

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

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри

_____ ПІБ
підпис
« ____ » _____ 2025 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
за першим (бакалаврським) рівнем вищої освіти

на тему: «Переваги та недоліки
мікроклонального розможення рослин»

Виконав

Анастасія ЯЦЕНКО

_____ ПІБ
Ім'я ПРИЗВИЩЕ

Група:

БІО 2101-1

Науковий керівник

Анатолій ПОДГАСЦЬКИЙ

_____ ПІБ
Ім'я ПРИЗВИЩЕ

Рецензент

Юрій МІЩЕНКО

_____ ПІБ
Ім'я ПРИЗВИЩЕ

Суми – 2025

АНОТАЦІЯ

Яценко А.В. "Переваги та недоліки мікроклонального розмноження рослин"

Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня бакалавр за спеціальністю (162 – Біотехнології та біоінженерія). – Сумський національний аграрний університет Міністерства освіти і науки України, Суми, 2025.

Виробництво мікророзмножених рослин у лабораторіях та розсадниках тканинних культур рослин є найважливішим методом розмноження багатьох економічно вигідних рослин. Мікророзмноження на основі технології тканинних культур передбачає масштабне розмноження, оскільки дозволяє розмножувати величезну кількість рослин, що відповідають типу, за дуже короткий час та на дуже обмеженому просторі, а також цілий рік, незалежно від клімату. Однак застосування методів тканинних культур рослин для комерційного розмноження рослин може зіткнутися з багатьма перешкодами або проблемами, які можуть виникнути з технічних, біологічних, фізіологічних та/або генетичних причин, або через перевиробництво чи брак обладнання та професійних техніків, як показано в цьому дослідженні. Це дослідження має на меті показати переваги та найсерйозніші проблеми та перешкоди мікророзмноження рослин, а також їх вирішення як з наукової, так і з технічної точки зору. Цей огляд, як перший звіт, включає в одну статтю різні проблеми мікророзмноження рослин (тобто забруднення, затримку субкультури, обпалені рослини, потемніння, труднощі з укоріненням *in vitro*, *сомаклональні варіації*, *гіпергідрікацію*, *некроз кінчиків пагонів*, *альбіносні рослини*, *стійкість*, *аномалії пагонів*, *звикання in vitro*). Більшість цих проблем пов'язані з науковими та/або технічними причинами, і їх можна уникнути, дотримуючись протоколу мікророзмноження, що підходить для кожного виду рослин.

Ключові слова: мікроклональне розмноження, переваги, недоліки, методи тканинних культур, *in vitro*.

ABSTRACT

Yatsenko A.V. "Advantages and disadvantages of microclonal plant propagation"

Qualification work for obtaining a bachelor's degree in the specialty (162 - Biotechnology and Bioengineering). - Sumy National Agrarian University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Sumy, 2025.

Micropropagation of plants in laboratories and plant tissue culture nurseries is the most important method of propagation of many economically valuable plants. Micropropagation based on tissue culture technology involves large-scale propagation, as it allows the propagation of a huge number of type-correct plants in a very short time and in a very limited space, and also all year round, regardless of the climate. However, the application of plant tissue culture methods for commercial plant propagation may encounter many obstacles or problems that may arise from technical, biological, physiological and/or genetic reasons, or due to overproduction or lack of equipment and professional technicians, as shown in this study. In addition, some violations and anomalies are discussed in this review. This study aims to show the most serious problems and obstacles of plant micropropagation, as well as their solutions from both a scientific and technical point of view. This review, as the first report, includes in one article various problems of plant micropropagation (i.e. contamination, subculture delay, scorched plants, browning, in vitro rooting difficulties, somaclonal variation, hyperhydration, shoot tip necrosis, albino plants, resistance, shoot anomalies, in vitro habituation). Most of these problems are due to scientific and/or technical reasons and can be avoided by following a micropropagation protocol appropriate for each plant species.

Keywords: microclonal propagation, advantages, disadvantages, tissue culture methods, in vitro.

ЗМІСТ

<u>ВСТУП</u>	6
<u>РОЗДІЛ 1</u>	8
<u>ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО</u>	8
<u>РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН</u>	8
<u>1.1. Історія розвитку культури тканин і мікроклонального розмноження</u>	8
<u>1.2. Біологічні основи методу in vitro</u>	17
<u>1.3. Етапи мікроклонального розмноження рослин</u>	18
<u>1.4. Методи мікроклонального розмноження</u>	19
<u>1.5. Застосування мікроклонального розмноження в сучасному</u>	
<u>рослинництві</u>	21
<u>РОЗДІЛ 2</u>	24
<u>ПЕРЕВАГИ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ</u>	24
<u>2.1. Загальна характеристика мікроклонального розмноження</u>	24
<u>2.2. Основні переваги мікроклонального розмноження</u>	28
<u>2.3. Застосування культури рослинних тканин</u>	32
<u>2.4. Мікроклональне розмноження в харчовій промисловості</u>	34
<u>2.5. Фармацевтична промисловість</u>	35
<u>РОЗДІЛ 3</u>	37
<u>НЕДОЛІКИ ТА ОБМЕЖЕННЯ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО</u>	
<u>РОЗМНОЖЕННЯ</u>	37
<u>3.1. Проблеми, пов'язані з мікророзмноженням рослин</u>	37
<u>3.2. Проблеми, що виникли з технічних причин</u>	37
<u>3.3. Проблеми, що виникли з фізіологічних причин</u>	45
<u>3.4. Проблеми, що виникли через генетичні причини</u>	48
<u>3.5. Порушення та аномалії в мікророзмноженні рослин</u>	49
<u>ВИСНОВКИ</u>	53
<u>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</u>	55

ВСТУП

У сучасному світі розвиток біотехнологій відкриває нові можливості для аграрного сектору, особливо у сфері рослинництва. Одним із найперспективніших методів відтворення рослин є мікроклональне розмноження, яке базується на принципах культури тканин *in vitro*. Цей метод дозволяє отримати значну кількість генетично однорідного садивного матеріалу за короткий час, що є особливо актуальним у світлі глобального попиту на високоякісну продукцію сільського господарства, декоративного рослинництва та фармакології.

Мікроклональне розмноження активно застосовується для розмноження рідкісних, зникаючих та особливо цінних сортів рослин, які важко або неможливо відтворити традиційними способами. Завдяки цьому методу можна зберегти та поширити унікальні генотипи, вільні від вірусів та інших патогенів. Водночас, незважаючи на численні переваги, метод має й певні обмеження – зокрема високу собівартість, складність технічного забезпечення процесів, а також ризики виникнення соматоклональних варіацій.

У зв'язку з цим виникає необхідність комплексного аналізу переваг і недоліків мікроклонального розмноження рослин, що дозволить оптимізувати його використання у практиці, оцінити доцільність впровадження на різних рівнях господарювання та визначити напрями подальших досліджень.

Актуальність теми: в умовах інтенсифікації сільського господарства, змін клімату та зростаючих вимог до якості рослинної продукції мікроклональне розмноження є одним із ключових інструментів біотехнологічного забезпечення аграрного виробництва. Актуальність теми обумовлена необхідністю ефективного та безпечного відтворення цінних сортів рослин з гарантованими характеристиками. Також важливим є аналіз обмежень,

що можуть впливати на економічну доцільність широкого впровадження даного методу.

Мета роботи: проаналізувати переваги та недоліки мікроклонального розмноження рослин, оцінити доцільність його використання у сучасному рослинництві та запропонувати можливі шляхи подолання обмежень цього методу.

Завдання роботи: дослідити теоретичні основи мікроклонального розмноження та методи його реалізації. Охарактеризувати переваги мікроклонального розмноження у порівнянні з традиційними способами розмноження рослин. Проаналізувати основні недоліки та проблеми, пов'язані з використанням цього методу. Розглянути приклади практичного застосування мікроклонального розмноження в Україні та світі. Запропонувати шляхи оптимізації мікроклонального розмноження в умовах виробництва.

Об'єкт дослідження: біотехнологічні процеси розмноження рослин.

Предмет дослідження: методи, переваги та недоліки мікроклонального розмноження рослин як форми вегетативного відтворення в умовах *in vitro*.

Структура та обсяг роботи: Загальна кількість сторінок комп'ютерного набору становить 60 сторінок: таблиць – 2. Кількість використаних джерел – 38.

РОЗДІЛ 1

ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН

1.1. Історія розвитку культури тканин і мікроклонального розмноження

Культуру рослинних тканин, яку також називають клітинною, *in vitro*, аксенічною або стерильною культурою, розглядають як важливий інструмент у фундаментальних і прикладних наукових дослідженнях, а також у комерційних застосуваннях. Це метод вирощування клітин, тканин, органів або їх компонентів у стерильних умовах на штучних поживних середовищах з контрольованими фізико-хімічними параметрами *in vitro*.

Теоретичні засади методу було запропоновано Готлібом Хаберландтом, який у 1902 році у зверненні до Німецької академії наук висловив припущення щодо можливості культивування ізольованих вегетативних клітин вищих рослин. Він зазначив, що хоча систематичних спроб у цьому напрямку ще не було, такі експерименти можуть дати цінну інформацію про властивості клітини як елементарної одиниці життя, а також про її взаємодію з іншими клітинами в складі багатоклітинного організму [1].

Попри те, що його ранні експерименти з ізольованими фотосинтезуючими клітинами листя та іншими спеціалізованими клітинами були невдалими, Хаберландт передбачив можливість створення штучних ембріонів із вегетативних клітин. Таким чином, він уперше сформулював ідею тотипотентності рослинних клітин, заклавши основу нового експериментального підходу до вивчення їх властивостей.

У подальшому було досягнуто прогресу в культивуванні ізольованих корневих верхівок, зокрема завдяки використанню експлантів із меристематичних тканин. Це дозволило створити стабільні культури корневих кінчиків томатів, а згодом — вирощувати кореневі культури на повністю

визначених поживних середовищах. Спочатку їх використовували для вивчення вірусів, а згодом — як важливий інструмент для фізіологічних досліджень. Значних результатів також було досягнуто у вирощуванні культур бруньок.

Розвиток культури ембріонів розпочався ще на початку ХХ століття, з дослідів із ембріонами ячменю. Згодом були досягнуті успішні результати з порятунку ембріонів, отриманих із нежиттєздатного насіння, утвореного внаслідок схрещування *Linum perenne* з *Linum austriacum*. Також вдалося забезпечити повноцінний розвиток ембріонів деяких ранньостиглих сортів плодкових дерев, що стало одним із перших прикладних застосувань методів *in vitro*. У ході цих досліджень було також виявлено явище передчасного проростання.

Справжні культури рослинних тканин були вперше отримані з камбіальної тканини клена (*Acer pseudoplatanus*). Досліднику вдалося також досягти позитивних результатів із подібними експлантатами інших деревних порід, зокрема в'яза (*Ulmus campestris*), робінії (*Robinia pseudoacacia*) та верби (*Salix caprea*). У цих експериментах використовувалося агар-затверділе поживне середовище на основі розчину Кнопа, глюкози та цистеїну гідрохлориду [2].

Подальші дослідження показали, що додавання індол-оцтової кислоти та вітамінів групи В до середовища забезпечує безперервне вирощування тканин. Це було продемонстровано, зокрема, на прикладі корневих тканин моркви та пухлинної тканини гібридного виду тютюну (*Nicotiana glauca* × *Nicotiana langsdorffii*), яка не потребувала ауксину. У цих умовах стало можливим не лише підтримувати життєздатність тканин протягом тривалого часу, але й спрямовувати їх на диференціацію коренів та пагонів.

Попри те, що на початковому етапі досліджень переважно використовувалися меристематичні тканини, ці експерименти стали основою для стрімкого розвитку технологій *in vitro* в наступні десятиліття. Детальніший

аналіз раннях досягнень у галузі культури рослинних тканин наведено в працях Вайта, Бходжвані, Раздана та інших дослідників.

1940–1960-ті роки стали надзвичайно динамічним періодом розвитку культури рослинних тканин, коли було впроваджено нові методи та вдосконалено вже відомі підходи. Одним із важливих проривів стало використання кокосової води (часто помилково називаної кокосовим молоком), що дало змогу успішно культивувати молоді ембріони та різноманітні стійкі тканини, включаючи представників однодольних. У цей період було створено калюсні культури великої кількості видів, як деревних, так і трав'янистих дводольних і голонасінних рослин, а також тканини коронкового галлу.

У процесі розвитку культури клітин було виявлено низку важливих явищ, таких як втрата клітинами чутливості до зовнішнього ауксину (звикання), а також генетична мінливість меристем, що формуються з калюсу. Попри це, саме в цей період було закладено основи більшості сучасних методів **in vitro**.

Серед значних досягнень слід згадати експерименти, які довели, що додавання аденіну та високих концентрацій фосфату до поживного середовища сприяє розвитку немеристематичних серцевинних тканин із формуванням пагонів і коренів — але лише за умови наявності судинних елементів. Подальші дослідження з нуклеїновими кислотами привели до відкриття першого цитокініну — кінетину, який виявився продуктом розпаду ДНК сперматозоїдів оселедця.

Запровадження кінетину значно розширило коло видів, які можна було культивувати впродовж тривалого часу. Водночас було доведено, що морфогенез тютюнового калюсу визначається співвідношенням екзогенних концентрацій ауксину та цитокініну: високий рівень ауксину стимулював формування коренів, переважаання цитокініну — розвиток пагонів, а збалансовані співвідношення сприяли проліферації калюсної або паренхімної тканини. Ця модель морфогенезу підтвердилася для багатьох видів. Пізніше

природні цитокініни було виявлено в рослинних тканинах, зокрема у кокосовій воді [3].

Одним із визначальних досягнень стало незалежне відкриття утворення біполярних соматичних ембріонів (наприклад, у моркви), яке супроводжувалося формуванням уніполярних структур — бруньок пагонів або коренів. Також було освоєно метод культивування окремих клітин або їхніх невеликих груп шляхом струшування калусних культур (наприклад, *Tagetes erecta* або тютюну) та подальшого розміщення клітин на фільтрувальному папері, що лежав на живильному калюсі. Цей підхід отримав назву культури-годувальниці.

Згодом окремі клітини вдавалося вирощувати в середовищі, попередньо кондиціонованому культурами тканин, або шляхом інкапсуляції в тонкому шарі агаризованого середовища, що дозволяло отримати клітинні колонії. Такий підхід став основою для технологій клонування клітин та культури протопластів.

Значним проривом стало культивування механічно ізольованих зрілих мезофільних клітин, а згодом — індукція соматичних ембріонів із калюсної тканини. Перші великомасштабні культури клітин було отримано на основі суспензій гінкго, падуба, лоліуму та троянди в 20-літрових ємностях із барботуванням.

Зрештою, заміна кондиціонованого середовища кокосовою водою як джерелом природних регуляторів росту дозволила реалізувати ідею, яку понад півстоліття тому висловив Готліб Хаберландт: отримання повноцінної рослини з однієї клітини. Це досягнення стало можливим завдяки роботі дослідників, які успішно регенерували рослину тютюну з однієї клітини, остаточно підтвердивши явище тотипотентності рослинних клітин [4].

Перші спроби створення поживних середовищ для вирощування рослинних тканин **in vitro** ґрунтувалися на формулах, призначених для живлення цілих рослин, яких на той час існувало чимало. Найчастіше

використовували розчин Кнопа та формулу, розроблену Успенським і Успенською, які містили менше 200 мг/л загальних солей. На основі досліджень тканин моркви та віргінської повзучої рослини, концентрацію солей було подвоєно, а експерименти з топінамбуром показали ефективність підвищення їх вмісту до приблизно 4 г/л. Водночас ці зміни не завжди забезпечували оптимальний ріст культур, що зумовлювало потребу у складних добавках, таких як дріжджовий екстракт, білкові гідролізати чи кокосова вода.

Інший підхід було реалізовано завдяки аналізу попелу тютюнового калюсу. На основі отриманих даних Мурашіге та Скуг (MS) створили нове поживне середовище, в якому концентрація деяких солей перевищувала показники розчину Кнопа у 25 разів. Особливо високими були рівні нітратів (NO_3^-) та амонію (NH_4^+), а також збільшено вміст мікроелементів. Розробка формули MS дозволила значно розширити коло рослин, придатних для культивування *in vitro*, оскільки вона містила не лише макро- і мікроелементи, а й джерела вуглецю, відновленого азоту, вітаміни групи В та фітогормони. Сьогодні формула MS є однією з найпоширеніших у культурі тканин рослин.

Одним із важливих досягнень стало успішне вирощування рослин із верхівкових пагонів *Lupinus* та *Tropaneolium*, які містили кілька зачатків. Однак справжнє значення цього відкриття було усвідомлене пізніше — саме цей метод ліг в основу отримання безвірусних рослин орхідей і відкрив шлях до ефективного клонального розмноження, насамперед декоративних культур. Подальші дослідження показали, що культивовані кінчики коренів також не містять вірусів. Було встановлено, що концентрація вірусів у верхівкових меристемах надзвичайно низька, що дозволило отримувати безвірусні рослини навіть із зараженого матеріалу, як у випадку з жоржинами. Така можливість пояснюється тим, що провідні тканини, якими поширюються віруси, не досягають коренів і апікальних зон пагонів. Методика була вдосконалена і згодом стала рутинною в лабораторній практиці.

У цей період також було закладено основи культивування квіткових органів і насінневих структур **in vitro**. Перші експерименти з вирощування зав'язей призводили лише до обмеженого росту, який іноді супроводжувався вкоріненням квітконіжок. Успіхи в культивуванні насінневих зачатків були скромними в порівнянні з досягненнями в роботі з ембріонами. Ці дослідження були переважно спрямовані на з'ясування регуляторних механізмів, які впливають на розвиток зародка та плоду.

Значним кроком стало отримання перших постійно зростаючих культур ендосперму, зокрема з незрілих зерен кукурудзи. Пізніше було досягнуто регенерації повноцінних рослин шляхом органогенезу, наприклад, у представника родини санталових — *Exocarpos cupressiformis*.

Запилення та запліднення in vitro вперше було запропоновано з використанням *Papaver somniferum*. Цей підхід передбачав культивування видалених насінневих зачатків разом із пилковими зернами в одному середовищі. Така методика стала ефективним засобом отримання міжвидових та міжродових гібридів. Ще до цього з пилових зерен гінкго в умовах культури було отримано клітинні колонії, а з цілих пиляків *Tradescantia reflexa* — гаплоїдний калюс.

Справжній прорив у галузі андрогенезу здійснили Гуха та Махешварі, які продемонстрували можливість отримання гаплоїдних рослин із культивованих пиляків *Datura innoxia*. Їхні результати були підтверджені успішною регенерацією гаплоїдних рослин тютюну, що остаточно підтвердило тотипотентність пилових зерен [5].

Ще одним ключовим напрямом досліджень стала **технологія протопластів** — клітин, позбавлених клітинної стінки. Вперше вони були механічно виділені з плазмолізованих тканин понад сто років тому, а перше успішне злиття клітин було зафіксовано ще в 1909 році. Проте лише після того, як Кокінг застосував грибкову целюлазу для ферментативного руйнування

клітинних стінок, протопласти стали доступними для широкого використання. Комерційна доступність ферментів у 1970-х роках дала поштовх до стрімкого розвитку цього напрямку.

Першим прикладом регенерації рослин із мезофілових протопластів стали експерименти Такебе та співавт., які отримали повноцінні рослини тютюну. Невдовзі було отримано перші міжвидові гібридні рослини (*Nicotiana glauca* ↔ *N. langsdorffii*), що відкривало перспективи для соматичної гібридизації.

Дослідження Брауна з використанням *Agrobacterium tumefaciens* на соняшнику показали, що пухлини можуть виникати не лише в місцях інокуляції, а й у віддалених ділянках рослини. Ці вторинні пухлини були вільні від бактерій, але клітини з них можна було вирощувати без додавання ауксину. Подальші експерименти виявили в цих тканинах пухлиноіндукуючий принцип (ТІР), ймовірно, макромолекулярної природи. У 1970-х роках було встановлено природу ТІР, а самі дослідження Брауна заклали основу для трансформаційних технологій із використанням *Agrobacterium*.

Варто також згадати відкриття Леду, який довів здатність рослинних клітин поглинати та інтегрувати екзогенну ДНК. Хоча це відкриття викликало суперечки та залишалося дискусійним понад десятиліття, згодом воно стало фундаментом для розвитку генної інженерії рослин.

З огляду на доступність різних методів *in vitro*, не дивно, що, починаючи з середини 1960-х років, спостерігалось різке зростання їх застосування до різних проблем у фундаментальній біології, сільському господарстві, садівництві та лісівництві протягом 1970-х та 1980-х років. Ці застосування можна зручно розділити на п'ять широких областей, а саме: поведінка клітин, модифікація та вдосконалення рослин, рослини, вільні від патогенів, та зберігання зародкової плазми, клональне розмноження та утворення продукту.

У цей період методи **культивування *in vitro*** дедалі частіше застосовували як доповнення до традиційних селекційних підходів для

цілеспрямованої модифікації та покращення культурних рослин. Зокрема, метод контрольованого запилення *in vitro* на рильці, плаценті або насіннєвому зачатку застосовувався для отримання міжвидових і міжродових гібридів, подолання бар'єрів статевої несумісності та індукції гаплоїдних форм.

Культивування ембріонів, зав'язей і насіннєвих зачатків дозволяло подолати такі проблеми, як життєздатність ембріонів, стан фізіологічного спокою насіння та труднощі, пов'язані з пророщуванням. Особливе значення мав метод "порятунку ембріонів", який широко використовувався під час створення міжвидових і міжродових гібридів. До початку 1980-х років андрогенез було успішно реалізовано у значної кількості видів, включно з багатьма сільськогосподарськими культурами. У випадках, де андрогенез був малоефективним або неможливим, застосовували гіногенез. Гаплоїдні рослини, отримані цими методами, використовувалися для виявлення рецесивних мутацій та створення унікальних рекомбінантів, що є особливо важливим у селекційній роботі. Крім того, створення подвійних гаплоїдів забезпечило ефективне виробництво гібридів та їх включення в селекційні програми.

Клітинні культури відігравали суттєву роль у вдосконаленні рослин, зокрема шляхом виділення клітинних варіантів. Хоча перші згадки про появу соматональних варіантів, зокрема адаптованих форм, датуються ще 1940-ми роками, лише в 1970-х роках були здійснені реальні спроби використати цю мінливість у селекції. Соматональна варіація є результатом як існуючої природної мінливості клітин, так і змін, індукованих умовами культивування. Вона може мати як генетичне, так і епігенетичне походження. Хоча багато змін, що виникають у регенерованих рослинах, мають потенційне значення для сільського господарства й садівництва, наразі цей потенціал реалізовано лише частково.

У культурі клітин стало можливим отримання мутантних ліній з біохімічними особливостями, стійкістю до антибіотиків, гербіцидів і стресових

факторів. Також було виділено ауксотрофні, автотрофні клітини та клітини зі зміненими шляхами розвитку. Зазвичай для цього використовували селективні агенти в присутності мутагенів. Однак лише в окремих випадках вдалося відновити повноцінні рослини з бажаними характеристиками, як-от тютюн, стійкий до гербіцидів, або *Datura innoxia*, стійка до метилтриптофану.

До середини 1980-х років вже близько сотні покритонасінних рослин вдавалося регенерувати з протопластів. Завдяки хімічним (наприклад, поліетиленгліколь) і фізичним (електрофузія) методам злиття протопластів стало можливим створення соматичних гібридів. Основною складністю залишалося отримання регенерації повноцінних рослин із гібридних клітин. Одним із прикладів успішного використання такого підходу було створення рослин із унікальними ядерно-цитоплазматичними комбінаціями: ядро *Brassica napus*, хлоропласти *B. campestris* (які кодують стійкість до атразину) та мітохондрії *Raphanus sativus* (які забезпечують цитоплазматичну чоловічу стерильність). Такі рослини могли бути використані для отримання гібридного насіння. Проте на сьогодні подібні приклади залишаються поодинокими.

Генетична трансформація рослин здійснювалася як шляхом прямого перенесення ДНК без використання векторів, так і за допомогою векторних систем. Серед вектор-незалежних методів у роботі з протопластами були застосовані електропорація, мікроін'єкція, злиття ліпосом і метод бомбардування мікрочастинками (біолістика), який ефективно застосовувався не лише для окремих клітин, а й для тканин і органів.

Використання *Agrobacterium tumefaciens* для перенесення генів стало одним із найуспішніших напрямів, який стрімко розвивався з моменту перших успішних трансформацій. Якщо на початковому етапі об'єктами трансформації були переважно протопласти, згодом використовували цілі органи — листки, стебла та корені. Основна увага в дослідженнях була зосереджена на створенні

культур із корисними агрономічними ознаками: стійкістю до шкідників, гербіцидів і фітопатогенів [6].

1.2. Біологічні основи методу *in vitro*

In vitro – це технологія, яка дозволяє успішно культивувати живі клітини, тканини та органи поза живим організмом. Вона унікальна та складається зі спеціальних методологій культивування, що описують контрольоване середовище зі специфічними параметрами, такими як необхідні поживні речовини, відповідні умови навколишнього середовища та інші необхідні матеріали. Ці культивовані клітини, тканини та органи створюють початковий полігон для дослідження гіпотез. Цікаві результати, отримані за допомогою методів *in vitro*, генерують нові ідеї, які можна застосувати при розробці експериментів, що дозволять перейти проекти на наступний рівень розуміння.

In vitro – це початок, він дає ці критичні перші відповіді та пропонує напрямки. Клітинні культури застосовувалися для вивчення основ клітинної біології, взаємодій, що відбуваються всередині клітин, взаємодій між патогенами та їх господарями, виробництва вакцин та білків тощо. Органоїди – це нова модель *in vitro*, яка революціонує наше розуміння органогенезу та розвитку захворювань. Успішне створення моделі на основі органоїдів для органів людини дозволяє моделювати складні фізіологічні процеси, такі як розвиток органів, розвиток генетичних захворювань та розвиток раку, які важко досягти у звичайних 2D- моделях *in vitro*. Більше того, органоїди, специфічні для пацієнта, можуть бути розроблені з використанням клітин, отриманих від пацієнтів, що дозволяє підвищити точність скринінгу ліків та тестування на токсичність.

Ці моменти можуть здатися досить очевидними для тих з нас, хто використовує та/або використовував технологію *in vitro* у дослідницьких проектах як студенти, а потім на кар'єрних шляхах в академічних колах чи промисловості. Однак багато людей у сучасному світі (дивно, але це також

включає деяких вчених) мають обмежені знання про те, що, де і особливо як *in vitro* насправді вписується в прикладні дослідження. Коли вони чувають або бачать слова *in vitro*, то, здається, одразу ж спадає на думку процес, відомий як екстракорпоральне запліднення або ЕКЗ. Для них In Vitro = ЕКЗ! Абсолютно недооцінюється той факт, що ЕКЗ насправді є лише одним із тисяч застосувань, отриманих з технології In Vitro.

Знаючи про величезний вплив методологій *in vitro* на дослідження живих організмів, у 1946 році група вчених побачила можливість поділитися цими знаннями, об'єднавши колег-вчених, які працюють у широкому спектрі дисциплін, застосовуючи різні методи *in vitro*. Це призвело до створення Товариства біології *in vitro* (SIVB), спочатку заснованого як Асоціація культури тканин [7].

1.3. Етапи мікроклонального розмноження рослин

Мікророзмноження є складним багатоступеневим процесом, що забезпечує ефективне клонування рослин із високою точністю та відтворюваністю. Традиційно цей процес поділяють на три основні етапи, проте деякі дослідники виділяють також додаткові — нульовий та четвертий — для більш повного відображення усіх стадій розвитку рослини від відбору вихідного матеріалу до акліматизації.

Стадія 0 — підготовка рослин-донорів

Це підготовчий етап, який передує безпосередньому культивуванню *in vitro*. Він включає відбір та вирощування здорових рослин-донорів (так званих маточних форм) у контрольованих умовах протягом приблизно трьох місяців. Метою є забезпечення максимальної фізіологічної стабільності та санітарного стану вихідного матеріалу.

Стадія I — ініціація культури

На цьому етапі здійснюється виділення експлантатів (зазвичай це частини пагонів, верхівкові меристеми або пазушні бруньки) та їх перенесення у

стерильне поживне середовище. Перед культивуванням експлантати проходять ретельну поверхневу стерилізацію, що дозволяє уникнути контамінації мікроорганізмами. Основною метою стадії є встановлення стабільної культури без втрати життєздатності клітин.

Стадія II — масове розмноження

Цей етап є ключовим для отримання великої кількості клональних рослин. У відповідних умовах культивування відбувається активне розмноження пагонів або, залежно від виду, формування соматичних ембріонів. Культури утримуються у камерах з температурою 20–24 °С, освітленням інтенсивністю 2000–4000 люкс і фотоперіодом близько 16 годин. Це забезпечує оптимальні умови для мітотичної активності та росту тканин.

Стадія III — укорінення

На цій стадії пагони переносять у спеціалізоване середовище, що стимулює розвиток кореневої системи. У деяких випадках можливе пряме висаджування пагонів у стерильний субстрат або ґрунт. Проте укорінення *in vitro* вважається ефективнішим, оскільки забезпечує контрольований розвиток коренів і підвищує рівень виживання рослин після висаджування.

Стадія IV — акліматизація рослин

Фінальний етап передбачає перенесення регенерованих рослин із лабораторних умов у теплицю або відкритий ґрунт. На цьому етапі важливо поступово адаптувати саджанці до умов зовнішнього середовища, зменшуючи вологість і змінюючи світловий режим. У деяких випадках, особливо при роботі з витривалими видами, стадію укорінення *in vitro* можуть пропускати, висаджуючи пагони безпосередньо у ґрунтову суміш або компост [8].

1.4. Методи мікроклонального розмноження

Мікророзмноження є ключовим інструментом у сучасній біотехнології рослин, що дозволяє отримувати велику кількість генетично ідентичних рослин

(клонів) з невеликої кількості вихідного матеріалу. Цей процес поділяється на три основні типи, які відрізняються своїм підходом до ініціації нового росту:

Розмноження з пагонів: цей метод передбачає стимулювання росту нових пагонів з існуючих меристем або бруньок експланту. Для цього зазвичай використовуються цитокініни – група рослинних гормонів, таких як бензиладенін (БАП) або кінетин. Ці гормони сприяють поділу клітин та формуванню множинних пагонів.

Множинна диференціація пагонів з калюсу: цей підхід починається з формування калюсу – недиференційованої маси клітин, що утворюється з експланту. Після цього калюс стимулюється до диференціації у пагони за допомогою ауксиноподібної індолоцтової кислоти (ІОК) або інших ауксинів, часто у поєднанні з цитокінінами.

Диференціація ембріона з калюсу (соматичний ембріогенез): цей метод також починається з формування калюсу, але замість пагонів він диференціюється в соматичні ембріони, які морфологічно подібні до зиготичних ембріонів. Ці ембріони можуть проростати в цілі рослини.

Вкорінення мікророслин: перші два методи – розмноження з пагонів та множинна диференціація пагонів з калюсу – потребують подальшого етапу вкорінення, оскільки мікропагони, як правило, не мають розвинутої кореневої системи. Для стимулювання утворення коренів застосовуються ауксиноподібні речовини, такі як індолоцтова кислота (ІОК), а потім нафталіноцтова кислота (НОК).

Переваги та недоліки методів: на сьогоднішній день метод розмноження пагонами є найбільш поширеним та переважним у комерційному мікророзмноженні. Це пов'язано з тим, що методи, що включають стадію калюсу (множинна диференціація пагонів з калюсу та диференціація ембріона з калюсу), несуть в собі вищий ризик виникнення **сомаклональних варіацій** – генетичних змін у регенованих рослинах. Ці зміни виникають

через нестабільність геному клітин калюсу, які є дедиференційованими та можуть накопичувати мутації під час тривалого культивування. Таким чином, хоча методи з калюсом можуть забезпечити більшу кількість рослин, вони поступаються методу розмноження пагонами за генетичною стабільністю клонів [9].

1.5. Застосування мікроклонального розмноження в сучасному рослинництві

Упродовж 1990-х років технології *in vitro* продовжували активно розвиватися та знаходили дедалі ширше застосування у вирощуванні великої кількості видів рослин. Методи культури тканин поступово стали використовуватися для представників усіх основних груп культур: від зернових і злаків до декоративних видів. Зокрема, культивування *in vitro* застосовувалося для таких груп, як: зернові та трави, бобові, овочеві культури, картопля, інші коренеплоди та бульбоплоди, олійні культури, фрукти помірною та тропічного поясів, плантаційні рослини, лісові породи, а також декоративні види. Таким чином, клітинні технології *in vitro* вийшли за межі виключно мікророзмноження та охопили широкий спектр методів, що адаптувалися до біологічних особливостей конкретних рослин і до вирішення різних біотехнологічних задач.

Разом з тим, певні напрями, які на початкових етапах вважалися перспективними, продемонстрували обмежений успіх. Це, зокрема, стосується використання соматклональної варіації, а також регенерації рослин із мутантних клітин. Аналогічно, очікування, пов'язані з технологією протопластів, не були реалізовані в повному обсязі. Натомість значного прогресу досягнуто в розвитку методів кріоконсервації зародкової плазми та в удосконаленні технології штучного насіння [10].

У галузі культивування клітин було запроваджено нові технічні підходи, такі як вирощування на плотах, мембранах, скляних паличках, а також модифікація поживного середовища шляхом додавання неіоногенних

поверхнево-активних речовин. Клітинні культури залишаються незамінним інструментом у фундаментальних дослідженнях біології рослин. Вони активно використовуються у вивченні цитоскелету, хромосомних перебудов, особливостей клітинного циклу, а також у дослідженнях абітуації, гіпергідрикації та неопластичного росту.

Важливу роль відіграють клітинні культури у вивченні як первинного, так і вторинного метаболізму. Наприклад, вони використовуються для розробки систем транскрипції *in vitro*, регуляції вуглеводного обміну у трансгенних рослин, а також для вивчення біосинтезу вторинних метаболітів. У результаті культивування клітин лікарських рослин було ідентифіковано понад 80 ферментів, що беруть участь у біосинтезі алкалоїдів. Це стимулювало подальші дослідження в напрямку метаболічної інженерії.

Клітинні технології також мають важливе значення для вивчення морфогенезу, зокрема органогенезу, соматичного ембріогенезу та цитодиференціації. Попри активне застосування модельного організму *Arabidopsis thaliana* для досліджень розвитку, саме культури *in vitro* залишаються ключовим інструментом у цій сфері.

Прогрес у молекулярній біології забезпечив розвиток генної інженерії рослин. Було реалізовано три основні прориви: створення човникових векторів для використання здатності *Agrobacterium tumefaciens* до переносу ДНК, розробка методів прямої трансформації експлантатів та впровадження ефективних селекційних маркерів. Для видів, нечутливих до *Agrobacterium*, застосовуються альтернативні методи, зокрема біолістику, електропорацію та інші фізико-хімічні засоби, що дозволяють здійснювати трансформацію практично всіх видів рослин.

Початковий етап розвитку рослинної біотехнології був орієнтований на аграрний сектор, зокрема насінневу й агрохімічну промисловість. Основними об'єктами трансформації були дводольні культури, проте з часом кількість

трансгенних однодольних і деревних видів зростає. На сьогоднішній день генетичні модифікації охопили понад 100 видів рослин, а трансформація стала доступною для комерційно значущої зародкової плазми. Прикладом сучасних досягнень є створення «золотого рису», збагаченого β-каротином.

Наступний етап розвитку сільськогосподарської біотехнології орієнтується на потреби харчової, хімічної, фармацевтичної та переробної промисловості. Важливість цієї сфери підтверджується зростаючим міжнародним інтересом, про що свідчать, зокрема, проведені міжнародні конгреси з рослинної біотехнології (Ізраїль, 1998; США, 2002).

За даними Організації Об'єднаних Націй, населення світу до 2050 року зросте до 9,9 мільярда, тому виробництво продуктів харчування має зрости на 50%, щоб прогодувати ще мільярди людей. Мікроклональне розмноження може гарантувати безперервні виробничі системи незалежно від екологічних чи географічних обмежень для задоволення потреб зростаючого населення в продуктах харчування, кормах, клітковині та енергії. Було використано кілька перспективних методів первинного клітинного розмноження, включаючи мікророзмноження *in vitro*, органогенез та соматичний ембріогенез. Також має багато переваг, таких як виробництво рослин, вільних від патогенів; соматична гібридизація; швидке розмноження рослин, що важко розмножуються; покращення генетики комерційних рослин за бажанням; отримання андрогенних та гінгеногенних гаплоїдних рослин для скорочення програм селекції; збереження рідкісних та зникаючих рослин; виробництво різних сортів, стійких до абіотичних стресів, таких як посуха, засоленість та спека; та виробництво біологічно активних сполук або вторинних метаболітів, особливо за допомогою суспензійної культури рослинних клітин[11].

РОЗДІЛ 2

ПЕРЕВАГИ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ

2.1. Загальна характеристика мікроклонального розмноження

Методи культивування рослинних тканин активно застосовуються для ідентифікації та виділення біологічно активних фітосполук, що мають широке промислове значення. Ці технології відкривають перспективи для таких галузей, як харчова, фармацевтична та косметична промисловість. Завдяки високій пластичності методів *in vitro*, до процесу культивування залучаються різноманітні агрономічно важливі культури — зернові, овочі, плодові дерева, декоративні рослини, а також деревні види.

Поєднання культури тканин із сучасними біотехнологічними підходами сприяє сталому розвитку сільського господарства, допомагаючи розв'язати ключові проблеми глобальної продовольчої безпеки. Рослини є важливим джерелом фітохімічних речовин, які проявляють широкий спектр лікувальних властивостей. Це робить їх цінною сировиною для виробництва лікарських препаратів і нутрицевтиків. Крім того, значна кількість сполук рослинного походження успішно використовується в косметичній промисловості, зокрема завдяки своїм зволожуючим, протизапальним, омолоджувальним, антивіковим і дерматологічно активним властивостям. Вони також виявляють фармакологічну активність: антивірусну, антимікробну, протигрибкову, протиракову, антиоксидантну, протиалергічну та інші [12].

Розмноження цінних видів флори за допомогою методів *in vitro* набуває все більшого значення, оскільки має низку переваг над традиційними методами вегетативного розмноження. Серед головних переваг слід виокремити можливість цілорічного отримання біологічного матеріалу, незалежно від сезонних умов, що є важливою перевагою для аграрного виробництва та переробних галузей. Крім того, методи мікророзмноження дозволяють

ефективно зберігати зникаючі або рідкісні види флори, підтримуючи біорізноманіття.

Таким чином, культура рослинних тканин є потужним, ефективним і економічно доцільним інструментом для біосинтетичних досліджень, біовиробництва, біотрансформації та біоконверсії цінних рослинних метаболітів. Проте для широкомасштабного та сталого впровадження таких технологій у промислове виробництво необхідно враховувати певні обмеження, зокрема труднощі, пов'язані з забезпеченням безперервного процесу культивування, вилученням продуктів біосинтезу, а також підтриманням стабільних асептичних умов. Подолання цих викликів є одним із ключових напрямів подальших досліджень у галузі біотехнології рослин.

Культура рослинних тканин є важливим інструментом у фундаментальних дослідженнях, зокрема у фітопатології, фізіології рослин, вивченні метаболітів, а також у заходах зі збереження рослинного різноманіття. Метод мікророзмноження широко використовується у фітопатологічних дослідженнях для вивчення факторів, що впливають на проникнення, інфікування та розмноження патогенних організмів, а також для аналізу природи аномального поділу або росту клітин та морфогенетичного потенціалу уражених тканин.

Застосування культури тканин у фітопатології не обмежується лише використанням рослин як субстрату для патогенів. Цей підхід також сприяє глибшому розумінню особливостей патологічного росту, механізмів агресії патогенів та реакції рослини-хазяїна на інфекційне ураження. У свою чергу, вивчення фізіології та морфогенезу рослин передбачає потребу у вирощуванні рослинних структур *in vitro*, що найбільш ефективно реалізується саме за допомогою методів культури тканин.

Збереження генетичного та видового різноманіття рослин має стратегічне значення для забезпечення стабільного розвитку сільського господарства, особливо в умовах посилення впливу біотичних і абіотичних стресів. У цьому

контексті методи *in vitro* дозволяють вдосконалювати риси, пов'язані з ростом, продуктивністю та стійкістю до несприятливих чинників, що створює умови для ефективного збереження рослин *ex situ*.

Крім того, технології культури тканин відкривають можливість виробництва цінних біоактивних сполук із рідкісних або зникаючих видів без шкоди для природного середовища [13].

Нижче на рисунку 2.1. наведено мікроклональне розмноження рослин

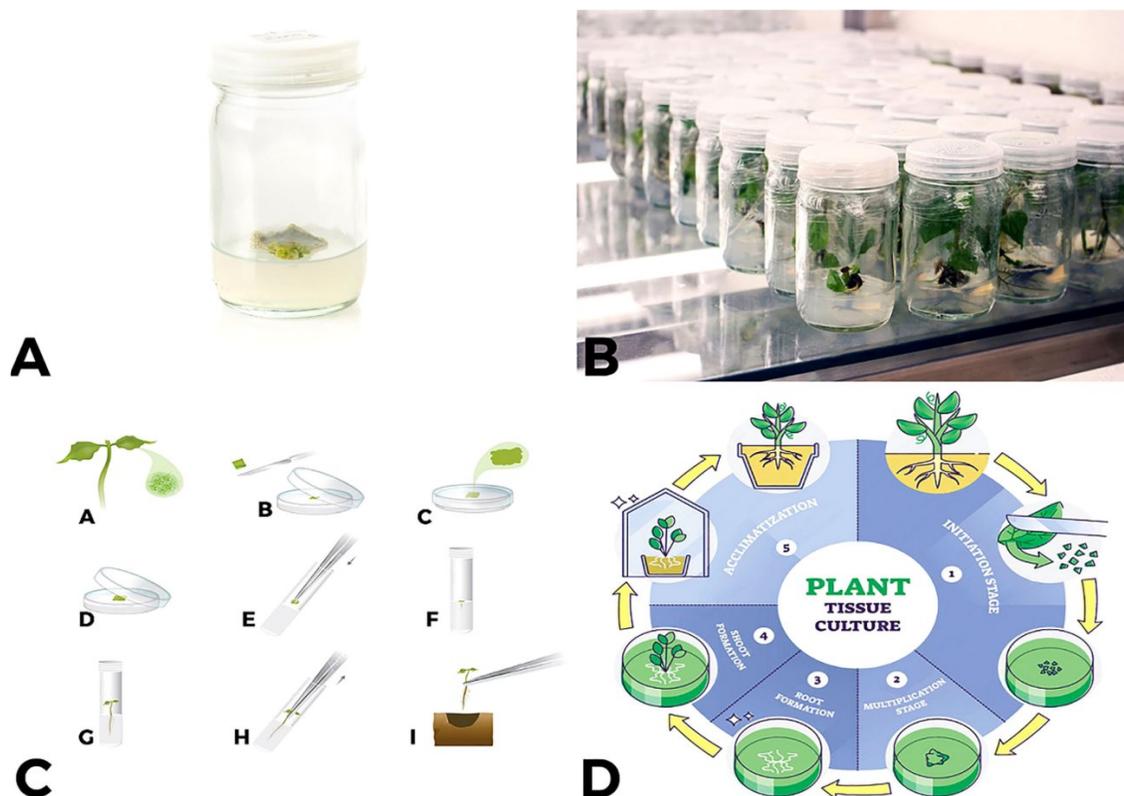


Рисунок 2.1. Огляд процесу культивування тканин (А, В) Невеликий експлант розвиває калус, який потім утворює пагони через кілька тижнів після розміщення в середовищі для культивування тканин (С) «А-І» показує повну процедуру від розміщення однієї клітини в середовищі MS до розвитку повноцінної рослини (D) Як відбуваються всі фази культивування рослинних тканин: від ініціації, розмноження, утворення коренів, утворення пагонів та акліматизації.

Методи розмноження рослин *in vitro* не лише сприяли розвитку фундаментальних досліджень, але й відкрили широкі можливості для практичного застосування у промисловості. Ці технології сприяють сталому розвитку, оскільки забезпечують ефективне виробництво біологічно активних сполук рослинного походження, що є основою для численних харчових, фармацевтичних та косметичних продуктів.

Культура рослинних тканин виступає універсальним інструментом для виділення та модифікації біологічно активних речовин, зокрема вторинних метаболітів, з рослин, що мають економічне значення. Завдяки прогресу в галузі біотехнологій, були розроблені численні протоколи для масштабного виробництва таких сполук, що дозволяє забезпечити їх стале постачання у промислових обсягах.

Поєднання культури тканин з сучасними біотехнологічними підходами також стало основою для створення генетично модифікованих рослин та реалізації програм порятунку ембріонів. Ці технології є важливим етапом у впровадженні генів до рослинного геному — як за допомогою векторів, так і без них — для отримання трансгенних рослин з покращеними характеристиками.

За допомогою зазначених методів вдалося створити культури з підвищеним вмістом поживних речовин, стійкістю до впливу біотичних та абіотичних факторів, що в цілому сприяє підвищенню врожайності. Зокрема, посилена експресія транскрипційних факторів, що беруть участь у регуляції метаболізму поживних речовин, позитивно впливає на продуктивність основних сільськогосподарських культур.

Культура тканин також відкриває важливі комерційні перспективи у виробництві декоративних, овочевих та плодово-ягідних рослин, особливо тих, що мають високу економічну цінність. Низка успішних досліджень демонструє ефективність регенерації рослин *in vitro* з метою отримання фітосполук з багатofункціональним застосуванням.

Разом з тим, сучасні огляди підкреслюють і низку обмежень, пов'язаних із впровадженням методів культури тканин у великомасштабне виробництво. Ці виклики мають бути враховані для забезпечення сталого промислового використання технологій *in vitro*. Масове впровадження таких рішень також має вирішальне значення для досягнення продовольчої безпеки, особливо в умовах постійного зростання населення [14].

2.2. Основні переваги мікроклонального розмноження

Мікророзмноження є перспективною біотехнологічною методикою, яка надає суттєві переваги порівняно з традиційними способами розмноження рослин, такими як живцювання або вирощування з насіння. Однією з ключових переваг цієї технології є можливість масового отримання великої кількості генетично ідентичних рослин з мінімальної кількості початкового матеріалу. У той час як класичні методи дозволяють отримати десятки або сотні екземплярів за один вегетаційний сезон, мікророзмноження дає змогу отримати тисячі клонів за значно коротший проміжок часу. Така висока продуктивність особливо цінна для агропромислового комплексу, адже дозволяє оперативно виводити нові сорти на ринок.

Швидкість є ще одним визначальним фактором ефективності мікророзмноження. Після отримання материнської рослини її розмноження відбувається в прискореному режимі, що значно скорочує виробничий цикл порівняно з традиційними методами. Це дає змогу швидко впроваджувати нові високопродуктивні сорти або перспективні культивари, що є суттєвою перевагою в умовах змін попиту на аграрному ринку.

Ще одна важлива перевага мікророзмноження — забезпечення фітосанітарної чистоти рослинного матеріалу. Завдяки стерильним умовам лабораторного культивування та використанню ретельно відібраної безпатогенної донорської тканини, одержувані рослини не містять вірусів, грибкових чи бактеріальних збудників. Це не лише покращує загальний стан

культури, а й зменшує потребу у використанні агрохімікатів, зокрема фунгіцидів. Наприклад, у виробництві бананів застосування рослин, отриманих методом культури тканин, дало змогу значно зменшити поширення таких захворювань, як фузаріозне в'янення та вірус бананового гроновидіння.

Крім того, використання генетично однорідного та патогенівільного посадкового матеріалу сприяє зменшенню втрат урожаю, покращенню енергії росту та підвищенню врожайності. Клони, отримані шляхом мікророзмноження, демонструють синхронний розвиток, краще адаптуються до умов вирощування та ефективніше використовують ресурси, зокрема воду й добрива. Завдяки добору високопродуктивних донорських рослин мікроклони часто характеризуються прискореним розвитком на початкових етапах, що може скоротити тривалість вегетаційного циклу або дозволити кілька циклів вирощування на рік [15].

Для виробників, переробників та експортерів важливою є також стандартизація врожаю. Однорідність рослин за такими характеристиками, як розмір, колір або текстура, дає змогу досягти стабільної якості продукції, що особливо важливо при дотриманні суворих вимог міжнародних ринків.

Мікророзмноження відіграє важливу роль у забезпеченні принципів сталого розвитку сільського господарства. Однією з його ключових переваг є можливість масового вирощування рослин у контрольованому середовищі, що знижує тиск на земельні ресурси. Завдяки високій ефективності використання ресурсів, зокрема води, добрив і засобів захисту рослин, методи мікророзмноження дозволяють зменшити негативний вплив аграрного виробництва на навколишнє середовище. Такий підхід сприяє більш ощадливому ставленню до природних ресурсів, знижує рівень агрохімічного навантаження на ґрунти та водні екосистеми.

Крім того, мікророзмноження є важливим інструментом у збереженні рідкісних та зникаючих видів рослин. Метод *in vitro* дозволяє розмножувати

цінні з точки зору біорізноманіття рослини без шкоди для природних популяцій. Після вирощування в умовах лабораторії екземпляри можуть бути використані для реінтродукції у природні екосистеми або зберігатися в колекційних фондах, що забезпечує довгострокове збереження генофонду.

Ще одним позитивним аспектом мікророзмноження є забезпечення стабільної якості продукції, що є визначальним фактором у формуванні позитивного іміджу бренду. Виробники, які використовують мікророзмножений посадковий матеріал, отримують врожаї з однорідними морфологічними та якісними характеристиками, що сприяє дотриманню стандартів якості в різних агрокліматичних зонах. Така передбачуваність продукції сприяє підвищенню довіри з боку споживачів і зміцненню репутації бренду на внутрішньому та міжнародному ринках.

З економічної точки зору мікророзмноження також відкриває нові можливості для розвитку агробізнесу як самостійного напрямку діяльності. Виробництво високоякісного посадкового матеріалу може перетворитися на прибутковий бізнес: підприємства, які володіють технологіями культивування *in vitro*, можуть реалізовувати надлишки розсади іншим виробникам, тим самим перетворюючи інвестиції в лабораторне обладнання з витрат на джерело доходу. Світовий ринок рослин, вирощених за допомогою технології культури тканин, продовжує зростати. Наприклад, в Індії ця галузь сформувалася як багатомільйонна індустрія: функціонує близько 200 комерційних лабораторій, які щорічно виробляють сотні мільйонів рослин для садівництва, овочівництва та декоративного квітництва [16].

Мікророзмноження рослин із використанням різних типів експлантатів — таких як насіння, ембріони, калуси, пиляки, протопласти та меристематичні тканини верхівок коренів і пагонів — широко застосовується для масового виробництва рослинної сировини в промислових масштабах. Традиційно одним із ключових методів у селекції рослин була соматична гібридизація, яка

дозволяє отримувати міжвидові та міжродові гібриди. Цей метод базується на злитті соматичних протопластів із подальшим відбором бажаних гібридних клітин і регенерацією повноцінних рослин. Такий підхід є ефективним для переносу цінних ознак між видами, що має велике значення для покращення сільськогосподарських культур. Наприклад, соматичні гібриди рису та цукрової тростини, отримані за допомогою електрофузії, демонструють підвищену стійкість до сольового стресу.

Одним із найсучасніших напрямів у культурі клітин і тканин є генетична трансформація, яка забезпечує введення певних генів із бажаними властивостями у клітини рослини-господаря, що дає змогу отримувати трансгенні організми з новими корисними ознаками. Генетично модифіковані рослини здатні забезпечувати вищу врожайність, поліпшену поживну цінність, а також виявляють підвищену стійкість до патогенів і шкідників [38].

Останні досягнення в галузі культури клітин, молекулярної біології, ензимології та ферментаційних технологій підтверджують перспективність цих систем як джерела синтезу біологічно активних сполук. Рослини, інфіковані штучно сконструйованими вірусами, здатні стабільно продукувати необхідні сполуки у значних кількостях без додаткових стимуляцій. Масштабне вирощування рослинних тканин є привабливою альтернативою традиційному землеробству, оскільки дозволяє отримувати цільові речовини незалежно від сезонності чи кліматичних умов. Різні параметри середовища культивування можуть бути оптимізовані для покращення продуктивності клітинних культур.

Істотний прогрес у галузі культури тканин також відкрив нові можливості для метаболічної інженерії рослин, зокрема через використання транскрипційних факторів, які сприяють синтезу важливих метаболітів. Клітинне вирощування *in vitro* відіграє важливу роль у біофармацевтичній сфері, дозволяючи отримувати терапевтичні білки, включаючи моноклональні

антитіла, антигенні білки, інтерферони, людський альбумін, гемоглобін, антигіпертензивні агенти та інші.

Метод культури тканин має суттєві переваги порівняно з традиційним розмноженням. Зокрема, за короткий період часу можна отримати тисячі саджанців із незначної кількості початкового матеріалу. Крім того, технологія дає змогу прискорити селекційний процес, зменшуючи витрати часу та простору. Тканинна культура ефективна і для розмноження багаторічних культур незалежно від кліматичних умов чи сезону. Ще одна перевага — отримання безвірусного та стерильного посадкового матеріалу, що захищений від основних збудників хвороб.

У випадках, коли насіння деяких видів не зберігається довго або є складнощі з його пророщуванням, культура тканин дозволяє зберігати рослини у вегетативному стані за умов повільного росту або використовувати методи кріоконсервування. Також за допомогою технології "порятунку ембріонів" можна зберегти міжвидові або міжродові гібриди, які не здатні до розвитку в природних умовах. Технологія тканинної культури вже понад пів століття активно використовується в селекції, зокрема для регенерації стерильних гібридів. При цьому склад середовища для вирощування можна коригувати залежно від мети дослідження або типу рослини [17].

2.3. Застосування культури рослинних тканин

Із найдавніших часів рослини відігравали ключову роль у житті людини, слугуючи джерелом їжі, прянощів, лікувальних засобів та сировини для різноманітних потреб. Завдяки надзвичайному біохімічному різноманіттю, рослини залишаються основним джерелом натуральних препаратів, що широко використовуються в харчовій, медичній і косметичній промисловості. Метод культури рослинних тканин має широкі можливості застосування як у наукових дослідженнях, так і в різних секторах промисловості. Зокрема,

мікророзмноження *in vitro* активно впроваджується у кількох ключових напрямках комерційної діяльності, що представлені у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1.

Застосування методу культивування рослинних тканин у різних галузях промисловості

Промисловість	Продукти	Застосування та переваги
Харчова	Рис	Високий урожай незалежно від сезону, потребує менше площі
	Пшениця	Стійкість до хвороб, підвищена врожайність, висока поживна цінність
	Картопля	Стійкість до хвороб, підвищена врожайність
	Ананас	Висока врожайність, ефективне та швидке виробництво
	Банан	Дешевий стерильний посадковий матеріал, високий урожай протягом року
Фармацевтична	Кодеїн	Полегшення болю та кашлю
	Атропін	Лікування брадикардії (низького пульсу)
	Резерпін	Лікування артеріальної гіпертензії
	Гіосціамін	Лікування шлунково-кишкових розладів
	Дигоксин	Лікування серцевої недостатності

З наведених прикладів таблиці 2.1., видно, що методи мікророзмноження та культура тканин відкривають широкі можливості для розвитку як харчової, так і фармацевтичної промисловості. У харчовому секторі ці технології дозволяють отримувати високоврожайні, стійкі до захворювань культури з підвищеною поживною цінністю, що є особливо важливим в умовах глобального зростання населення та обмеженості сільськогосподарських ресурсів. У фармацевтиці використання тканинних культур забезпечує сталий доступ до важливих біоактивних сполук, необхідних для лікування різних захворювань, зменшуючи залежність від природних джерел та забезпечуючи стабільну якість продукції. Таким чином, мікророзмноження сприяє підвищенню ефективності виробництва, якості продукції та сталому розвитку в обох галузях [18].

2.4. Мікроклональне розмноження в харчовій промисловості

Рослини відіграють ключову роль у житті на Землі, забезпечуючи основні потреби живих організмів, зокрема харчування для людини. Вони є джерелом цінних фітокомпонентів, таких як крохмаль, білки, харчові волокна, мінерали та біоактивні речовини, здатні запобігати онкологічним захворюванням. Культура рослинних тканин є ефективним біотехнологічним інструментом для підвищення ефективності сільського господарства, адже дозволяє знаходити рішення для проблем, пов'язаних із втратами врожаю через вплив біотичних та абіотичних факторів стресу [37].

Інтеграція технологій культури тканин із сучасними біотехнологічними підходами сприяє формуванню сталого сільського господарства, забезпечуючи продуктивність, харчову безпеку та адаптацію до змін навколишнього середовища. Завдяки методам генної інженерії та культури тканин створено трансгенні рослини, такі як *Arabidopsis*, пшениця та тютюн, що вирізняються стійкістю до екологічних стресів.

Культура тканин є відносно простою у застосуванні, економічно вигідною та безпечною для довкілля, що робить її надзвичайно перспективною для розвитку сільського господарства в умовах зростання світового населення. Особливу цінність ця технологія має не лише у сфері масового розмноження рослин, але й у напрямках генетичного вдосконалення культур та біообробки. Її застосування має стратегічне значення для налагодження тісної взаємодії між науково-дослідними установами та агропромисловим сектором.

Розвиток агропромислових проєктів є важливим кроком до досягнення сталого розвитку сільського господарства, що дозволяє залучити результати світових досліджень для практичного використання. У цьому дослідженні проаналізовано можливості мікророзмноження важливих плодово-овочевих та сільськогосподарських культур з високою харчовою цінністю, з метою глибшого розуміння ролі культури рослинних тканин у забезпеченні сталого розвитку аграрного сектору [19].

2.5. Фармацевтична промисловість

Використання рослин для лікування та профілактики різноманітних захворювань має давню історію, що сягає незапам'ятних часів. Історичні свідчення від єгиптян, римлян та китайців підтверджують широке застосування лікарських рослин у традиційній медицині для подолання різних людських недуг. Лікарські рослини — це ті, що містять активні метаболіти з фармакологічними властивостями, здатними чинити терапевтичний вплив. Вони є багатим джерелом фітохімічних речовин, які не лише сприяють лікуванню хвороб, але й широко використовуються у виробництві фармацевтичних препаратів і нутрицевтиків.

Ці лікувальні властивості рослин обумовлені різноманітною групою біоактивних сполук — вторинних метаболітів, що відрізняються за структурою та шляхами біосинтезу. Розвиток методів культури рослинних клітин сприяв значному зростанню застосування цієї технології у фармацевтичній індустрії.

Використання систем культури рослинних тканин у виробництві лікарських засобів має суттєві переваги, серед яких зниження виробничих витрат, прискорення процесу синтезу і можливість масштабування.

Хоча рослини є надзвичайно цінними джерелами фармацевтично активних сполук, для їх стабільного і контрольованого отримання необхідно застосовувати суворі лабораторні умови культивування [20].

РОЗДІЛ 3

НЕДОЛІКИ ТА ОБМЕЖЕННЯ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ

3.1. Проблеми, пов'язані з мікророзмноженням рослин

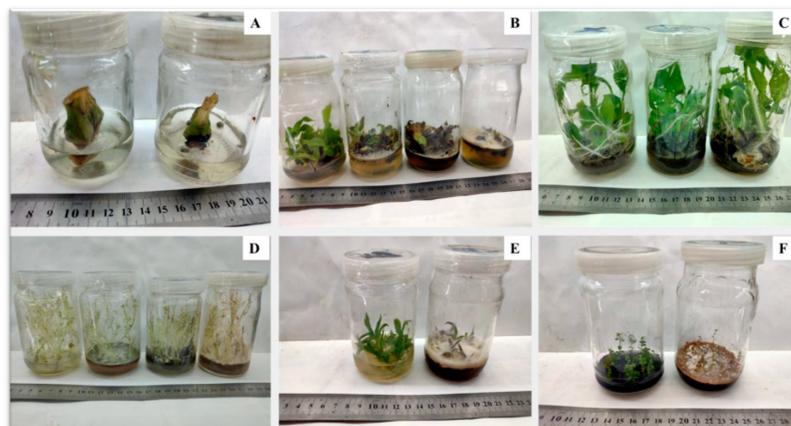
Будь-яка лабораторія, що спеціалізується на мікроклональному розмноженні, потребує певних базових умов та інфраструктури, без яких неможливе ефективне виробництво посадкового матеріалу. До таких умов належать наявність повноцінної технічної бази, контрольоване середовище та кваліфікований персонал, здатний дотримуватися необхідних стандартів стерильності та технологічного процесу. Успішне функціонування лабораторій з мікроклонального розмноження у великомасштабному виробництві рослинного матеріалу значною мірою залежить від цих чинників, поряд із науковою командою та її компетентністю.

Попри широкий потенціал мікроклонального розмноження як у наукових дослідженнях, так і в комерційному секторі, ця галузь досі стикається з низкою викликів, особливо у сфері відтворення рослин. Такі труднощі часто призводять до економічних ускладнень для лабораторій і компаній, які займаються цією діяльністю. У наступних розділах огляду розглянуто ці проблеми, зокрема ті, що стосуються створення лабораторій, а також запропоновано науково обґрунтовані рішення для подолання існуючих бар'єрів і оптимізації процесів мікроклонального розмноження [21].

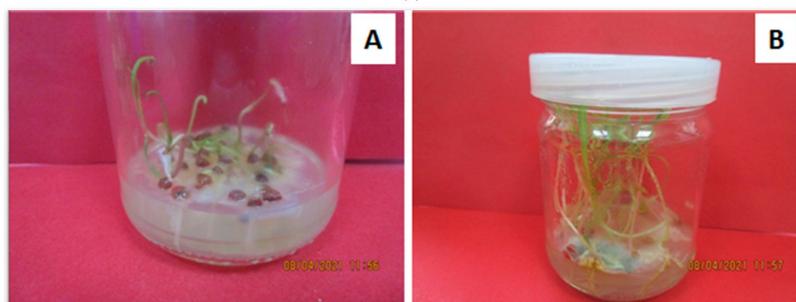
3.2. Проблеми, що виникли з технічних причин

Забруднення рослин, культивованих *in vitro*, є однією з ключових проблем, що перешкоджає успішному проведенню протоколів мікроклонального розмноження (див. рисунок 3.1). Забруднення може включати різноманітні мікроорганізми, такі як бактерії, грибки, цвіль і дріжджі. Цей фактор суттєво впливає на втрату часу та ресурсів у процесі мікроклонального розмноження, що призводить до збільшення виробничих витрат. Зовнішнє

забруднення пов'язане із середовищем культивування, скляним посудом, інструментами, посудинами та експлантатами, тоді як внутрішнє забруднення зумовлене присутністю ендofітних мікроорганізмів у материнських рослинах.



(a)



(b)

Рисунок 3.1. (а) Вплив забруднення на рослини *in vitro* (ліва банка = нормальна рослина, права банка або банки = забруднена рослина). (А) Банан (*Musa* sp.) на початковій стадії меристемної культури, (В) банан на стадії розмноження пагонів, (С) банан на стадії вкорінення, (D) картопля (*Solanum tuberosum* L.), (Е) *Cattleya* sp. та (F) лохина (*Vaccinium corymbosum* L.) на стадії вкорінення. (b) Вплив забруднення на ріст *in vitro* та проліферацію пагонів шпинату (*Spinacia oleracea* L.) (А) = бактеріальне забруднення та (В) = грибкове забруднення.

Для виключення та усунення забруднень за допомогою стерилізації поверхні використовують різні ефективні методи, зокрема застосування хімічних антисептиків (рідкі мийні засоби, хлорид ртуті, гіпохлорит натрію),

ультрафіолетове опромінення, автоклавування середовищ та інструментів, а також удосконалення методик культивування. Важливою умовою успішної роботи лабораторії є ретельна стерилізація обладнання та рослинних матеріалів, що дозволяє отримувати асептичні культури [22].

Крім того, для боротьби з ендofітними бактеріями у рослинах, культивованих *in vitro*, застосовують антимікробні препарати, зокрема антибіотики, які допомагають знизити рівень внутрішнього забруднення та підвищити ефективність мікроклонального розмноження.

У таблиці 3.1. наведено методи стерилізації які необхідні для створення стерильних умов в тканинних культур

Таблиця 3.1.

Методи стерилізації поверхонь від зовнішнього забруднення, що використовуються в лабораторіях тканинних культур

Рослини	Методи поверхневої стерилізації та стерилізовані предмети	Основні результати стерилізації
Картопля (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	Ультрафіолетове випромінювання С на експлантати протягом 10 хв	Зовнішнє забруднення експлантів зменшилося.
Шовковиця (<i>Morus alba</i> L.)	Хлорид ртуті у розчині 0,2% протягом 10 хвилин для верхівок пагонів та допоміжних бруньок	Мінімальний відсоток зараження та високий відсоток виживання у кореляції з розвитком пагонів спостерігалися для всіх досліджуваних сортів шовковиці.

Продовження таблиці 3.1.

<p>Евкалипт (<i>Eucalyptus obliqua</i>)</p>	<p>Активний хлор додають до поживних середовищ у концентрації 0,005% для приживлення та 0,003% для розмноження та подовження пагонів.</p>	<p>Активний хлор у концентрації 0,005% призвів до найнижчого рівня грибкового забруднення на стадії приживлення, тоді як при концентрації 0,003% спостерігалася максимальна кількість пагонів на експлант та найбільша довжина пагона на стадії розмноження.</p>
<p>Розмарин лікарський (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)</p>	<p>Біосинтезовані наночастинки срібла з використанням культури клітин <i>Rubia tinctorum</i> L. були застосовані для поверхневої стерилізації стеблових експлантатів.</p>	<p>Відсоток стерильності експлантатів коливався від 40 до 97%, і потемніння не спостерігалось. Цей метод можна використовувати для поверхневої стерилізації експлантатів, які мають проблему потемніння, спричинену вмістом фенолів.</p>
<p>Гвоздика (<i>Dianthus caryophyllus</i>)</p>	<p>Дихлорізоціанурат натрію (NaDCC) застосовували як стерилізатор середовища для культивування з концентрацією 0,02 г/л стерилізації в автоклаві.</p>	<p>Оскільки рівень забруднення зареєстровано нижче 5%, ізоціанурат натрію має потенціал замінити автоклавування середовищ у культурах рослинних тканин.</p>

Продовження таблиці 3.1.

Горох звичайний <i>Clitoria ternatea</i> L.	Для поверхневої стерилізації вузлових експлантатів використовували 0,1% розчин Бавістину + 70% етанолу та 0,1% HgCl ₂ .	Мікробне забруднення було усунено, а потім для індукції розмноження пагонів використано поверхнево стерилізовані вузлові експлантати.
Орхідея (<i>Angraecum rutenbergianum</i> Kraenzl)	Для поверхневої стерилізації насінневих капсул використовували 0,5% (мас. / об.) розчин NaDCC + 2 мл L	87,5% від загальної кількості капсул було продезінфіковано, а насіння всередині них було чистим після 3 місяців культивування. Як NaDCC, так і PPM були необхідними для пригнічення росту мікробів.

У зв'язку з поширеністю внутрішнього бактеріального забруднення, зокрема у пазушних пагонах бананів, дослідники проводили культивування експлантатів на поживному середовищі MS із додаванням різних антибіотиків, стерилізованих фільтрацією (ампіцилін, пеніцилін, тикарцилін), які вносили окремо у концентраціях 25, 50, 100 та 200 мг/л. Результати показали, що при концентрації 100 та 200 мг/л жодного прояву бактеріального забруднення зафіксовано не було. Проте ці дози також негативно впливали на показники розмноження пагонів, що свідчить про певну фітотоксичність препаратів. Оптимальним у цьому дослідженні виявився рівень 100 мг/л, який забезпечував

ефективне пригнічення бактеріального зараження з мінімальним впливом на рослини [23].

Зовнішнє, або епіфітне, забруднення можна зменшити або запобігти йому шляхом ретельної поверхневої стерилізації експлантатів за допомогою проточної води з використанням або без використання мийних засобів, а також шляхом обробки хімічними речовинами, такими як етанол, хлорид ртуті, гіпохлорит натрію чи спеціальні суміші консервантів для рослин. Окрім обробки перед культивуванням, певні речовини можна додавати безпосередньо до живильних середовищ з метою профілактики контамінації. Наприклад, дослідження показали ефективність додавання фунгіциду беномілу у концентраціях 100 та 500 мг/л до поживного середовища, що значно знизило грибкове забруднення при вирощуванні експлантатів *Melia azedarach* L. *in vitro*, зменшило ступінь потемніння тканин та забезпечило високий рівень індукції і росту калюсу.

Найбільшу складність становить боротьба з ендоефітними мікроорганізмами, які проникають всередину тканин рослин і не видаляються звичайними методами стерилізації. Для їх усунення до поживних середовищ доцільно додавати речовини, що мають антимікробні властивості, такі як антибіотики, сульфат міді або фунгіциди. При цьому важливо попередньо ідентифікувати тип забруднення та обрати відповідний препарат з низькою фітотоксичністю, аби не погіршити ріст та розвиток культур *in vitro*.

Процес розмноження *in vitro* включає декілька етапів, яких необхідно дотримуватись для досягнення високих результатів: (1) попереднє укорінення, (2) укорінення, (3) розмноження, (4) формування кореневої системи та (5) акліматизація рослин до умов поза лабораторією [36].

Попри ефективність цього методу, в умовах мікроклонального розмноження часто виникають труднощі, пов'язані з великим обсягом робіт, нестачею обладнання, обмеженою кількістю кваліфікованих працівників та

лабораторних техніків. Через ці фактори нерідко відбуваються затримки у пересаджуванні (субкультивуванні), що може призводити до значних втрат рослинного матеріалу або його пошкодження. Ці проблеми особливо актуальні для лабораторій, що функціонують у країнах, що розвиваються, де обмежені ресурси не дозволяють підтримувати належний рівень технологічного процесу.

Варто зазначити, що затримка субкультивування впливає на інтенсивність розмноження пагонів, і цей вплив залежить від біологічних особливостей конкретної культури. Наприклад, у деяких декоративних представників родини розових та сортів *Dasiphora fruticose* подовжений період інкубації на середовищі з незмінним гормональним складом зменшував коефіцієнт розмноження. Водночас для ананасу триваліше культивування (75 днів) сприяло збільшенню кількості пагонів порівняно з коротким періодом (30 днів) [24].

Однак тривале перебування рослин у культуральному середовищі може спричиняти соматональні варіації — зміни, які перешкоджають отриманню клонально ідентичних особин. Це суперечить основному завданню мікроклонального розмноження. Дослідження показали, що чим довше триває культивування, тим вищою є частота таких варіацій. Зокрема, тривалий період культивування калюсних культур *Tetrastigma hemsleyanum* або пагонів *Moringa oleifera* призводив до істотної генетичної нестабільності.

Один зі способів зменшення негативного впливу тривалого культивування — додавання до середовища саліцилової кислоти (SA), яка діє як антиетиленова сполука. Її застосування зменшувало прояви гіпергідрікації та соматональної варіації, що дозволяє рекомендувати SA як ефективний засіб у клональному розмноженні морінги.

Ще однією розповсюдженою проблемою є пошкодження рослин при пересаджуванні, яке виникає внаслідок використання перегрітих інструментів (щипців, скальпелів) під час роботи. Уникнути цієї ситуації можна шляхом

належного навчання персоналу та набуття достатнього практичного досвіду у сфері мікроклонального розмноження [25].



Рисунок 3.2. Вплив затримки субкультури на ріст та розмноження пагонів *in vitro* (на кожному фото ліва банка = нормальна рослина, середня банка = рослина на першій стадії деградації, права банка = мертва рослина). Ожина (**A**), Банан (**B**), Філодендрон Селум (**C**), Чорниця (**D**), Картопля (**E**) та Гіпсофіла волотиста (**F**).



Рисунок 3.3. Вплив занадто високої температури щипців та скальпелів під час стерилізації на розмноження пагонів *in vitro* та ріст обпалених рослин. Фото (**A**) зображує бананову рослину (*Musa* sp.) та (**B**) рослину лохини (*Vaccinium corymbosum* L.).

3.3. Проблеми, що виникли з фізіологічних причин

Побуріння експлантатів, або фенольне потемніння, є природним процесом, що виникає в результаті ферментативного окислення поліфенольних сполук. Ці сполуки відомі як інгібітори мікроклонального розмноження (див. рис. 3.4.). Після механічного пошкодження чи розрізання експлантатів, з клітин вивільняються фенольні сполуки, які під дією поліфенолоксидаз (PPO) і пероксидази (POD) окислюються до хінонів. Останні вступають у реакцію з білками клітини або полімеризуються, що порушує клітинний метаболізм, пригнічує ріст тканин і зрештою призводить до загибелі експлантатів.

Щоб зменшити побуріння, до культурального середовища додають різні антиоксиданти, такі як лимонна кислота, аскорбінова кислота, активоване вугілля (AC) та полівінілпіролідон (PVP), як окремо, так і в комбінації. Також ефективними підходами є застосування рідких культур або мікрощеплення. Додатково, зменшення біосинтезу фенольних сполук або інгібування активності ферменту фенілаланінаміакліази також сприяє зниженню інтенсивності побуріння під час культивування *in vitro* [26].

Серед специфічних речовин, що пригнічують фенольне окислення, варто відзначити 2-аміноіндан-2-фосфонову кислоту (AIP) — інгібітор біосинтезу поліфенолів. Її включення до живильного середовища дозволяє зменшити побуріння тканин. Крім того, використання оксиду азоту (NO) також продемонструвало здатність знижувати побуріння калюсу, сприяючи відновленню та регенерації тканин.

У рамках одного з досліджень було проведено порівняльний аналіз ефективності трьох інгібіторів побуріння при культивуванні калюсу бамбука (*Dendrocalamus sinicus*). Для цього до середовища додавали різні концентрації стерилізованих речовин: лимонну кислоту (200–600 мг/л), вітамін С (100–300 мг/л) та активоване вугілля (400–1200 мг/л). Найкращі результати були отримані при додаванні лимонної кислоти в концентрації 400 мг/л, яка

забезпечила найефективніше пригнічення побуріння, зменшивши його до 17,59%.



Рисунок 3.4. Симптоми побуріння на стадії розмноження пагонів рослин *in vitro*. Ліва банка = нормальна рослина, права банка = побуріла рослина. Банан (*Musa* sp.) (А), чорниця (*Vaccinium corymbosum* L.) (В), фаленопсис (*Phalaenopsis* sp.) (С) та каттлея (*Cattleya* sp.) (D).

Складність укорінення *in vitro* та невдача подальшої акліматизації:

Для ефективного мікроклонального розмноження необхідно забезпечити оптимальні умови для формування кореневої системи *in vitro* та подальшого розвитку відновлених пагонів. Здорові пагони, які вкоренилися *in vitro*, можна успішно адаптувати як в умовах *in vitro*, так і *ex vitro*. Після перенесення у зовнішнє середовище (*ex vitro*) такі пагони здатні вкорінюватися в ґрунті [27].

У попередніх дослідженнях вивчався вплив цитокінінів, присутніх у середовищі розмноження, на подальшу здатність мікропагонів до утворення коренів. Було встановлено, що тип і концентрація цитокініну суттєво впливають

на наступний етап вкорінення. У багатьох видів використання тидіазурону (TDZ) або бензиладеніну (BA) знижувало ефективність вкорінення або повністю його пригнічувало. Наприклад, підвищення концентрації TDZ до 0,45 мкМ призводило до повної відсутності утворення коренів. Подібні результати були зафіксовані й для пагонів яблуні сорту «Royal Gala» при використанні високих концентрацій мета-тополін-рибозиду (TOPR). Навіть найбільш поширений цитокінін — бензиладенін — мав гальмівний ефект на коренеутворення, зокрема у сорту «Red Fuji», де його ефективність була нижчою порівняно з мета-тополіном (TOP).

Зниження концентрації мінеральних солей до половини або третини в середовищі для вкорінення позитивно впливає на індукцію та розвиток кореневої системи, особливо у бобових, плодово-ягідних, лікарських та деревних рослин. Повне середовище Мурасіге й Скуга (MS) все ще широко використовується для вкорінення *in vitro* у більшості трав'янистих рослин, які легко вкорінюються. Наприклад, у цінної лікарської рослини *Typhonium flagelliforme* максимальне коренеутворення досягалося саме на повному середовищі MS. Аналогічно, 100% успішність вкорінення *in vitro* спостерігалася у *Cordyline fruticosa* та *Philodendron selloum* після чотиритижневого культивування на повному середовищі MS без фітогормонів [28].

Для рослин із труднощами в укоріненні рекомендовано зменшувати концентрацію середовища, щоб знизити осмотичний тиск. Наприклад, мікропаростки батату (*Ipomoea batatas*) демонстрували 100% ефективність вкорінення після тритижневого культивування на MS із половинною концентрацією мінеральних речовин. Оптимальне вкорінення для *Arnica montana* та гібридів орхідей роду *Cattleya* досягалося при додаванні індол-3-масляної кислоти (IBA) у концентрації 0,5–2,5 мг/л до половинного середовища MS.

Загально визнано, що для індукції кореневої системи необхідний ауксин, проте як його відсутність, так і надлишок у середовищі можуть пригнічувати утворення додаткових коренів, наприклад, у мікропагонів яблуні. Якість коренів також може покращуватись при введенні ауксинів до живильного середовища.

Тип ауксину, який додається до середовища для вкорінення, залежить від кількох факторів, найважливішим із яких є структура самого протоколу — однофазна чи двофазна. Двофазна схема найчастіше використовується для садівничих культур, зокрема яблуні. У цьому випадку коротка фаза тривалістю близько тижня включає застосування ІВА для стимуляції утворення коренів, після чого слідує триваліша фаза, де додають нафталіноцтову кислоту (NAA) для подовження коренів.

Серед способів застосування ІВА найбільш ефективними були як безпосереднє додавання до середовища для вкорінення, так і попереднє занурення пагонів у стерильний розчин ІВА з подальшим перенесенням на середовище MS. Наприклад, у сорту нуту (*Cicer arietinum* 'Giza4') найвищу ефективність вкорінення спостерігали при попередньому зануренні пагонів у розчин ІВА з концентрацією 50 мМ/л та культивуванні у рідкому середовищі [29].

3.4. Проблеми, що виникли через генетичні причини

Сомаклональна варіація стосується неочікуваних, небажаних змін, які виникають під час культивування тканин, можуть передаватися клональному потомству та набувають спадковості. Такі зміни зазвичай спостерігаються у рослин, регенерованих *in vitro*, і є небажаними, особливо в програмах масового мікроклонального розмноження, де необхідна висока генетична однорідність матеріалу, що відповідає материнській рослині.

Цей тип варіацій тісно пов'язаний з генотипом: деякі види та сорти є більш схильними до змін під час *in vitro* культивування. На виникнення сомаклональної варіації також впливають інші фактори, зокрема тривалість

культивування експлантату, склад поживного середовища (особливо концентрації ауксинів і цитокінінів), тип цукру, інтенсивність проліферації тканини, частота субкультур, природний відбір, мутації, рівень плоідності та обраний метод регенерації. Сам процес культивування створює для клітин стресові умови, що може призводити до геномних змін [30].

Додатково, механічні пошкодження експлантату, обробка стерилізуючими речовинами, а також коливання температури, вологості та освітлення також можуть сприяти розвитку соматклональної варіації.

Дослідження цього явища проводилися на багатьох культурах, включаючи орхідеї, оливу, фінікову пальму, огірок, ананас і льон. Хоча в сільському господарстві соматклональна варіація має потенціал для створення нових агрономічно цінних сортів, зокрема з підвищеною стійкістю до хвороб, вона водночас має низку недоліків. До основних проблем належать: (1) поява непередбачуваних і неконтрольованих змін, (2) обмежене використання лише до тих рослин, що здатні до розмноження *in vitro* та регенерації, (3) уповільнене зростання і знижена фертильність отриманих клонів, (4) утруднення отримання рослин, які відповідають вихідному типу — ключова мета мікротклонального розмноження.

Щоб мінімізувати соматклональну варіацію, слід уникати тривалого культивування *in vitro*, надмірного використання фітогормонів, обмежувати кількість субкультур і періодично відновлювати культури з нових експлантів. Особливу обережність слід застосовувати при використанні таких регуляторів росту, як 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота та кінетин, які можуть підвищувати ризик виникнення змін [32].

3.5. Порушення та аномалії в мікророзмноженні рослин

Мікротклональне розмноження вважається важливим інструментом, що використовується в лабораторії, збереженні та генетичному вдосконаленні видів

рослин у програмах селекції. Однак таке застосування, зокрема техніка мікророзмноження, ускладнюється деякими порушеннями та аномаліями.

Гіпергідрикація

Термін **гіпергідричність (ГГ)** означає фізіологічне порушення, що виникає у рослин, вирощених *in vitro*, внаслідок надмірного зволоження тканин, слабкого здерев'яніння та, як наслідок, зниження механічної міцності. Це явище спостерігається у трав'янистих, деревних і сукулентних рослин. Гіпергідричність також відома під назвами "склоподібність", "сизуватість" або "напівпрозорість" і характеризується аномальним водянистим виглядом рослин.

Такі рослини мають надмірний тургор, знижений рівень лігніфікації, напівпрозорі або водянисті органи, менш інтенсивне забарвлення і схильність до ламкості. Гіпергідричність значно ускладнює процес регенерації та мікроклонального розмноження, знижуючи вихід якісного посадкового матеріалу та викликаючи суттєві економічні втрати у біотехнологічному виробництві [31].

Крім того, це явище обмежує ефективність використання методів культури тканин для збереження генетичних ресурсів рослин і проведення генетичного поліпшення шляхом трансформації.



Рисунок 3.5. Вплив гіпергідритації на проліферацію пагонів рослини топінамбура (*Helianthus tuberosus* L.) *in vitro*. Фотографії (A – C) = нормальні рослини *in vitro*, тоді як фотографії (D – F) = гіпергідратовані рослини *in vitro*

Основними причинами гіпергідритації (ГГ) у рослинах з пероральною культивуацією можуть бути висока відносна вологість, висока концентрація солі в середовищі, низька інтенсивність освітлення, накопичення газу в банці, тривалість інтервалів між субкультурами, де тривала субкультура посилювала накопичення етилену в культуральних судинах, що призводило до ГГ, кількість субкультур, де при збільшенні кількості субкультур рослин, культивованих *in vitro*, зростала частота ГГ, низький вміст кальцію та високий вміст амонію, що може спровокувати оксидативний стрес [33].

Некроз кінчика пагона

Некроз верхівки пагона (НВП) — це фізіологічне порушення, що призводить до загибелі апікальної частини пагона під час культивування *in vitro* та зумовлене несприятливими умовами середовища. НВП проявляється у вигляді опіків, пошкоджень або повного відмирання верхівкової частини пагонів. Це явище може виникати навіть за, на перший погляд, оптимальних умов росту, як *in vitro*, так і *ex vitro*, коли рослини проходять стадії видовження, вкорінення або розмноження, але при цьому верхівка набуває бурого забарвлення та гине.

НВП найчастіше спостерігається у деревних рослин і чагарників, у яких частота його прояву може сягати понад 50%. Хоча точний механізм розвитку цього явища ще недостатньо з'ясований, дослідники пов'язують його з дефіцитом мінеральних елементів, таких як кальцій, магній, калій, бор або нітрати, а також із порушенням живлення, накопиченням фенольних сполук у верхівках, нестачею антиоксидантів, низьким рівнем іонів кальцію, надмірною концентрацією регуляторів росту або неправильно підібраними видами та кількістю цитокінінів у середовищі.

Некроз верхівки може завдати значної шкоди при мікроклональному розмноженні таких видів, як яблуня, виноград, фісташка, слива та декоративні види з роду *Prunus*. Щоб подолати цю проблему, були розроблені ефективні

методи — наприклад, додавання хлориду кальцію у середовище, що дозволило досягти високої виживаності пагонів банану та плантану, або комбінація фруктози з кальцієм, яка повністю усунула проблему некрозу у сливи [34].

Альбіносні рослини (альбінізм) у культурах пиляків

Альбінізм стосується неповної диференціації хлоропластних мембран та подальшої повної або часткової втрати хлорофілових пігментів рослин *in vitro*. Це може негативно впливати на ефективність процесу фотосинтезу у рослин, що може знизити їхню виживаність (Рисунок 3.6.). Крім того, спостерігалися зміни біохімічних параметрів зеленого та альбіносного листя культур *Caladium bicolor in vitro*. Крім того, альбінізм *Agave angustifolia* зумовлений молекулярними змінами в меристематичних клітинах листя альбіносних рослин, що призводить до морфологічних аномалій, які впливають на продихову провідність, транспірацію та фотосинтез, водночас вони спричиняють втрату фізіологічних функцій та розвиток продихів [35].

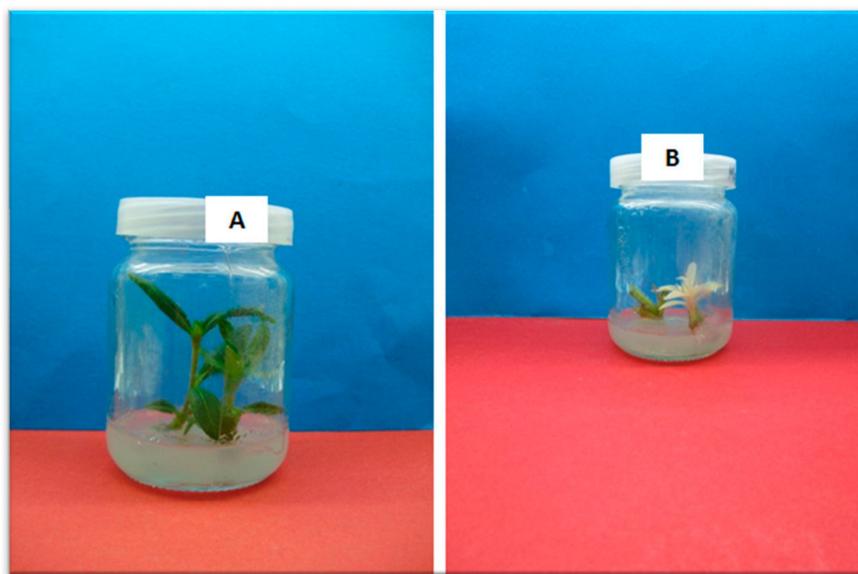


Рисунок 3.6. Феномен альбіноса рослини топінамбура (*Helianthus tuberosus* L.), розмноженої *in vitro* . Фото (**A**) = звичайні рослини, тоді як фото (**B**) = рослини альбіноса.

ВИСНОВКИ

У результаті наведеної інформації було встановлено, що мікроклональне розмноження є ефективною біотехнологічною методикою для отримання великої кількості генетично однорідних рослин високої якості за короткий час. Цей метод дозволяє забезпечити масове виробництво оздоровленого, фітосанітарно чистого посадкового матеріалу незалежно від кліматичних умов, що є надзвичайно важливим для інтенсифікації сучасного рослинництва.

До основних **переваг** мікроклонального розмноження слід віднести:

- можливість масового клонування рослин з мінімальної кількості початкового матеріалу;
- високу швидкість розмноження та цілорічне виробництво садивного матеріалу;
- отримання рослин, вільних від патогенів, що знижує потребу в агрохімікатах;
- збереження рідкісних та зникаючих видів;
- генетичну однорідність і синхронність росту отриманих клонів;
- перспективи для селекції, соматичної гібридизації та генної інженерії;
- застосування у фармакології, харчовій та косметичній промисловості для біосинтезу цінних сполук.

Проте, поряд із численними перевагами, мікроклональне розмноження має низку **недоліків**:

- висока вартість створення та утримання лабораторій;
- складність забезпечення стерильних умов та ризик мікробного забруднення;
- необхідність висококваліфікованого персоналу;
- ймовірність виникнення соматичних варіацій;
- труднощі з укоріненням *in vitro* та адаптацією рослин до умов *ex vitro*;

- фізіологічні порушення, такі як гіпергідрикація, побуріння тканин або некроз верхівки пагона.

Таким чином, мікроклональне розмноження має значний потенціал для впровадження в комерційне рослинництво та наукові дослідження, проте потребує подальшої оптимізації технологічних процесів з урахуванням біологічних особливостей кожного виду та економічної доцільності. Подолання наявних обмежень та удосконалення методик дозволить повною мірою реалізувати можливості цього прогресивного біотехнологічного інструмента.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бріджен, М.; Ван Хаутвен, В.; Еескхат, Т. Методи культивування тканин рослин для селекції. В: *Декоративні культури, Довідник із селекції рослин* / Van Huylbroeck, J. (ред.). Springer International Publishing AG, Cham, Швейцарія, 2018, с. 127–144.
2. Нойманн, К.-Х.; Кумар, А.; Імані, Дж. Культура рослинних клітин і тканин — інструмент основ і застосування біотехнології, 2-ге вид. Springer Nature Switzerland AG, Cham, Швейцарія, 2020, с. 1–11.
3. Віана, К.М.; Фрейре, Д.; Абрантес, П.; Роча, Дж.; Перейра, П. Важливість сільськогосподарських угідь для підтримки продовольчої безпеки та цілей сталого розвитку: систематичний огляд. *Sci. Total Environ.* 2022, 806, 150718.
4. Бідабаді, С.С.; Джайн, С.М. Клітинні, молекулярні та фізіологічні аспекти регенерації рослин *in vitro*. *Рослини* 2020, 9, 702.
5. Рані, А.; Донован, Н.; Мантрія, Н. Огляд: Майбутнє діагностики фітопатогенів у системі виробництва в розсадниках. *Biosens. Bioelectron.* 2019, 145, 111631.
6. Пе, П.П.В.; Найнг, А.Г.; Сое, М.Т.; Канг, Х.; Парк, К.І.; Кім, К.К. Створення меристемної культури для безвірусного та генетично стабільного виробництва рослини, що знаходиться під загрозою зникнення, *Hosta capitata*. *Sci. Hortic.* 2020, 272, 109591.
7. Кумар, М.К.; Сандіп, Б.В.; Рао, С.П. Розвиток солестійких калюсних культур шляхом соматичної гібридизації між *Oryza sativa* та мангровою травою *Myriostachya wightiana*. *Ann. Agrar. Sci.* 2018, 16, 396–404.
8. Ван, М.; Цзі, Ю.; Фен, С.; Лю, К.; Сяо, З.; Ван, Х.; Ван, Ю.; Ся, Г. Невипадкові патерни генетичної варіації, індуковані асиметричною соматичною гібридизацією у пшениці. *BMC Plant Biol.* 2018, 18, 244.

9. Парк, С. Методи та експерименти з культивування рослинних тканин, 5-те вид. Academic Press, Кембридж, Массачусетс, США; Elsevier Inc., Лондон, Велика Британія, 2021, с. 1–23.
10. Найнг, А.Г.; Адедеджи, О.С.; Кім, К.К. Технологія протопластів у декоративних рослинах: сучасний прогрес та потенційні застосування для генетичного покращення. *Sci. Hortic.* 2021, 283, 110043.
11. Санчес, М.А.; Коронадо, Ю.М.; Коронадо, А.К.М. Андрогенні дослідження у виробництві гаплоїдів та подвійних гаплоїдів у *Capsicum* spp. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 2020, 73, 9047–9056.
12. Дхіман, К.М.; Шарма, Л.; Сінгх, А.; Шарма, М.М. Збереження ex situ з використанням методів in vitro рослини, що знаходиться під загрозою зникнення *Sterculia urens* Roxb.: рослина для торгівлі камеддю у великих обсягах. *Ind. Crops Prod.* 2020, 158, 113015.
13. Каракас, Ф.П.; Бозат, Б.Г. Коливання продукції вторинних метаболітів та ферментів антиоксидантного захисту в калюсних культурах козячої рути (*Galega officinalis*) in vitro за різних абіотичних стресових умов. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2020, 142, 401–414.
14. Солеймані, С.Х.; Бернард, Ф.; Аміні, М.; Хаварі-Нежад, Р.А. Накопичення кадмію та продукція алкалоїдів рослинами *Narcissus tazetta*, вирощеними in vitro з кадмієвим стресом. *Plant Physiol. Rep.* 2020, 25, 51–57.
15. Фортіні, Е.А.; Батіста, Д.С.; Мамедес-Родрігес, Т.К.; Феліпе, С.Х.С.; Коррейя, Л.Н.Ф.; Чагас, К.; Сільва, П.О.; Роча, Д.І.; Отоні, В.К. Швидкість газообміну та концентрація сахарози впливають на ріст рослин та виробництво флавоноїдів у *Vernonia condensata*, вирощеній in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2021, 144, 593–605.
16. Кізбол, А.; Лукасевич, С.; Себастьян, В.; Кустровський, П.; Козел, М.; Майда, Д.; Черняк, А. До хімії, опосередкованої рослинами — наночастинки

золота, отримані з використанням водного екстракту *Rosa damascena*, та їхня біологічна активність *in vitro*. *J. Inorg. Biochem.* 2021, 214, 111300.

17. Грегоріо, Н.; Гербон, Дж.; Гаррісон, С. Розвиток дрібномасштабного лісництва в Лейте, Філіппіни: центральна роль розсадників. *Small-Scale For.* 2004, 3, 337–351.

18. Дегранде, А.; Таджо, П.; Такоутсінг, Б.; Асаа, Е.; Цобенг, А.; Зак Чоунджеу, З. Посадка дерев на фермерські поля: успіх сільських розсадників у розповсюдженні високоякісного посадкового матеріалу в Камеруні. *Small-Scale For.* 2013, 12, 403–420.

19. Маршалл, М.; Сазерленд, Р.; Халм, П. Е. Оцінка ролі мереж торгівлі рослинами у вразливості лісових розсадників до рослинних патогенів. *Australas. Plant Pathol.* 2021, 50, 671–681.

20. Селієм, М.К.; Абдалла, Н.А.; Ель-Рамаді, Г.Р. Реакція орхідеї фаленопсис на селен та біо-наноселен: укорінення та акліматизація *in vitro*. *Env. Biodiv. Soil Secur.* 2020, 4, 277–290.

21. Гаспар, Т. Вітрифікація при мікророзмноженні. В: *Високі технології та мікророзмноження I*, «Біотехнологія в сільському господарстві та лісництві», ред. Баджадж, YPS. Springer, Берлін/Гейдельберг, Німеччина, 1991, том 17, с. 116–126.

22. Пандей, С.; Сундарараджан, С.; Рамалінгам, С.; Пант, Б. Вплив нітропрусиду натрію та регуляторів росту на калюс, індукцію множинних пагонів та побуріння тканин у комерційно важливої *Valeriana jatamansi* Джонс. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2020, 142, 653–660.

23. Тейшейра да Сілва, JA; Незамі-Аланаг, Е.; Барреал, ME; Хер, М.М.; Вікасоно, А.; Гульяс, А.; Хідвегі, Н.; Мадьяр-Таборі, К.; Мендлер-Дріньовський, Н.; Мартон, Л. та ін. Некроз верхівки пагона рослинних культур *in vitro*: повторна оцінка можливих причин і рішень. *Planta* 2020, 252, 47.

24. Павелкович, М.Є.; Скажинська, А.; Мроз, Т.; Бистрицький, Е.; Пледер, В. Молекулярне розуміння явищ соматональної варіації з профілювання транскриптомів ліній огірка (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2021, 145, 239–259.
25. Рангху-Санмухія, В.М. Соматональна варіація та методи, що використовуються для її виявлення. В: *Розмноження та генетична маніпуляція рослинами*; Сіддік, І. (ред.). Springer Nature, Сінгапур, 2021, с. 1–18.
26. Такур, М.; Ракшандха; Шарма, В.; Чаухан, А. Оцінка генетичної точності довгострокових культур пагонів *in vitro* та регенерованих рослин японської сливи сортів Santa Rosa та Frontier за допомогою маркерів RAPD, ISSR та SCoT. *S. Afr. J. Bot.* 2020, 140, 428–433.
27. ФАО/МАГАТЕ. Низьковитратні варіанти технології культивування тканин у країнах, що розвиваються. Матеріали технічної наради, Відень, Австрія, 26–30 серпня 2002. Доступно онлайн: https://www-pub.iaea.org/mtcd/publications/pdf/te_1384_web.pdf (дата звернення: 14.06.2022).
28. Лойола-Варгас, В.М.; Очоа-Алехо, Н. Вступ до культури рослинних тканин: досягнення та перспективи. В: *Протоколи культивування рослинних клітин, методи молекулярної біології*; Лойола-Варгас, В.М., Очоа-Алехо, Н. (ред.). Springer Nature, Нью-Йорк, 2018, том 1815, с. 3–13.
29. Сінгх, К.Р. Огляд проблем та їх вирішення в культурі рослинних тканин. *Азійський журнал біології та наук* 2018, 11, 165–172.
30. Gangopadhyay, M.; Nandi, S.; Roy, SKB. Ефективний протокол стерилізації після вирощування для зменшення мікробного забруднення *Solanum tuberosum* CV. 'Kufri jyoti' для налагодження мікророзмноження в сезон дощів. *J. Basic Appl. Plant Sci.* 2017, 1, 25.
31. Нойманн, К.-Х., Кумар, А., Імані, Дж. Культура рослинних клітин і тканин: інструмент основ і застосування біотехнології. 2-ге вид. Cham: Springer Nature Switzerland AG, 2020. С. 1–11.

32. Бідабаді, С.С., Джайн, С.М. Клітинні, молекулярні та фізіологічні аспекти регенерації рослин *in vitro* // Рослини. 2020. Т. 9, № 5. С. 702.
33. Парк, С. Методи та експерименти з культивування рослинних тканин. 5-те вид. Кембридж: Academic Press, 2021. С. 1–23.
34. Сінгх, К.Р. Огляд проблем та їх вирішення в культурі рослинних тканин // Азійський журнал біології та наук. 2018. Т. 11, № 3. С. 165–172.
35. Базіле, Г.Н.; Тедоне, Л.; Пульвенто, К.; Де Мастро, Г.; Рута, К. Розробка ефективного протоколу розмноження *in vitro* для *Cannabis sativa* L. subsp. *ruderalis* Janish. *Horticulturae* 2023 , 9 , с 1241.
36. Пурхасан, А.; Кавіані, Б.; Кулус, Д.; Мілер, Н.; Негахдар, Н. Повний протокол мікророзмноження чорнолистого *Zamioculcas zamiifolia* (Lodd.) Engl. «Довон». *Horticulturae* 2023 , 9 , с 422.
37. Кавіані, Б.; Дельталаб, Б.; Кулус, Д.; Тимошук А.; Багері, Х.; Azarinejad, Т. Розмноження *Pyracantha angustifolia in vitro* (франц.) СК Schneid. *Horticulturae* 2022 , 8 , с 964.
38. Папафотіу, М.; Влаху, Г.; Мартіні, А.Н. Дослідження впливу типу експлантату та різних регуляторів росту рослин на мікророзмноження п'яти середземноморських видів шавлії , що походять з Греції. *Horticulturae* 2023, 9, с 96.