтезу і регулюють їх діяльність. Відомо, що хлорофіл є носієм адаптивних фотосинтетичних властивостей структури рослин в несприятливих умовах навколишнього середовища. Також було з'ясовано зміну вмісту хлорофілу в листі на різних етапах онтогенезу рослин.

За стадіями їх розвитку і довжині листя [30, 15]. Вважається, що співвідношення ауксину і абсцизину сприяє фотохімічній активності та інтенсивності фотосинтезу в хлоропластах та онтогенезі рослин [28].

Робота антиоксидантних систем у хлоропластах пов'язана з фотосинтезом [32]. Активність і спрямованість процесу, здійснюваного в хлоропластах. Хлоропласти визначають характер життєдіяльності рослин, їх реакцію на вплив багатьох факторів навколишнього середовища.

Під час міграції *in vitro-ex vitro* необхідно індукувати різні перебудови органел, від клітин до рівнів ендогенної регуляції росту і розвитку рослин

Організм забезпечує проходження всіх процесів. Повноцінне автотрофне харчування; поліпшення системи водообміну (включаючи баланс всмоктування і випаровування).. З регуляторних механізмів це може бути не тільки метаболічний, але і морфологічний і анатомічний. Наприклад, утворення нового типу клітин за допомогою (кутикули), або зміна утворення нового типу клітин. Тканини (з вторинною ксилемою), тобто утворюються зворотні зміни, Повертаються до нормального рівня функціональних можливостей організму. Це сталося в ході еволюції виду.

Звикання регенеруючих агентів до певних комплексів факторів *in vitro*

Обумовлено пристосувальними реакціями рослин. Але в нормальних умовах, після трансплантації регенеруючих агентів *in vitro- ex vitro*, таких показань не виявлено.

Оскільки відбувається постійне зневоднення рослин [33], що призводить до зміни їх гормонального стресу. Кількість останніх збільшується при впливі несприятливих умов *in vivo*[17].

### **3.3. Підбір оптимального середовища для ризогенезу павловнії**

Для комерційного застосування мікроклонального розмноження, щоб одержати адаптовану рослину з корінням. Аналізуючи середовища WM, MS, QL та BDS з присутністю 0 мг/л NOC, підтверджено, що оптимальним є середовище QL (табл.3.2). На середовищі DDS регенератори мали більше коренів, але за довжиною були менші, ніж ті, що вирощувались на конторолі.

Регенеративні рослини порівнювали при їх вирощуванні в двох приміщеннях з температурним режимом: +24 і +32 °С, при більш високих температурах формування кореневища починалося на 11-й день вирощування, але при більш низькій температурі - +24 °С - перші коріння утворювалися на 14-й день. Коренева система також візуально мала багато гілок і корневих волосків при вирощуванні на середовищі QL.

При подальшому поліпшенні складу живильного середовища була обрана оптимальна концентрація активованого вугілля. Оскільки формування кореневища було досягнуто за короткий проміжок часу, а саме за 14 днів, в цьому порівнянні записи були зроблені і на 15-й день культивування. Оптимальною концентрацією серед порівнянних концентрацій кількість активованого вугілля в поживному середовищі 2,0-2,5 мг/л, а варіанти нижчої концентрації були гіршими з точки зору початку коренеутворення, довжини та кількості коренів.

При збільшенні концентрації препарату до 3,0 мг/л з'явилися ознаки фітотоксичного впливу на загальний стан регенеруючого засобу, включаючи висоту рослин, швидкість росту і утворення коренів, ознаки впливу на рослину-регенеранта, в т. ч. висоту пагону, швидкість росту та коренеутворення. При додаванні  $\text{AgNO}_3$  в поживне середовище встановили позитивний вплив на регенерацію: у рослини з'явилися більші, інтенсивно забарвлені листя, стебла були достатньої довжини, а вторинні коріння збільшилися в розмірах.

### **3.4. Вплив віку рослин на приживлення регенерантів**

Для вибору оптимального віку рослин *in vitro* для висадки в теплиці на торф'яні субстрати порівнювали ефективність регенеративної приживлюваності в таких варіантах: 15 днів; 20 днів; 30 днів; 40 днів. Було виявлено, що в 15-, 20- і 30-денних варіантах показники приживлюваності істотно не відрізнялися і становили від 73 до 77%. При старих регенераціях (40 днів) половина рослин, посаджених *in vitro* (52%), прижилася. Такі регенеруючі агенти часто вражали пагони в корені. У більшості рослин коренева система, сформована *in vitro*, розвивається рідко. Однак нові коріння повільно розвивалися на субстраті, що стало однією з причин повільного зростання рослин-регенерантів. Висота перших трьох варіантів також не відрізнялася. Таким чином, можна використовувати регенеруючий засіб протягом 15 днів, що дозволяє економити ресурси.

Досліджено негативний вплив залишків агару на кореневу систему рослин при адаптації в природних умовах. Таким чином, приживлюваність регенеруючих речовин, висаджених без відмивання від агару, знизилася з 77% до 31%. Його залишки надавали токсичний вплив на рослину. Ми припускаємо, що це могли бути ферментовані продукти. Якщо пересадити вже вимиті рослини на субстрат, де раніше не миті рослини загинули, загине 40-50% нових рослин. Оскільки промивання великої кількості агару вимагає значних витрат

часу і зусиль, було протестовано безагаровая середовище, в якій агар був замінений вермикулітом на стадії формування кореневища. Результати отримані при застосуванні регенеруючого агента для приживлення, не відповідали дійсності.

На відміну від рослин, вирощених на агаризованому середовищі і відмитих від неї, кількість пошкоджених рослин також зменшується.

### **3.5. Вплив глибини садіння на кількість живих рослин регенерантів.**

Глибина посадки впливала на приживлення рослин - регенерантів. У вологій камері зберігалось 30-50% живців регенеруючого агента, не проникаючи глибоко в субстрат. Якщо живці були посаджені на глибину 2-3 мм, вони, перш за все, вкоренилися і відновилися. Посадка на глибину 5-10 мм призводить до відмирання, як кореневої системи, так і частини стебла. Деяка кількість рослин (33-41%) вижило завдяки утворенню нових коренів близько до поверхні субстрату.

На нашу думку, використання торф'яно-кокосових "таблеток" є перспективним для збільшення аерації. Згідно з попереднім порівнянням" контейнерів " діаметром 30 мм; 41 мм; 50 мм, найменші з порівнюваних виявилися оптимальними для вкорінення зелених 2-вузлових живців. Наповнювачі від одного і того ж виробника (LET) впливали, як на регенерацію, зростання, так і на прояв захворювань ( регенеруючі речовини). Субстрат з кокосової стружки був найкращим.

Крім глибини посадки, на рененарію впливала товщина плівки, що покривала вологу камеру. У камері були різні температури: 28 °С (плівка, стабілізована УФ-випромінюванням в теплиці, 150 мкм); 26 °С (плівка, стабілізована УФ-випромінюванням в теплиці, 80 мкм); 23 °С (стрейч-плівка, 15 мкм).

### 3.6. Постасептична адаптація рослин

Найчастіше для адаптації та після асептики використовують торф'яні субстрати, кокосовий субстрат, ґрунт, або перліт. У субстрат додавали живильний розчин (мг/л) мінеральних елементів цього складу.:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 1250;  $\text{KNO}_3$  – 1100;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 970;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 770;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 440;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 27,8;  $\text{NaEDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 37,3 та мікросолі за прописом Мурасіге й Скуга<sup>9</sup> (таб.3.3.)

Зокрема, через недотримання технології (боротьба з грибами, кислотність) вирощування на субстраті, що містить домішки органічних речовин, призводить до появи комплексу патогенних мікроорганізмів, що викликають фузаріозне в'янення і чорну ніжку.

Для захисту від комплексу захворювань на дернових субстратах були протестовані фунгіцидні обробки. Однак це знижує вміст води в субстраті, і Previcur Energy 840 SL V.It тільки частково вдалося зменшити поширення грибка, обробляючи 2 мл на 1 л води кожні 5-3 дні .

Згідно асептичної постадаптації, для павловнії, як і в природних умовах, характерний швидкий темп зростання як пагонів, так і кореневої системи. На 5-й день спостерігалось утворення нальоту в прикореневій частині, на 10-й день вже з'явилося кілька коренів. Через два тижні регенеруючий засіб став придатним для пересадки у великі ємності, або у відкритий ґрунт за умови крапельного зрошення і мульчування.

Таблиця 3.3.  
Модифіковане середовище за Мурасіге і Скугом

Компонент	Кількістьмг/л		Компонент	Кількістьмг/л	
	розмнож.*	укорін.		розмнож.	укорін.
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1250	1250	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	37,3
$\text{KNO}_3$	1100	1100	Тіамін-НCl	0,1	0,1
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	440	440	Піридоксин-НCl	0,5	0,5

MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	770	770	ВітамінС	1,6	1,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	970	970	Нікотиновакислота	1,0	1,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	Мезоінозит	100	100
MnSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	22,3	22,3	Гліцин	0,5	0,5
CoCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	Аденін	0,2	0,1
CuSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	0,025	0,025	ІМК	0,1	4,0
ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	БАП	0,3	0,2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	Сахароза	30000	10000
KJ	0,83	0,83	Агар	7000	7000
FeSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8			
Примітка:*скороченнюрозмнож.відповідаєрозмноження,укорін.укорінення					

Адаптація після асептики дозволяє отримувати багато живців рослин, тим самим знижуючи вартість посадкового матеріалу. Регенеруючі агенти мали різну швидкість приживлюваності залежно від кількості послідовних живців. Найкращий регенеруючий агент був у перших 3 стерильних живцях павловнії. Після посадки третього живця *in vitro* розмір рослини-регенеранта збільшився, а починаючи з п'ятого, як життєздатність, так і висота зменшилися.

### 3.7. Оптимізація живлення рослин *ex vitro*

У субстрат була додана мінеральна складова модифікованих рецептур Мурасігі і Скуга. Однак на різних етапах адаптації після асептики потреба в поживних елементах регенеруючих засобів змінюється. Було проведено порівняння різних варіантів поживних розчинів з різними хелатними формами заліза.

Поживне середовище зарекомендувало себе сам по собі завдяки додаванню в субстрат при живцюванні після висадки рослин *in vitro* і першої асептичної обробці. При подальшому зрізанні утворювався регенеруючий агент, який

вимагав більшої кількості елементів живлення. Візуально це проявилось окремими симптомами нестачі мінеральних поживних елементів. У зв'язку з цим рекомендується використовувати мінеральні поживні елементи в подвійній кількості  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KN}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  і 2 речовини для підзарядки:  $\text{KN}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  окремо.

Встановлено, що досвідчені варіанти і контрольні відрізнялися розмірами пагонів і кореня (таблиця 4). Практично незмінним залишилося тільки кількість розвинених міжвузел. Для збільшення кількості вмісту азоту був отриманий кращий регенеруючий агент. Однак вони поступалися рослинам у формуванні кореня. Найбільший корінь був виявлен у рослин з подвійним вмістом  $\text{K}_2\text{PO}_4$  або  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . серед них ці варіанти відрізнялися кращим розвитком кореневої системи в останньому випадку.

Додавання як  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  або  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в основний розчин у процесі висаджування об'єктів у касети і підживлення ними обумовило невеликі. Додавали як  $\text{KN}_2\text{PO}_4$ , так і  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в основний розчин під час посадки рослин в касети і їх підливанні, протягом перших 5-10 днів вирощування між рослинами, але потім, особливо починаючи з 15-го дня, спостерігалися ознаки дефіциту кальцію. Це закінчилося появою некрозу на старих листьях, і вони опадають, тобто, живильний розчин наступного складу був (мг/л):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ –1250;  $\text{KNO}_3$  і–1100;  $\text{KN}_2\text{PO}_4$ –970; солей підгодівлі проводили з  $\text{KN}_2\text{PO}_4$ -970; солей  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -770.

Схема забезпечення рослин поживними речовинами дозволила поліпшити розмноження рослин павловнії і уникнути проблем із засвоєнням кальцію. Для оптимізації постасептичного живлення *Paulownia regenerator* став підбір добрива, що містять іони заліза. Оскільки добрива з цим іоном, вироблені Valagro, в минулому успішно застосовувалися *in vitro* для культур рослин, різні добрива в були досліджені для павловнії *ex vitro*. Їх кількість була розрахована на основі вмісту іонів заліза. Навпаки, кількість іонів відповідає класичним положенням Мурашігі та Скуга, а схема експерименту така: Варіант

1- $\text{Feso}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{NaEDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (контроль); Варіант 2- $\text{Rrrileme}_4.80\text{rto-Oro}$ ;  
Варіант 3- $\text{Rrrilene Thim}$ ; Варіант 4-цей випадок.

### 3.8. Введення регенерантів павловнії у стан спокою

Зростання і розвиток пагонів однорічних рослин проходять кілька стадій органогенезу. Ці безперервні фізіологічні та біохімічні зміни контролюються на різних рівнях різними регуляторними системами, зокрема поживними речовинами та гормонами, від окремих клітин до всього організму в цілому. Коли біологічний об'єкт вводиться в пробірку, він піддається впливу факторам, а саме світла, вегетативних систем, екзогенних гормонів і т.д. у результаті виникають проблеми з адаптацією рослин в пробірках, якщо їх висаджувати в ґрунт.

Після того, як рослина відпочила і перейшла до наступного пробудження, програма організму, якби перезапускається ("перезавантажується"). І вже "записана" під умови, в яких рослина пробуджується. Отже, введення в стан спокою може бути однією з форм адаптації. Крім того, введення у стан спокою має позитивне значення: рослинний матеріал накопичується протягом тривалого часу і при необхідності може бути пробуджений. Це скорочує період.

Переведення рослини павловнія в стан спокою, необхідна умова це вологість з 70-75% до 30-35%, температура - з 22-24 °C до 6-8°C.

Для цього процесу були протестовані наступні рослини за віком: тритижневі, п'ятинадцятиденні і двомісячні.

Через те, що в експеримент були включені наймолодші рослини, виявилось, що їх надземні частини майже всі загинули. Прокинулися тільки 42% рослин. У 35-денних рослин висота пагонів зменшилася менш, ніж на половину (41%), а частка живих рослин після пробудження була значно вищою.

У рослинному варіанті через 2 місяці життя тканину стебла виявилась зрілою, тому в процесі входження в спокій стебло майже не засохло. Серед них

93% вижили після пробудження. Повноцінне "мікродерево" можна отримати, вводячи регенеруючі речовини, вирощені *in vitro* в стані спокою.

Було встановлено, що на ефективність адаптації павлонії впливає загальний об'єм контейнера для субстрату та інші параметри, наприклад, глибина. Тому посадка рослин в невеликі касетні осередки ємністю 0,1 літра негативно позначилась на формуванні кореневищ, на їх зростанні і життєздатності рослини, сформувалися низькі тонкі стебла, не розвинулися листові пластинки, приживлюваність склала 64%. Спостерігалось випадання (випинання) рослин з осередків касети( рис.7).



Рис. 7 Рослини картоплі в касетах (Фото Чирви О.С.,Кравченко Н.В.)

При посадці рослин павлонії в глибокі горщики утворюється добре розвинена коренева система, і виходить, що приживлюваність рослини найвища - 98%. Рослина формує потовщені стебла з добре розвиненими листовими пластинками.

У маленьких горщиках того ж обсягу рослини поступалися за морфологічними параметрами, які гірше прижились.

За нашими спостереженнями, на відміну від попереднього варіанту (глибокі горщики), рослина формує більше укорочених міжвузел (5 штук), а одерев'яніння стебла і пробудження пазушних бруньок відбувається швидше.

## ВИСНОВКИ

При переході рослинних об'єктів на етапах *in vivo* – *in vitro* – *ex vitro* – *in vivo* за наявності індукуючих умов відбуваються процеси ювенілізації та реювенілізації. Це залежить від способів живлення (міксотрофне, гетеротрофне, чи мікотрофне) та компонентів живильного середовища. Генезис листка у картоплі, павлонії залежав від трофічної регуляції та онтогенетичного віку організму. Домінуючу роль у прояві форми листка *in vitro* також відіграло походження експлантів: від насінини, чи бруньки.

2. Доведений вплив аерації та способів живлення на формування листків у рослин. Особливо велика роль в утворенні органів відводиться концентрації сахарози, хоча вона по-різному впливала на кількість і масу рослин.

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

4. Виявлено, що введення вихідних для живцювання рослин у стан спокою спричинило потовщення пагона в прикорневій зоні, всихання листків. Після пробудження розвиток листків був типовим для нативних умов. Кращими поживними середовищами для формування кореневища в умовах, що

передували *in vitro*, були Куарин і Лапуа, які збільшили довжину кореневої системи рослини-регенеранта на 6,9%, кількість яких склала 46%, чому також сприяло застосування активованого вугілля в кількості 0,5-2,5 г/л.

### ПРОПОЗИЦІЇ

1. З точки зору висоти рослини, було встановлено, що для приживлення *in vitro* найкраще підходить 20-денний регенеруючий агент, а для приживлення *in vitro* - 30-денний регенеруючий агент.
2. Доведено, що живцювання павловнії *ex vitro* слід проводити перед першим або третім розмноженням, а для кращого розвитку рослини рекомендується удобрювати сумішшю солі  $\text{KN}_2\text{P}_04 + \text{MdSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , а також  $\text{Rrrileme4.80rt-Oro}$ .
3. Оптимальним для адаптації після стерилізації є використання рослин в період спокою, що було досягнуто зниженням відносної вологості з 70-75% до +30-35 і температури з +22-24°C до 6-8 протягом 60 днів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Acharya B. R., Assman S. M. Hormone interactions in stomatal fundtion // Plant.Mol. Biol. 2009. 69. P. 451-562.
2. Bhargava A., Clabaugh I., To J. P. Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-Seq in Arabidopsis // Plant. Physiol. 2013. 162. P. 272-294.
3. Blackman P.G., Davies W. J. The effects of cytokinins and ABA on stomat albehavi our of maize and Commelina // Exp. Bot. 1983. 34. P. 619–626.
4. Brenner W. G., Ramireddy E., Heyl A., Schmulling T. Gene regulation by cytokinin in Arabidopsis // Front. Plant. Sci. 2012. 3. P.8-12.
5. Clonal propagation of mature tres of Eucalyptus citriodora Horsk. by tissue culture //
6. Filipova L, Matskevych V, Karpuk L, Andriievsky V, Vrublevsky A, Pavlichenko A Features of paulownia plants post-sepnic adaptation. Abstract is apart of Multidisciplinary Conference for Young Researchers held in Bila Tserkva on 22nd November 2019 within the framework of the project Support of young university capacity in education and research and science activities in Ukraine (2019), financed by Czech Republic Development Cooperation. P. 50-53.
7. Gupta P. K., Mascarenhas A. F., Jagannathan V. Tissue culture of forest trees .2014.P.17-25
8. <https://uk.wikipedia.org/wiki//Аклімація>
9. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2669/aklimatizaciya-roslin>
- 10.Matskevych V., Filipova L. Using cytokinin sinberries clonal micropropagation// Агробіологія: збірник наукових праць БНАУ. Біла Церква: БНАУ. 2015. № 1 (117). С. 91-95.
- 11.Mitrofanova I. Physiological and biochemical features of some cultivars in essential oil rose (Rosa damascena Mill.) growing in situ and in vitro // International Journal of PharmTech Research. 2016. 9(7). P. 226-232.

12. Mitrychenko A., Teplova I., Farkhutdinovetal R. Growth, transpiration and hormonal of wheat seedlings trees // 11th Congress of FESPP Federation of European societies of plant physiology/ Varna, Bulgaria, 7-11 September 2008. P. 240.
13. Moreira M. F., Appezzato-Gloria B., Zaidan L. B. P. Anatomical aspects of IBAtreated microcuttings of *Gamphera macrocephala* St.-Hil. // Braz. Arch. Biol. And Technol. 2000. 43. 2. P. 37-49.
14. Plant Sci. Lett. 1981. V. 20. № 3. P. 195-201.
15. Pospíšilová J., Synková H., Haisel D., Semoradova S. Acclimation of plant lets to ex vitro conditions: effect so fairhrmidity, irradiance, CO<sub>2</sub> concentration and abscisicacid (a review) // Acta. Hort. 2007. P. 29-38.
16. Yildiz A., Cagdas A., Aslihan A., Yesim Y., Sedat S., Ibrahim O. The effect of mycorrhiza in nutrient uptake and biomass of cherry rootstocks during acclimatization // Romanian Biotechnological Letters. 2010. 15. 3. P. 246-252.
17. Буюн Л. І. Адаптивні зміни поверхні листка *Cattleya gaskelliana* // Modern Phytomorphology, 2013. 3. P. 293–296.
18. Буюн Л. І. Адаптивні зміни поверхні листка тропічної орхідеї *Cattleya gaskelliana* (N.E.Br.) B.S. Williams при зміні умов культивування (in vitro – ex vitro) // Modern Phytomorphology. 2013. 3. P. 293 -296.
19. Васильківський С.П., Мацкевич В.В. Перспективи створення та функціонування фітобіотехнологічних лабораторій. Аграрна наука виробництву. Матеріали тез VI Державної науково-практичної конференції 14-15 листопада 2007 року. Частина 1. м. Біла Церква. С. 17-18. 2.
20. Веденичова Н.П., Косаківська І.В. Косаківська Цитокиніни, як регулятори рослин за різних умов зростання. Київ: Наш формат. 2017. 200 с. використання отриманого матеріалу в первинному насінництві: дис.. ... канд.

- 21.Власенко М.Ю., Мацкевич В.В., Дульнєв П.Г., Козак А.Л., Детермінація онтогенезу рослин картоплі в умовах *in vitro* синтетичними фітогормонами класу цитокінінів. “Інноваційні агротехнології в умовах глобального потепління. Матеріали тез міжнародної науково-практичної конференції. 4-6 червня. 2009 р. Мелітополь-Кирилівка. Вип. 1., с.24-25. 3.
- 22.Врублевський А.Т., Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Особливості боротьби із фенолоутворенням за введення ліщини *in vitro*. «Аграрна наука – виробництву». Тези доповідей державної науково-практичної конференції. М. Біла Церква, 17 листопада 2016 року. Біла Церква, 2016. Ч. 2. С. 65-67.
- 23.Григорюк І. П., Ткачов В. І., Михальський М. Ф., Серга О. І. Біоенергетичні основи стійкості озимої пшениці до посухи. Київ: Науковий світ. 2004. 202 с.
- 24.Зеленянська Н. М. Ефективні способи адаптації мікроклонів винограду // Вісник аграрної науки: генетика, селекція, біотехнологія. 2012. С. 50-52.
- 25.Калінін Ф.Л., Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Технологія мікроклонального розмноження рослин– Київ: Наукова думка. 1992. 232 с.
- 26.Ковалевський С. Б., Білоус С. Ю., Ліханов А. Ф. Культура *Populus tremula* L. Київ: Прінтеко. 2014. 187 с.
- 27.Косаківська І. В., Голов'янка І. В. Адаптація рослин: біосинтез та функції стресових білків // / Український фітоценологічний збірник. Київ. 2014. Сер. С. Вип. 24. С. 3-17
- 28.Кравченко Н.В., Подгаєцький А.А., Масік К.А, Лупійко М.М. Ефективність оздоровлення сортів картоплі в культурі *in vitro*. «Гончарівські читання»: Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 94-річчю з дня народження доктора сільськогосподарських наук, професора Гончарова Миколи Дем'яновича (25 травня 2023 р.), Суми, 2023, С.143-145

- 29.Кравченко Н. В., Молоданович Я. О. Особливості мікроклонального розмноження малини XII Міжнародна науково-практична конференція «Youth, education and science through today's challenges», 04-06 грудня 2023 р., Бордо, Франція с.78-83
- 30.Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження рослин. Київ: Наукова думка. 2005. 271 с.
- 31.Мацкевич В. В. Мікроклональне розмноження рослин: введення в культуру. Гончарівські читання. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції 25-26 травня 2020 р., Суми, Сумський національний аграрний університет. 2020. С. 31-38
- 32.Мацкевич В.В. Дибба Р.Д., Філіпова Л.М. Особливості введення *in vitro* *Agapanthus umbellatus*. Новітні технології в рослинництві. Тези доповідей державної науково-практичної конференції Біла Церква, 2013. С. 4. 7.
- 33.Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Введення регенерантів *in vitro* у стан спокою як шлях постасептичної адаптації. Тези доповідей міжнародної науково-практичної конференції молодих учених, аспірантів і докторантів “Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті” 16-17 травня 2013 р. м. Біла Церква. С. 7. 6.
- 34.Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Вплив заліза на гіпергідратацію *in vitro* регенерантів ягідних культур. Досягнення та перспективи генетики, селекції і рослинництва зернових культур. Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла НААН. 14-15 червня 2016. С. 121-122
- 35.Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Гіпергідратація *in vitro* та її чинники. Наукові пошуки молоді в третьому тисячолітті. Тези доповідей Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених, аспірантів і докторантів БНАУ, Біла Церква, 19–20 травня 2016 року. С. 31. 13.
- 36.Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Деконтамінація експлантів агпантусу. “Аграрна наука — виробництву» «Новітні технології у рослинництві”

- Тези доповідей Державної науково-практичної конференції: листопад 2014 р. м. Біла Церква. С. 10.
- 37.Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Застосування цитокінінів замікроклонального розмноження ягідних культур. Новітні технології в рослинництві. Тези доповідей державної науково-практичної конференції молодих вчених, аспірантів та докторантів 14-15 травня 2015 (БНАУ, м. Біла Церква). С. 8-9.
- 38.Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Розробка технології одержання кореневласних саджанців вітчизняних сортів персика Сучасні проблеми ведення сільського господарства та підготовки фахівців аграрного профілю. Тези Міжнародної науково-практичної конференції 15 лютого 2018, Біла Церква, БНАУ. С. 16-17. 20.
- 39.Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Мацкевич О.В. Удосконалення технології мікроклонального розмноження *Prúnus pérsica* на етапі введення в асептичну культуру. Сучасні агробіотехнології та землеустрій в Україні. Матеріали державної науково-практичної конференції. 23 листопада 2017 року. Біла Церква. 2017. С. 21-23. 19.
- 40.Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Сінельник О.О. Сумісне використання гіберелінів та цитокінінів у культурі тканин. Актуальні проблеми озеленення населених місць: освіта, наука, виробництво, мистецтво формування ландшафту. Матеріали II Міжнародної наукової конференції 4-6 червня 2014 р. м. Біла Церква. С. 69-70.
- 41.Медведева Т. В. Проблеми акліматизації культивованих *in vitro* рослин // Фізіологія і біохімія культурних рослин. 2008. 4. С. 299-309.
- 42.Міжнародної науково-практичної конференції. 27-28 вересня 2018 року. – Біла Церква, 2018. – С. 19-20. 21. Подгаєцький А. А., Мацкевич В. В., Філіпова Л. М., Кравченко Н. В. «Проблеми постасептичної адаптації рослин». VII Международная научно- практическая конференция

- “Dynamics of the development of word Science». 18-20 марта 2020. Wankuwer, Kanada. С. 662-675.
43. Мусієнко М.М. Фізіологія рослин. К: Либідь. 2005. 808 с.
44. Нижник Т. П. Фізіологічні основи та способи підвищення стійкості картоплі до посухи: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: 03.00.12 «Фізіологія рослин». Київ. 2001. 21 с.
45. Подгаєцький А.А., Мацкевич В. В., Подгаєцький А. Ан. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин: монографія. Біла Церква: БНАУ, 2018. 209 с.
46. Таран О.П. Регенераційна здатність рослин картоплі за дії абіотичних чинників у культурі картоплі *in vitro* та *ex vitro*: автореф. дис. ... канд. біол. наук за спеціальністю 03.00.12 — фізіологія рослин. Київ. 2011. 21 с.
47. Філіпова Л.М., Мацкевич В. В., Мацкевич О. В. Ризогенез павловнії *in vitro*. «Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту. Інноваційні технології в агрономії, агрохімії та екології. Землеустрій та кадастри у сучасних умовах: проблеми та вирішення». Матеріали
48. Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Протокол мікроклонального розмноження аличі, сливи, персика та підщепи персика. «Актуальні проблеми озеленення населених місць: освіта, наука, виробництво, мистецтво формування ландшафту» Тези доповідей учасників III Міжнародної науково-практичної конференції. Біла Церква. 2017. 5. С. 141-142. 17.
49. Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Вплив екзогенної сахарози на формування асимілюючих органів в рослин картоплі *in vitro*. Новітні технології в рослинництві. Тези доповідей державної науково-практичної конференції 8-9 листопада 2012 року. м. Біла Церква. С. 3.

## ДОДАТКИ

**Рослини, залучені в дослідження**

<b>Трав'янисті:</b>  картопля;  хоста	<b>Деревні:</b>  туя західна;  павловнія
<b>Чагарники:</b>  малина;  ожина	