

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології**

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**  
**Завідувач кафедри**  
**екобіотехнології та біорізноманіття**  
**Кваско О.Ю.**  
“ \_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2025 р.

**БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
**на тему: Культура *in vitro* рідкісних лікарських рослин *Potentilla L.***

**Спеціальність** 162 Біотехнології та біоінженерія  
(код і назва)

**Гарант освітньої програми**  
к.б.н., доцент

\_\_\_\_\_ **Кваско О.Ю.**

**Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи**  
д.с.-г.н., професор

\_\_\_\_\_ **Коломієць Ю.В.**

**Виконав**

\_\_\_\_\_ **Одінцов О.О.**

**КИЇВ-2025**

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ  
Завідувач кафедри  
екобіотехнології та біорізноманіття  
Кваско О.Ю.  
“ \_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2025 р.

З А В Д А Н Н Я

на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студенту  
Одінцову Олексію Олександровичу  
(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія  
(код і назва)

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи Культура *in vitro* рідкісних лікарських рослин  
*Potentilla L.*

затверджена наказом ректора НУБіП України від “22” жовтня 2024 р. №1880 «С»  
Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 травня 2025 р.  
(рік, місяць, число)

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи саджанці *Potentilla L.*,  
стерилізуючі речовини, живильні середовища, регулятори росту

Перелік питань, які потрібно розробити:

1. Ефективність стерилізації експлантатів *Potentilla L.*
2. Ініціація пагонів *Potentilla L. in vitro*
3. Вплив регуляторів росту на видовження пагонів
4. Укорінення та адаптація рослин-регенерантів *Potentilla L.*

Перелік графічних документів фото, таблиці

Дата видачі завдання “01” вересня 2024 р.

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи \_\_\_\_\_ Коломієць Ю.В.  
(підпис) (прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання \_\_\_\_\_ Одінцов О.О.  
(підпис) (прізвище та ініціали студента)

## РЕФЕРАТ

Бакалаврська кваліфікаційна робота виконана на 46 сторінках, містить 9 таблиць, 4 рисунки, 37 джерел використаної літератури.

Метою роботи було мікроклональне розмноження рідкісних лікарських рослин *Potentilla L.*

Для рідкісних лікарських рослин *Potentilla L.* було оптимізовано основні етапи мікроклонального розмноження. Встановлено, що стерилізація у 7% розчині гіпохлориту натрію NaClO протягом 10 хвилин мала найвищий рівень виживання (65,1%) завдяки нижчому рівню смертності та нижчому рівню контамінації. Показано, що оптимальним середовищем для індукції пазушних бруньок у сегментах стебла *Potentilla L.* було модифіковане середовище МС, доповнене 0,5 мг/л БАП. Розраховано, що максимальну довжину пагонів спостерігали (1,72 см) у всіх варіантах за концентрації БАП 0,4 мг/л, і концентрації ІОК 0,5 мг/л. Визначено, що за концентрації 0,5 мг/л ІМК частота укорінення досягала найвищого рівня 85,2%, середня кількість коренів становила 5,2, а середня довжина коренів була 3,2 см.

## ЗМІСТ

Вступ .....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	7
1.1. Культура клітин і тканини <i>in vitro</i> .....	7
1.2. Основні вимоги до культури рослинних тканин .....	10
1.3. Етапи культури рослинних тканини .....	11
1.4. Регулятори росту рослин .....	17
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ .....	25
2.1. Об'єкт дослідження .....	25
2.2. Підготовка експлантатів .....	27
2.3. Приготування живильних середовищ .....	28
2.4. Індукція органогенезу та ріст пагонів <i>Potentilla L.</i> в культурі <i>in vitro</i> .....	30
2.5. Індукція коренів та адаптація <i>ex vitro</i> .....	32
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	33
3.1. Ефективність стерилізації експлантатів <i>Potentilla L.</i> .....	33
3.2. Ініціація пагонів <i>Potentilla L. in vitro</i> .....	35
3.3. Вплив регуляторів росту на видовження пагонів .....	38
3.4. Укорінення та адаптація рослин-регенерантів <i>Potentilla L.</i> .....	39
Висновки .....	41
Список використаних джерел .....	42

## ВСТУП

Культура рослинних тканин стосується культивування *in vitro* протопластів або ембріонів, рослинних клітин, тканин, органів, насіння, на поживному середовищі в асептичних умовах, де вологість, світло, температура, фотоперіод, та компоненти середовища забезпечують ідеальне, контрольоване середовище для вирощування [1]. Для створення генетичної варіативності у рослин необхідно використовувати кілька методів культивування тканин. Ці процедури *in vitro* були успішно застосовані на багатьох видах і використовувалися для створення рослин, стійких до хвороб і комах, толерантних до водного стресу, які демонструють посилений ріст, покращену врожайність та багато іншого. Традиційна селекція рослин удосконалюється такими методами, як ембріональні культури, для порятунку стійких гібридів. Такі технології, як соматональна варіація та злиття протопластів, використовуються для використання існуючого генетичного різноманіття або для створення нової генетичної варіативності. Після розробки нових рослин мікророзмноження може бути використано для ефективного клонального розмноження великої кількості рослин для комерційного ринку. Генна інженерія була б неможливою без залучення процедур регенерації рослинних тканинних культур *in vitro* [2].

Мікророзмноження – це вегетативне розмноження, що проводиться в контрольованих та асептичних умовах на живильному середовищі, що відповідає всім вимогам росту рослини в природних умовах. Розроблено різні підходи мікророзмноження, які можуть сприяти масовому виробництву рослин та покращенню виду. Сьогодні методи мікророзмноження застосовуються для отримання великої кількості нових високоякісних рослин за відносно короткий час, з низькими витратами, а також для їх збереження.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Культура клітин і тканини *in vitro*

Культивування рослинних тканин – це інноваційний біотехнологічний підхід, розроблений для задоволення зростаючого світового попиту на сільськогосподарську продукцію з підвищеною харчовою цінністю. Цей асептичний метод *in vitro* дозволяє культивувати рослинні клітини, тканини або цілі рослини в контрольованих умовах навколишнього середовища та харчування, сприяючи отриманню генетично ідентичних клонів. Цей метод є незамінним для збереження видів рослин, що знаходяться під загрозою зникнення, підвищення врожайності та якості сільськогосподарських культур, а також забезпечення цілорічного виробництва рослин, вільних від хвороб. Центральним фактором у культивуванні рослинних тканин є склад середовища для росту, яке повинно містити точний баланс макроелементів, мікроелементів, амінокислот, вітамінів та регуляторів росту рослин, таких як ауксини, цитокініни, гібереліни та абсцизова кислота. Нещодавні досягнення дозволили вдосконалити рецептури середовищ для кращого задоволення потреб різних видів рослин [3].

Культивування рослинних тканин і клітин передбачає асептичне культивування та розмноження рослинних клітин, тканин і органів у ретельно контрольованих лабораторних умовах. Цей інноваційний метод використовує потенціал багатих на поживні речовини середовищ для ефективного розмноження рослинних клітин у великих масштабах, що призводить до швидкого виробництва зрілих і вільних від хвороб рослин. Основою комерційних технологій у цій галузі є мікророзмноження, процес, який забезпечує швидке розмноження з дрібних живців рослин, пазушних бруньок і, обмеженою мірою, із соматичних ембріонів і клітинних скупчень у суспензійних культурах і біореакторах. Мікророзмноження, ключовий аспект культури рослинних тканин і клітин, має величезне значення для створення

високоякісних та стабільних посадкових матеріалів. Ці матеріали знаходять застосування в різних галузях, включаючи молекулярну генетичну інженерію, селекцію рослин, садівниче виробництво та збереження навколишнього середовища. Процес мікророзмноження проходить через кілька окремих етапів, включаючи розмноження, субкультивування експлантів для розмноження, пагони та вкорінення, а також загартування. Ці етапи разом утворюють універсальну основу для масштабного розмноження рослин. Цей метод відіграє вирішальну роль у подоланні обмежень традиційних методів розмноження рослин. Забезпечуючи контрольований та прискорений ріст у лабораторних умовах, культури рослинних тканин і клітин сприяють ефективному виробництву стійких до хвороб та генетично однорідних рослинних матеріалів. Це не лише підтримує прогрес у різних наукових дисциплінах, але й задовольняє практичні потреби сільського господарства, садівництва та охорони навколишнього середовища. Постійне вдосконалення та застосування методів культур рослинних тканин і клітин підкреслює їхню важливість у задоволенні зростаючого попиту на стійкі та високоякісні рослинні матеріали в різних секторах [4].

Мікророзмноження рослин є одним із прикладних біотехнологічних інструментів, що використовуються в садівництві, лісівництві, селекції рослин, охороні природи та вирощуванні безвірусних рослин. Його корисність може бути розширена до клонування *in vitro* на основі культури, виробництва біоактивних сполук, вторинних метаболітів та сконструйованих молекул, таких як вакцини та численні фармацевтичні препарати

Метод мікророзмноження *in vitro* має багато переваг; найважливіша з них полягає у виробництві рослин, що відповідають типу, які є генетично та фізіологічно однорідними. Протокол розмноження *in vitro* включає певні етапи, яких слід дотримуватися: (1) етап попереднього укорінення, (2) етап укорінення, (3) етап розмноження, (4) етап вкорінення та (5) етап акліматизації. Мікророзмноження рослин для різних застосувань має різні

труднощі та зазвичай вирішується за допомогою різних підходів, зокрема шляхом відповідного відбору рослин донорів та їх належної дезінфекції, оптимізації поживних середовищ, а також використання різних типів джерел азоту та вуглецю, регуляторів росту, макроелементів, мікроелементів та середовищ для культивування [5].

Загалом, вплив часу субкультивування на швидкість розмноження пагонів культур *in vitro* варіюється від одного виду до іншого. Як принцип, рослинні клітини, тканини, органи та будь-які інші частини рослини культивуються *in vitro* на штучних поживних середовищах в асептичному та контрольованому середовищі. Загальновідомо, що вихідні рослинні матеріали з поля природним чином забруднені на своїй поверхні (а іноді й всередині) мікроорганізмами, тому поверхнева стерилізація вихідних матеріалів (експлантатів) у хімічних розчинах (зазвичай спирті або відбілювачі) є дуже важливою. Після цього експлантати зазвичай поміщають на поверхню твердого живильного середовища, але іноді поміщають безпосередньо в рідке середовище, особливо коли потрібні суспензійні культури клітин. Культура рослинних тканин залежить головним чином від концепції тотипотенційності рослинних клітин, яка стосується здатності однієї рослинної клітини експресувати повний геном шляхом поділу клітин та/або росту та розвиватися в повністю диференційовану рослину. Окрім тотипотентного потенціалу рослинної клітини, здатність клітин змінювати свій метаболізм, ріст і розвиток також є не менш важливою для регенерації всієї рослини. Живильне середовище містить усі необхідні поживні речовини, необхідні для нормального росту та розвитку рослин. Воно в основному складається з макро- та мікроелементів, вітамінів, амінокислот, регуляторів росту рослин, джерела вуглецю та деяких гелеутворюючих агентів у випадку твердого живильного середовища. рН середовища також дуже важливий, оскільки він впливає як на ріст рослин, так і на активність регуляторів росту рослин, тому його необхідно регулювати до критичного

значення. Склад живильного середовища, особливо регулятори росту рослин та джерело азоту, мають глибокий вплив на реакцію початкового експлантату. Загалом існує ряд методів культивування тканин, і їх можна використовувати для різних цілей. Зовсім недавно культурі тканин рослин надано найвищий пріоритет у селекційній роботі рослин, оскільки вона забезпечує величезний потенціал для програм покращення врожаю, таких як відбір на хвороби/комахи або стрес [6].

## **1.2. Основні вимоги до культури рослинних тканин**

Існує кілька важливих аспектів культивування тканин. Це:

- 1 – Асептичні умови
- 2 – Аерація
- 3 – Обладнання
- 4 – Живильне середовище.

Культивування тканин – це метод культивування рослинних або тваринних клітин, тканин або органів «*in vitro*» на живильному середовищі в асептичних умовах, зазвичай у скляному контейнері. Культивування тканин іноді називають «стерильною культурою» або культурою «*in vitro*» [7].

### **1. Асептичні умови:**

Культивування тканин слід проводити в повністю асептичних умовах. Сухе тепло використовується для стерилізації обладнання в інкубаторі. Стерилізація вологим теплом проводиться в автоклаві при температурі 120°C під тиском 15 фунтів протягом 15 хвилин. Рідкі середовища, які нестабільні при високій температурі, стерилізуються ультрафільтрацією. Хімічні речовини, такі як спирт, використовуються для стерилізації робочої зони та інструментів. Тканина, що культивується, поверхнево стерилізується хімічно. Деякі з поширених стерилізуючих агентів:

(I) 9-10% гіпохлорит кальцію, (I) 2% розчин гіпохлориту натрію, (III) 10-12% перекис водню, (IV) 1-2% бромна вода. Деякі інші стерилізуючі агенти: 1% хлорна вода, хлорид ртуті, нітрат срібла, антибіотики тощо [8].

## 2. Аерація:

Правильна аерація тканини в культуральному середовищі є важливою. Тканини, які культивуються на напівтвердому середовищі, не потребують спеціального методу аерації. Але ті тканини, які культивуються в рідкому середовищі, потребують спеціального пристрою для аерації [9].

3. Обладнання: Скляний посуд, що використовується для культивування тканин, повинен бути з боросилікатного скла (Pyrex glass), оскільки натрієве скло може перешкоджати росту тканини [10].

## 4. Поживні середовища:

Середовище для культивування рослинних тканин містить усі поживні речовини, необхідні для нормального росту та розвитку рослин. Воно в основному складається з макроелементів, мікроелементів, вітамінів, інших органічних компонентів, регуляторів росту рослин, джерела вуглецю та деяких гелеутворюючих агентів у випадку твердого середовища (Murashige and Skoog, 1962). Середовище Мурашіге та Скуга (середовище MS) найчастіше використовується для вегетативного розмноження багатьох видів рослин *in vitro*. рН середовища також важливий, оскільки впливає як на ріст рослин, так і на активність регуляторів росту рослин. Його регулюють до значення від 5,4 до 5,8. Для культивування можна використовувати як тверде, так і рідке середовище. Склад середовища, зокрема рослинні гормони та джерело азоту, має значний вплив на реакцію початкового експлантату [11].

### 1.3. Етапи культури рослинних тканини

#### 1. Підготовка поживного середовища:

Ріст, розвиток та морфогенетична реакція експлантату в культурі залежить від його генетичного складу, навколишнього середовища та складу живильного середовища. Успіх експерименту з культивування рослинних тканин значною мірою залежить від вибору правильного живильного середовища. Живильне середовище – це повна суміш поживних речовин та регуляторів росту. Підказкою для розробки базового живильного середовища, здається, спочатку були потреби рослин, що ростуть у ґрунті, в поживних речовинах, а пізніше – поживні розчини, що використовуються для культивування цілих рослин. Потреби в поживних речовинах для оптимального росту тканини *in vitro* можуть відрізнятися залежно від виду. Навіть тканини з різних частин рослини можуть мати різні вимоги для задовільного росту (Murashige and Skoog, 1962) [4]. Таким чином, жодне окреме середовище не можна вважати повністю задовільним для всіх типів рослинних тканин та органів. Починаючи з нової системи, важливо розробити середовище, яке відповідатиме специфічним вимогам цієї тканини. Протягом останніх 25 років необхідність культивування різноманітних тканин та органів призвела до розробки кількох рецептів. Деякі з найперших середовищ для культивування рослинних тканин, наприклад, середовище для культивування коренів Уайта (1943) та середовище для культивування калюсу Готре (1939), були розроблені на основі поживних розчинів, які раніше використовувалися для культивування цілих рослин. Уайт розробив це середовище на основі середовища Успенського та Успенської (1925) для водоростей, а середовище Готре базується на сольовому розчині Кнопа (1865). Усі наступні рецептури середовищ базуються на середовищах Уайта та Готре [12].

Одним з найважливіших факторів, що регулюють ріст і морфогенез рослинних тканин у культурі, є склад живильного середовища. Основні потреби культивованих рослинних клітин у поживних речовинах дуже схожі на потреби цілих рослин. Основні потреби мінеральних елементів,

необхідних для росту рослинних тканин, задовольняються шляхом забезпечення їх звичайних солей у середовищі. Коли мінеральні солі розчиняються у воді, вони зазнають дисоціації та іонізації. Активним фактором у середовищі є іони різних типів, а не сполуки. Один тип іонів може бути внесений кількома сіллю в середовищі. Тому змістовне порівняння між двома середовищами можна провести на основі загальної концентрації різних типів іонів у них. Живильники для рослинних тканин забезпечують не тільки ці неорганічні поживні речовини, але й зазвичай вуглевод (найпоширеніша сахароза) для заміни вуглецю, який рослина зазвичай фіксує з атмосфери шляхом фотосинтезу. Для покращення росту багато середовищ також містять слідові кількості певних органічних сполук, зокрема вітамінів, та регуляторів росту рослин [13].

Середовища для культивування рослинних тканин зазвичай виготовляються з розчинів таких компонентів:

- ♣ Макроелементи
- ♣ Мікроелементи
- ♣ Вітаміни
- ♣ Амінокислоти або інші азотні добавки
- ♣ Вуглеводи або цукри
- ♣ Агар-агар
- ♣ Регулятори росту (рослинні гормони)

Таблиця 1.1

Вплив елементів на ріст, поділ і регенерацію рослин

Хімічний елемент	Форми доступності	Роль
Калій	$K^+$	Необхідний для нормального поділу клітин, синтезу білків і хлорофілу

Магній	$Mg^{2+}$	Компонент молекули хлорофілу
Кальцій	$Ca^{2+}$	Компонент клітинної стінки; бере участь у регуляції гормональних реакцій і може відігравати превентивну роль у морфогенезі; дефіцит може спричинити некроз кінчиків пагонів
Азот	$NO_3^-$ $NH_4^+$ Органічний азот (вітаміни/амінокислоти)	Важливий компонент амінокислот, вітамінів, нуклеїнових кислот та білків; опосередковано впливає на ріст через вплив на рН середовища; $NH_4^+$ необхідний для соматичного ембріогенезу в клітинних та калюсних культурах
Фосфор	$PO_4^{3-}$	Життєво важливий для поділу клітин; зберігання та передачі енергії (частина АМФ, АДФ та АТФ)

Сірка	$\text{SO}_4^{2-}$	Присутній у деяких амінокислотах (цистеїні, цистині та метіоніні) та білках
-------	--------------------	---

Напівтверде середовище готують у подвійно дистильованій воді, що містить макроелементи, мікроелементи, амінокислоти, вітаміни, джерело заліза, джерело вуглецю, таке як сахароза, та фітогормони. Середовище нагрівають для розчинення агару, і від 25 до 50 мл розливають у кожен пляшку з широким горлом. Потім посудини, що містять поживне середовище, герметизують та стерилізують автоклавуванням [14].

#### 2. Створення асептичної культури:

Вихідним матеріалом для процесу зазвичай є активно зростаюча верхівка пагону допоміжної або кінцевої бруньки або верхівка пагону рослини. Процес культивування тканин починається з відбору материнських рослин, що мають бажані характеристики. Експлантацію бажано виділяти, зокрема, меристематичну тканину вибраної материнської рослини. Вирізану тканину/експлант промивають водою, а потім дезінфікуючим засобом, таким як розчин савлону або деттолу, після чого промивають стерильною водою. Потім тканину занурюють у 10% розчин відбілювача на десять хвилин для дезінфекції рослинного тканинного матеріалу, знищуючи більшість грибкових та бактеріальних організмів. Процес стерилізації експлантатів залежить від виду рослини та типів експлантатів [15].

#### 3. Власне мікророзмноження:

Розмноження проводять в асептичних умовах. У цьому процесі експлантати або мікропаростки переносять на стерилізоване поживне середовище [16].

#### 4. Розвиток рослин у кімнаті для вирощування:

Після посадки рослинної тканини пляшки герметично закривають та переносять у кімнату для вирощування, щоб запустити процес розвитку під розсіяним світлом (флуоресцентне світло 1000-2000 люкс) при температурі  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  та відносній вологості від 50 до 60%. Вимоги до світла та температури різняться залежно від виду, а іноді й на різних стадіях розвитку. За культурами щодня спостерігають на предмет росту та будь-яких ознак інфекції/зараження. Культури, які не показують хорошого росту або інфіковані, викидають. Здорові культури перетворюються на маленькі бруньки пагонів. Їх пересівають на свіже середовище через 4 тижні. Кількість необхідних пересівань залежить від виду рослини та є стандартизованою. Пагони зазвичай розвиваються через 4 тижні. Після того, як у кожному контейнері розвинуться достатні пагони (від 10 до 15), мінімальна висота яких становить 2 см, їх пересаджують в інше середовище для початку процесу вкорінення. Склад середовища для вкорінення є специфічним для кожного виду рослин. Коріння зазвичай формується протягом 2-4 тижнів. Рослини на цій стадії ніжні та потребують обережного поводження [17].

#### 5. Адаптація мікророслин:

Через дуже високу вологість усередині посудини для культивування та штучні умови розвитку, рослини ніжні та тому не готові до польових умов. Рослини, вийняті зі стерильного середовища, промивають та утримують під періодичним туманом або накривають чистим прозорим пластиком. Після 10-15 днів при високій вологості рослини переносять у теплицю та утримують ще 4-6 тижнів. Після цього їх можна переносити в теплицю або поле. Зазвичай рослини тканинної культури продаються або як рослини з агару, або як загартовані рослини з теплиці [18].

1: Рослини з агару: Залежно від таких параметрів, як місце посадки, якість ґрунту та кліматичні умови, визначені замовником, рослини з агару, що продаються, можуть бути рослинами з вкоріненням *in vitro* або лише пагонами. Коли рослини тканинної культури продаються на цьому етапі, їх

промивають у стерилізованій воді для видалення агарового середовища. Помиті рослини сортують на 2-3 сорти та упаковують у гофровані пластикові коробки, вистелені стерилізованим папером, відповідно до специфікацій Управління з карантину рослин уряду Індії для експорту. Кількість рослин у коробці залежить від вимог замовника. Залежно від кінцевого пункту призначення та уподобань замовника, рослини обробляють спеціальними фунгіцидами та антибіотиками, щоб уникнути інфекції. Рослини з агарового ґрунту є кращими для експорту або для тих напрямків, де є обладнання для загартування. Рослини після виймання з поживного середовища бажано пересадити протягом 72 годин [19].

2: Загартовані рослини: Рослини пересаджують у сітчасті горщики/протоки для акліматизації після того, як вони повністю розвинуть пагони та коріння у пляшках. Вкорінені рослини пересаджують у горщики, наповнені відповідним субстратом, та поливають. Ця операція проводиться на відкритому столі. Потім ці горщики переносять у теплицю на 4-6 тижнів. Під час цього процесу їх удобрюють та обробляють так само, як і рослини, отримані будь-яким іншим способом розмноження. Після повної акліматизації рослини пересаджують у поліетиленові пакети. На цьому етапі рослини повністю загартовані та готові до висаджування в поле для культивування. Установки для загартування можна встановити на ділянках, віддалених від установок для мікророзмноження [20].

#### **1.4. Регулятори росту рослин**

Регулятори росту рослин (РРР) – це хімічні речовини, що використовуються в середовищі для культивування тканин рослин для виконання їхньої специфічної функції. Ці РРР відіграють важливу роль в органогенезі. У природі існують різні типи РРР, які мають специфічну функцію, а також синтетичні РРР, які додаються до штучного середовища для культивування тканин рослин для органогенезу. Ауксини, цитокініни,

гібереліни, абсцизова кислота та етилен – основні класи РРР. Співвідношення ауксину до цитокінінів, включених у середовище, визначає специфічну реакцію щодо органогенезу, яка є унікальною для конкретного [21]. Детальна інформація про РРР та їхню роль у фізіології рослин наведена в таблиці 3.

Таблиця

Регулятори росту рослин та їхня роль у середовищі для культивування тканин

Група	Ауксини
Хімічна назва	Індоліл-3-оцтова кислота
Скорочення	ІОК
Розчинність	NaOH
Роль у фізіології рослин	Поділ та видовження клітин (Dusa et al., 2014)
Група	Ауксини
Хімічна назва	2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота
Скорочення	2,4-Д
Розчинність	NaOH
Роль у фізіології рослин	Соматичний ембріогенез та поділ клітин (Raghavan, 2004)
Група	Ауксини
Хімічна назва	Індоліл-3-масляна кислота
Скорочення	ІМК
Розчинність	NaOH
Роль у фізіології рослин	Індукція коренів (Ludwig-Müller, 2000)
Група	Ауксини
Хімічна назва	$\alpha$ -нафтилоцтова кислота
Скорочення	НОК

Розчинність	NaOH
Роль у фізіології рослин	Подовження клітин, розвиток кореневої системи (Campanoni and Nick, 2005)
Група	Ауксини
Хімічна назва	2,4,5-Трихлорфеноксіоцтова кислота
Скорочення	2,4,5-Т
Розчинність	етанол
Роль у фізіології рослин	Соматичний ембріогенез (Estabrooks et al., 2007)
Група	Ауксини
Хімічна назва	4-аміно-3,5,6-трихлорпіколінова кислота
Скорочення	Піклорам
Розчинність	Ацетон
Роль у фізіології рослин	Регенерація рослин з калюсів (Colins et al., 1978)
Група	Ауксини
Хімічна назва	1-нафталінооцтова кислота
Скорочення	НАК
Розчинність	NaOH
Роль у фізіології рослин	Зав'язування та дозрівання плодів (Karapanos et al., 2013)
Група	Ауксини
Хімічна назва	3,6-Дихлор-о-анісова кислота
Скорочення	Дикамба
Розчинність	Етанол
Роль у фізіології рослин	Регенерація пагонів з калюсу пшениці (Bahieldin et al., 2000)
Група	Цитокініни

Хімічна назва	6-(Фурфуриламіно)-пурин
Скорочення	(КІН) Кінетин
Розчинність	NaOH
Роль у фізіології рослин	Поділ клітин (Miller et al., 1956)
Група	Цитокініни
Хімічна назва	2-(ізопентиніл)-аденін
Скорочення	2-іР
Розчинність	NaOH
Роль у фізіології рослин	Проліферація пагонів у поєднанні з іншими регуляторами росту (Канна та Джаябала, 2010)
Група	Цитокініни
Хімічна назва	6-(бензиламіно)-пурин
Скорочення	БАП
Розчинність	NaOH
Роль у фізіології рослин	Розмноження пагонів (Jafari et al., 2011)
Група	Цитокініни
Хімічна назва	1-Феніл-3-(1,2,3-тіадіазол-5-іл)-сечовина
Скорочення	TDZ (Тіадіазурон)
Розчинність	ДМСО Диметілсульфоксид
Роль у фізіології рослин	Утворення калюсу та додаткових пагонів (Ernst, 1994)
Група	Цитокініни
Хімічна назва	6-(4-Гідрокси-3-метилбут-2-еніламіно)-пурин
Скорочення	ЗЕА (Зеатин)
Розчинність	NaOH
Роль у фізіології рослин	Покращений ріст рослин у поєднанні з ауксинами

рослин	(Erland et al., 2017)
Група	Гібереліни
Хімічна назва	Гіберелінова кислота
Скорочення	ГКЗ
Розчинність	Вода
Роль у фізіології рослин	Цвітіння <i>in vitro</i> (Chaari-Rkhis et al., 2006)
Група	Абсцизини
Хімічна назва	Абсцизова кислота
Скорочення	АБК
Розчинність	NaOH
Роль у фізіології рослин	Соматичний ембріогенез (Rai et al., 2011)
Група	Етилен
Хімічна назва	Етилен
Скорочення	–
Розчинність	газоподібна форма
Роль у фізіології рослин	Морфогенез (Biddington, 1992) та старіння листя (Li and Guo, 2018).

### Ауксини

Хімічно ауксини є ненасиченими ароматичними кільцями з карбоксильними бічними ланцюгами [22]. Індоліл-3-оцтова кислота (ІОК) – перший природний ауксин, виявлений у рослин з кінчиків колеоптилів вівса. Ауксини мають різноманітну фізіологічну активність, таку як подовження клітин, диференціація, соматичний ембріогенез, утворення коренів, пагонів та апікальне домінування. Багато синтетичних ауксинів є заміниками ІОК та додаються до штучного середовища для культивування рослинних тканин. 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д), індоліл-3-масляна кислота (ІМК),

нафталіноцтова кислота (НОК), 2,4,5-трихлорфеноксоцтова кислота (2,4,5-Т), 4-аміно-3,5,6-трихлорпіколінова кислота (пiклорам), 3,6-дихлор-о-анісова кислота (дикамба) та нафтоксиоцтова кислота – це деякі із синтетичних ауксинів, що використовуються в середовищі для культури рослинних тканин [23].

#### Цитокиніни

Цитокиніни – це регулятори росту рослин, які беруть участь у поділі клітин та органогенезі. Вони являють собою молекули аденіну з пуриновим кільцем, приєднаним за допомогою N6-замісника [24]. Зеатин – це перший природний цитокинін, виділений із незрілих зерен *Zea mays* L. Науково це (E)-2-метил-4-(7H-пурин-6-іламіно)бут-2-ен-1-ол. Кінетин – це ще один цитокинін, виділений з тваринного джерела, тобто автоклавованої сперми оселедця. Цитокиніни мають різноманітні фізіологічні функції. Цитокиніни в поєднанні з ауксинами відіграють важливу роль у поділі та диференціації клітин [25]. 2-іP, бензиладенін (BA) та тiдіазурон (TDZ) – це деякі інші цитокиніни, що використовуються в середовищах для культури рослинних тканин. Поряд із цими найчастіше використовуваними цитокинінами, тополіни були включені в культуральне середовище та демонструють різноманітну фізіологічну активність, подібну до активності цитокинінів. Іноді тополіни мають коригувальні ролі та можуть використовуватися разом із класичними цитокинінами. Використання тополінів в оптимізованому середовищі разом зі звичайними цитокинінами може підвищити ефективність методу культивування рослинних тканин [26].

#### Гібереліни (ГК)

Гібереліни були виділені з гриба *Gibberella fujikuroi* як вторинний метаболіт. Це клас регуляторів росту рослин, які відіграють певну роль у рості та розвитку рослин [27]. Хімічно ці гібереліни є дитерпеноїдами; було виявлено близько 136 гіберелінів, з яких дуже мало є біологічно активними. Гібереліни, такі як GA1, GA3, GA4 та GA7, є одними з біоактивних типів, що

використовуються в дослідженнях [28]. GA3 є найбільш використовуваним гібереліном, тобто гібереліновою кислотою в середовищі для культивування тканин. Гібереліни відіграють важливу роль у цвітінні, подовженні стебла, проростанні насіння та зав'язуванні плодів. У культурі тканин GA3 допомагає в рості клітин. Гібереліни мають основне гіберелінове кільце. Існує два типи гіберелінів: тип C20 та тип C19; останні є більш активними фізіологічно [29].

#### Абсцизова кислота

Абсцизову кислоту (АБК) також називають гормоном стресу, і вона бере участь в опаданні плодів та настанні періоду спокою деревних рослин. Хімічно АБК є сесквітерпеноїдом, а біосинтетично вона виробляється з ІПП (ізопентенілдіфосфату) [30]. У культурі тканин абсцизова кислота використовується переважно через її роль у соматичному ембріогенезі, і також повідомляється, що АБК підвищує якість соматичних ембріонів [31]. Крім того, АБК бере участь у пригніченні відкриття продихів, тобто діє антипрозорим чином і допомагає у живородіння [32]. АБК відома своєю роллю в допомозі рослинам переносити стресові умови, тобто тепловий стрес [33]. Використання АБК у середовищі для культивування тканин рослин допомагає подолати запрограмовану клітинну смерть [34].

#### Етилен

Етилен – це газоподібний гормон, який відіграє важливу роль у дозріванні плодів. Він біосинтетично виробляється з метіоніну [35]. Етефон використовується як хімічна речовина, що вивільняє етилен, у культурах рослинних тканин [35]. Важко визначити одну конкретну роль, яку етилен відіграє у фізіології рослини, але його роль спостерігається в комбінаціях з багатьма іншими регуляторами росту рослин (РР). Етилен, коли він виробляється ендогенно або екзогенно вводиться певним видам у певний час, відіграє певну роль у різних фізіологічних процесах, таких як утворення пагонів та коренів, проліферація калюсу та соматичний ембріогенез [36]. Згідно з повідомленнями, 1-аміноциклопропан-1-карбонова кислота може

використовуватися в культурі тканин, оскільки вона є молекулою-попередником для біосинтезу етилену [36].

Поряд із вищезгаданими рослинними гормонами, деякі інші хімічні речовини використовуються як регулятори росту рослин. 2,3,5-Трийодбензойна кислота (ТІВА), будучи включеною до середовища для культивування рослинних тканин, допомагає в калюсогенезі та пригнічує ріст пагонів у томатах [37]. Хімічно ТІВА є інгібітором виведення ауксину. Таким чином, виходячи з наших потреб, ми можемо додавати ці сполуки для отримання бажаних культур клітин або органів. Флороглюцинол (1,3,5-тригідроксибензол) – це ще одна хімічна молекула, яка може бути використана як PGR у середовищі для культивування рослинних тканин. Це продукт розпаду флоризину. Він допомагає в утворенні пагонів та соматичному ембріогенезі, а при додаванні разом з ауксином допомагає в укоріненні [37]. Саліцилати та жасмонати – це інші класи PPP, які широко використовуються в культурі рослинних тканин для виробництва вторинних метаболітів та їх регуляції [36]. Наукові дослідження показують, що додавання брасиностероїдів до середовища для культивування рослинних тканин сприятиме належному росту та розвитку бажаних культур тканин або органів [37].

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Об'єкт дослідження

Перстач (*Potentilla* L.) – рід багаторічних рослин із родини розових (*Rosaceae*). Назва походить від латинського *potentia* – «сила», що відображає лікувальні властивості рослини. Рід включає понад 300, а за деякими джерелами – до 500 видів. Перстач широко поширений у природі, переважно у Північній Америці. На території країн СНД зростає понад 170 видів, в Україні – 41 вид.

Це багаторічна трав'яниста рослина заввишки 10–40 см, з товстим, дерев'янистим, шишкоподібним кореневищем. Стебла прямостоячі або висхідні, розгалужені, з рідким опушенням. Листя зелене з обох боків (знизу трохи світліше): прикореневе — трійчасте, іноді розсічене на 4–5 частин, швидко в'яне й відсутнє під час цвітіння; стеблові листки сидячі, з трьома видовжено-клиновидними, надрізано-пилчастими листочками і великими прилистками.

Квітки правильні, двостатеві, чотирипелюсткові (діагностична ознака), золотисто-жовті, поодинокі, розташовані в пазухах верхніх листків на довгих квітконіжках. Плід – збірний, складається з 8–15 горішкоподібних сім'янок. Період цвітіння – з червня по вересень.

Росте на вологих луках, у лісах, на болотах, переважно в Поліссі, Карпатах, Закарпатті, північній частині лісостепу; рідше – в степовій зоні.

**Лікарською сировиною** є кореневища перстачу, які заготовляють восени або навесні, ретельно миють і сушать на відкритому повітрі або у провітрюваних приміщеннях.

#### **Хімічний склад і активні речовини:**

- **Дубильні речовини** (до 35%) — продукти конденсації катехінів і ціанідинів; проціанідини, (±)-катехін, (+)-галокатехін, (–)-епігалокатехін та їх похідні.

- **Тритерпеноїди та сапоніни** (до 6%) — зокрема торментилова кислота та її ізомери, мають миючі властивості, що сприяють розчиненню гідрофобних сполук.
- **Органічні кислоти:** хінна, елагова.
- **Фенольні сполуки:** пірокатехін, пірогалол, флороглюцин, фенолкарбонові кислоти (гідролізуються до галової, кавової, р-кумарової, 3,4-бензойної кислот).
- **Флавоноїди:** кемпферол.
- **Антоціани:** глюкозид ціанідину.
- **Інші речовини:** ефірна олія, крохмаль, віск, смоли, тригліцериди жирних кислот (пальмітинова, олеїнова, ліноленова тощо).

У складі золи (близько 5%) містяться макро- і мікроелементи: калій, кальцій, магній, залізо, мідь, марганець, цинк, кобальт, хром, алюміній, ванадій, селен, нікель, стронцій, свинець, йод, бор. Рослина здатна накопичувати Mn, Cu, Zn, Se, Co, Ni, Sr, Ba.

В роботі використовували саджанці перстачу білого. Загальна характеристика:

**Особливості:** володіє лікувальними властивостями, широко застосовується в народній медицині.

**Форма росту:** багаторічна декоративна рослина у вигляді чагарника з привабливими квітами та листям

**Розміри:** досягає висоти від 60 см до 1 метра

**Листя:** глибокого темно-зеленого кольору, перисте, надає рослині декоративної густоти

**Квіти:** білосніжні пелюстки з жовтим центром, діаметр квітки до 4 см.

**Цвітіння:** з червня по жовтень.

**Умови вирощування:** найкраще виглядає на сонячних місцях, але добре переносить і легке затінення.

**Догляд:** надзвичайно невибагливий — чудово росте на звичайних садових ґрунтах, витримує як сухі, так і вологі умови.

**Використання:** ідеальний для оформлення квітників, бордюрів і міксбордерів; гармонійно поєднується в пейзажних композиціях із аквілегією, ароматними травами та трояндами.

## 2.2. Підготовка експлантатів

Для роботи брали здорові пагони перстачу білого, поверхневу стерилізацію експлантатів проводили трьома способами:

I варіант – занурення в 70% етиловий спирт (30 с – 1 хв), 5% гіпохлорит натрію NaClO 5-15 хв, 70% етиловий спирт 10 с

II варіант – занурення в 70% етиловий спирт (1 – 2 хв), 7% гіпохлорит натрію NaClO 5-10 хв, 70% етиловий спирт 10 с

III варіант – занурення в 70% етиловий спирт (1 – 1,5 хв), 10% гіпохлорит натрію NaClO 8-15 хв, 70% етиловий спирт 10 с



Рис. 2.1. Зовнішній вигляд

### 2.3. Приготування живильних середовищ

Існує кілька основних етапів приготування середовища для культивування рослинних тканин. Нижче наведено загальний опис процесу:

1. Додайте надчисту воду лабораторного класу до приблизно 80% кінцевого об'єму, який потрібно приготувати, у колбу Ерленмейєра або склянку, що щонайменше вдвічі перевищує об'єм середовища, що готується.

2. Додайте до води мішалку відповідного розміру та поставте колбу або мензурку на мішалку; увімкніть мішалку для помірної перемішування.

3. Помішуючи, повільно додавайте компоненти середовища по одному (за винятком гелеутворюючого агента) та дайте їм розчинитися.

4. Вийміть мішалку з колби/стаканчика (магнітний «витягувач» мішалки найкраще підходить для цього) та перелийте вміст у мірний циліндр відповідного розміру; додайте воду лабораторного класу, щоб досягти кінцевого об'єму.

5. Обережно перелийте вміст назад у колбу/стакан, додайте мішалку та помістіть її на пластину для перемішування біля рН-метра; додайте гелеутворювач (наприклад, агар, геланову камедь, агарозу тощо) та дайте перемішатися, постійно помішуючи.

6. Відкалібруйте рН-метр за допомогою відповідних калібрувальних буферів (зазвичай достатньо рН 4 та 7), потім вставте кінчик зонда в середовище, помішуючи.

7. Додайте відповідний розчин кислоти або основи (зазвичай 0,1-1М соляної кислоти або гідроксиду калію) краплями до середовища для встановлення бажаного рН\*

8. Поставте колбу/стакан на плиту/мішалку та увімкніть сильний вогонь, помірно помішуючи.

9. Уважно спостерігаючи та одягаючи відповідні засоби індивідуального захисту, доведіть розчин до кипіння, а потім негайно вимкніть вогонь, щоб уникнути википання.

10. Під час помішування використовуйте перистальтичний насос або подібний пристрій для рівномірного розподілу середовища в потрібні посудини\*\*, потім закрийте кришками.

11. Помістіть заповнені посудини в контейнери, придатні для автоклавування, та стерилізуйте відповідно до рекомендованого часу для кожного об'єму посудини.

12. Одягнувши належне захисне спорядження, обережно вийміть стерилізоване середовище з автоклава та дайте йому охолонути в чистому середовищі.

Таблиця 2.1

Склад живильного середовища

<b>Макроелементи</b>		
Компоненти	Хімічна формула	Вага (мг/л)
Аміачна селітра	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
Калієва селітра	$\text{KNO}_3$	1900
Безводний хлорид кальцію	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
Безводний сульфат магнію	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
Двоосновний фосфат калію	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
<b>Мікроелементи</b>		
Борна кислота	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
Йодид калію	$\text{KI}$	0,83
Сульфат марганцю	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
Сульфат цинку	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
Молбідат натрію	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
Сульфат міді	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
Хлорид кобальту	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025

<b>Залізо / Хелатна форма</b>		
Тетраацетат етилендіаміну натрію	Na <sub>2</sub> ЕДТА•2Н <sub>2</sub> О	37.3
Сульфат заліза ·7Н <sub>2</sub> О	FeSO <sub>4</sub> •7Н <sub>2</sub> О	27.8
<b>Вітаміни</b>		
Тіамін гідрохлорид		0,1
Нікотинова кислота		0,5
Піридоксин		0,5
Інозитол		100
Гліцин		2
Сахароза		3%

#### **2.4. Індукція органогенезу та ріст пагонів *Potentilla L.* в культурі *in vitro***

Для одержання достатньої кількості рослин-регенерантів *Potentilla L.* в культурі *in vitro*, живці культивували на середовищі Мурасіге-Скуга, доповненому 0-10,0 мг/л БАП окремо або з додаванням НОК (0,1 та 0,5 мг/л) (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Модифіковані середовища МС для індукції пагонів *Potentilla L.*

Варіант	Регулятори росту, мг/л	
	НОК	БАП
1	0	0
2	0	0,1
3	0,1	0,1
4	0,5	0,1
5	0	0,2

6	0,1	0,2
7	0,5	0,2
8	0	0,3
9	0,1	0,3
10	0,5	0,3
11	0	0,4
12	0,1	0,4
13	0,5	0,4
14	0	0,5
15	0,1	0,5
16	0,5	0,5
17	0	1,0
18	0,1	1,0
19	0,5	1,0

Результати реєстрували у відсотках відношення кількості посаджених експлантатів до кількості одержаних рослин-регенерантів на 3 тижень культивування. Одержані рослини-регенеранти культивували на модифікованому середовищі МС, доповненому 0-1,0 мг/л ГКЗ для розмноження та росту пагонів. Дані фіксували через чотири тижні після початку культивування (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Модифіковані середовища МС для культивування пагонів *Potentilla L.*

Варіант	Регулятори росту, мг/л		
	ГКЗ	ІОК	БАП
1	0,1	0,1	0,2
2	0,2	0,2	0,2
3	0,4	0,5	0,2

4	0,1	0,1	0,4
5	0,2	0,2	0,4
6	0,4	0,5	0,4
7	0,1	0,1	0,5
8	0,2	0,2	0,5
9	0,4	0,5	0,5

### 2.5. Індукція коренів та адаптація *ex vitro*

Для індукції коренів *Potentilla L. ex vitro* відбирали рослини-регенеранти довжиною 5–6 см, їх базальну частину поміщали в різні концентрації ІМК (1,5–5,0 мг/л) на 30 хвилин, а потім висаджували у пластикові стаканчики, що містили стерилізований ґрунт. Пластикові стакани з рослинами накривали прозорими поліетиленовими пакетами та витримували в кімнаті для вирощування за температури  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  за 16-годинного фотоперіоду при освітленні холодним флуоресцентним світлом. Рослини щодня поливали 1–2 мл водопровідної води. Поліетиленові пакти знімали через 2 тижні, а пластикові стакани витримували в кімнаті для вирощування ще 2 тижні, а потім переносили в звичайні лабораторні умови (2 тижні). Адаптовані рослини потім пересаджували в польові умови. Дані щодо відсотка вкорінення, кількості та довжини коренів фіксували після 4 тижнів пересадки *ex vitro*.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми Excel (середнє значення  $\pm$  стандартна похибка).

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 3.1. Ефективність стерилізації експлантатів *Potentilla L.*

Було використано декілька варіантів стерилізації експлантатів *Potentilla L.* Нами відмічено високу життєздатність експлантатів за всіх запропонованих методів стерилізації.

Протягом перших 7 діб не спостерігали мікробної інфекції експлантатів, через 10 діб нами було відмічено незначне мікробне інфікування експлантатів, що ймовірно пов'язано із ендofітною інфекцією експлантатів (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Вплив розчину гіпохлориту натрію на стерилізацію експлантатів

Експозиція, хв	Інфіковані експлантати, %	Некротизовані експлантати, %	Життєздатні експлантати, %
70% етиловий спирт (30 с – 1 хв), 5% гіпохлорит натрію NaClO 5-15 хв, 70% етиловий спирт 10 с			
5	80,4±0,3	1,2±0,1	18,4±0,2
8	77,3±0,1	1,4±0,1	21,3±0,1
10	74,4±0,2	2,1±0,2	23,5±0,1
12	70,6±0,2	4,2±0,1	25,2±0,2
15	68,4±0,1	5,3±0,2	26,3±0,2
70% етиловий спирт (1 – 2 хв), 7% гіпохлорит натрію NaClO 5-10 хв, 70% етиловий спирт 10 с			
5	48,2±0,4	0,4±0,1	51,4±0,3
7	46,3±0,4	0,8±0,1	52,9±0,1
8	47,4±0,3	1,6±0,2	51,0±0,3
9	35,3±0,2	1,8±0,2	62,9±0,4
10	32,6±0,2	2,3±0,2	65,1±0,1

70% етиловий спирт (1 – 1,5 хв), 10% гіпохлорит натрію NaClO 8-20 хв, 70% етиловий спирт 10 с			
8	7,6±0,4	18,9±0,4	73,5±0,2
10	7,4±0,2	19,4±0,4	73,2±0,2
15	7,2±0,2	19,6±0,2	73,2±0,4
17	6,2±0,4	21,8±0,2	72,0±0,4
20	5,2±0,2	22,4±0,2	72,4±0,2

Нами було відмічено, що відсоток інфікованих експлантатів, стерилізованих у 10% розчині гіпохлориту натрію NaClO протягом 20 хвилин, був найнижчим (5,2%), стерилізація протягом 17 хвилин (6,2%), а відсоток інфікованих експлантатів, стерилізованих у 10% розчині гіпохлориту натрію NaClO протягом 15 хвилин, суттєво не відрізнявся від ступеня стерилізації протягом 10 хвилин або 8 хвилин. Відсоток інфікованих експлантатів був нищим за стерилізації у 7% розчині гіпохлориту натрію NaClO протягом 5 хвилин або 8 хвилин. Гіпохлорит натрію NaClO має певний токсичний вплив на рослини, і цей ефект, як правило, посилюється зі збільшенням часу обробки. Рівень некротизованих експлантатів досяг найвищого значення (22,4%) за стерилізації 10% розчином гіпохлориту натрію NaClO протягом 20 хвилин, що суттєво відрізнялося від рівня стерилізації протягом 5 хвилин, 8 хвилин та 10 хвилин у 7% розчині гіпохлориту натрію NaClO, але суттєво не відрізнялося від рівня стерилізації протягом 10 хвилин у 5% розчині гіпохлориту натрію NaClO.

Отже, стерилізація у 7% розчині гіпохлориту натрію NaClO протягом 10 хвилин мала найвищий рівень виживання (65,1%) завдяки нижчому рівню смертності та нижчому рівню контамінації.

### 3.2. Ініціація пагонів *Potentilla L. in vitro*

Морфогенетична активність експлантатів *Potentilla L.* на модифікованих живильних середовищах Мурасіге-Скуга, які доповнені БАП і НОК в різних комбінаціях наведені в таблиці 3.2.

На модифікованому середовищі МС без додавання БАП не спостерігали індукцію пагонів. На модифікованому середовищі МС, доповненому різними концентраціями БАП відмічено індукцію пагонів з різною частотою індукції. Частота індукції пагонів та кількість пазушних пагонів на експлантат збільшувалася із збільшенням концентрації БАП до 0,5 мг/л. Одержані дані підтверджують, що БАП відіграє суттєву роль в індукції пагонів. Однак встановлено, що вищі концентрації БАП в середовищі призводять до зменшення кількості утворених пагонів і зниження ростових показників пагонів. Також спостерігали, що середовища з високим вмістом БАП пригнічення домінування апікальних меристем та активації пазушних меристем. В результаті культивування на середовищах протягом 2 тижнів спостерігали утворення зелених листків, збільшення площі листових пластинок та збільшення довжини пагонів.

Таблиця 3.2

Морфогенетична активність експлантатів *Potentilla L.*

Варіант	Регулятори росту, мг/л		Частота індукції пазушних бруньок, %	Середня довжина пазушних бруньок, см
	НОК	БАП		
1	0	0	35,4±0,2	0,4±0,05
2	0	0,1	66,3±0,4	0,5±0,04
3	0,1	0,1	67,2±0,2	0,5±0,04
4	0,5	0,1	67,5±0,2	0,7±0,02
5	0	0,2	71,3±0,1	0,7±0,02
6	0,1	0,2	71,5±0,6	0,6±0,04

7	0,5	0,2	72,1±0,4	0,7±0,02
8	0	0,3	75,6±0,4	0,9±0,02
9	0,1	0,3	76,2±0,2	0,8±0,04
10	0,5	0,3	77,4±0,2	0,8±0,02
11	0	0,4	81,6±0,2	1,1±0,02
12	0,1	0,4	83,2±0,4	1,1±0,04
13	0,5	0,4	85,4±0,1	1,3±0,06
14	0	0,5	91,2±0,2	1,4±0,04
15	0,1	0,5	91,4±0,4	1,6±0,04
16	0,5	0,5	92,3±0,4	1,6±0,06
17	0	1,0	88,7±0,2	1,3±0,04
18	0,1	1,0	88,5±0,1	1,3±0,02
19	0,5	1,0	87,6±0,1	1,2±0,02

Загалом нами було перевірено 19 варіантів живильних середовищ для індукції пазушних бруньок сегментів стебла. Основною метою додавання бензиламінопурину до середовища було стимулювання поділу клітин та диференціації додаткових пагонів від калюсів або органів.

Склад живильного середовища і концентрація БАП мали значний вплив на частоту індукції пазушних бруньок та середню довжину пазушних бруньок, а їхня взаємодія також показала значний вплив на середню довжину пазушних бруньок, але вплив на частоту індукції пазушних бруньок був незначним.

Серед шести модифікованих живильних середовищ без додавання НОК довжина пазушних бруньок завжди була значно коротшою, ніж за двох концентрацій 0,1 і 0,5 мг/л НОК, а довжина пазушних бруньок на середовищі з 0,5 мг/л БАП завжди була довшою, ніж за нижчих концентрацій БАП в середовищі. Частота індукції пазушних бруньок досягала максимального значення за концентрації 0,5 мг/л БАП і становила 92,3%.



Рис. 3.1. Індукція пазушних бруньок сегментів стебла на середовищі МС з додаванням 0,3 мг/л БАП



Рис. 3.2. Індукція пазушних бруньок сегментів стебла на середовищі МС з додаванням 0,4 мг/л БАП



Рис. 3.3. Індукція пазушних бруньок сегментів стебла на середовищі МС з додаванням 0,5 мг/л БАП

Таким чином, оптимальним середовищем для індукції пазушних бруньок у сегментах стебла *Potentilla L.* було модифіковане середовище МС, доповнене 0,5 мг/л БАП.

### 3.3. Вплив регуляторів росту на видовження пагонів

На основі результатів дослідження проліферації пазушних пагонів нами також досліджено вплив різних комбінації концентрацій БАП та різних концентрацій ГКЗ і ІОК на видовження пагонів. Для перенесення на живильне середовище для видовження пагонів використовували пазушні пагони висотою 1 см і модифіковані живильні середовища МС з додаванням БАП (0,2, 0,4 та 0,5 мг/л), ГКЗ (0,1, 0,2 та 0,4 мг/л) та ІОК (0,1, 0,2 та 0,5 мг/л).

Наші одержані результати показали, що БАП, ІОК та ГКЗ в різних концентраціях мали на видовження пазушних пагонів. Серед використаних регуляторів росту ІОК показала найбільший ефект.

Таблиця 3.3

Вплив ГК, ІОК та БАП на видовження пазушних пагонів

Варіант	Регулятори росту, мг/л			Середня довжина пазушних пагонів, см
	ГКЗ	ІОК	БАП	
1	0,1	0,1	0,2	1,5±0,1
2	0,2	0,2	0,2	1,6±0,1
3	0,4	0,5	0,2	1,7±0,2
4	0,1	0,1	0,4	1,4±0,2
5	0,2	0,2	0,4	1,4±0,1
6	0,4	0,5	0,4	1,5±0,1
7	0,1	0,1	0,5	1,3±0,2
8	0,2	0,2	0,5	1,3±0,2
9	0,4	0,5	0,5	1,4±0,1

Незалежно від концентрації БАП, довжина пазушних пагонів за додавання 0,1 мг/л ІОК була завжди значно коротшою, ніж за додавання до середовища 0,5 мг/л ІОК або 0,2 мг/л ІОК. Нами відмічено, що за концентрації 0,1 мг/л ІОК, концентрація БАП не мала значного впливу на довжину пазушних пагонів. Встановлено, що якщо концентрація ІОК була 0,2 мг/л або 0,1 мг/л, довжина пазушних пагонів за додавання 0,5 мг/л БАП була значно довшою, ніж за додавання 0,2 мг/л БАП. Максимальну довжину пагонів спостерігали (1,72 см) у всіх варіантах за концентрації БАП 0,4 мг/л, і концентрації ІОК 0,5 мг/л.

### 3.4. Укорінення та адаптація рослин-регенерантів *Potentilla L.*

Рослини-регенеранти *Potentilla L.* довжиною близько 1,5–2,0 см переносили на модифіковане живильне середовище для вкорінення з різною концентрацією ІМК (0, 0,1, 0,2 та 0,5 мг/л).

Таблиця 3.4

Вплив ІМК на укорінення рослин-регенерантів

ІМК, мг/л	Частота укорінення, %	Середня кількість коренів на експлантат, шт	Середня довжина коренів, см
-	40,3±0,2	3,1±0,2	1,8±0,2
0,1	68,4±0,1	3,8±0,1	2,2±0,1
0,2	70,4±0,2	4,1±0,2	2,7±0,1
0,5	85,2±0,4	5,2±0,2	3,2±0,2

Нами відмічено утворення кореневої системи за використання зазначених концентрацій ІМК, також спостерігали, що концентрація ІМК впливає на частоту укорінення одержаних рослин-регенерантів. Без додавання ІМК в живильне середовища частота індукції кореневої системи

не перевищувала 40%, кількість коренів була мінімальною, самі корені були короткими.



Рис. 3.4. Укорінення рослин-регенерантів *Potentilla* L.

Показано, що за концентрації 0,1-0,2 мг/л частота укорінення рослин-регенерантів становила вище 70%, середня кількість коренів на експлантат складала більше 4 шт, середня довжина корінців становила більше 2 см.

За концентрації 0,5 мг/л ІМК частота укорінення досягала найвищого рівня 85,2%, середня кількість коренів становила 5,2, а середня довжина коренів була 3,2 см.



Рис. 3.5. Укорінення рослин-регенерантів *Potentilla* L. за концентрації 0,5 мг/л ІМК

## ВИСНОВКИ

1. Стерилізація у 7% розчині гіпохлориту натрію NaClO протягом 10 хвилин мала найвищий рівень виживання (65,1%) завдяки нижчому рівню смертності та нижчому рівню контамінації.

2. Оптимальним середовищем для індукції пазушних бруньок у сегментах стебла *Potentilla L.* було модифіковане середовище МС, доповнене 0,5 мг/л БАП.

3. Максимальну довжину пагонів спостерігали (1,72 см) у всіх варіантах за концентрації БАП 0,4 мг/л, і концентрації ІОК 0,5 мг/л.

4. За концентрації 0,5 мг/л ІМК частота укорінення досягала найвищого рівня 85,2%, середня кількість коренів становила 5,2, а середня довжина коренів була 3,2 см.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Tomczyk M, Latté KP. *Potentilla* - a review of its phytochemical and pharmacological profile. *J Ethnopharmacol.* 2009 Mar 18;122(2):184-204.
2. Saad, A.I.M., Elshahed, A.M., 2012. *Plant Tissue Culture Media. Recent Adv. Plant Vitr. Cult.*, 30–40.
3. Safavi, K., 2012. Evaluation of using nanomaterial in tissue culture media and biological activity. *2nd Int. Conf. Ecol. Environ. Biol. Sci.* 5–8.
4. Aremu, A.O., Bairu, M.W., Doležal, K., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2012. Topolins: a panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 108 (1), 1–16.
5. Duca, D., Lorv, J., Patten, C.L., Rose, D., Glick, B.R., 2014. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek. Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 106 (1), 85–125.
6. Raghavan, V., 2004. Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. *Am. J. Bot.* 91 (11), 1743–1756.
7. Ludwig-Müller, J., 2000. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regul.* 32 (2), 219–230.
8. Ma, J.H., Yao, J.L., Cohen, D., Morris, B., 2018. Ethylene inhibitors enhance in vitro root formation from apple shoot cultures. *Plant Cell Rep.* 17 (3), 211–214.
9. Campanoni, P., Nick, P., 2005. Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiol.* 137 (3), 939–948.
10. Estabrooks, T., Browne, R., Dong, Z., 2007. 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid promotes somatic embryogenesis in the rose cultivar “Livin’ Easy” (*Rosa* sp.). *Plant Cell Rep.* 26 (2), 153–160.

11. Colins, G.B., Vian, W.E., Phillips, G.C., 2008. Use of 4-Amino-3,5,6-trichloropicolinic acid as an auxin source in plant tissue cultures. *Crop Sci.* 18 (2), 286–288.
12. Karapanos, I.C., Alexopoulos, A.A., Akoumianakis, K.A., Grigoriou, F., Miliordos, D., Rigakis, K., Skandalou, I., Passam, H.C., 2013. Application of  $\beta$ -naphthoxyacetic acid ( $\beta$ -NOA) improves fruit yield and marketable quality in out-of-season cherry tomatoes (*Solanum lycopersicum* L. vAr. Cerasiforme (dunal) D. M. Spooner, G. J. Anderson and R. K. Jansen) cultivated in unheated greenhouses in Mediterranean basin. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 88 (2), 165–172.
13. Bahieldin, A., Dyer, W.E., Qu, R., 2010. Concentration effects of dicamba on shoot regeneration in wheat. *Plant Breed.* 119 (5), 437–439.
14. Miller, C.O., Skoog, F., Okumura, F.S., Von Saltza, M.H., Strong, F.M., 2016. Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J. Am. Chem. Soc.* 78 (7), 1375–1380.
15. Kanna, S.V., Jayabalan, N., 2010. Influence of N 6-(2-Isopentenyl) Adenine on in vitro shoot proliferation in *Solanum melongena* L. *Int. J. Acad. Res.* 2 (2), 98–100.
16. Jafari, N., Othman, R.Y., Khalid, N., 2011. Effect of benzylaminopurine (BAP) pulsing on in vitro shoot multiplication of *Musa acuminata* (banana) cv. Berangan. *African J. Biotechnol.* 10 (13), 2446–2450.
17. Ernst, R., 2014. Effects of thidiazuron on in vitro propagation of Phalaenopsis and Doritaenopsis (Orchidaceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 39 (3), 273–275.
18. Erland, L.A.E., Shukla, M.R., Glover, W.B., Saxena, P.K., 2017. A simple and efficient method for analysis of plant growth regulators: a new tool in the chest to combat recalcitrance in plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 131 (3), 459–470.

19. Chaari-Rkhis, A., Maalej, M., Ouled Messaoud, S., Drira, N., 2006. In vitro vegetative growth and flowering of olive tree in response to GA<sub>3</sub> treatment. *African J. Biotechnol.* 5 (22), 2097–2302.
20. Rai, M.K., Shekhawat, N.S., Harish, G., A.K., Phulwaria, M., Ram, K., Jaiswal, U., 2011. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 106 (2), 179–190.
21. Biddington, N.L., 2022. The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regul.* 11 (2), 173–187.
22. Li, Z., Guo, H., 2018. Ethylene treatment in studying leaf senescence in *Arabidopsis*. In: *Plant Senescence*. Humana Press, New York, NY, pp. 105–112.
23. Gao, X., Zhang, Y., He, Z., Fu, X., 2017. Gibberellins, Hormone Metabolism and Signaling in Plants. pp. 107–160.
24. Langhansová, L., Konrádová, H., Vaněk, T., 2004. Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryos. *Plant Cell Rep.* 22 (10), 725–730.
25. Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A.D., 2010. Abscisic acid biosynthesis and metabolism. In: *Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. *Plant Hormones*, vol. 678, pp. 137–155.
26. Ding, W., Song, L., Wang, X., Bi, Y., 2010. Effect of abscisic acid on heat stress tolerance in the calli from two ecotypes of *Phragmites communis*. *Biol. Plant.* 54 (4), 607–613.
27. Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M., Lo Schiavo, F., 2013. Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* 216 (3), 413–421.
28. Da Silva, J.A.T., Dobránszki, J., Ross, S., 2013. Phloroglucinol in plant tissue culture. *In Vitro. Cell. Dev. Biol. - Plant* 49 (1), 1–16.
29. Largia, M.J.V., Pothiraj, G., Shilpha, J., Ramesh, M., 2015. Methyl jasmonate and salicylic acid synergism enhances bacoside A content in shoot cultures of *Bacopa monnieri* (L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 122 (1), 9–20.

30. George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J., 2008a. The Components of plant tissue culture media I: macro- and micro- nutrients. *Plant Propag. Tissue Cult.* 1 (3), 65–113.
31. George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J., 2008b. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and ph effects, and support systems. *Plant Propag. Tissue Cult.* 1 (3), 115–173.
32. Akhiriana, E., Samanhudi, Y., A., 2019. Coconut water and IAA effect on the in vitro growth of *Tribulus terrestris* L. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendelianae Brun.* 67 (1), 9–18.
33. Bhojwani, S.S., Dantu, P.K., 2013. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text.* pp. 39–43.
34. Dagla, H.R., 2012. Plant tissue culture: historical developments and applied aspects. *Resonance* 17 (8), 759–767.
35. Georgiev, M.I., Eibl, R., Zhong, J.J., 2013. Hosting the plant cells in vitro: recent trends in bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (9), 3787–3800.
36. Misra, A.N., Misra, M., 2012. Sterilization techniques in plant tissue culture. In: Sharma, H.P., Dogra, J.V.V., Misra, A.N. (Eds.), *Plant Tissue Culture: Totipotency to Transgenic.* Agrobios, India.
37. Rahaman, S.K.S., Adhikari, P., Islam, S., Banerjee, A., Uddin, A.F.M.J., 2018. Effect of NAA for callus induction of *Lisianthus* [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn] on MS and B5 medium. *Adv. Floricult. Urb. Hortic.*, 98–101.