

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07 – МКР. 1998 «С». 2023.01.11. 6 ПЗ

КУЩЕНКО КАТЕРИНА СЕРГІЇВНА

2023

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології**

УДК 631.5.635.9

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету

захисту рослин, біотехнологій та екології

_____ Коломієць Ю.В.

«___» _____ 2024 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри

екобіотехнології та біорізноманіття

_____ Кваско О.Ю.

«___» _____ 2024 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: «Оптимізація біотехнологічних етапів клонального мікророзмноження гвоздики (*Dianthus caryophyllus* L.)»

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

Освітня програма Екологічна біотехнологія та біоенергетика
(назва)

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

Керівник магістерської роботи

д. с.-г. наук, професор

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

Кляченко О. Л.

(ПІБ)

Виконав

(підпис)

Кущенко К. С.

(ПІБ студента)

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри екобіотехнології та
біорізноманіття
к. б.н., доцент _____ Олена КВАСКО
« ____ » _____ 2024 р.

З А В Д А Н Н Я

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Кущенко Катерині Сергіївні

(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

1. Тема роботи «Оптимізація біотехнологічних етапів клонального мікророзмноження гвоздики (*Dianthus caryophyllus* L.)»

Затверджена наказом ректора НУБіП України від 01 листопада 2024 р. № 1998 "С"

керівник роботи Кляченко Оксана Леонідівна, д.с-г. наук, професор
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

2. Строк подання студентом роботи 05 листопада 2024 року
3. Вихідні дані до роботи: навчальна та наукова література, публікації наукових установ, власні спостереження та дослідження.
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):
 - 4.1. Провести аналіз наукових джерел, включаючи підручники, наукові статті, монографії та інтернет-ресурси, щодо питань, пов'язаних із оптимізацією клонального мікророзмноження гвоздики. Підготувати розділ "Огляд літературних джерел".
 - 4.2. Введення в культуру *in vitro* експлантів гвоздики.
 - 4.3. Вивчити особливості калюсо- та морфогенезу гвоздики в умовах *in vitro*.
 - 4.4. Провести укорінення рослин-регенерантів гвоздики *in vitro* та їх адаптацію.
 - 4.5. Вивчити ефективність термотерапії рослин гвоздики.
 - 4.6. Розробити оптимізовану технологію клонального мікророзмноження рослин гвоздики.
 - 4.7. Сформулювати висновки на основі проведених досліджень.

5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	Кляченко О.Л.		
2	Кляченко О.Л.		
3	Кляченко О.Л.		

6. Дата видачі завдання 05 листопада 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів випускної бакалаврської роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Опрацювання літературних джерел та написання розділу “Огляд літератури”	Жовтень-Грудень 2023	
2	Збір необхідних даних та матеріалів	Січень – травень 2024	
3	Аналіз результатів проведених досліджень	Червень - липень 2024	
4	Написання розділу “Результати досліджень”	Серпень - вересень 2024	
5	Написання висновків, пропозицій, списку літератури	Жовтень 2024	
6	Оформлення роботи	Жовтень 2024	

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

(підпис)

Оксана КЛЯЧЕНКО

Завдання прийняв до виконання

(підпис)

Катерина КУЩЕНКО

Реферат

Дипломна робота на тему «Оптимізація біотехнологічних етапів клонального мікророзмноження гвоздики (*Dianthus caryophyllus* L.)» виконана на 73 сторінках друкованого тексту, містить 19 інформаційних таблиць та 14 рисунків, 49 джерел використаної літератури, із них 39 латиницею.

Магістерська кваліфікаційна робота складається із наступних розділів, а саме: огляд літератури; матеріали та методи дослідження; експериментальна частина; висновки; список використаних джерел;

Дослідження проводилися в 2023-2024 рр у лабораторії біотехнології рослин кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів та природокористування України.

Мета роботи - Вивчення особливостей основних етапів клонального мікророзмноження різних сортів голландської гвоздики в умовах *in vitro* та дослідження ефективності термотерапії при оздоровленні рослин.

Об'єкт дослідження: біотехнологічні основи, що забезпечують реалізацію морфогенетичного потенціалу тканин і органів рослин гвоздики, особливості отримання рослин-регенерантів та їх адаптації до умов *in vivo*.

Предмет дослідження: різні генотипи гвоздики;

Методи дослідження: культура ізольованих клітин та тканин *in vitro*, мікроклональне розмноження, статистичні.

У магістерській роботі наведені основні аспекти по отриманню рослин-регенерантів *Dianthus caryophyllus* L. в культурі *in vitro*. Відпрацьовано методику отримання рослин-регенерантів за допомогою прямого та непрямого морфогенезу. Вивчено ефективність термотерапії за оздоровлення посадкового матеріалу різних генотипів гвоздики. Розроблено оптимізовану технологію клонального мікророзмноження рослин гвоздики.

Ключові слова:, *Dianthus caryophyllus* L. мікроклональне розмноження, калус, рослини-регенеранти, *in vitro*.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ		
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ		
ВСТУП		
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ		
1.1	Біологічні особливості гвоздики (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.)	
1.2	Теоретичні основи мікроклонального розмноження та його практичне застосування	
1.2.1	Отримання безвірусного посадкового матеріалу гвоздики	
1.3	Термотерапія рослин гвоздики	
1.4	Застосування методу мікроклонального розмноження у квітникарстві	
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ		
2.1.	Місце проведення досліджень, обладнання лабораторії і умови роботи	
2.2	Матеріали дослідження	
2.3	Методи дослідження	
2.3.1	Стерилізація експлантатів гвоздики та умови культивування рослин	
2.3.2	Підбір живильних середовищ для культивування ізольованих тканин гвоздики	
2.3.3.	Отримання калюсу із різних експлантатів гвоздики та непрямий морфогенез	
2.3.4	Отримання прямого морфогенезу та укорінення рослин гвоздики	
2.3.5	Адаптація рослин-регенерантів гвоздики.	
2.3.6	Термотерапія рослин гвоздики	
2.3.7	Статистична обробка результатів досліджень	

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ		
3.1	Введення в культуру <i>in vitro</i> та отримання асептичних експлантатів гвоздики	
3.2	Індукція калусогенезу тканин та органів рослин гвоздики та вивчення їх регенераційної здатності	
3.3	Індукція пагоноутворення із апікальних меристем та мікроживців різних генотипів гвоздики	
3.4	Одержання рослин-регенерантів гвоздики та їх укорінення <i>in vitro</i>	
3.5	Адаптація рослин-регенерантів та перенесення їх в субстрат	
3.6	Ефективність термотерапії рослин гвоздики	
3.7	Розробка оптимізованої технології клонального мікророзмноження рослин гвоздики	
ВИСНОВКИ		
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ		
ДОДАТКИ (копії публікацій)		

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

БАП – 6-бензиламінопурин

ІОК – індоліл-3-оцтова кислота

НОК – α -нафтилоцтова кислота

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота

МС – середовище Мурасіге і Скуга

МКР – мікроклональне розмноження

ЖС – живильне середовище

ВСТУП

Гвоздика – багаторічна рослина, яка культивується майже в усіх регіонах Європи і використовується в озелененні як декоративна рослина для висадження на клумбах та альпійських горках. У квітникарстві гвоздику використовують для зрізання та реалізації. В оранжереях і теплицях для зрізання вирощують гвоздику ремонтантну, яку часто називають голландська. Гвоздика (червона, розова чи біла) є прикрасою студентів Оксфорду, які йдуть на випускний екзамен. Основним способом розмноження гвоздики голландської є меристемна культура тканин, яка уможливорює отримання безвірусного посадкового матеріалу та його швидке розмноження [25, 20].

В останні роки в дослідженнях по культурі тканин і клітин вищих рослин можна чітко спостерігати два напрямки. Перший - пов'язаний з поглибленим дослідженням біології культивованих клітин, вивченням особливостей їх росту та диференціації. Другий – більш прикладний, який має за мету більш широке застосування прийомів і методів культури тканини для вирішення важких практичних завдань, які виникають в квітникарстві. Одним із таких ефективних і економічно вигідних прийомів є культура апікальних меристем та мікроклональне розмноження і оздоровлення рослинного матеріалу в культурі *in vitro* [7].

Терміном мікроклонального розмноження називають масове нестатеве розмноження рослин в культурі тканин і клітин, при якому форми рослин, що виникають *de novo* генетично ідентичні вихідному екземпляру. В основу мікророзмноження покладено застосування унікальної здатності рослинної клітини реалізувати властиву їй тотипотентність під впливом індукторів і давати початок цілому рослинному організму [8].

Даний метод уможливорює отримання великої кількості посадкового матеріалу рослин за короткий проміжок часу. Важливим є те, що при розмноженні рослин в культурі тканин відбувається їх звільнення від

патогенних мікроорганізмів і в багатьох випадках від вірусів. В процесі мікророзмноження немає ризику повторного зараження рослин.

Актуальність теми. Оздоровлення посадкового матеріалу покращує якість продукції. Крім того велике значення має однорідність отриманих рослин, економія площі теплиць, які використовуються під маточні рослини. Тисячі розмножених рослин легко розміщуються на невеликих площах кліматичних камер. В культурі тканин можна підтримувати ріст рослин протягом року, що є важливим для рослин, які мають в циклі свого розвитку періоди спокою [7, 12]

Не дивлячись на велику кількість експериментальних робіт, присвячених морфогенезу і розмноженню *in vitro*, технологія мікроклонального розмноження не розроблена для багатьох видів декоративних рослин та в квітникарстві. Причиною цього є перш за все відсутність чітких методик, їх складності, по-друге, у використанні дефіцитних і дорого стоячих компонентів живильного середовища та недостатніх знань морфогенетичного потенціалу рослин та способів управління ними в культурі тканин.

Складним залишається питання отримання безвірусного посадкового матеріалу гвоздики, його розмноження та адаптації в умовах *in vivo*. Для задоволення ростучого попиту на гвоздику недостатньо використання традиційних підходів в розмноженні і селекції цих рослин.

Мета і завдання досліджень:

Вивчення особливостей основних етапів клонального мікророзмноження різних сортів голландської гвоздики в умовах *in vitro* та дослідження ефективності термотерапії при оздоровленні рослин.

Для досягнення поставленої мети запропоновано вирішити наступні завдання:

1. Отримати асептичні експлантати гвоздики.
2. Оптимізувати умови калусогенезу різних тканин та органів рослин гвоздики і дослідити їх регенераційну здатність.

3. Розробити оптимальні умови пагоноутворення із апікальних меристем та мікроживців різних генотипів гвоздики.

4. Одержати рослин-регенеранти гвоздики *in vitro* та провести їх укорінення.

5. Адаптувати рослини-регенеранти гвоздики та дослідити ефективність термотерапії.

6. Розробити оптимізовану технологію клонального мікророзмноження рослин гвоздики

Об'єкт дослідження: біотехнологічні основи, що забезпечують реалізацію морфогенетичного потенціалу тканин і органів рослин гвоздики, особливості отримання рослин-регенерантів та їх адаптації до умов *in vivo*.

Предмет дослідження: різні генотипи гвоздики.

Методи дослідження: культура ізольованих клітин та тканин *in vitro*, мікроклональне розмноження, статистичні.

В наших досліджень вивчено отримання безвірусного посадкового матеріалу та особливості клонального мікророзмноження (отримання асептичної культури, регенерація первинних експлантатів і власне мікророзмноження шляхом прямого та непрямого морфогенезу) в умовах *in vitro* двох сортів голландської гвоздики та вирішення питань, пов'язаних з розробленням ефективних способів отримання рослинного матеріалу.

Основні публікації за темою:

1. Стаття

O. KLIACHENKO, K. KUSHCHENKO, I. SHIAKHTUN, I. BEZPROZVANA. *IN VITRO* PRODUCTION OF VIRUS-FREE CARNATION (*DIANTHUS CARIOPHYLLUS* L.) PLANTING MATERIAL // BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 2024. - Т.15. - №1. - с. 17-29.

2. Тези

Куценко К.С, Кляченко О.Л. КАЛЮСОГЕНЕЗ ГВОЗДИКИ ГОЛЛАНДСЬКОЇ (*DIANTHUS CARYOPHYLLUS* L.) В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* //X Всеукр. наук.-практ. конф. студентів, аспірантів, молодих вчених "Біотехнологія: Звершення та надії" 1-2- травня 2024 - С.42-44.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічні особливості гвоздики (*Dianthus caryophyllus* L.)

Гвоздика – багаторічна рослина родини гвоздичних (*Caryophyllaceae*). Існує багато сучасних різновидностей, які були отримані в результаті довготривалої селекції. Гвоздика є представником родини каріолістних, яка налічує 88 родів і 1750 видів [1, 10, 11]. Найбільшою популярністю користується гвоздика голландська та садова гвоздика Шабо, які використовують для квіткових композицій та букетів протягом всього року, у випадку тепличних рослин.

Велика кількість її різновидностей отримані шляхом схрещування гвоздики садової з іншими видами гвоздики у 19 столітті. Її назвали гвоздиною голландською, тому що в інші країни Європи і Азії вона попала із Нідерландів. Це трав'яниста дикоростуча чи садова рослина з квітами різного кольору. Природнім ареалом її розповсюдження є середземноморське побережжя Південної Європи та Західної Азії [18].

Листя лінійне або лінійно-ланцетоподібне. Квітки поодинокі або по 2-3 на кінцях гілочок. Чашечка циліндрична або циліндрично-конічна з чисельними повздовжніми жилками та 2-4 парами лускоподібних чашелистиків. Тичинок десять, стовпчиків два, плід-циліндрична коробочка, одногніздна, яка розкривається чотирма зубцями. Коренева система розвинена слабо. При цьому глибина залягання коренів становить 10-20 см. Більшість видів роду *Dianthus* легко гібридизують між собою [1, 10].

Особливість цієї квітки полягає в тому, що вона має зазубрини по краям пелюсток, а самі пелюстки наближено нагадують геометричну форму.

Існує два типи квіток: велика квітка з діаметром від 4 до 5 см і маленька, яку називають міні-гвоздиною (рис.1.1). Горшечна гвоздика – це вид, виведений для вирощування в горшках з короткими міжвузлями та щільними листками, який цвіте при висоті рослин 10-30 см.



Рис.1.1. Різновидності квітів гвоздики: А – міні-гвоздика, Б – голландська

Гвоздика голландська характеризується висотою рослин 40-100 см. забарвлення квітів різноманітне від білого до темно-бордового та фіолетового. Бутони квітів округлі, листки товсті, воскові і часто бувають хвилястими або закрученими.

Гвоздика – теплолюбива рослина, яка незалежно від виду потребує багато сонця. За інших умов рясного цвітіння досягти неможливо. Найкраще культура розвивається на легких, не кислих, вологопроникаючих типах ґрунтів.

Деякі сорти гвоздики чутливі до перепадів температури, зазвичай при температурі -5°C вони підмерзають, а -10°C є порогом виносливості рослин. Тому деякі сорти можна залишати на відкритому повітрі взимку, інші – найкраще зберігати в приміщенні і приймати певні міри по збереженню тепла, щоб запобігти обморожуванню. Деякі види гвоздики мають певну морозостійкість, за низьких температур взимку їх можна поміщати в закриті приміщення [1].

1.2. Теоретичні основи мікрклонального розмноження та його практичне застосування

Мікрклональне розмноження – це нестатеве вегетативне розмноження, при якому отримують генетично ідентичні форми, що сприяє збереженню генетично однорідного посадкового матеріалу. Даним методом можна

розмножувати за короткі терміни важко розмножувані види і високо цінні рослини, а також стерильні генотипи. При цьому коефіцієнт розмноження сягає $1 : 1000000$ і дозволяє в 2-3 рази скоротити терміни відбору і одержання нових рослин.

Теоретична основа, загальні принципи мікроклонального розмноження рослин виходять із закономірностей їх онтогенезу, часової і просторової реалізації морфогенетичної програми, автономії рослинного організму на різних етапах його росту та розвитку, наявності в рослині систем самоавторегуляції, функціонуючих в певних умовах.

Для отримання цілої рослини може бути використано два типи клітин:

1) ізольована клітина в стані активного ділення із ембріональної, недиференційованої, неспеціалізованої меристемної тканини. Такими тканинами є верхівкові (апикальні) меристеми пазушних або сплячих бруньок стебла;

2) ізольовані спеціалізовані тканини, які пройшли процес диференціації. Такі клітини складають спеціалізовані тканини експланту (мезодерміс, епідерміс). В цьому випадку виникають *in vitro* ініціюючі меристемоїдні ембріональні клітини, проходить соматичний ембріогенез, утворюються бруньки або ембріоїди із яких формується рослина і здійснюється процес розмноження рослин [4, 5].

Натепер існує декілька, детально розроблених методів мікроклонального розмноження, які відрізняються станом вихідних клітин і тканин, що використовують для одержання мікроклонів. Меристемні клітини, які активно діляться утворюють конус, проходять первинну диференціацію. При цьому спостерігається інтенсивний гісто- і органогенез, формуються ембріоїди, бруньки і утворюється мікроклон. У випадку використання диференційованих клітин спостерігається процес диференціації, а всі подальші процеси проходять як у першому випадку. Даний метод широко застосовується для швидкого розмноження і розвитку покращених сортів гвоздики [30]

Найбільш важливою вимогою технології є забезпечення повної стерильності і оптимізації умов клітинного ділення та диференціації вихідних клітин чи тканин [28]. Початок активного поділу здійснюється при ізолюванні диференційованої клітини, вичленення її із рослини і перенесення в інші фізіологічні умови. Важливим компонентом живильного середовища є ауксини та цитокініни. На перших етапах вирощування експлантатів важливе успішне проходження процесів диференціації і вступ клітини в фазу активного ділення.

Для мікроклонального розмноження використовують низку живильних середовищ. Найчастіше застосовують середовище Мурасіге-Скуга [22], склад якого збагачений неорганічними речовинами, в тім числі азотом (амонійним і неорганічним), що зумовлює стабільність проходження процесу формоутворення, диференціації і забезпечує стабільне отримання посадкового матеріалу. Додавання до складу середовищ таких речовин як вітаміни, амінокислоти проводять з урахуванням морфогенетичних особливостей рослини.

Основними етапами мікроклонального розмноження є:

- відбір експлантатів, їх стерилізація і експлантація на живильне середовище;
- проліферація пагонів на середовищі для розмноження;
- перенесення проростків на середовище, що сприяє утворенню коренів і висадження їх в ґрунт.

Відбір експлантатів залежить від виду і сорту рослини-донора. Більшість рослин доцільно вводити в культуру у фазі активного росту, проте деякі з них починають утворювати пагони лише у фазі спокою. Здебільшого ізольовані пагони стерильні, оскільки вони захищені листками. Експлантати більш відкритих органів стерилізують розчинами з активним хлором, тімеросалом, пероксидом водню, нітратом срібла. Дуже часто для отримання стерильних проростків і подальшого їх застосування як експлантатів використовують насіння.

Ізольовані органи рослин, тканини і клітини у більшості випадків культивують на живильних середовищах, які містять основні елементи живлення, а саме: макро- мікроелементи, деякі амінокислоти, вітаміни, сахароза, регулятори росту. Згідно теорії Міллера-Скуга утворення пагонів стимулюється при наявності за наявності високих концентрацій цитокінів стосовно ауксинів, тоді як зворотне співвідношення викликає утворення коренів [4, 17].

Для органів чи проростків, що культивуються *in vitro* необхідними є фізичні умови, такі як освітлення та температура, які забезпечують процес морфогенезу та утворення хлорофілу. Як правило використовують інтенсивність освітлення 3-5 тис лк, фотоперіод 16 год і температуру 24-25°C.

Більша частина рослин має проміжний тип росту, при якому в міжвузлях і пазушних листках містяться меристематичні тканини, які здатні формувати пагін. Розвиток має тільки обмежена кількість пазушних меристематичних тканин. Причиною гальмування є апікальне домінування.

За умов використання калюсних тканин для отримання пагонів гвоздики до живильного середовища вносять регулятори росту такі як ауксини та цитокініни. Концентрації гормонів, найбільш сприятливі для утворення калюсу, варіюють залежно від виду рослин і органу, який використовують як експлантат. Проте, зазвичай, вони вищі ніж ті, за яких проходить формування пагону безпосередньо на експлантаті.

У більшості рослин калюс може бути відокремлений від експлантату і перепасирований. Масове виробництво калюсу з подальшою регенерацією пагонів можна було б вважати ідеальним методом розмноження. Однак існують певні недоліки, які обмежують використання даного методу. Перш за все це зниження морфогенетичного потенціалу при довготривалому пасируванні. По-друге – зростає кількість поліплоїдних клітин, а значить ймовірність того, що утворені рослини будуть не ідентичні батьківським формам [28]. Культура тканин рослин регенерована через калюсогенез демонструє ймовірність виникнення спадкових генетичних варіацій, які

потенційно можуть бути використані як життєздатні варіанти поліпшення рослин шляхом як якісних змін, так і кількісних ознак [13].

1.2.1. Отримання безвірусного посадкового матеріалу гвоздики.

Голландська гвоздика є однією із провідних культур промислового квітникарства. Гвоздика пошкоджується вірусними хворобами, які викликаються декількома вірусами, наприклад, вірус крапчатості та фузаріозами, нематодами і трипсами.

При одержанні безвірусного посадкового матеріалу необхідно враховувати, що майже всі рослини, які розмножуються за допомогою культури пазушних пагонів, майже завжди заражені вірусами, що присутні в материнському організмі. Для видалення вірусів використовують метод, відомий як культура вірусотратних меристемних тканин.

Згідно даного методу культивують дуже маленький шматочок (0,3-0,5 мм) верхівкової тканини. При цьому для зниження інфікованості материнську рослину перед ізоляцією меристемної тканини піддають тепловій обробці (6-12 тижнів за температури 30-40°C).

Віруси не здатні поникати в стебловий апекс з такою легкістю як в інші тканини, а у випадку проникнення їх, вони пригнічуються реакцією рослини на травму викликану ізолюванням верхівки. В результаті деякі із рослин, що вирости із верхівкових меристематичних клітин, виявляються повністю вільними від вірусів, хоча при цьому швидкість росту і життєздатність експлантатів помітно знижуються [3, 27].

Структурною основою явища, яке використовується на практиці, слугує специфіка побудови точки росту рослин. При цьому дистальна її частина представлена апікальною меристемою і має діаметр близько 200мкм та висоту 50-150 мкм. В нижніх шарах клітини меристеми, які диференціюються, утворюють прокамбій, що дає початок пучкам провідної системи.

Надійним і ефективним методом оздоровлення посадкового матеріалу гвоздики є культура апікальних меристем в сукупності із термотерапією

маточних рослин. Ці методи широко застосовують у промисловому квітникарстві багатьох країн.

Крім позитивної дії високих температур на звільнення від вірусів, виявлено аналогічний вплив їх на точку росту і процеси деяких квіткових культур (гвоздики) в умовах *in vitro*. Високі температури збільшують коефіцієнт розмноження на 50-60%, підвищують адаптацію пробірочних рослин до ґрунтових умов і уможливають отримання великої кількості безвірусних маточних рослин.

1.3. Термотерапія рослин гвоздики

Метод термотерапії є найбільш широко відомим методом оздоровлення заражених вірусами рослин. Метод термотерапії підрозділяють на два способи, а саме: застосування гарячої води та метод апікальних меристем. Перший спосіб було вивчено в 1936 році [27, 37]. Другий спосіб – культивування апікальних меристем на сьогодні є головним при одержанні безвірусних рослин. Натепер відбір і розмноження здорових маточних рослин на основі ранньої і точної діагностики та біотехнологічні прийоми оздоровлення посадкового матеріалу широко застосовуються на виробництві. У випадку зараження рослин цінного сорту або селекційної форми вірусами, для їх оздоровлення залучають біотехнологічні методи, а саме: культуру апікальних меристем, термотерапію і хемотерапію. Для оздоровлення рослин гвоздики використовують культуру апікальних меристем, хіміо-, термо-, кріо- і електротерапію, а також різні поєднання цих методів (комплексна, або комбінована, терапія) [27, 45].

Метод оздоровлення в культурі апікальних меристем було розроблено одним із перших, оскільки він є мало затратним, то широко застосовується і нині. Проте для оздоровлення великих колекцій рослин, які налічують більше тисячі зразків, цей метод стає менш затребуваним за рахунок його трудомісткості та появи більш ефективних комбінованих підходів. Термотерапія *in vivo* і *in vitro* рослин базується на зниженні титру вірусів у

заражених тканинах унаслідок порушення синтезу вірусних РНК за підвищених температур, таких як +36-40°C. Даний спосіб є менш ефективним що стосується сферичних вірусів, тому саме за змішаних інфекцій рекомендовано його поєднувати з іншими технологіями.

Термотерапія – це обеззаражування рослин від вірусів під дією підвищених температур в діапазоні + 36–42°C [26].

Механізм терапевтичного ефекту вивчено недостатньо, і пояснюється декількома гіпотезами, а саме:

1) високі температури призводять до втрати інфекційності вірусних часточок. При цьому викликають деструкцію їх нуклеїнової кислоти або білкової оболонки. Це стосується термолабільних вірусів;

2) висока температура діє на віруси опосередковано через метаболізм рослини. При цьому викликає дисбаланс між синтезом і деградацією вірусних частинок в сторону деградації;

3) під дією високих температур зростає інгібуюча активність клітин рослини-хазяїна;

4) під дією підвищених температур відбувається денатурація білкових вірусних рецепторів клітин, що приймають участь на початкових етапах інфекційного процесу, і клітини втрачають сприйнятливість до вірусу.

Проте ні одна із представлених гіпотез не пояснює повністю всі факти, що були накопичені великою практикою термотерапії рослин [38]. Що стосується наших досліджень, то ми дотримуємося гіпотези «відходу» верхівкових тканин від вірусів за рахунок швидкого росту рослин в умовах термокамери. Це було доведено використанням даної камери в процесі оздоровлення клонових рослин. На сьогодні метод сухоповітряної термотерапії застосовується на практиці отримання безвірусних клонів у наукових центрах низки країн [15]. Однак необхідно його деталізувати і доопрацювати для проведення оздоровлення окремих деревних порід та видів плодових рослин, враховуючи те, що основні роботи проведені на зернових культурах.

1.4. Застосування методу мікроклонального розмноження в промисловому квітникарстві

Натепер створена галузь промислового квітникарства на основі технологій культури клітин, тканин та органів рослин *in vitro*. Декоративні рослини багатьох видів, родин на сьогодні розмножують біотехнологічними методами. Вихід посадкового матеріалу при клональному мікророзмноженні в декілька раз ефективніше традиційних методів розмноження. Даний метод не залежить від сезонності і уможлиблює отримання рослин-регенерантів протягом року.

Серед декоративних видів рослин особливий інтерес представляє гвоздика голандська, яка відрізняється тривалістю цвітіння, великою різноманітністю форм і забарвлення. В результаті успішної селекції отримано велику кількість гібридних форм цих рослин, що також сприяло їх широкому розповсюдженню.

Сьогодні в багатьох наукових лабораторіях світу розроблені і використовуються біотехнології отримання і розмноження для цілої низки культурних рослин [27]. Проте необхідно відмітити, що квітково-декоративні рослини, як правило відрізняються до різних таксономічно віддалених один від одного ботанічних таксонів і значно відрізняються рівнем тотипотентності клітин і регенераційним потенціалом. Тому необхідним є методичний підхід до біотехнологічних досліджень, що дозволяє розробляти і вдосконалювати способи регенерації рослин.

При оптимізації біотехнологій масового виробництва квіткових та декоративних культур важливим є забезпечення економічної ефективності методів, які використовуються за рахунок здешевлення складу живильних середовищ, скорочення етапів розмноження та підвищення виходу адаптованих рослин високої якості.

Клональне мікророзмноження гвоздики можна успішно використовувати в селекційній роботі для масової репродукції, що в декілька

разів прискорює терміни одержання нових гібридних форм рослин, збільшує коефіцієнт їх розмноження [19]. За допомогою даного методу можна проводити зберігання генофонду і розмноження рідкісних сортів гвоздики [29]. Наразі розроблені досконалі технології вирощування ізолюваних тканин багатьох декоративних рослин [15, 14].

Необхідним є введення рентабельних методів одержання посадкового матеріалу нових господарсько-цінних сортів і видів рослин. Проте необхідно враховувати, що під час культивування *in vitro* рослини піддаються особливим умовам культивування, таким як недостатнє освітлення, надлишок цукрів і нітратів, висока вологість, що може призвести до анатомічних, морфологічних та фізіологічних порушень [16].

В Україні станом на 2022 рік кількість промислових біотехнологічних лабораторій та теплиць по вирощуванню меристемних рослин зменшилась втричі за рахунок нерентабельності вирощування на відміну від країн Європи та Азії [13, 11].

Існують лабораторії, які спеціалізуються на розмноженні тільки одного виду рослин, наприклад орхідей (горшечних чи культур на зріз). Вони проводять санітарний контроль і сортову селекцію для отримання здорових маточних рослин. Відоме в Україні МПП «Апекс» має власну лабораторію *in vitro* та адаптаційний комплекс. Із лабораторії мікросаджанці *in vitro* переносять в адаптаційний комплекс для повної адаптації до зовнішніх умов *in vivo* і дорощування до висадкової кондиції (15-30 см). Виробництво меристемних саджанців розвивається в двох напрямках: квіткові культури (гвоздика, гербера, роза, гіпсофіла) та ягідні культури (суниця садова, ожина, малина, смородина та виноград) [31].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Місце проведення досліджень, обладнання лабораторії і умови роботи

Дослідження проводились в 2022-2023 рр. у лабораторії біотехнології рослин кафедри екобіотехнології та біорізноманіття.

Оснащення лабораторії біотехнології рослин:

1. Мийна кімната з холодною, гарячою та дистильованою водою. В кімнаті повинен бути дистильатор і бідистильатор; стелажі для сушіння посуду; сухожарові шафи для стерилізації посуду та інструментів (температура 150-160 °С); шафи для зберігання посуду.

2. Кімната для стерилізації – це приміщення, яке обладнане горизонтальними або вертикальними автоклавами для стерилізації живильних середовищ.

3. Кімната для приготування живильних середовищ з лабораторними столами, технічними та аналітичними терезами, дистильатором, бідистильатором, рН-метром, холодильником електроплиткою, центрифугою, ультрацентрифугою, водяною банею та необхідними реактивами.

4. Стерильна кімната з ламінар-боксами, термостатами із заданим режимом роботи (температурою 25-27 °С, вологістю 80 %), витяжною шафою, шейкерними установками (качалками) та ін.

5. Світлова культуральна кімната із кондиційованим повітрям, де повинна підтримуватися температура 24-26 °С, відносна вологість повітря – на рівні 80-85 %, фотоперіод – 16 годин. Для кондиціювання використовуються кондиціонери БК-1500 або БК-2500 залежно від об'єму приміщення (рис. 2.1.).

6. Темнова культуральна кімната із кондиційованим повітрям, де повинна підтримуватися температура 25-26 °С, відносна вологість повітря – на рівні 70-80 %.



Рис. 2.1. Культивування рослин-регенерантів в світловій культуральній кімнаті.

Обладнана установками ротаційного та шейкерного типу з режимом роботи 90-100 об/хв, з гніздами для колб різного об'єму (100 та 250 мл). Дана кімната використовується для вирощування калюсних та суспензійних культур.

7. Кімната цитологічних досліджень, обладнана мікроскопами (МБИ-3, МБИ-15, МБС-9), покрівельними скельцями й мікронасадками.

Посуд, інструменти та матеріали

Для роботи з тканинними та клітинними культурами необхідний термостійкий посуд для приготування живних середовищ:

- колби з плоским дном місткістю 100; 250; 500 мл; 1; 2; 3 та 5 л, стакани хімічні місткістю 50; 100; 250; 400; 800 мл та 1л, мірні циліндри місткістю 25; 50; 100; 250; 500 мл; 1 та 2 л, пеніцилінові флакончики, чашки Петрі (скляні, пластикові), пробірки;

- інструменти: піпетки Мора (1 - 10 мл), автоматичні піпетки, піпетки градуйовані (0,1 - 0,5 мл), скляні конічні лійки різні у діаметрі, скляні палички

різних розмірів, фільтри мембранні “Синпор” з розміром пор 0,4 мкм, пастерівські піпетки, металеві ножиці, ланцети, пінцети різних розмірів;

- матеріали: папір (фільтрувальний, обгортковий, пергаментний), вата, марлями, ватні пробки, алюмінієва фольга.

Проведення досліджень

Роботи з одержання первинного калюсу, розділення рослин-регенерантів проводили у асептичних умовах – в операційних ламінар-боксах, які стерилізували протягом 30 хв ультрафіолетовим опроміненням з попереднім протиранням робочої поверхні. Стерилізацію рук проводили 96 °С етиловим спиртом. Для стерилізації ламінар-боксу іноді достатньо протирання його спиртом та 30-хвилинного продування стерильним повітрям.

Живильні середовища стерилізували у автоклаві за робочого тиску 1-2 ат протягом 20-25 хвилин. Посуд стерилізували у сушильній шафі сухим жаром при температурі 160-180 °С протягом 2-2,5 год.

В боксі перед роботою стерилізували інструменти, поміщаючи спочатку в фарфоровий стакан із 96 % етиловим спиртом, а потім прожарюючи в полум’ї спиртівки. Для охолодження інструменти розміщали на підставку й використовували тільки для однієї маніпуляції. Для повторного використання інструменту проводили його повторну стерилізацію.

2.2. Матеріали досліджень

Для введення в умови *in vitro* як експлантати використовували пагони з пазушними і апікальними бруньками двох сортів гвоздики голандської «Тіуа» та «Raffino Linde», які широко застосовуються у промисловому квітникарстві.

Характеристика сортів:

«Тіуа» - багаторічна трав’яниста рослина, яка вирощується в теплиці як однорічна. Стебло тонке вузловате висотою 50-60 см. Квіти великі, діаметром 7-8 см із сильним ароматом. Зацвітає через 2 місяці після висадження розсади в субстрат. Рослина світло- і теплолюбива.

«Raffino Linde» - високорослий сорт гвоздики висотою 60-80 см. Листя подовжене зафарбовані в темно-зелений колір. Бутони квітів дуже ароматні, діаметром до 7 см, білого кольору з рожевими прожилками.

2.3. Методи досліджень

В роботі застосовували загальноприйняті в біотехнології методи досліджень [8].

Дослідження проводились в декількох напрямках: вивчали здатність експлантатів гвоздики до калюсогенезу, прямого – та непрямого морфогенезу, інтенсивність пагоноутворення в умовах *in vitro*, укорінення рослин-регенерантів та адаптація їх до умов *in vivo*, проведення термотерапії рослин гвоздики та перевірка отриманого матеріалу на вірусоносійство.

Калюсну тканину гвоздики отримували за культивування стеблових експлантатів. Для вирощування маточних рослин використовували апікальні меристеми з листовими примордіями, довжиною 0,3-0,5 мм. За вивчення пагоноутворення, як експлантати використовували апікальні меристеми та проміжні мікрочеренки гвоздики, довжиною 1-2 см з однією парою листків, які містять пазушні меристематичні тканини.

2.3.1. Стерилізація експлантатів гвоздики та умови культивування рослин

Для досліджень по культурі ізольованих меристем гвоздики з рослин-донорів гвоздики зрізали верхню частину стебла, довжиною 1,5-2,0 см, ретельно мили в мильному розчині, потім промивали проточною водою, далі дистильованою і споліскували двічі стерильною дистильованою водою. Стерелізацію рослинного матеріалу і введення експлантатів в ізольовану культуру проводили в ламінар-боксі.

Для оптимізації умов стерилізації рослинного матеріалу застосовували різні розчини стериліантів та ступінчасту стерилізацію з різною експозицією. Як

стериланти використовували Thimerosal, 70% спирт та 0.08% AgNO₃. Стерилізацію проводили послідовно. В таблиці 2.1. вказано два варіанти 2.1.

Таблиця 2.1

Розчини стерилантів, їх концентрація та експозиція обробки

Стерилізуючі речовини	Концентрація, %	Експозиція, хв	
		1 варіант	2 варіант
Thimerosal	1	2	2
C ₂ H ₅ OH	70	1	0,5
AgNO ₃	0,08	0,5	1

Простерилізовані експлантати тричі по 10 хв. відмивали у стерильній дистильованій воді і поміщали в чашку Петрі на стерильний фільтрувальний папір для обсихання. Стерильним пінцетом переносили у пробірки для на безгормональне живильне середовище (МС1) для адаптації, склад якого представлено у табл.2.2.

Таблиця 2.2

Склад безгормонального ЖС для культивування експлантатів гвоздики (МС1)

Компоненти	Кількість
Макро МС	50мл
Мікро МС	0,5мл
Fe – хелат	5мл
Вітаміни по МС	1мл
Сахароза	20г
Агар	0,7%

Примітка: рН 5,6-5,8

Пробірки з експлантатами культивували у термостаті без освітлення за температури 25±1°C. Через тиждень слід перевірити пробірки з експлантатами на зараженість мікроорганізмами. За умови виявлення інфікованих експлантатів, їх необхідно видалити з термостату враховуючи те, що вони є джерелом інфекції.

Ефективність стерилізації (E_c), у відсотках обчислювали за формулою:

$$E_c = \frac{K_e - K_{вр.е.}}{K_e} * 100\%,$$

Де K_e – загальна кількість експлантатів, шт.

$K_{вр.е.}$ – кількість вражених експлантатів [2].

2.3.2. Підбір живильних середовищ для культивування ізольованих тканин гвоздики

Головною умовою успішного одержання калюсу, його культивування, регенерації рослин із різних експлантатів є правильний підбір концентрації та співвідношення компонентів живильного середовища.

В своїх дослідженнях ми використовували модифіковане середовище Мурасіге і Скуга (МС) [22, 24], склад якого наведено в табл. 2.3. та доповнене регуляторами росту БАП і НОК в різних концентраціях.

Таблиця 2.3.

Склад живильного середовища Мурасіге-Скуга.

Компоненти	Кількість в мг/л
Макросолі: NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
Мікросолі: H_3BO_3	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
KI	0,83
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28
$\text{Na}_2\text{EDTO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
Вітаміни: B_1	0,1
B_6	0,5
PP	0,5
Сахароза	30000
Агар	0,8%

Примітка: рН 5,6-5,8

2.3.3. Отримання калюсу із різних експлантатів гвоздики та непрямий морфогенез

Калюсну тканину гвоздики сортів «Тіуа» та «Raffino Linde» одержували зі стерильних листових пластинок (0,40–0,50 см²) та фрагментів мікропагонів (0,5–0,8 см). На експлантатах скальпелем штучно робили додаткові насічки для кращого утворення калюсу. Пагони розрізають на сегменти по 2-4 мм. Виділені експлантати висаджують на стерильні живильні середовища для калюсогенезу, які попередньо стерилізували автоклавуванням при 1 атм 20 хвилин [4Помилка! Джерело посилання не знайдено.].

Експлантати листків гвоздики культивували на модифікованому середовищі Мурасіге-Скуга (варіант МСК1 з додаванням 0,2 мг/л БАП, 2 мг/л НОК, варіант МСК2 з додаванням 0,5 мг/л БАП, 2 мг/л НОК та МСК 3, доповнене 1,0 мг/л БАП, 2 мг/л НОК) (табл. 2.4).

Таблиця 2.4

Склад живильного середовища для культивування калюсних тканин гвоздики

Компоненти	для одержання калюсу		
	МСК1	МСК2	МСК3
МС-макро, мл	100	100	100
МС-мікро, мл	1	1	1
Fe-хелат, мл	5	5	5
м-Інозит, мг	100	100	100
Сахароза, г	30	30	30
Гідролізат казеїну,мг	0,5	0,5	0,5
БАП	0,2	0,5	1,0
НОК	2,0	2,0	2,0
Вітаміни по МС, мл	1,0	1,0	1,0
Агар	0,7%	0,7%	0,7%

Для субкультивування маса сирої речовини калюсу становила 2,0±0,10 г. Тривалість пасажу складала 28–30 діб. Рослинний матеріал культивували у пеніцилінових флакончиках у термостаті ТС-80 без освітлення за температури

25±1 °С та ВВП 70–75 %. Частоту калусоутворення визначали як відсоток експлантатів, які утворили калус від загальної кількості експлантатів. Середньомісячний приріст сирової маси калюсу визначали як різницю між кінцевою та початковою масою [8].

Для індукції непрямого морфогенезу калюсні тканини масою 2,0±0,10 г пасирували на живильне середовище МС з додаванням 0,1-3,0 мг/л БАП, 0,5-2,0 мг/л кінетину та 0,1-1,0 мг/л 2,4-Д. Рослинний матеріал культивували за температури 25±1 °С, освітлення 2,0-3,0 клк, 16-годинному фотоперіоді та вологості повітря 70–75 %.

2.3.4. Отримання прямого морфогенезу та укорінення рослин гвоздики

Для отримання прямого морфогенезу апікальні меристеми культивували на модифікованому живильному середовищі МСА, доповненому вітамінами по Уайту, БАП в концентрації 0,5 мг/л. Для укорінення мікропагонів, отриманих в культурі ізольованих апікальних меристем їх переносили на живильне середовище МСР. Склад середовищ представлено в табл. 2.5.

Таблиця 2.5.

Склад ЖС для пагоноутворення та різогенезу гвоздики

Компоненти	МСА	МСР
Макро МС, мл	100	50
Мікро МС,мл	1	0,5
Fe – халат, мл	5	5
Вітаміни по Уайту,мл	1	1
Сахароза, г	20	20
БАП, мг/л	0,5	
НОК, мг/л		0,5 - 2,0
Агар	0,7	0,7
pH 5,6-5,8		

2.3.5. Адаптація рослин-регенерантів гвоздики

Укорінені рослини гвоздики з добре розвинутими листовими пластинками та черешками темно-зеленого кольору виймали із пробірок для адаптації і висадження в умови теплиці.

При адаптації рослин до не стерильних умов пробірки з рослинами відкривали, додавали 1-2 мл дистильованої води, для запобігання висихання живильного середовища і залишали відкритими протягом 2 діб. Через цей проміжок часу рослини діставали із пробірок, кореневу систему ретельно відмивали від залишків агару, потім обробляли 1% розчином перманганату калію. Надалі рослини переносили у субстрат, склад якого перліт:торф 1:1.

Субстрат попередньо автоклавували при 2 атм згідно Калінін та ін. [4]. Після висадення рослин-регенерантів в субстрат, їх накривали скляними циліндрами, для запобігання пересихання рослин. Через 7 діб проводили підкормку рослин розчином макро- і мікросолей по МС. Через 2 тижні скляні циліндри, рослини витримували протягом 7 діб і пересаджували в умови відкритого ґрунту. Проводили облік приживаності рослин в умовах *in vivo*.

2.3.6. Термотерапія рослин гвоздики

Термотерапія, як метод, полягає в збільшенні безвірусних зон в бокових та верхівкових бруньках. Термотерапія створює сприятливі умови, для виділення верхівкової меристеми на живильному середовищі та для черенкування. На сьогодні відомо біля 90 вірусів, які вивільнюються з рослини завдяки методу термотерапії [42]. Згідно поведінки вірусів за підвищеної температури їх підрозділяють на дві групи:

1. Віруси, які інфікують рослини та розмножуються за +36 °С. Проте їх розмноження уповільнюється порівняно з кімнатною температурою.

2. Віруси, що втрачають здатність інфікувати та розмножуватися в рослинах за умов підвищеної температури - +36 °С.

За термообробки першої групи рослин, інфікованих вірусами - їх концентрація спочатку зменшується, а розмноження підтримується відносно стабільно. Це спричинює зберігання інфекції. Концентрація вірусу знову підвищується, за умов розміщення рослин в нормальні температурні умови.

Концентрація вірусів другої групи при інфікуванні ними рослин за температури +36°С - зменшується, синтез нових вірусних частин

призупиняється і рослини вивільнюють віруси. Наразі, існує думка, що віруси знаходяться в стані динамічної рівноваги. При цьому їх кількість відображає баланс між синтезом та елімінацією.

У вірусів другої групи, деградація є головним процесом і рослини стають безвірусними. Дуже часто здатність вірусів інфікувати рослини і розмножуватися в них за температури + 36 °С не змінюється з точкою температурної інактивації. Інактивація рослин не є наслідком дії безпосередньо на вірус, а є результатом порушення синтезу вірусів в клітинній системі.

2.3.7. Статистична обробка результатів досліджень

Експериментальний матеріал, отриманий в результаті досліджень статистично опрацьовували з використанням пакету аналізу MS Excel. Повторюваність дослідів 3–15- кратна, кількість зразків використаних у досліді – 10–30 шт. У таблицях наведені середні арифметичні значення та їх основні похибки.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Введення в культуру *in vitro* та отримання асептичних експлантатів гвоздики

В процесі досліджень нами було поставлено низку дослідів по отриманню асептичної культури гвоздики. Гвоздику зберігали у воді, привозили до лабораторії та ретельно промивали під проточною водою для видалення бруду із стебла поверхні. Подальшу стерилізацію проводили в ламінар-боксі. В літературі відмічено труднощі пов'язані зі стерилізацією експлантатів [27, 28].

Стерилізацію проводили поступово декількома стерилізуючими розчинами з різною експозицією обробки. Перший варіант – ступінчата обробка Thimerosal – 2 хв, 70% етиловий спирт - 1 хв і 0,08% AgNO₃ - 0,5 хв Другий варіант - ступінчата обробка Thimerosal – 2 хв, 70% етиловий спирт – 0,5 хв і 0,08% AgNO₃ - 1 хв. з послідуєчим три разовим промиванням стерильною дистильованою водою.

Після стерилізації, верхівки пагонів і вузлові сегменти розрізали на дрібні частини (1,0-1,5 см) для експлантації на безгормональне живильне середовище.

Результати досліджень показали, що ефективність стерилізації залежала від варіанту експозиції обробки стерилізуючими речовинами. Більш ефективним виявився другий варіант стерилізації, який уможливив звільнити рослинний матеріал від екзогенної та ендогенної інфекції.

Експлантати перевіряли на наявність чи відсутність зараження на третю та сьому добу культивування. Результати представлені в таблиці 3.1. З представлених даних можна бачити, що другий варіант стерилізації виявився більш ефективним, при якому ефективність стерилізації становила на 7 добу для сорту «Тіуа» 99%, для сорту «Raffino Linde» - 100% відповідно.

**Ефективність стерилізації експлантатів гвоздики за різних схем
асептичної обробки**

Сорт	Кількість експлантатів	Кількість інфікованих експлантатів на 7 добу, %		Кількість інфікованих експлантатів на 10 добу, %	
		Варіант			
		1	2	1	2
«Tiya»	100	4	1	2	-
«Raffino Linde»	100	2	-	-	-
НІР ₀₅		0,15	0,05	0,20	

Після проведення успішної стерилізації та отримання асептичних проростків гвоздики на 10 добу культивування експлантати поміщали у біологічні пробірки на живильні середовища доповнені регуляторами росту для отримання калюсу та рослин-регенерантів.

На першу-другу добу культивування стерильних експлантатів гвоздики можна спостерігати їх збільшення в розмірі. (рис. 3.1).



Рис. 3.1. Стерильний експлантат гвоздики сорту «Raffino Linde».

Таким чином, проаналізувавши отримані нами результати можна зробити висновок, що асептична обробка експлантатів за використання схеми Thimerosal – 2 хв, 70% етиловий спирт – 0,5 хв і 0,08% AgNO₃ - 1 хв є найефективнішою. Крім того, застосування 0,08% AgNO₃ знижує рівень контамінації грибної інфекції за умов подовження часу експозиції.

3.2. Індукція калусогенезу тканин і органів рослин гвоздики та вивчення їх регенераційної здатності

Відомо, що калусною тканиною вищої рослини називають тканину, яка виникла шляхом неорганізованої проліферації із експлантатів органів рослин після першого субкультивування. Відомий вчений – ботанік Н.Кренке присвятив вивченню ролі калусної тканини в цілій рослині і пов'язав її з фазами, які проходить калусна тканина: швидкий ріст калусних клітин, які захищають місце пошкодження, запасання поживних речовин в клітинах калусів та регенерація із калусної тканини втрачених органів. Калусні тканини можна культивувати протягом довгого часу, але при цьому можуть виникати цитогенетичні зміни. При довготривалому культивуванні калусних тканин, його здатність до морфогенезу знижується або зовсім зникає.

Згідно досліджень вітчизняних та зарубіжних вчених [4, 7, 15, 20] інтенсивність та ефективність калусогенезу у рослин, які культивуються *in vitro* залежить від зовнішніх факторів, а саме умов культивування, і перш за все, наявністю регуляторів росту у живильному середовищі.

Регулятори росту викликають багаточисельні зміни у рослинних тканинах і є основою структурної трансформації клітин при калусогенезі. Наявність регуляторів росту у живильному середовищі спричинюють отримання калусної маси з високим ступенем проліферації, що уможлиблює отримання великої кількості рослин-регенерантів. Відомо, що класичне співвідношення ауксинів до цитокінінів (10:1) в живильному середовищі індукує калусогенез. Крім того, певний генотип має свої особливості та складнощі в процесі отримання і культивування калусних тканин.

Калюсну тканину гвоздики отримували шляхом культивування стеблових експлантатів на модифікованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга з додаванням регуляторів росту НОК та БАП у різних концентраціях та співвідношеннях. Для калюсогенезу використовували наступну серію живильних середовищ представлених в табл. 3.2.

Таблиця 3.2.

Вміст регуляторів росту у калюсогенних ередовищах

Варіант	Регулятори росту
1	0,2 мг/л БАП + 2 мг/л БАП
2	0,5 мг/л БАП + 2 мг/л БАП
3	1 мг/л БАП + 2 мг/л БАП

Пеніцилінові флакончики з висадженими експлантатами поміщали в термостат з регульованою температурою, умови темряви та відносної вологості 70% і культивували 12 діб.

Через 12 діб експлантати виставляли на світло за температури $+23 \pm 1$ °С і 16-годинному світловому періоді в кімнатних умовах, на підвіконня з південного боку. На 24 добу проводили облік утворення калюсних тканин, результати якого представлено в табл. 3.3.

Таблиця 3.3.

Залежність калюсогенезу гвоздики сорту «Тіуа» від вмісту регуляторів росту в живильному середовищі

Варіант	Склад ЖС	Кількість експлантатів, шт	Кількість експлантатів, що утворили калюс	
			%	маса калюса, мг
1	МС + 0,2 мг/л БАП + 2 мг/л БАП	40	100	350 \pm 17,5
2	МС + 0,5 мг/л БАП + 2 мг/л БАП	40	100	820 \pm 41.1
3	МС + 1 мг/л БАП + 2 мг/л БАП	40	100	610 \pm 30,5

Із представлених даних можна бачити, що мінімальну масу калюсів в середньому формувалася на живильному середовищі варіанту 1.

Крім ростових характеристик було визначено якісні характеристики калюсних тканин, а саме компактність та забарвлення. Результати представлено в табл. 3.4.

На рис. 3.2. представлено не щільну калюсну тканину гвоздики сорту «Raffino Linde».

Таблиця 3.4

Якісні характеристики калюсних тканин гвоздики залежно від складу живильного середовища

Варіант	Склад ЖС	Характеристика калюсних тканин гвоздики	
		сорт	
		«Тіуа»	«Raffino Linde»
1	МС + 0,2 мг/л БАП + 2 мг/л БАП	світло-жовтого кольору не щільний	світло-жовтого кольору не щільний
2	МС + 0,5 мг/л БАП + 2 мг/л БАП	щільний із зеленими осередками клітин	щільний із зеленими осередками клітин
3	МС + 1 мг/л БАП + 2 мг/л БАП	щільний із зеленими осередками клітин	щільний із зеленими осередками клітин

Отже, в межах сортів гвоздики майже не спостерігалися значні відмінності у протіканні процесів калюсогенезу і частота калюсогенезу становила 100%.

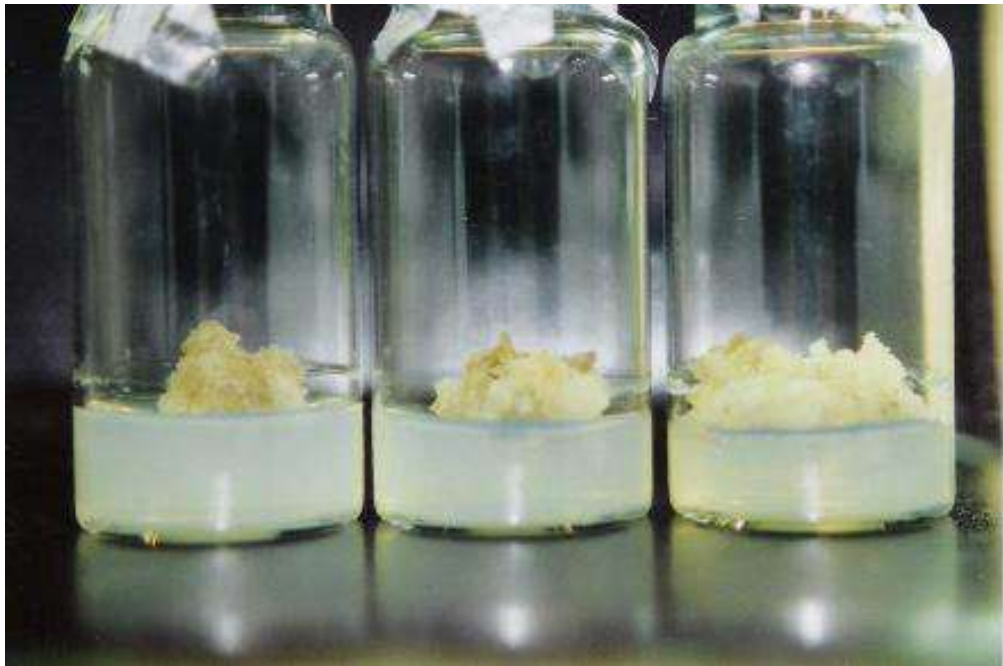


Рис. 3.2. Калюсна тканина гвоздики сорту «Raffino Linde»

Одним із найменш вивчених аспектів диференціювання є морфогенез. При цьому складність досліджень фізіологічних, біохімічних та молекулярних процесів, які лежать в основі морфогенезу, полягає в тому, що диференціація клітин в органи проходить асинхронно.

Однак клітини, що диференціюються та осередки диференціації розрізнені в просторі.

В процесі диференціювання у культивованих неорганізованих калюсних тканинах формуються морфологічні структури, які призводять до утворення в них бруньок, коріння, стебел, квітів, цілих рослин [7, 9].

Непрямий морфогенез проходить в два етапи:
перший етап – це процес утворення на експлантаті калюсних тканин;
другий етап – утворення морфологічних структур у калюсних тканинах.

При цьому утворення морфологічних структур обумовлене певним співвідношенням цитокинів та ауксинів, яке у класичним вважається 10:1 [4, 7, 30]. У культурі калюсних тканин розрізняють соматичний ембріогенез та органогенез (стебловий, кореневий, флоральний, листовий).

Дослідження по індукції органогенезу викликано перш за все запитами селекціонерів та генетиків, які зацікавлені в використанні методів культури тканин і генетичної інженерії для отримання нових форм найбільш цікавих декоративних рослин та квітів.

Здатність до органогенезу зменшується у тканин, ізольованих по направленню від верхівки до основи стебла. Тенденція до органогенезу знижується також при багаторазових пересадках калусних тканин, причому здатність до коренеутворення зберігається більш довгий час.

Для індукції непрямого морфогенезу калусні тканини масою $2,0 \pm 0,10$ г пасирували на живильне середовище МС з додаванням $0,1-3,0$ мг/л БАП, $0,5-2,0$ мг/л кінетину та $0,1-1,0$ мг/л 2,4-Д. Рослинний матеріал культивували за температури 25 ± 1 °С, освітлення $2,0-3,0$ клк, 16-годинному фотоперіоді та вологості повітря $70-75$ %.

В наших дослідженнях інтенсивний органогенез спостерігався для обох сортів гвоздики (табл. 3.5).

Таблиця 3.5.

Здатність до органогенезу в умовах *in vitro* у різних сортів гвоздики

№ п/п	Сорт	Інтенсивність органогенезу		
		Частота органогенезу, %	Кількість пагонів, шт	Висота пагонів, см
1	«Tiya»	68,22	$3,2 \pm 0,36$	$6,15 \pm 0,062$
2	«Raffino Linde»	95,75	$3,8 \pm 0,13$	$8,28 \pm 0,091$

На рис. 3.3 та 3.4 представлено розвиток морфогенного та неморфогенного калюсу гвоздики різних сортів.



Рис. 3.3. Калюсогенез гвоздики сорту «Raffino Linde» : А- неморфогенний калюс на стадії формування меристемоїдів; Б – морфогенний калюс на стадії активного органогенезу.



Рис. 3.4. Утворення морфогенного калюсу гвоздики сорту «Тіуа»

На рис. 3.5 представлено процес непрямого морфогенезу за різної тривалості культивування калюсних тканин з урахуванням, що один пасаж триває протягом 21-30 діб.



Рис.3.5. Утворення пагонів гвоздики сорту «Тіуа»: 1- тривалість культивування калюсних тканин становила 4 пасажі; 2 - 2 пасажі; 3- 6 пасажів.

Таким чином, при отриманні непрямого морфогенезу необхідно враховувати те, що регенераційна здатність калюсних тканин різних генотипів гвоздики залежить не тільки від генотипу рослин, а й від вікової категорії. З віком, особливо після дев'ятого пасажу спостерігається зниження регенераційної здатності. Можливо причиною цього може бути соматональна мінливість, яка виникає в результаті довготривалого культивування калюсних тканин.

3.4. Індукція пагоноутворення із апікальних меристем та мікроживців різних генотипів гвоздики

Загально відомо, що одним із основних умов регенерації рослин із меристем є наявність і оптимальне співвідношення в живильному середовищі регуляторі росту. Приклади формування органів в культурі тканин і клітин виключно різноманітні по відношенню до певних типів і концентрацій

фітогормонів [17, 20, 24, 26]. Однак не існує загальної формули у відношенні концентрацій фітогормонів, а також інших фізіологічно активних речовин. які можна було б застосовувати у всіх випадках. Важлива роль належить цитокинінам, а саме 6-БАП, кінетину та ауксином, таким як ІОК, НОК, ІМК. Типи і рівень екзогенних фітогормонів в живильному середовищі на сьогодні один основних чинників, які уможливають направленість регуляції процесів росту, розвитку і морфогенезу в культурі тканин [7, 5].

Враховуючи, що апікальна меристема містить ендогенні ауксини, безпосередньо ІОК, нами розроблено живильне середовище для пагоноутворення із апікальних меристем гвоздики, склад якого представлено в табл. 2.5.

Середовище містить речовину групи цитокинінів – 6-БАП. Цитокиніни індують розвиток пазушних бруньок в культурі апексів, стимулюють ріст органів, які знаходяться в стані спокою , а також регулюють ріст соматичних зародків і формування рослини.

Як експлантат використовували апікальну меристему гвоздики сортів «Тіуа» та «Raffino Linde» довжиною 0,3-0,5 мм. Результати пагоноутворення представлені у табл. 3.6.

Таблиця 3.6.

**Пагоноутворення із апікальних меристем гвоздики
на 7 тиждень культивування**

Сорт	Кількість експлантатів	Кількість пагонів			Довжина пагонів, см
		Кількість пагонів 1 шт	Кількість пагонів 2шт	Кількість пагонів 3шт і більше	
«Тіуа»	20	10	5	5	2,1± 0,09
«Raffino Linde»	20	3	5	12	2,8± 0,14

Рослини гвоздики отримані із апікальних меристем представлені на рис. 3.5.



Рис. 3.6. Рослини-регенеранти отримані із апікальних меристем гвоздики сорту «Тіуа»

Таким чином, при додаванні до живильного середовища МС цитокінів, а безпосередньо 6-БАП уможливорює розвиток апікальних меристем та інтенсивне пагоноутворення гвоздики.

Вивчення процесу експериментального морфогенезу *in vitro* на всіх рівнях організації – від окремої клітини до верхівки пагона - призвело до створення мікроклонального розмноження рослин, яке в більшості країн поставлено на комерційну основу. Клональне мікророзмноження – це використання техніки *in vitro* для швидкого отримання нестатевим шляхом рослин, які ідентичні вихідному [7] .

При клональному мікророзмноженні через органогенез використовують прямий шлях отримання рослин. В цьому випадку індукція бруньок проходить безпосередньо із клітин експлантату. Метод базується на здатності ізольованих частин рослин за певних умов відновлювати втрачені органи і таким чином регенерувати нові рослини.

В його основу покладено два принципово різні явища: виникнення пагонів із бокових інтеркалярних меристем, а також із меристеми органів з обмеженим ростом; редиференціація спеціалізованих клітин, утворення меристематичних вогнищ і диференціація стеблових бруньок.

Відміною між цими процесами полягають в тому, що меристематичне походження рослин гарантує їх генетичну ідентичність батьківським формам [6]. При регенерації мікропагонів меристематичні тканини, які виконують певні функції в рослинному організмі, реорганізуються, і при цьому відновлюються їх первинні функції.

Даний метод мікророзмноження базується на виникненні бруньок із існуючих меристем або редифеєнціяції спеціалізованих клітин, а наступною диференціацією стеблових бруньок.

Однією із важливих проблем при клональному мікророзмноженні є питання концентрації регуляторів росту, які додають живильного середовища. Останнім часом з'явилися данні про те, що високі концентрації регуляторів росту негативно впливають морфогенетичні особливості отриманих рослин, а також на можливість довготривалого мікророзмноження в культурі *in vitro*.

Можливо в процесі культивування пагонів проходить поступове накопичення регуляторів росту в тканинах, що культивуються, вище необхідного фізіологічного рівня і при цьому вони стають токсичними. Це призводить до зміни морфології рослин, пригніченню проліферації пазушних меристем, зменшенню здатності до укорінення.

Застосування середовищ з мінімальною концентрацією цитокинінів, яка забезпечує високу швидкість мікророзмноження, зменшує їх негативну дію. Чергування циклів культивування на середовищах з низьким і високим рівнем регуляторів росту також запобігає негативному впливу цитокинінів.

Рослини, вирощені із апікальних гвоздики, через 5-6- тижнів після закладання досліду, черенкували і використовували мікрочеренки довжиною 1-2-см з одним міжвузлям.

Мікрочеренки трансплантували таким чином, що міжвузля знаходилося на поверхні живильного середовища. Експлантати культивували за температури +24-25 °С, 16-ти годинному фотоперіоді та вологості повітря 70-80%. Два рази на тиждень зразки оглядали. Загальна кількість висаджених

експлантатів становила 30 шт. Через 4 і 6 тижнів культивування проводили облік пагоноутворення, результати якого представлені в табл. 3.7.

Таблиця 3.7.

Пагоноутворення гвоздики сорту із мікрочеренків

Час обліку	Пагони довжиною 1-2,9 см	Пагони довжиною 3-4,9 см	Пагони довжиною 5 см і більше	Всього пагонів
Сорт «Тіуа»				
Кількість пагонів через 4 тижні культивування, шт	26 ± 1,31	10±0,54	2±0,12	38±1,93
Кількість пагонів через 6 тижні культивування, шт	51±2,52	16±0,81	4±0,22	71±3,55
Сорт «Raffino Linde»				
Кількість пагонів через 4 тижні культивування, шт	28±1,40	18±0,90	6±0,30	52±2,60
Кількість пагонів через 4 тижні культивування, шт	64±3.20	24±1,20	8±040	96±4,80

З представлених даних можна бачити, що через 4 тижні культивування у сорту «Тіуа» утворилось в середньому 38 розвинутих пагонів, тоді як у сорту «Raffino Linde» - 71 пагін. Через 6 тижнів культивування у сорту «Тіуа»

утворилось в середньому 52 пагони, у сорту «Raffino Linde» - 96 пагонів. Пагоноутворення у мукрочеренків представлено на рис. 3.7.



Рис. 3.7. Пагоноутворення у мікрочеренків гвоздики сорту «Raffino Linde».

Таким чином, проведені нами дослідження наглядно ілюструють переваги мікроклонального розмноження порівняно із звичайним вегетативним розмноженням, оскільки за наявних пагонів можна отримати необмежену кількість посадкового матеріалу, розділяючи пагони, які заново утворилися і пересаджуючи їх на свіже живильне середовище.

3.6. Одержання рослин-регенерантів гвоздики та їх укорінення *in vitro*

Укорінення рослин-регенерантів є заключним і одним із найбільш складних етапів при мікроклональному розмноженні. Зазвичай індукцію коренеутворення можна викликати використовуючи наступні прийоми:

- додавання до живильного середовища ауксинів;
- обробка базальних ділянок мікропагонів ауксинами з наступним культивуванням на живильних середовищах, які не містять регуляторів росту;
- додавання до живильного середовища невеликої кількості активованого вугілля чи обгортання нижньої частини пробірок, враховуючи те, що утворення коренів пригнічується високою інтенсивністю світла.

Одні автори рекомендують [4, 11] застосовувати для укорінення розбавлене в два рази мінеральне середовище без регуляторів росту, інші [24] – додавати ауксини.

Нами вивчена дія ауксину НОК у концентрації від 0, 5 мг/л до 2 мг/л в агаризованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга, яке містило половинну концентрацію мінеральних солей на процес коренеутворення у досліджених сортів гвоздики та укорінення на безгормональному живильному середовищі.

Для укорінення відбирали пагони одного розміру з добре розвиненими листочками і висаджували на модифіковане живильне середовище Мурасіге-Скуга різних варіантів :

МСП1 – половинна концентрація мінеральних солей без додавання регуляторів росту;

2 - половинна концентрація мінеральних солей з додаванням 0,5 мг/л НОК;

3 - половинна концентрація мінеральних солей з додаванням 2 мг/л НОК.

Результати досліджень представлені у табл. 3.8. Можна бачити, що коренеутворення проходить у основи пагонів.

Аналізуючи результати досліджень по укоріненню рослини-регенерантів гвоздики, що наведені у табл. 3.8, можна бачити, що оптимально ефективним є 2 варіант живильного середовища МС, яке доповнене 0,5 мг/л НОК як для сорту «Tiya», так і для сорту «Raffino Linde».

На цьому живильному середовищі спостерігали 90% укорінення, тоді як варіанти середовища 1 і 3 давали відповідно 20% і 50% укорінення пагонів для сорту «Тіуа». Укорінені пагони представлено на рис. 3.7.

Таблиця 3.8.

Вплив складу живильного середовища на укорінення пагонів

ГВОЗДИКИ

Варіант	Склад середовища	Кількість пагонів, шт	Кількість укорінених пагонів	
			шт	%
Сорт «Raffino Linde»				
1	½ МС	40	8	20
2	½ МС + 0,5 мг/л НОК	40	36	90
3	½ МС + 2,0 мг/л НОК	40	20	50
НІР ₀₅			0,02	10,80
Сорт «Тіуа»				
1	½ МС	40	10	25
2	½ МС + 0,5 мг/л НОК	40	38	95
3	½ МС + 2,0 мг/л НОК	40	18	45
НІР ₀₅			1,10	2,75

Стосовно сорту «Raffino Linde» на середовищі варіанту 1 спостерігали 95% укорінення, тоді як варіанти середовища 1 і 3 давали відповідно 25% і 45% укорінення пагонів.



Рис. 3.8. Коренеутворення *in vitro* гвоздики сорту «Тіуа»

Таким чином, можна зробити висновок, що згідно проведених досліджень найкращим для укорінення виявилось середовище МС з половинною концентрацією макро- і мікросолей та доповнене 0,5 мг/л НОК, яке ми рекомендуємо для укорінення рослин-регенерантів гвоздики різних сортів.

3.7. Адаптація рослин-регенерантів та перенесення їх в субстрат.

Заключним і одним із проблемних етапів розмноження рослин методом культивування ізольованих тканин є адаптація, яка у рослин, отриманих *in vitro*, досить ускладнена порівняно із рослинами *in vivo*.

Рослини, отримані в умовах *in vitro* відрізняються анатомічними ознаками. а саме тонкою кутикулою, яка містить мало воску та воскоподібних речовин; малою кількістю механічних тканин; провідні пучки розвинені слабо; органи, які необхідні для фотосинтезу (продихи) функціонують обмежено [9].

Пересадження інтактних рослин *in vitro* в умови *in vivo* призводить до виникнення стресу, оскільки їх органи, сформовані за високої вологості повітря та низької інтенсивності освітлення, не можуть функціонувати

адекватно у нових умовах. Підчас поступового зниження вологості повітря, за адаптації у рослин-регенерантів утворюються кутикули.

Нами при адаптації рослин-регенерантів гвоздики проводилися наступні маніпуляції. Пробірки з укоріненими рослинами відкривали, рослини з добре розвиненою кореневою системою виймали, відмивали від залишків живильного середовища, поміщали на 20 хв в 1% розчин перманганату калію, а потім висаджували у субстрат: перліт: торф (1:1).

Попередньо субстрат автоклаували за 1 атм. Посудини з висадженими рослинами поміщали в умови високої вологості для кращого приживання. Через 10-12 діб по мірі адаптації рослин, вони приживалися і починали рости.

Результати приживаності рослин-регенерантів гвоздики представлені в табл. 3.9.

Таблиця 3.9.

Приживання рослин-регенерантів різних сортів гвоздики

Сорт	Висаджено рослин в субстрат, шт	Рослин, що прижилися	
		шт	%
Сорт «Raffino Linde»	30	27	90 ± 3,56
Сорт «Tiya»	30	25	83 ± 3,96

Через 30 діб розсада мала висоту 8-10 см та 6-10 справжніх листочків і була придатною для висадження в умови відкритого ґрунту в теплиці. При цьому для отримання квітів обов'язково використовують туманостворюючі установки.

Адаптовані рослини-регенеранти гвоздики представлено на рис. 3.9.



Рис. 3.9. Адаптовані рослини-регенеранти гвоздики сорту «Raffino Linde»

Таким чином, в результаті проведених досліджень по адаптації рослин-регенерантів гвоздики нами встановлено, що приживаність рослин сорту «Raffino Linde» становила 90%, тоді як за однакових умов у рослин Сорт «Тіуа» - 83% відповідно.

3.6. Ефективність термотерапії рослин різних генотипів гвоздики

Для оздоровлення рослин гвоздики нами вивчена можливість проведення термотерапії в умовах *in vitro*. В своїх дослідженнях безпосередньо вивчали вплив температури $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ на ріст і розвиток мікророслин гвоздики та на елімінацію вірусів. Ця температура є стресовою для рослин, враховуючи що температурою переходу від сприятливих до несприятливих умов життєдіяльності є температура $+35^{\circ}\text{C}$. Відомо, що у рослин за високого температурного рівня відбувається дезорганізація багатьох функцій клітини, зниження різних фізіологічних процесів. За рекомендованої для термообробки температури $+38^{\circ}\text{C}$ відмічається лізис ядра у 5,3 % клітин, тоді як кількість клітин, що проходять процес мітотичного поділу, становить 14,3 %. За температури $+20^{\circ}\text{C}$ мітоз відмічається у всіх клітин.

Основним завданням нашого експерименту з термотерапії *in vitro* є визначення температурного режиму, за умов якого відбувається збереження верхівкових бруньок, забезпечується найбільший приріст мікропагонів та відбувається елімінація вірусів. Нами відбирано рослини без зовнішніх симптомів вірусної інфекції. Для виявлення латентної вірусної інфекції донорні рослини тестували методом імуноферментного аналізу. Результати ІФА показали, що дослідні зразки містять антигени INSV, тоді як показник екстинції рослинних екстрактів з сироватками, специфічними до TMV, AMV, TRV, WSMV, BYDV, CMV і PVX, перебував на рівні негативного контролю.

INSV (*Impatiens necrotic spot virus*), вірус некротичної плямистості бальзаміну, належить до родини *Tospovirus*, роду *Bunyaviridae*. Вперше виявлений на бальзаміні в США в 1990 році Law M.D. і Moyer J.W. Розповсюджений в Бельгії, Німеччині, Нідерландах, Польщі, Великобританії, США, Грузії.

Аналіз життєздатності рослин гвоздики в період термотерапії показав, що цей показник залежить від часу експозиції термообробки, генотипу та типу досліджуваного матеріалу (рис.3.10, 3.11).

Зниження життєздатності пагонів спостерігали на 6-8-му добу термообробки. При цьому відмічали загибель 14,3-33,3 % верхівкових бруньок. Виключення становили мікророслини гвоздики сорту «Raffino Linde», у яких життєздатність пагонів на рівні 100% зберігалася до 10 доби культивування. На 12 добу культивування у обох сортів в умовах підвищеної температури спостерігали різке зниження життєздатності пагонів до 57,1-33,3%. На 16-20 добу культивування кількість життєздатних верхівкових бруньок у мікророслин становила 42,9-6,7 %, і відмічалася повна загибель мікропагонів (табл. 3.9).

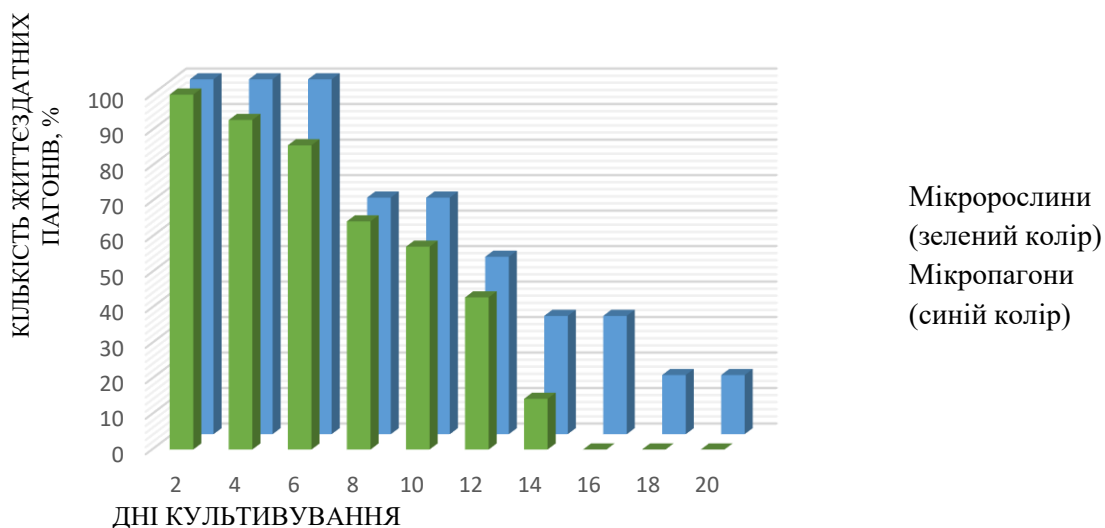


Рис. 3.10. Життєздатність пагонів рослин гвоздики сорту «Raffino Linde» в умовах термотерапії *in vitro*

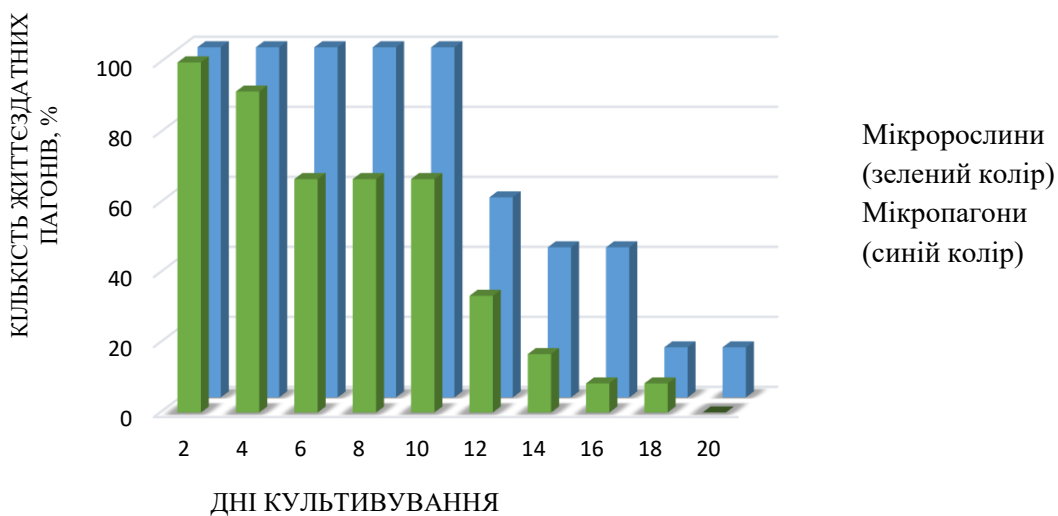


Рис. 3.11. Життєздатність пагонів рослин сорту «Tiya» в умовах термотерапії *in vitro*.

Таким чином, оптимальна експозиція термообробки рослин гвоздики обох сортів в умовах *in vitro* становила 10 діб. При цьому зберігалася життєздатність пагонів на рівні 66,0-100,0%.

Термотолерантність та інтенсивність росту рослин гвоздики залежали від генотипу та типу досліджуваного матеріалу (табл. 3.10).

Таблиця 3.10.

Вплив термообробки на розвиток меристемних рослин різних генотипів гвоздики

Сорт гвоздики	Тип досліджуваного матеріалу	Варіант досліджу	Кількість життєздатних пагонів, %	Приріст за 10 днів культивування	
				висоти пагонів, мм	пар листків, шт.
«Raffino Linde»	мікропагони	контроль	100,00	11,50 ± 1,50	3,00 ± 0,00
		термообробка	66,67	12,08 ± 1,44	1,00 ± 0,00
	мікророслини	контроль	100,00	10,75 ± 2,84	2,00 ± 0,00
		термообробка	100,00	11,43 ± 1,85	1,00 ± 0,00
«Tiya»	мікропагони	контроль	100,00	22,50 ± 1,50	2,25 ± 0,48
		термообробка	57,14	25,25 ± 3,09	1,50 ± 0,19
	мікророслини	контроль	100,00	20,00 ± 2,18	3,50 ± 0,50
		термообробка	66,67	19,67 ± 2,10	1,00 ± 0,00**

Примітка. Різниця між контрольним і дослідним варіантами достовірна при **P=0,01.

Встановлено, що життєздатність верхівок мікророслин була вищою порівняно з мікропагонами у обох сортів гвоздики. У сорту «Raffino Linde» за 10 діб культивування в умовах підвищеної температури життєздатність зберегли 100,0% верхівок бруньок, а у мікропагонів – 66,7%.

Можна бачити, що термотолерантність рослин сорту «Tiya» виявилась нижчою порівняно з сортом «Raffino Linde». При цьому життєздатність мікророслин становила 66,7%, мікропагонів – 57,1% відповідно.

Приріст пагонів досліджуваних рослин суттєво не відрізнявся від контрольних, а також між мікропагонами і мікророслинами в межах одного генотипу. Однак, спостерігалися суттєві відмінності за цим показником між сортами, як в контрольних, так і в дослідних варіантах.

У сорту «Raffino Linde» спостерігали приріст в 1,7-2,1 рази вищий порівняно з сортом «Тіуа». Слід відмітити, що за період термообробки у досліджуваних рослин сформувалася одна пара листків, тоді як в контролі – дві-чотири пари листочків.

Можна зробити припущення, що за температури $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$ не відбувалося значного пригнічення росту клітин розтягненням. Внаслідок цього приріст пагонів не відрізнявся як у досліджуваних, так і у контрольних рослин (табл. 3.11).

Проте, ймовірно, за цих умов збільшувався інтервал між закладанням двох листкових зачатків, що обумовлювало зменшення кількості листків на пагоні в 2-4 рази порівняно з контролем.

Таким чином, можна зробити висновок, що найкращим рослинним матеріалом для проведення термотерапії гвоздики *in vitro* являються мікророслини.

При цьому життєздатність за підвищеної температури вища на 33,3 % у сорту «Raffino Linde», і на 9,6 % у сорту «Тіуа» порівняно з мікропагонами, а довжина приросту пагонів суттєво не відрізняється між типами досліджуваного матеріалу. Верхівкові бруньки ізолювали відразу після припинення температурного режиму та культивували на середовищі МС.

Приживлюваність бруньок становила 100 %. Можна бачити, що інтенсивність процесів формування основного пагону і листків з верхівкових бруньок, які пройшли термотерапію, суттєво не відрізнялася від контрольних.

Проте нами виявлено значне збільшення кількості додаткових пагонів у експлантатів, які сформувалися за умов високої температури.

**Розвиток ізольованих верхівкових бруньок різних генотипів
гвоздики в культурі *in vitro* (50 діб культивування)**

Біометричні параметри	«Raffino Linde»		«Тіуа»	
	контроль (без термообробки)	після термообробки	контроль (без термообробки)	після термообробки
Частота регенерації, %	100,0	100,0	100,0	100,0
Висота основного пагону, мм	21,42 ± 1,41	23,25 ± 3,01	44,20 ± 2,89	47,00 ± 5,43
Кількість пар листків, шт.	4,74 ± 0,44	5,50 ± 0,48	6,90 ± 0,54	7,50 ± 0,29
Частота множинного пагоноутворення, %	100,0	100,0	70,0	60,0
Кількість додаткових пагонів, шт.	3,42 ± 0,34	6,75±0,48***	1,36 ± 0,13	3,67± 0,67**
Коефіцієнт розмноження	1 : 8,16	1 : 12,25	1 : 7,85	1 : 9,70

Примітка. Різниця між контрольним і дослідним варіантами достовірна при **P=0,01, ***P= 0,001.

Детекцію антигенів INSV у рослин-регенерантів після термотерапії проводили методом непрямого ІФА. Встановлено, що звільнення рослин від вірусу INSV залежало як від генотипу так і концентрації вірусного антигену у вихідних рослинах.

Ефективність термотерапії для звільнення рослин сорту Raffino Linde від INSV становила 70 %, а при застосуванні методу культури апікальних

меристем розміром 0,7 мм було отримано 60 % безвірусних рослин. У сорту Тіуа вільними від вірусу INSV виявились всі рослини-регенеранти.

Таким чином, можна зробити висновок, що для звільнення рослин гвоздики від вірусу INSV найбільш ефективним є метод термотерапії *in vitro*, оскільки він забезпечує високий вихід здорових рослин за рахунок високого коефіцієнту розмноження.

Крім того, має низку переваг порівняно з повітряною термотерапією *in vivo*, а саме:

- скорочення термінів вирощування рослин перед термотерапією з 1 року до 2-2,5 місяців;
- зменшення площ культиваційних споруд для вирощування рослин для термообробки;
- зменшення площі термокамери, необхідної для проведення термотерапії, і, відповідно, затрат електроенергії;
- виключення етапу стерилізації рослинного матеріалу перед ізолюванням відрослих верхівок пагонів і введенням їх в культуру *in vitro*;
- скорочення термінів одержання оздоровлених рослин з 1-2 років до 4-5 місяців.

3.6. Розробка оптимізованої технології клонального мікророзмноження рослин гвоздики.

На основі експериментального вивчення закономірностей морфогенезу в культурі ізолюваних меристем та стеблових експлантатів гвоздики розроблено повний цикл процесу та запропоновано біотехнологічну схему клонального мікророзмноження сортів гвоздики «Raffino Linde» та «Тіуа» починаючи від введення експлантатів в ізолювану культуру до адаптації рослин-регенерантів *in vivo* (рис. 3.12).

Проведено апробацію та показано можливість використання біотехнологічних прийомів для клонального мікророзмноження даних сортів (табл. 3.12).

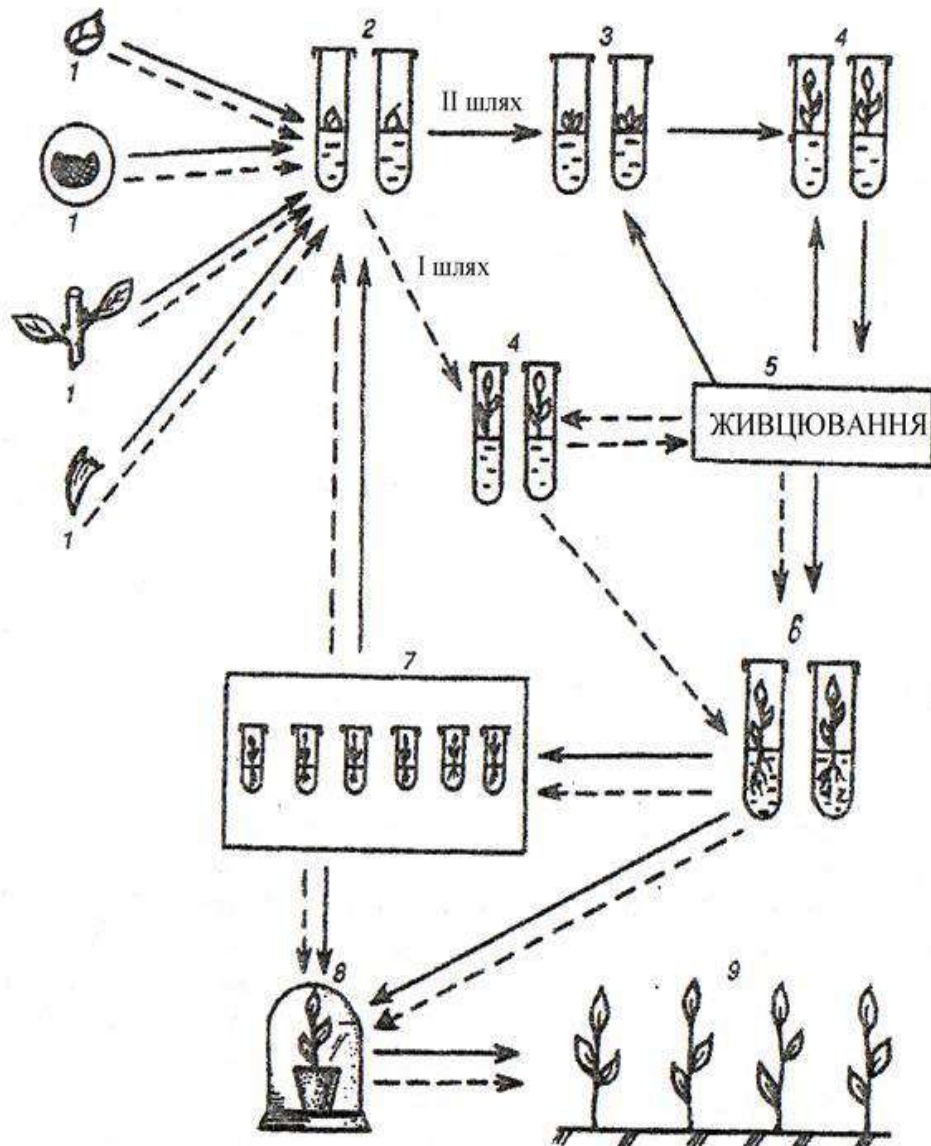


Рис. 3.12. Загальна біотехнологічна схема клонального мікророзмноження рослин гвоздики на основі техніки *in vitro*: 1 - донорна рослина; 2 - ізоляція експлантів; 3 - введення експлантатів в культуру *in vitro*; 4 - регенерація рослин; 5 - живцювання *in vitro*; 6 - прямий органогенез в культурі листкових експлантів; 7 - непрямий органогенез в культурі стеблових експлантів; 8 - адаптація рослин-регенерантів *in vivo*.

Основні етапи клонального мікророзмноження рослин гвоздики на основі культури ізолюваних меристем *in vitro*

Зміст етапу	Умови реалізації етапу
1. Висадження донорних рослин гвоздики в закритий ґрунт	Вегетаційні посудини об'ємом 10 літрів, субстрат-торф, пісок, деревний ґрунт (1:1:1)
2. Ізоляція та експлантація меристем на живильні середовища	Стерилізація рослинного матеріалу 0,1 % HgCl ₂ , час експозиції – 10 хвилин. Експлантація на живильні середовища сегментів стебел завдовжки 0,7-1,0 см.
3. Культивування експлантатів ізолюваних меристем <i>in vitro</i>	Модифіковане агаризоване середовище Мурасіге-Скуга, з додаванням маточних розчинів «Майстру» та «Акварину» – 30 діб
4. Живцювання меристемних мікропагонів	Розділення мікропагонів на вузли з однією парою листків
5. Культивування вузлів стебла <i>in vitro</i>	Модифіковане агаризоване середовище Мурасіге-Скуга, з додаванням маточних розчинів «Майстру» та «Акварину» – 15 діб
6. Адаптація рослин-регенерантів до умов <i>in vivo</i>	Розділення укорінених мікропагонів та перенесення в пластикові стаканчики об'ємом 200 мл з кокосовим субстратом. Вирощування 45 діб, полив за необхідності

Для адаптації до умов *in vivo* рослини, що одержані на основі меристемної культури та черенкування *in vitro*, переносили в субстрати, які містили суміш деревного ґрунту, торфу та піску. У процесі адаптації до умов *in vivo* рослини поступово переводили на звичайний режим вирощування в закритому ґрунті та умов високої вологості.

Уже першій половині травня меристемні рослини висаджували в теплицю і вирощували до фази технічної зрілості. Порівнюючи меристемні

рослини гвоздики з рослинами, що були розмноженя традиційним розсадним способом, відмінностей між ними не виявлено (табл. 3.13).

Таблиця 3.13.

Етапи біотехнологічної схеми клонального мікророзмноження рослин гвоздики на основі культури ізольованих стеблових експлантатів *in vitro*

Зміст етапу	Умови реалізації етапу
1. Висадження донорних рослин в закритий ґрунт	Вегетаційні посудини об'ємом 10 літрів, субстрат-торф, пісок, деревний ґрунт (1:1:1)
2. Введення експлантатів стеблових сегментів в умови <i>in vitro</i>	Стерилізація рослинного матеріалу 0,1 % HgCl ₂ , час експозиції – 10 хвилин. Експлантація на живильні середовища сегментів стебел завдовжки 0,7-1,0 см.
3. Культивування експлантатів <i>in vitro</i>	Агаризоване середовище Мурасіге-Скуга, з додаванням маточкових розчинів «Майстру» та «Акварину» – 30 діб
4. Індивідуалізація рослин і їх адаптація <i>in vivo</i>	Розділення укорінених мікропагонів та перенесення в кокосовий субстрат

Адаптацію рослин до умов *in vivo* була ідентична, що і для рослин, одержаних в культурі ізольованих меристем. Однак, в даному випадку завдяки високому коефіцієнту розмноження дещо ускладнювався етап розділення та індивідуалізації рослин, які отримані з одного експлантату. Процедуру розподілу на індивідуальні рослини проводили в чашках Петрі за допомогою препарувальної голки.

Рослини переносили в кокосовий субстрат. Надалі їх поступово переводили на звичайний режим вирощування у закритому ґрунті до фази технічної зрілості. Порівнюючи рослини гвоздики, отримані в культурі

стеблових експлантатів із рослинами, розмноженими традиційним розсадним способом, нами морфологічних відмінностей не виявлено (табл.3.14).

Таблиця 3.14.

Порівняльна характеристика результатів клонального мікророзмноження рослин гвоздики на основі розробленої біотехнологічної схеми

Показники	Тип експлантату	
	Меристеми	Стеблові сегменти
Первинний експлантат	2-3 пари листкових примордіїв (1,27-1,64 мм)	Довжина 0,7-1,0 см
Тривалість культивування від введення експлантату до одержання рослин-регенерантів, діб	40-75	30
Коефіцієнт розмноження за один цикл вирощування	1:4,9- 1:6,9	1:11-1:14
Живильне середовище	Оптимізоване (Мурасіге-Скуга)	Оптимізоване (Мурасіге-Скуга)
Субстрат для адаптації до умов <i>in vivo</i>	Кокосовий субстрат	
Приживлюваність рослин в умовах <i>in vivo</i> (через 45 діб), %	96,7-100,0	91,7-100,0

Становить інтерес з практичної точки зору порівняльна характеристика результатів клонального мікророзмноження за використання різних експлантатів. Цей порівняльний аналіз надає можливість провести оцінку

ефективності розроблених біотехнологічних прийомів і визначити оптимальний спосіб клонального мікророзмноження залежно від мети і поставлених завдань.

Нами встановлено, що культивування мікропагонів на живильних середовищах з речовинами «Майстер» та «Акварин» позитивно впливає на адаптацію рослин-регенерантів гвоздики в нестерильних умовах. На етапі ризогенезу залежно від генотипової реакції рослин, можливе застосування як Майстру і Акварину в концентраціях 2,0-3,0 мг/л. Культивування мікропагонів рослин на запропонованих середовищах пришвидшує процес утворення коренів на 1-2 тижні та підвищує укорінення на 20,0 - 93,3%, та збільшує кількість коренів в 2,5- 11,1 рази та їх довжину в 3,4-6,0 разів.

Традиційна технологія клонального мікророзмноження рослин гвоздики

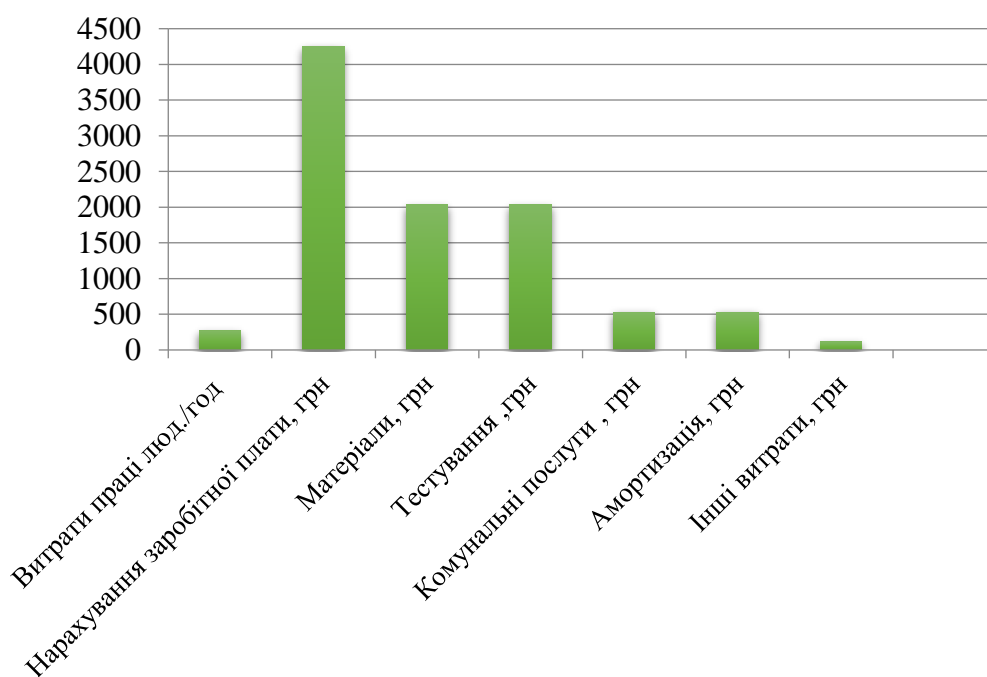


Рис.3.13. Традиційна технологія клонального мікророзмноження рослин гвоздики

Застосування комплексних мінеральних речовин уможливило укорінення мікропагонів у рослин гвоздики до 100%, враховуючи те, що на

загальноприйнятих живильних середовищах вони практично не утворюють коренів (рис. 3.14). Аналізуючи результати досліджень можна припустити, що найкраща регенераційна здатність експлантатів на етапах проліферації і ризогенезу обумовлена більш збалансованим поєднанням макро- і мікроелементів в досліджуваних комплексних мінеральних речовинах.

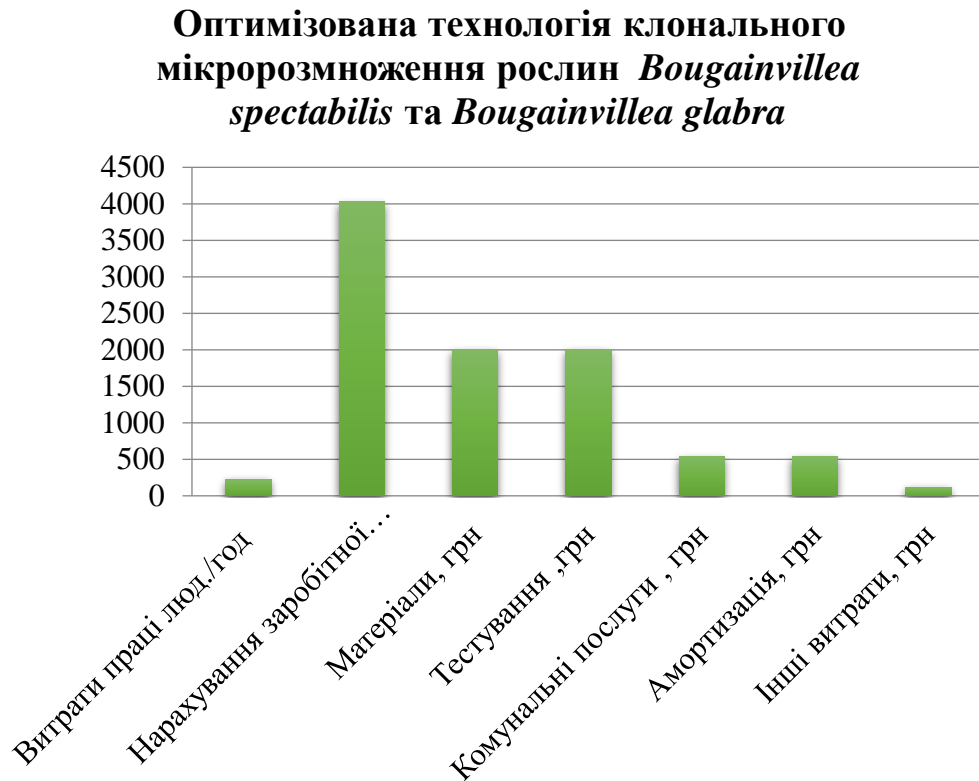


Рис.3.14. Оптимізована технологія клонального мікророзмноження рослин гвоздики

Нами була розрахована економічна ефективність порівняння оптимізованої та традиційної технології мікроклонального рослин гвоздики. За традиційною технологією витрати на виробництво становили: витрати праці люд./год – 268; нарахування заробітної плати, грн – 4250; матеріали, грн. - 2031,52; тестування, грн. - 2031,52; комунальні послуги, грн. – 528; амортизація, грн. - 528 та ін. витрати, грн. - 118,4.

Загальна сума витрат на традиційну технологію мікроклонального розмноження становила 9755,44 грн. Проте за використання оптимізованої

технології мікроклонального розмноження витрати на виробництво становили: витрати праці люд./год - 223,50, нарахування заробітної плати, грн-4030; матеріали, грн. - 1998,13; тестування, грн. - 1998,13; комунальні послуги, грн. – 534; амортизація, грн. – 534; ін. витрати, грн. – 120 грн. В загальному витрати на оптимізоване виробництво становили 9437,76 грн.

Таким чином, застосування комплексних мінеральних речовин уможлиблює вдосконалення технологічного процесу мікроклонального розмноження та зниження витрат праці на виробництво рослин гвоздики на 16,7% та собівартість адаптованих рослин *ex vitro* на 317,68 грн.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що при введенні в культуру *in vitro* асептична обробка експлантатів за використання схеми Thimerosal – 2 хв, 70% етиловий спирт – 0,5 хв і 0,08% AgNO₃ - 1 хв є найефективнішою. Крім того, застосування 0,08% AgNO₃ знижує рівень контамінації грибної інфекції за умов подовження часу експозиції.

2. В межах сортів гвоздики майже не спостерігалися значні відмінності у протіканні процесів калюсогенезу і частота калюсогенезу становила 100%.

3. Встановлено, що за отримання непрямого морфогенезу необхідно враховувати те, що регенераційна здатність калюсних тканин різних генотипів гвоздики залежить не тільки від генотипу рослин, а й від вікової категорії. З віком, особливо після дев'ятого пасажу спостерігається зниження регенераційної здатності.

4. Додавання до живильного середовища МС цитокінів, а безпосередньо 6-БАП уможливує розвиток апікальних меристем та інтенсивне пагоноутворення гвоздики.

5. Згідно проведених досліджень найкращим для укорінення виявилось середовище МС з половинною концентрацією макро- і мікросолей та доповнене 0, 5 мг/л НОК, яке ми рекомендуємо для укорінення рослин-регенерантів гвоздики різних сортів.

6. Встановлено, що приживаність рослин сорту «Raffino Linde» становила 90%, тоді як за однакових умов у рослин Сорт «Tiya» - 83% відповідно.

7. Оптимальна експозиція термообробки рослин гвоздики в умовах *in vitro* становить 10 діб, протягом яких зберігається життєздатність пагонів на рівні 66,0-100,0 %. При чому, термотолерантність та інтенсивність росту рослин залежать від генотипу та типу досліджуваного матеріалу.

8. Встановлено, що застосування комплексних мінеральних речовин дозволяє вдосконалити технологічний процес клонального мікророзмноження та знизити витрати праці на виробництво рослин гвоздики на 16,7% та

собівартість адаптованого рослини *ex vitro* на 317,68 грн.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Енциклопедія рослин садових та кімнатних: довідкове видання / уклад. С. В. Ануфрієва. — Донецьк : Глорія Трейд, 2013. — С. 100. — 224 с.
2. ДСТУ 6055:2008 Буряки цукрові. Методи отримання розсади клональним мікророзмноженням.
3. Кляченко О.Л., Желтоножская Л.В., Кушнір Н.А. Микроклональное размножение гвоздики (2013). *Sodininkyste ir darzininkyste, Mokslo darbai.* 20(4) – 2 : P.89-95
4. Калинин Ф.Л., Кушнір Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений.– К.: Наук. думка, 1992. – 228 с.
5. Колдар Л.А. (2018) Морфогенез експлантатів *DIANTHUS RATIANOPOLITANUS* VILL. в культурі *in vitro*. Автохтонні та інтродуковані рослини. 6: 68-72.
6. Кунах В.О. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. К.: Логос, 2005. – 730 с.
7. Кушнір Т.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. – К.: Наук. думка. - 2005. – 355 с.
8. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л. Біотехнологія в агросфері. Навчальний посібник. Вінниця. ТОВ «Нілан-ЛТД», 2015. – 286 с.
9. Мельничук М.Д., Клюваденко А.А., Оверченко О.В., Чорнобров О.Ю., Ліханов А.Ф. Мікроклональне розмноження декоративних і плодово-ягідних видів рослин. К, 2012. – 64 с.
10. Олейнікова О.М. Садові декоративні рослини. Харків : Веста, 2010. - 622 с.
11. Ahmadian M, Babaei A, Shokri S, Hessami S. (2017). Micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in liquid medium by temporary immersion bioreactor in comparison with solid culture. *J. Genet. Eng. Biotech.*;15:309-315.

12. Ali A, Afrasia H, Naz S, Rauf M, Iqbal J. (2008) An efficient protocol for *in vitro* propagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Pak. J. Bot., 40:111-121.
13. Altvorst A, Koehorst G, Bruinsma T, Jansen J, Custers J, Jong J, Dons, J (1992) Adventitious shoot formation from *in vitro* leaf explants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.), Sci. Hort, 51: 223-235
14. Arditti J. (2008) Micropropagation of Orchids, Vol. II., second ed. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
15. Arif M, Rauf S, Din AU, Rauf M, Afrasiab H. (2014) High frequency plant regeneration from leaf derived callus of *Dianthus caryophyllus* L. Am. J. Plant Sci. 5: 2454-2463.
16. Boase M, Wright S, McLeay P (1993) Coconut milk enhancement of axillary shoot growth *in vitro* of kiwifruit, N. Z. J. Crop Hortic. Sci., 21: 171-176
17. Buah J, Agu-Asare P (2014) Coconut water from fresh and dry fruits as an alternative to BAP in the *in vitro* culture of dwarf Cavendish banana, Journal of Biological Science, 14(8):521-526
18. Casanova E, Valdes AE, Fernandez BL, Moysset, Trillas MI. Levels and immuno localization of endogenous cytokinins in thidiazuron induced shoot organogenesis in carnation. J. Plant Physiol. 2014;161(1): 95-104.
19. Cheong E, Mock R, Li R (2019) Optimizing culture medium for meristem tissue culture of several *Saccharum* species and commercial hybrids, J. Am. Soc. Sugar Cane Technol., 29: 149-165.
20. Danial G, Yousif A, Omar M (2019) Clonal propagation of *Dianthus caryophyllus* L. through tissue culture, J. Duhok Univ. Vol 12. No.1 (Special Issue), P. 91-95.
21. Farooq A, Mandal B, Sandhya G (2018) Effect of some growth regulators on rooting of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) under *in vitro* condition, Appl. Biol. Res. 10: 193-201.

22. Das J., Mao A.A., Handique P.J. (2012). Callusmediated organogenesis and effect of growth regulators on production of different valepotriates in Indian valerian (*Valeriana jatamansi* Jones). *Acta Physiol. Plant*, 35 : 55-63.
23. Gang Y.Y., Du G.S., Shi D.J., Wang M.Z., Li X.D., Hua Z.L. (2003) Establishment of *in vitro* regeneration system of the *Atrichum* mosses. *Acta Bot. Sin.* 45 : 1475-1480.
24. Hazarika B.N. (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Sci. Hortic.* 108 : 105-120.
25. Jorapur S, Jogdande N, Dhumale D. (2018) Petal callus mediated *de novo* regeneration of shoots in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *The Pharma Innov. J.* 7(1) : 218-222.
26. Frey L, Saranga Y, Janick J. (2020) Somatic embryogenesis in carnation. *Hort. Sci.* 27(1):63-65.
27. Kallak H, Reidla M, Hilpus I, Virumae K. (2019) Effects of genotype, explant source and growth regulators on organogenesis in carnation callus. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1997;51:127-135.
28. Kanwar J.K, Kumar S. (2009) Influence of growth regulators and explants on shoot regeneration in carnation. *Hortic. Sci.* 36(4) : 140-146.
29. Karami O. (2008) Induction of embryogenic callus and plant regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Online J. Biol. Sci.* 8(4) : 68-72.
30. Khatun M., Roy P.K., Razzak M. A. (2018). Additive effect of coconut water with various hormones on *in vitro* regeneration of carnation (*DIANTHUS CARYOPHYLLUS* L.). *J. Anim. Plant Sci.* 28(2) : 2018-2030
31. Kovac J. (1995) Micropropagation of *Dianthus caryophyllus* sub sp. Bohemicus- an endangered endemic from the Czech Republic. *Biol.* 37, 27-33.
32. Matter MA, Hanafy MS, Aly UI. Effect of methyl jasmonate and mannitol application on growth and eugenol content in callus cultures of carnation. *Plant Tiss. Cult. Biotech.* 2017;27(2):227- 240.

33. Miller R, Kaul V, Richards D (1991) Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) from axillary bud explants, *Ann. Bot.*, 67 : 35-42
34. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-97.
35. Murashige T. (1990) Plant propagation through tissue culture. Paractice with unrealized potential. In: *Handbook of Plant Cell Culture, Ornamental Species* (Eds. P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp and Y.P.S. Bajaj). McGraw Hill Publishing Company, New York. 5 : 3-9.
36. Muszyńska E, Hanus-Fajerska E. (2017). *In vitro* multiplication of *Dianthus carthusianorum* calamine ecotype with the aim to revegetate and stabilize polluted wastes. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 128 : 631–640.
37. Nasib A, Ali K, Khan S (2008) An optimized and improved method for the *in vitro* propagation of kiwifruit (*Actinidiadeliciosa*) using coconut water, *Pak. J. Bot.*, 40: 2355-2360
38. Pareek A, Kantia A, Kothari S (2004) *In vitro* cloning of ornamental species of *Dianthus*. *Indian J. Biotechnol.*, 3, 263-266
39. Peixe A, Raposo A, Lourenco R, Cardoso H, Macedo E. (2017) Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 113:1-7
40. Pralhad G. (2009) Evaluation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) varieties under greenhouse condition. M.Sc. Thesis, Dept. Horti., Univ. Agri. SCI., Dharwad
41. Qadri Z. A., Neelofar, N. H. Masoodi, Ambreena Din, Muneeb Ahmad Wani (2018). *In vitro* Callusing of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cv. Scania and Indios. *Current Journal of Applied Science and Technology* 27(1): 1-10.
42. Polivanova O. and. Bedarev V. A (2022). Hyperhydricity in Plant Tissue Culture. *Plants*, 11 : 3313-3326.
43. Ram Lakhan Maurya, Manoj K. Sharma, M.K. Yadav, Gaurav Kumar and Mukesh Kumar. (2019). *In vitro* high-frequency callus introduction in carnation

(*Dianthus caryophyllus* L.) cultivar “IRENE” (2019). *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 20 (23&24) : 1363–1368.

44. Radojevic L., Calic-Dragosavac D., Spiric J., Stevanovic B., Stevanovic V. (2010) *In vitro* propagation of *Dianthus ciliatus* ssp. dalmaticus and *D. giganteus* ssp. croaticus (Caryophyllaceae) from stem segment cultures. *Bot. Serb.* 34(2) : 153-161.

45. Seo JW, Kim SW, Min SR, Liu JR. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in root explant cultures of carnation. *Plant Biotechnol. Rep.* 2007;1: 67-70.

46. Siddique AB, Islam SM. Effect of light and dark on callus induction and regeneration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Bangladesh J. Bot.* 2015;44(4):643-651.

47. Zang Q, Zhou L, Zhuge F, Yang H, Wang X, Lin X.(2016) Callus induction and regeneration via shoot tips of *Dendrocalamus hamiltonii*. *Springer Plus.*;5

48. Zhu X, Li X, Ding W, Jin S, Wang Y. (2018) Callus induction and plant regeneration from leaves of peony. *Hortic. Environ. Biotech.* 59(4) : 575-582.

Wang WG, Wang SH, Wu XA, Jin XY, Chen F. High frequency plantlet regeneration from callus and artificial seed production of rock plant *Pogonatherum paniceum* (Lam.) Hack. (Poaceae). *Sci. Hortic.* 2007;113(2):196-201.

49. www.apex-plant.com

ДОДАТОК 1

УДК 631.5.635.9

Кущенко К.С., Кляченко О.Л.

КАЛЮСОГЕНЕЗ ГВОЗДИКИ ГОЛЛАНДСЬКОЇ (*DIANTUS CARYOPHYLLUS L.*) В КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

*Національний університет біоресурсів і природокористування
України Вул. Героїв Оборони, 15, м.Київ, 03041, Україна*

e-mail: Kukateryna@gmail.com

Гвоздика голландська (*Dianthus caryophyllus L.*) - багаторічна рослина родини гвоздичних, яка використовується в комерційному квітникарстві для отримання квітів на зріз. На сьогодні існує багато сучасних різновидів, що були отримані в результаті довготривалої селекції. Наразі на ринку представлено велику кількість квітів гвоздики різного кольору.

Гвоздика є однією з найбільш продаваних декоративних культур у всьому світі (Khatun, 2018). Важливою сферою застосування методу культури тканин є розмноження з метою отримання генетично ідентичних цінних елітних рослин. При цьому декоративні і квіткові рослини найчастіше розмножують за допомогою техніки культури тканин.

Калюсна тканина – це неорганізована недиференційована маса клітин паренхіми рослин, утворення якої індукують на поверхні механічно пошкоджених рослинних тканин, поміщаючи їх після стерилізації на живильне середовище. При цьому до живильного середовища обов'язково додають регулятори росту ауксини та цитокиніни у класичному співвідношенні 10 : 1. Специфічне співвідношення аксинів і цитокинів в культуральному середовищі ініціюють утворення калюсу або соматичний ембріогенез. За консистенцією калюсні тканини підрозділяють на компактні, середньої щільності та пухкі.

Промислові підприємства, які вирощують гвоздику потерпають від відсутності якісного посадкового матеріалу, що як правило імпортується із різних країн. На сьогодні для подолання цієї проблеми важливим є розробка ефективної проліферації калюсу для отримання великої кількості посадкового матеріалу *in vitro* та для впровадження у виробництво нових сортів.

Метою нашої роботи є підбір експлантатів гвоздики голандської та підбір оптимальних живильних середовищ і фізичних умов культивування для індукції калюсогенезу *in vitro*.

Дослідження проводили в лабораторії біотехнології рослин кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України в 2023-2024 рр. Для введення в умови *in vitro* як експлантативикористовували пагони з пазушними і апікальними бруньками двох сортів гвоздики голандської «Тіуа» та «Raffino Linde». В роботі застосовували загальноприйняті в біотехнології методи досліджень (Кляченко та ін., 2023)

Для отримання асептичної культури гвоздики голандської рослинний матеріал стерилізували в 1% розчині Thimerosal, 70% етиловому спирті та 0, 08% AgNO₃ з різною експозицією. Стерилізацію проводили послідовно. Встановлено, що ефективним виявився варіант 1% розчин Thimerosal з експозицією 2 хв, 70% етиловому спирті – 30 сек та 0, 08% AgNO₃ – 1хв, який дозволив звільнити рослинний матеріал від екзо-і ендогенної інфекції. Калюсну тканину гвоздики сортів «Тіуа» та «Raffino Linde» одержували зі стерильних листових пластинок (0,40–0,50 см²) та фрагментів мікропагонів (0,5–0,8 см). На експлантатах скальпелем штучно робили додаткові насічки для кращого утворення калюсу. Пагони розрізали на сегменти по 2-4 мм. Виділені експлантати висаджували на стерильні живильні середовища для калюсогенезу, які попередньо стерилізували автоклавуванням при 1 атм 20 хвилин. Для субкультивування маса сирої речовини калюсу становила 2,0±0,10 г. Тривалість пасажу складала 28–30 діб. Рослинний матеріал

культивували у пеніцилінових флакончиках у термостаті ТС-80 без освітлення за температури 25 ± 1 °C та ВВП 70–75 %. Частоту калюсоутворення визначали як відсоток експлантатів, які утворили калюс від загальної кількості експлантатів. Середньомісячний приріст сирової маси калюсу визначали як різницю між кінцевою та початковою масою.

Відомо, що регулятори росту викликають багаточисельні зміни у рослинних тканинах і є основою структурної трансформації клітин при калюсогенезі. Наявність регуляторів росту у живильному середовищі спричинюють отримання калюсної маси з високим ступенем проліферації, що уможливує отримання великої кількості рослин-регенерантів. Крім того, певний генотип має свої особливості та складнощі в процесі отримання і культивування калюсних тканин.

Калюсну тканину гвоздики отримували шляхом культивування стеблових експлантатів на модифікованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) з додаванням регуляторів росту НОК та БАП у різних концентраціях та співвідношеннях. Для калюсогенезу використовували наступну серію живильних середовищ : МСК1 (МС+0,2 мг/л БАП + 2 мг/л БАП); МСК2 (МС+0,5 мг/л БАП + 2 мг/л БАП); МСК3 (МС+1 мг/л БАП + 2 мг/л БАП). Пеніцилінові флакончики з висадженими експлантатами поміщали в термостат з регульованою температурою, умови темряви та відносної вологості 70% і культивували 12 діб.

Через 12 діб експлантати виставляли на світло за температури $+23\pm 1$ °C і 16- годинному світловому періоді в кімнатних умовах, на підвіконня з південного боку. На 24 добу проводили облік утворення калюсних тканин.

В процесі експерименту нами вивчено вплив фітогормонів на проліферацію калюсних тканин гвоздики голандської сорту «Тіуа» та «Raffino Linde» і встановлено, що найбільш оптимальним виявилось середовище МСК2, доповнене 0,5 мг/л БАП та 2 мг/л БАП. При цьому кількість експлантатів, що утворили калюс становила 100% для обох досліджуваних сортів. Однак, приріст калюсної маси становив для сорту «Тіуа» - $820\pm 41,1$, для сорту «Raffino Linde» - $610\pm 30,5$ відповідно. Мінімальна маса калюсів в середньому формувалася на живильному середовищі варіанту МСК1.

Крім ростових характеристик було визначено якісні характеристики калюсних тканин, а саме їх компактність та забарвлення. Необхідно зазначити, що для обох генотипів вони відрізнялись від складу живильного середовища. При культивуванні калюсних тканин на живильних середовищах МСК2 та МСК3 спостерігали утворення щільного калюсу із зеленими осередками клітин, тоді як на середовищі МСК1 – світло-жовтого кольору, не щільного, що характерно для обох досліджуваних сортів гвоздики.

Отже, в межах сортів гвоздики майже не спостерігалися значні відмінності у протіканні процесів калюсогенезу і частота калюсогенезу становила 100%.

Таким чином в результаті проведених досліджень встановлено впливу концентрації фітогормонів в живильному середовищі на індукцію калюсогенезу ізольованих експлантатів двох сортів гвоздики голандської «Тіуа» та «Raffino Linde» та розроблені етапи отримання асептичної культури.

Список використаних джерел:

1. Khatun M., Roy P.K., Razzak M. A. Additive effect of coconut water with various hormones on in vitro regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). J. Anim. Plant Sci. 28(2):2018. 204-215
2. Кляченко О.Л., Коломієць Ю.В., Субін О.В. Біотехнологія рослин. Навчальний посібник. К.: НУБІП України, 2023. – 350 с.
3. Murashige T., F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 5. 473 – 497.

ДОДАТОК 2

Кляченко О.Л., Куценко К.С., Шляхтун І.С., Безпрозвана І.В. (2024). ОТРИМАННЯ БЕЗВІРУСНОГО ПОСАДКОВОГО МАТЕРІАЛУ ГВОЗДИКИ (*DIANTHUS CARIOPHYLLUS* L.) IN VITRO

Анотація. Для отримання безвірусного посадкового матеріалу гвоздики використано метод культури апікальних меристем та прямий і непрямий морфогенез *in vitro*. Розроблена схема отримання асептичного матеріалу, яка полягає в поетапній обробці експлантатів: Thimerosal – 2 хв, 70% етиловий спирт – 0,5 хв і 0,08% AgNO₃ - 1 хв, що знижує рівень контамінації грибною інфекцією. Наведено результати досліджень калюсогенезу та прямого і непрямого морфогенезу в культурі *in vitro* експлантатів гвоздики голандської, їх залежність від вмісту регуляторів росту в живильному середовищі. Встановлено, що межах сортів гвоздики майже не спостерігалися значні відмінності у протіканні процесів калюсогенезу. При цьому частота калюсогенезу становила 100%. За умов отримання непрямого морфогенезу необхідно враховувати вік калюсних тканин. Ріст та інтенсивне пагоноутворення гвоздики відмічали на живильному середовищі Мурасіге-Скуга, доповненому БАП у концентрації 0,5 мг/л. Найкращим для укорінення виявилось середовище МС з половинною концентрацією макро- і мікросолей з додаванням 0,5 мг/л НОК, яке рекомендоване нами для укорінення рослин-регенерантів гвоздики різних сортів. Як субстрат для адаптації рослин-регенерантів використовували торф : перліт у співвідношенні 1:1. Приживаність рослин гвоздики до умов *in vivo* для сорту «Raffino Linde» становила 90%, тоді як для сорту «Тіуа» - 83% відповідно.

Ключові слова: гвоздика, калюсогенез, морфогенез, пагоноутворення, різогенез.