

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

ОЛІЙНИК ОЛЬГА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 631.589:633.811

**ОПТИМІЗАЦІЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ
МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ
(*ROSA DAMASCENA* MILL.)**

03.00.20 «Біотехнологія»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата сільськогосподарських наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано у Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник доктор біологічних наук, професор, академік НААН
Мельничук Максим Дмитрович,
Приватне підприємство «Агрономіка»,
директор з виробництва біопродукції

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Дробик Надія Михайлівна,
Тернопільський національний педагогічний
університет імені Володимира Гнатюка,
декан хіміко-біологічного факультету

доктор біологічних наук
Іванніков Роман Вікторович,
Національний ботанічний сад
імені М. М. Гришка НАН України,
провідний науковий співробітник
відділу тропічних та субтропічних рослин

Захист відбудеться «18» жовтня 2019 року о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.15 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «17» вересня 2019 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Ю. В. Коломієць

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. В Україні троянда ефіроолійна (*Rosa damascena* Mill.) є однією з провідних культур, яку вирощують у промислових масштабах на півдні та в центральній частині України (Єгорова Н. А., Ставцева І. В., Інюткіна А. Г., 2008; Макаревич А. М., 2010). Потреби в сировині значно перевищують пропозиції виробництва, що пов'язано з поширенням хвороб різної етіології, втратою корисних властивостей, погіршенням фізіологічного стану рослин. Для промислового вирощування основним способом розмноження є живцювання, – насінневе – практикують в основному для отримання підщеп і створення нових сортів троянди ефіроолійної. Однак, наявні методи розмноження не дозволяють ефективно оздоровити рослини від хвороб та отримати високоякісний садивний матеріал (Bitis L., Kultur S., Melikoglu G., 2008; Mileva M., Kusovski V., 2014; Mahboubi M., 2016).

Метод клонального мікророзмноження на основі культури ізольованих тканин є найціннішим способом підтримання біорізноманіття колекцій багаторічних рослин (Бугара А. М., Пилунська О. А., 2001; Кушнір Г. П., Сарнацька В. В., 2005; Митрофанова І. В., 2011) (особливо об'єктів, представлених у колекції в єдиному екземплярі або в обмеженій кількості) у зв'язку з тим, що за умов культивування *in vitro* найбільшою мірою забезпечується стабільність генотипів рослин (Ginova A., Kondakova N., 2014; Badzhelova V., 2017; Jovtchev G., Stankov A., Georgieva A., 2018).

Для мікророзмноження рослин троянди метод культури тканин із використанням ізольованих тканин було започатковано у 70–80 рр. минулого століття (Назаренко Л. Г., 1978; Кириченко О. Б., 1990). Проте, до теперішнього часу практично не вивчено питання індукції і проходження етапів органогенезу кожного генотипу рослин. Не визначено кращі підходи щодо відбору ефективних індукторів морфогенезу *in vitro* та не вивчено механізми, які відповідають за оптимальну регенерацію троянди ефіроолійної, вирощування якої має вагомe значення для розвитку багатьох галузей агропромислового комплексу.

У зв'язку з цим, системні дослідження біотехнологічних, фізіологічних та біохімічних основ регуляції морфогенезу перспективних сортів троянди ефіроолійної в культурі ізольованих тканин і органів та створення на цій основі ефективних моделей оптимізації процесу мікророзмноження мають актуальність.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано на базі навчально-наукової лабораторії фітовірусології та біотехнології Національного університету біоресурсів і природокористування України в рамках науково-технічних програм за темою «Вивчити особливості впливу хімічних та фізичних факторів на морфогенез *in vitro* цінних сортів троянди ефіроолійної для розроблення біотехнологічних систем їх розмноження» (номер державної реєстрації 0114U002530, 2014–2017 рр.).

Мета та завдання дослідження. Мета роботи – створення цілісної моделі та розроблення принципів цілеспрямованої оптимізації

біотехнологічного процесу мікроклонального розмноження троянди ефіроолійної (*Rosa damascena* Mill.) з урахуванням особливостей фізіолого-біохімічних параметрів тканин і органів на різних етапах морфогенезу. Відповідно до поставленої мети передбачалося вирішити такі завдання:

- дослідити вплив загального вмісту фенольних сполук на процес ініціації меристем і регенераційну здатність експлантатів у рослинах троянди досліджуваних сортів;
- відібрати вихідний рослинний матеріал та підібрати оптимальні умови отримання асептичної культури;
- вивчити особливості калюсогенезу в культурі соматичних тканин *in vitro* та провести мікроморфологічні дослідження калюсних тканин;
- встановити типи й концентрації екзогенних фітогормонів для розвитку мікропагонів та індукції множинного пагоноутворення;
- визначити особливості регуляції морфогенезу в культурі тканин і органів, їхню залежність від генотипу, типу експлантата, умов культивування та складу живильних середовищ;
- виявити вплив оксикоричних та оксибензойних кислот на морфогенез у культурі тканин і органів;
- розробити математичну модель для опису динаміки зміни показників коефіцієнтів розмноження рослин-регенерантів троянди ефіроолійної;
- підібрати умови для ризогенезу мікропагонів та оптимізувати процес адаптації рослин-регенерантів до умов *ex situ*;
- провести порівняльний диференціальний аналіз рослин троянди ефіроолійної до й після культури *in vitro* за мофоанатомічними та фізіолого-біохімічними показниками.

Об'єкт дослідження – процес культивування клітин, тканин і органів сортів троянди ефіроолійної *Rosa damascena* Mill. в умовах *in vitro* та *ex situ*.

Предмет дослідження – вплив ендогенних та екзогенних чинників на прояв морфогенетичного потенціалу органів та клітин сортів троянди ефіроолійної в умовах *in vitro* та *ex situ*.

Методи дослідження: анатомічні, цитологічні, гістохімічні, спектрофотометричні, біохімічні, біотехнологічні, агротехнологічні, математичні та статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлено фізіологічні, морфологічні, анатомічні та біотехнологічні показники рослинного матеріалу, які дозволяють оптимізувати процес мікроклонального розмноження рослин сортів троянди ефіроолійної. Запропоновано математично вивірений підхід циклічного безперервного тиражування сортів та розроблено математичну модель опису процесу розмноження, яка дозволяє прогнозувати рівень відхилення за мікроклонування від стандартів, визначених для модельного сорту.

Уперше:

- для оптимізації отримання асептичної культури проаналізовано вміст і локалізацію речовин фенольної природи у тканинах модельних сортів троянди ефіроолійної перед уведенням у культуру *in vitro*;

– з'ясовано, що якісний склад і кількість поліфенолів й конденсованих танінів, активація синтезу яких відбувається після травматичного ушкодження тканин первинних експлантатів, слугують маркерами потенційної здатності пагонів сортів троянди ефіроолійної до регенерації;

– показано здатність оксибензойних (ванілінова, сирінгова, галова) й оксикоричних (р-кумарова, кавова, ферулова) кислот у складі безгормонального живильного середовища $\frac{1}{2}$ MS в концентрації 1 мМ/л ініціювати калюсогенез та уповільнювати процеси диференціації клітин;

– виявлено, що за умов тривалого субкультивування рослин *in vitro* відбувається поступове зниження показника коефіцієнту розмноження, тривалість фази експоненційного росту якого залежить від умісту фенольних сполук та обмежене 8 пасажами;

– розроблено математичну модель циклічного процесу мікроклонального розмноження рослин-регенерантів сортів Лань, Лада та Радуга троянди ефіроолійної, яка дозволяє оптимізувати біотехнологію промислового отримання високоякісного посадкового матеріалу.

Практичне значення одержаних результатів. Запропоновано біотехнологічний процес отримання посадкового матеріалу і досліджено морфогенетичний потенціал тканин і органів *in vitro* перспективних для вирощування високопродуктивних сортів троянди ефіроолійної. Посадковий матеріал троянди ефіроолійної сорту Лань впроваджено Національним ботанічним садом імені М. М. Гришка НАН України для розширення колекційного фонду троянд ефіроолійних. На базі ботанічного саду Національного університету біоресурсів і природокористування України впроваджено спосіб розмноження *in vitro* троянди ефіроолійної сортів української селекції Лань, Лада та Радуга.

За результатами досліджень розроблено науково-методичні рекомендації «Використання біотехнологічних методів в одержанні безвірусного посадкового матеріалу троянди ефіроолійної: спосіб регенерації *in vitro* безвірусних рослин цінних сортів троянди ефіроолійної» та впроваджено в навчальний процес під час викладання дисципліни «Мікроклональне розмноження рослин» для ОС «Магістр» за спеціальністю «Екологічна біотехнологія та біоенергетика» на факультеті захисту рослин, біотехнологій та екології Національного університету біоресурсів і природокористування України. Отримано патент на спосіб стерилізації експлантатів троянди ефіроолійної.

Особистий внесок здобувача. Здобувачу належить постановка проблеми, визначення мети та завдань дослідження, розроблення теоретично-методологічних й методичних підходів під час біотехнологічних та гістохімічних досліджень. Основну частину наведених у дисертації експериментальних даних одержано здобувачем особисто. Автором здійснено пошук літературних даних, аналіз і узагальнення результатів експериментів.

Апробація результатів дисертації. Основні положення та результати дисертації апробовано на IV Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії»

(м. Київ, 2015 р.); Міжнародній науковій конференції «Охорона біорізноманіття та історико-культурної спадщини у ботанічних садах та дендропарках» (м. Умань, 2015 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (м. Київ, 2016 р.); XII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м. Львів, 2016 р.); III Міжнародній науковій конференції «Лікарські рослини: традиції та перспективи досліджень» (м. Березоточа, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Наука у контексті сучасних глобалізаційних процесів» (м. Полтава, 2017 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукових праць, з яких 2 статті у наукових фахових виданнях України, 3 статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 2 статті в інших наукових виданнях України, науково-методичні рекомендації, патент України на корисну модель, 6 тез наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено на 186 сторінках і складається з анотацій, вступу, шести розділів, висновків і рекомендацій, списку використаних джерел та додатків. Основний текст містить 28 таблиць і 45 рисунків. Список використаних джерел включає 238 найменувань (з них 127 латиницею).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ОТРИМАННЯ САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ

Проаналізовано сучасні дослідження з біотехнології, фізіології та метаболоміки троянди ефіроолійної, наведено дані щодо біологічних особливостей представників виду *Rosa L.*, особливостей розмноження троянд ефіроолійних. Виявлено сучасні тенденції та проведено порівняльну характеристику досліджень вітчизняних та зарубіжних науковців. Обґрунтовано актуальність і перспективи проведення дисертаційного дослідження.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженнях використано рослини троянди ефіроолійної сортів Лада, Лань та Радуга селекції Інституту ефіроолійних і лікарських культур УААН, які характеризуються високою продуктивністю та рекомендовані для промислового розмноження з метою використання у фармацевтичній та харчовій галузях промисловості. Схему досліджень представлено на рис. 1.

Вихідним матеріалом слугували дворічні рослини троянди ефіроолійної фенотипово однорідні, не пошкоджені хворобами та шкідниками. Частини однорічних приростів, довжиною 4–7 см із верхівковими та бічними бруньками, зрізали для подальшого введення в культуру *in vitro*. Відбирали різні типи експлантатів для вивчення регенераційної здатності, зокрема фрагменти стебел з однією брунькою, довжиною 10–15 мм та вегетативні бруньки, розміром 3–5 мм.

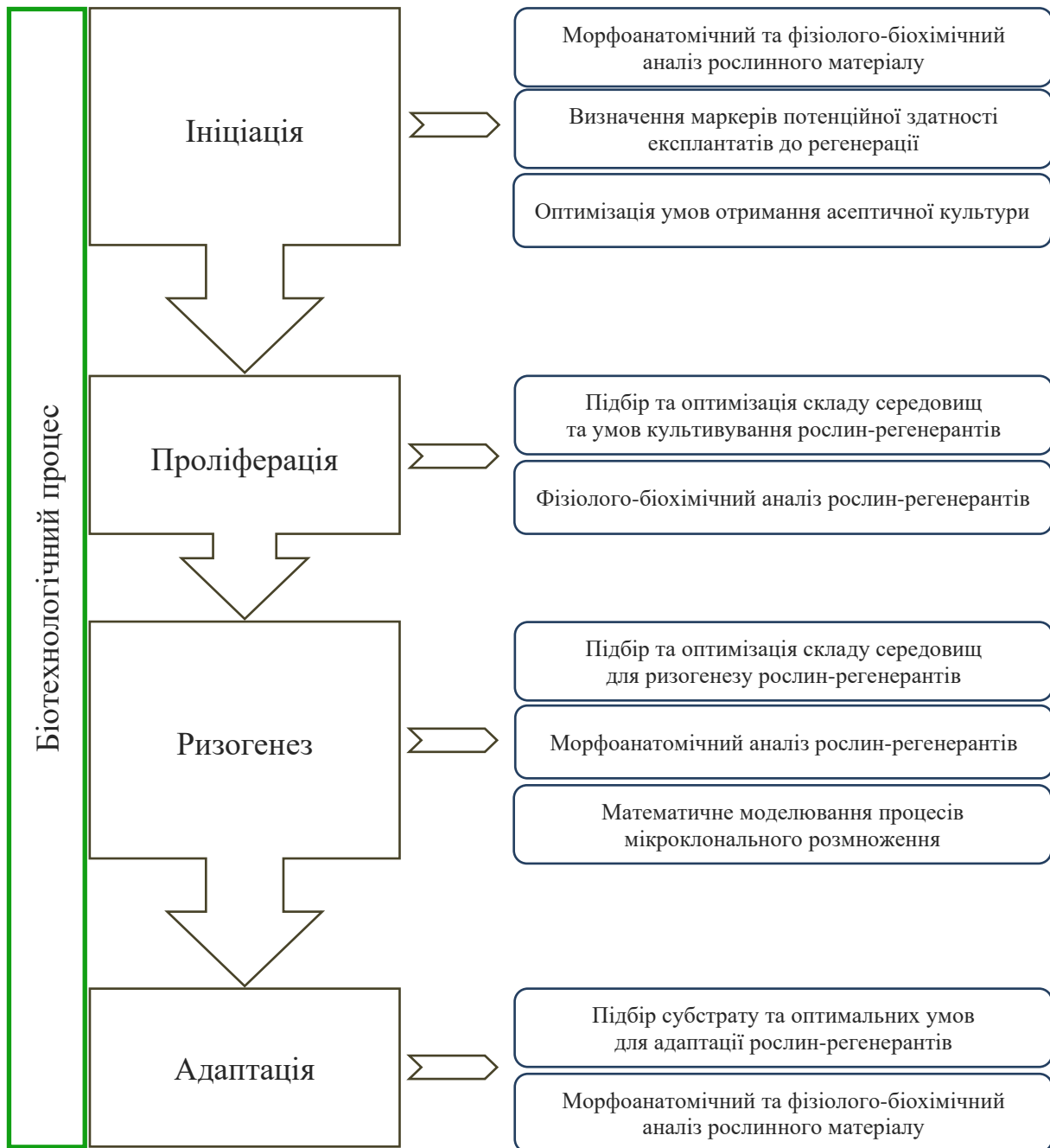


Рис. 1. Схема дисертаційного дослідження

Стерилізацію рослинного матеріалу проводили за такою схемою: експлантати витримували в мильному розчині, відмивали у проточній воді, занурювали у 70 % етиловий спирт, стерилізували в 0,1 % розчині HgCl_2 та відмивали від останнього в стерильній воді.

Ефективність стерилізації (%) визначали як відношення асептичних життєздатних експлантатів до загальної кількості введених в умови *in vitro*. Регенераційну здатність експлантатів, які вводили в культуру *in vitro* у квітні-травні та серпні-вересні на б/г MS (Murashige, Skoog, 1962) та QL (Quirin, Leroivre, 1977), досліджували на різних типах: фрагментах пагонів (10–15 мм) та вегетативних бруньках (3–5 мм). Повторність дослідження шестиразова (у кожному досліді використовували по 15 шт. експлантатів).

Для отримання калюсної тканини використовували стерильні листкові пластинки ($S=0,40-0,50 \text{ см}^2$) та частини стебел із пазушними бруньками ($l=0,5-0,8 \text{ см}$). На експлантатах скальпелем штучно робили насічки. Для індукції калюсогенезу й росту отриманого калюсу використовували MS із додаванням регуляторів росту ауксинового типу дії (1,0–2,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти, 0,05–2,0 мг/л нафтилоцтової кислоти) та цитокінінового типу дії (0,1–0,2 мг/л тидіазурону). Маса сирової речовини калюсу, який використовували для субкультивування, становила $2,0 \pm 0,10 \text{ г}$. Тривалість пасажу – 28–30 діб. Рослинний матеріал культивували у чашках Петрі по 10–15 шт. на поверхні живильного середовища у термостаті ТС-80 без освітлення за температури $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ та відносної вологості повітря 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.

Для індукції органогенезу калюс масою $2,0 \pm 0,10 \text{ г}$ переносили на живильне середовище MS із додаванням 0,1–3,0 мг/л 6-бензиламінопурину, 0,5–2,0 мг/л кінетину та 0,1–1,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти. Рослинний матеріал культивували за температури $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, освітлення – 2,0–3,0 кЛк з 16-годинним фотоперіодом та відотною вологістю повітря 70–75 %.

Цитологічні й гістохімічні дослідження неморфогенного й морфогенного калюсу сортів троянди ефіроолійної (перший-п'ятий пасажі) здійснювали на мікромомних зрізах (завтовшки 10 мкм). Рослинні тканини фарбували гематоксиліном за Гейденгайном та ацетофуксином. Рослинний матеріал фіксували 24 год за прописом Чемберлена (70 % етиловий спирт:формалін: оцтова кислота – 90:5:5) із подальшим перенесенням у розчин 70 % етилового спирту.

Послідовність і терміни проходження етапів морфогенезу в культурі ізольованих фрагментів мікропагонів *in vitro* троянди ефіроолійної сортів Лань, Лада та Радуга проводили шляхом культивування мікроживців *in vitro* (1,0–1,5 см) на базовому MS, $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{4}$ MS, QL, $\frac{1}{2}$ QL, WPM (Lloyd McCown, 1981), DKW (Driver, Kuniyuki, 1984) та Андерсона (Anderson, 1978) із додаванням регуляторів росту ауксинового (0,01–0,5 мг/л β -індоліл-3-оцтової кислоти) та цитокінінового (0,1–2,0 мг/л 6-бензиламінопурину, 0,1–1,0 мг/л тидіазурону) типів дії. До живильних середовищ додавали 100 мг/л мезоінозитулу, 15–30 г/л сахарози та 6,8–6,9 г/л агару. Рівень рН середовища становив 5,7–5,8. Вимірювання морфометричних показників (довжина мікропагону, кореневої системи, коефіцієнт розмноження) рослин-регенерантів проводили на 30 добу культивування. Повторюваність дослідів трьохразова (у кожному досліді використовували 10 шт. експлантатів).

Вивчення структури рослинних тканин виконували на зрізах пагонів, виготовлених за допомогою леза вручну (товщина 10–15 мкм). Для виявлення катехінів у тканинах використовували 1 % розчин ваніліну в сірчаній кислоті, для фенолів – 5 % хлорид заліза, для білків – 0,1 % розчин бромфенолового синього, 10 % розчин хлориду ртуті та 0,6 % розчин оцтової кислоти, а

м-лігніну – 1 % розчин перманганату калію, соляну кислоту та 10 % гідроксид амонію.

Уміст фотосинтетичних пігментів у листках сортів троянди ефіроолійної визначали на спектрофотометрі Optizen POP (Корея) за загальноприйнятою методикою, кількість розчинних поліфенолів – за методом Folin Ciocalteu в модифікації Singleton Rossi (1965). Для кількісного визначення суми флавоноїдів у зразках троянди використовували методику спектрофотометричного аналізу.

Регресійний аналіз динаміки показників інтенсивності мікроклонального розмноження рослин методом прямого морфогенезу здійснювали із застосуванням спеціалізованого програмного забезпечення Sigma Plot. Для математичного моделювання біотехнологічних процесів використовували логнормальні й логістичні функції. Аналіз розподілу емпіричних даних на нормальність проводили методом Шапіра-Уїлка. Визначення біологічного значення коефіцієнтів у математичних моделях виконували за їхніми змінними значеннями в програмному пакеті Microsoft Excel.

Для закладання маточника на території Ботанічного саду Національного університету біоресурсів і природокористування України використовували клоновані *in vitro* рослини з навчально-наукової лабораторії фітовірусології та біотехнології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВВЕДЕННЯ В УМОВИ *IN VITRO* СОРТІВ ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ

Особливості введення рослинного матеріалу в культуру *in vitro*. Експериментально розроблено способи одержання асептичних життєздатних експлантатів троянди ефіроолійної, які полягають у встановленні стерилізуючих речовин та їхніх експозицій залежно від термінів відбору вихідного рослинного матеріалу для отримання асептичних і життєздатних первинних експлантатів сортів Лань, Лада й Радуга. У якості стерилізуючих розчинів використовували 70 % етиловий спирт 60 с та 0,1 % сулему з різним часом експозиції. Простерилізовані експлантати триразово відмивали стерильною dH₂O – по 10 хв та разово – у розчині стерильної dH₂O з 2 мг/л лимонної кислоти – 10 хв для запобігання окиснення поліфенолів, що виділялися на зрізах пагонів. Для висаджування простерилізованих експлантатів застосовували живильні середовища з різними модифікаціями мінеральних солей, фітогормонів та органічних сполук. Через 7, 14 і 21 добу враховували кількість контамінованих і стерильних експлантатів та визначали ефективність стерилізації.

Стерильні пагони розрізали на фрагменти стебла 1,5–2 см з однією брунькою (рис. 2). Для підвищення ефективності процедури введення первинних експлантатів у культуру *in vitro* враховували фенологічну фазу

вегетації рослин-донорів. Вищу регенераційну здатність мали експлантати на початку вегетації інтактних рослин (квітень-травень).

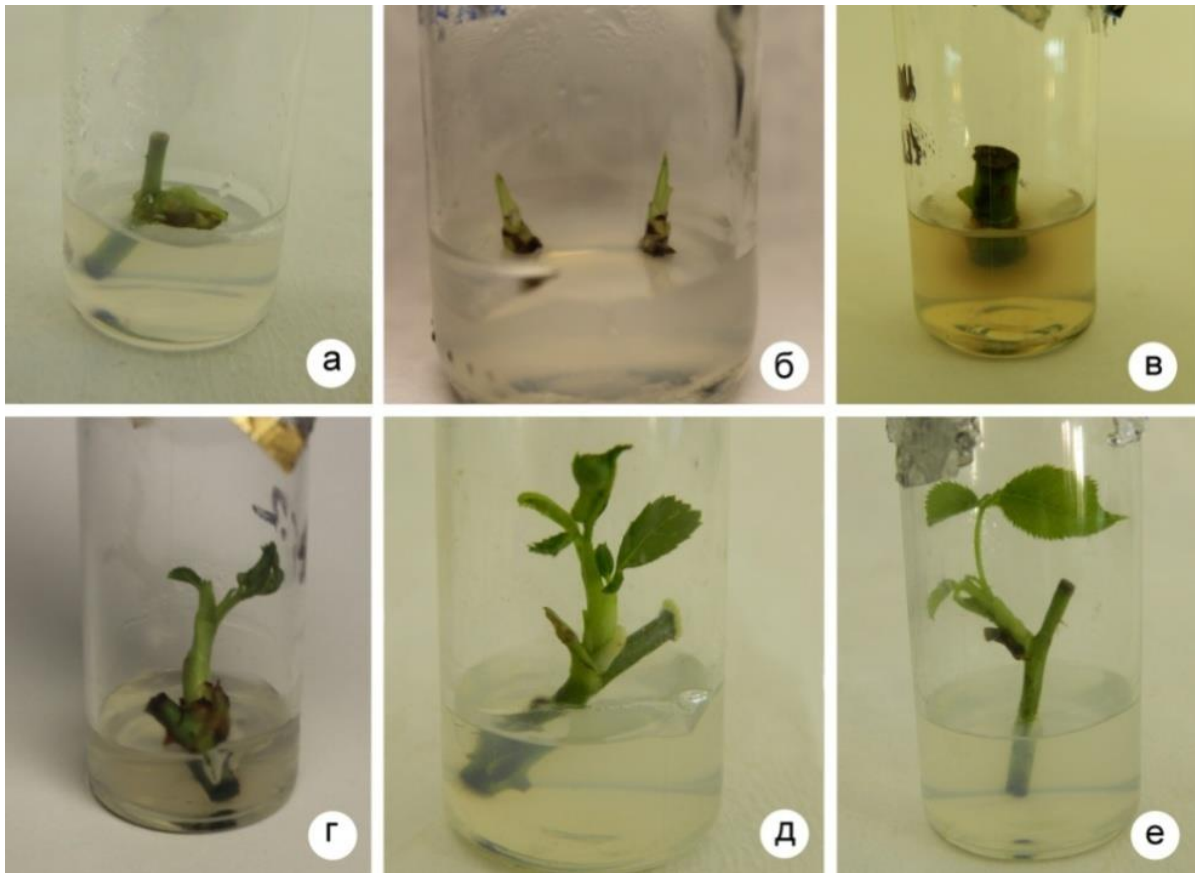


Рис. 2. Стерильні експлантати на етапі введення в культуру *in vitro*, сорт: а – Лань; б – Лада; в – Радуга (7 доба культивування); активація пазушних бруньок, сорт: г – Лада; д – Радуга; е – Лань (21 доба культивування)

На етапі введення в культуру *in vitro* найнижчим адаптивним потенціалом відзначалися сорти Лада і Радуга (рис. 2, б, в, г, д), найвища регенераційна здатність за підібраних умов стерилізації відмічена у сорту Лань (рис. 2, а, е).

Вплив фенольних сполук на ефективність введення сортів *Rosa damascena* Mill. у культуру *in vitro*. За умов вмісту фенольних сполук у листках первинних експлантатів у концентрації нижче за 63 мг/г сирової маси ефективність введення рослин у культуру *in vitro* суттєво підвищується. Установлено найбільший вміст фенольних сполук у листках троянди сортів Лада (118,9 мг/г) і Радуга (109,1 мг/г), найменший – Лань (63,0 мг/г), який виявив найвищу регенераційну здатність за підібраних умов стерилізації та культивування первинних експлантатів *in vitro*.

На етапі введення первинних експлантатів троянди в культуру *in vitro* в тканинах первинної кори, вторинної флоєми й паренхіми серцевинних променів прослідковується інтенсивний синтез фенольних сполук, зокрема дубильних речовин та флавоноїдів. Частина фенолів дифундує в живильне середовище з подальшим окисненням, решта (проантоціанідини, флавоноїди) утворює складні полімери, які здатні специфічно зв'язуватися із білками клітинних

мембран, впливати на їхню селективність та трансмембранне перенесення, суттєво змінюючи функціональний стан живих клітин (Schieber A., Mihalev K., 2005). Дослідження сортоспецифічних відмінностей у якісному складі фенольних сполук показало, що в листках рослин сорту Лада, порівнюючи з Ланню та Радугою, міститься менша кількість катехінів, проте, сортових відмінностей у їхньому якісному складі не виявлено.

Особливості нагромадження фенольних сполук в експлантатах в умовах *in vitro*. Між регенераційною здатністю експлантатів і вихідним пулом фенольних сполук існує прямий зв'язок. Дифузія в живильне середовище сполук, що виділяються рослинними тканинами, мала відносно рівномірний характер, проте інтенсивність самого процесу залежала від радіального розміру експлантата та сорту. Найактивніше фенольні сполуки виділялися експлантатами сорту Лада (рис. 3).

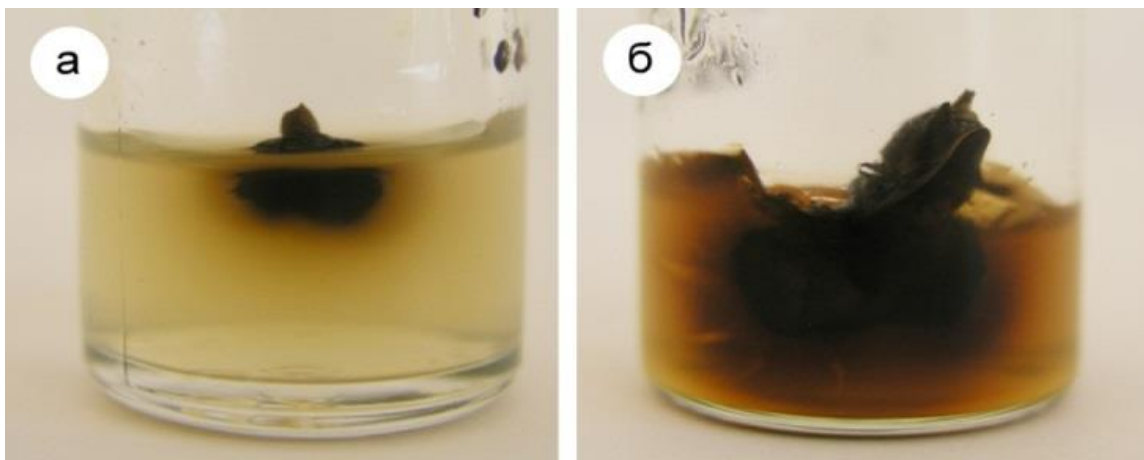


Рис. 3. Виділення та дифузія вторинних метаболітів експлантатами троянди ефіроолійної сортами Лань(а) та Лада (б)

Визначено, що синтез фенольних сполук найактивніше відбувається в живих тканинах первинної кори й серцевинних променів. Інтенсивність виділення поліфенолів у стеблі має просторову тканинну неоднорідність і топологічно пов'язана з розташуванням вегетативних бруньок. Найактивнішими в цьому відношенні були зони первинної кори під брунькою. Втім, навіть такі ділянки кори виявляють активність групами паренхімних клітин (рис. 4).

Після обробки зрізів стебла реактивом Folin Ciocalteu з наступною обробкою препарату розчином карбонату натрію місця зосередження фенольних сполук темнішали, що дозволило виявити високий вміст фенолів в молодих клітинах ксилеми і флоєми, що межують з камбієм (рис. 4, в, г). Незначні скупчення фенольних сполук виявляються в дрібних клітинах і міжклітинниках серцевинної паренхіми.

У підборі складу живильного середовища необхідно здійснювати розділення сортів рослин на різні категорії складності щодо вмісту фенольних сполук у рослинних тканинах та забезпечення тканин достатньою кількістю екзогенних антиоксидантів.

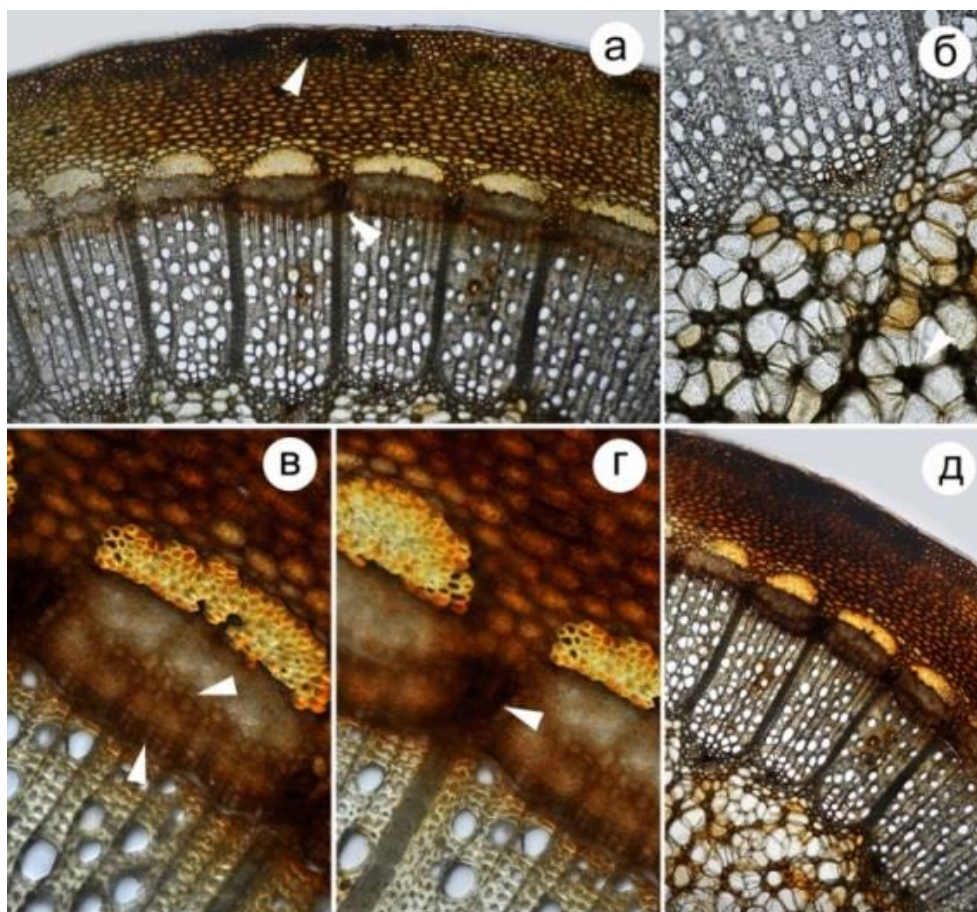


Рис. 4. Анатомічна будова й центри активного виділення фенольних сполук у пагонах троянди ефіроолійної сорту Лада в умовах *in vitro*: а – фрагмент пагону із неоднорідною інтенсивністю виділення фенольних сполук (позначене стрілками темне забарвлення тканин); б – фрагмент перимедулярної зони стебла (накопичення фенольних сполук в окремих клітинах серцевинної паренхіми); в – фрагмент поперечного зрізу стебла в камбіальній зоні й флоемі (стрілками виділено тканини, які активно виділяють феноли); г – виділення фенольних сполук у серцевинного променя в зоні вторинної кори; д – гістохімічне виявлення тканин, які активно виділяють фенольні сполуки (реактив Folin Ciocalteu)

Анатомічна пластичність сортів троянди ефіроолійної як показник регенераційного потенціалу пагонів у культурі *in vitro*. Інтегрованим критерієм зрілості тканин стебла є відкладення в живих клітинах кори, серцевинних променів і перимедулярної зони серцевинної паренхіми крохмалю. З'ясовано, що даний запасний полісахарид найінтенсивніше накопичується в тканинах стебел сорту Лань (рис. 5).

У рослин-регенерантів крохмаль виявлено лише в клітинах первинної кори. Екзокортекс закладається під епідермою стебла у вигляді багат шарового суцільного кільця, клітини якого з часом диференціюються в коленхіму пластинчастого типу. В умовах *in vitro* даний процес значно уповільнюється, що пов'язано зі специфікою фітогормонального статусу рослин, на фоні якого гальмується формування вторинних клітинних стінок.

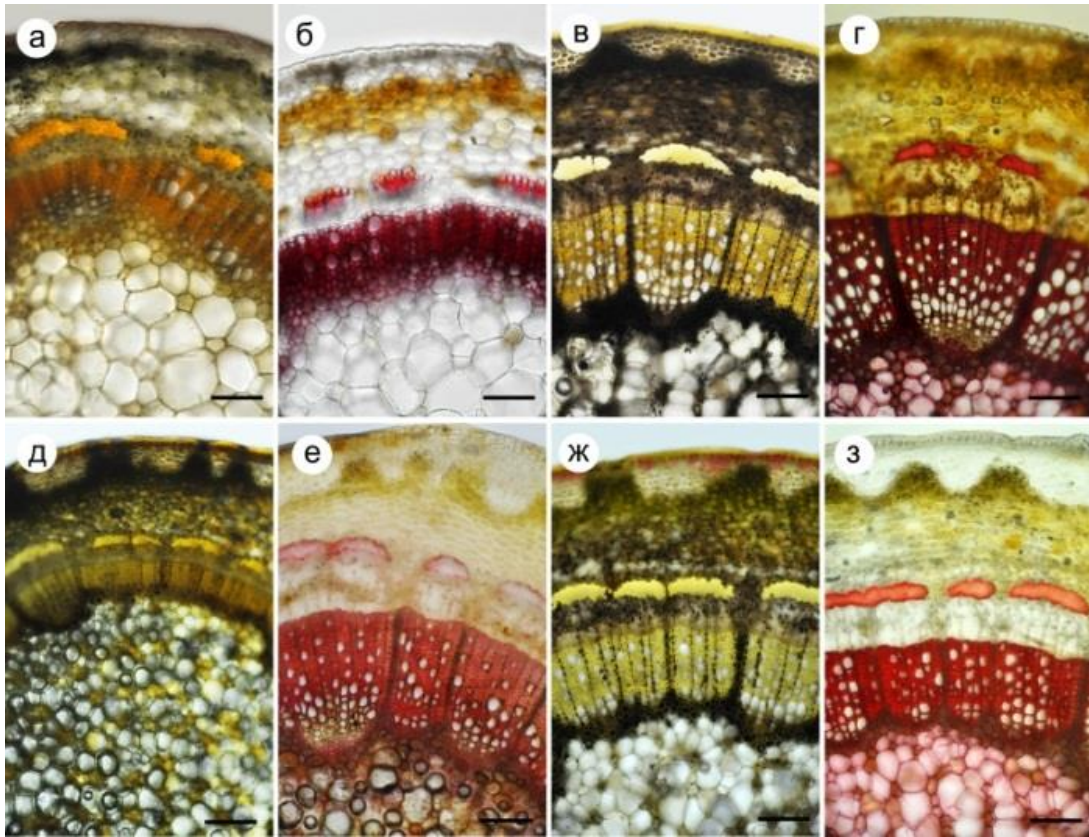


Рис. 5. Локалізація крохмалю (а, в, д, ж) і М-лігніну (б, г, е, з) у тканинах стебла троянди ефіроолійної сортів: а–г – Лань; д–е – Лада; ж–з – Радуга: а, б – рослина-регенерант в умовах *in vitro* (лінійка – 150 мкм)

У рослин *in vitro* зовнішнє коло клітин мезокортексу містить найбільший запас крохмалю. Запасні полісахариди забезпечують енергетичні потреби рослини для процесів синтезу фенольних сполук, зокрема епікатехінів, які значною кількістю накопичуються саме в цій зоні кори. Підтверджено, що накопичення катехінів найактивніше відбувається в мезокортексі первинної кори, клітинах серцевинних променів та флоєми (рис. 6). Просторово епікатехіни зосереджені в молодших зонах флоєми, а в ксилемі вони виявлені лише в паренхімі серцевинних променів.

Локалізація білків просторово пов'язана з нагромадженням основної маси катехінів та інших поліфенолів, зокрема оксибензойних та оксикоричних кислот і танінів. Активація синтезу поліфенолів відбувається у відповідь на травматичне пошкодження тканин первинних експлантатів за введення рослин у культуру *in vitro*. Саме цей процес є критичним для отримання життєздатних регенерантів.

Окиснення й полімеризація фенольних продуктів зумовлює інактивацію ферментів та блокування транспортних систем ксилеми, які забезпечують живлення меристем. Отже, для успішної регенерації експлантатів доцільним є пошук хімічних регуляторів, що здатні гальмувати активність ферментів фенілпропаноїдного синтезу. Це дозволяє уповільнювати процеси аутоінтоксикації живих тканин.

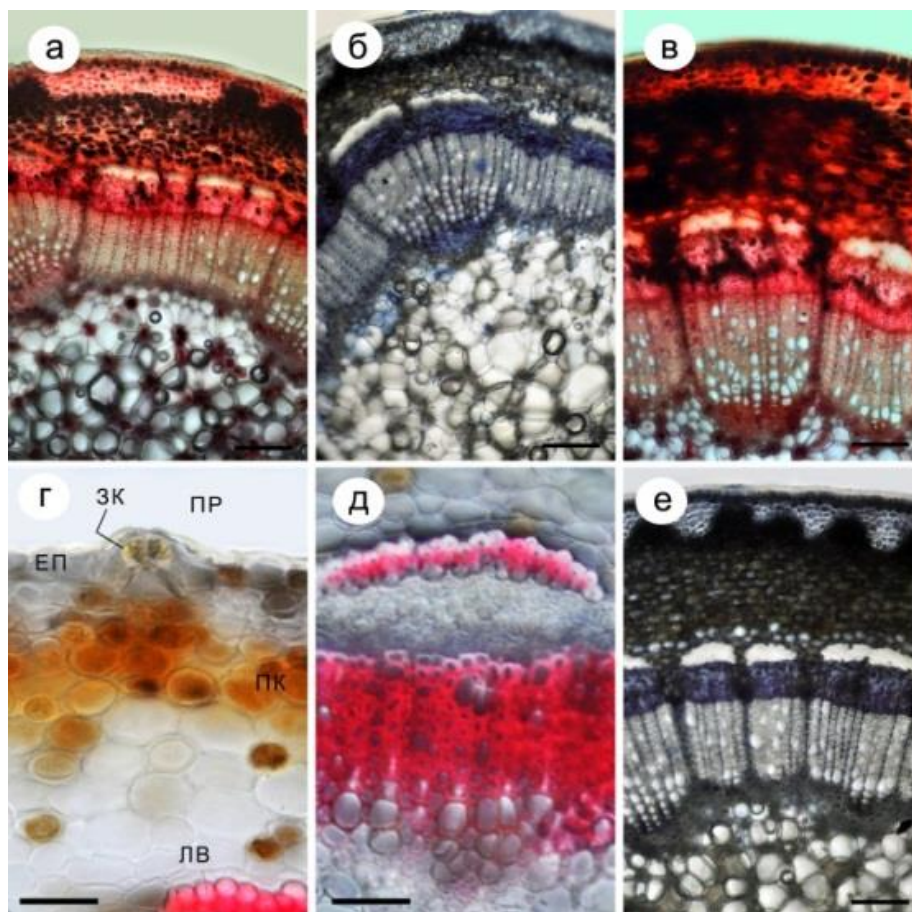


Рис. 6. Особливості гістогенезу й локалізація катехінів (а, в) і білка (б, е) в тканинах стебла троянди ефіроолійної, сорти: а–б – Лада; в–е – Радуга; г – формування продиху на стеблі рослини-регенеранту в умовах *in vitro*: зк – замикаючі клітини; пр – продих; еп – епідерма; лв – луб'яні волокна; пк – паренхіма мезокортексу; д – поступове відкладення лігніну на стінках клітин ксилеми та екстрацелярних волокнах (лінійка: а–в, е – 150 мкм; г, д – 50 мкм)

РОЗРОБЛЕННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ШЛЯХІВ ІНДУКЦІЇ МОРФОГЕНЕЗУ СОРТІВ ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ

Непрямий морфогенез та регенераційна здатність тканин троянди ефіроолійної. На живильних середовищах початок калусогенезу експлантатів троянди ефіроолійної відзначали на фрагментах листової пластинки на 7–9, а на мікропагонах – 10–14 добу культивування. Аналіз експериментальних даних свідчить, що використання лише 6-бензиламінопурину на середовищі MS не спричинює отримання морфогенного калюсу (табл. 1). Консистенція залишалася рихлою, забарвлення – світло-жовтим. За умов культивування калюсу на середовищі QL+0,5 мг/л 6-бензиламінопурину на 30 добу отримували морфогенний калюс із темно-зеленими зонами, а на 40 добу почали формуватися розетки та мікропагони. На середовищі $\frac{1}{2}$ MS + 0,150 мг/л тидіазурону та 0,05 нафтилоцтової кислоти прослідковується активне наростання калюсних тканин. Регенерація мікропагонів відбувається на 45 добу.

**Вплив живильного середовища та концентрації регуляторів росту
на культивування калюсної тканини, отриманої із фрагмента
листяної пластинки**

Морфометричні показники	Склад живильного середовища			
	MS+0,5 мг/л БАП	QL+2,0 мг/л БАП + 0,1 мг/л ІОК	½ MS+0,150 мг/л ТДЗ + 0,05 мг/л НОК	QL+0,5 мг/л БАП
Забарвлення калюсу, 30 доба культивування	світло-жовте	світло-жовте з осередками темно-салатового	салатове з осередками темно-зеленого	салатове з осередками темно-зеленого
Консистенція калюсу, 30 доба культивування	рихла	середньої щільності	щільна	щільна
Регенерація мікропагонів, шт.	–	10–15	5–10	12–25
Інтенсивність калюсоутворення	+	++	+++	++

Примітка. БАП – 6-бензиламінопурин; ІОК – β -індоліл-3-оцтова кислота; ТДЗ – тидіазурон; НОК – нафтилоцтова кислота; «+» – низька; «++» – середня; «+++» – висока інтенсивність калюсоутворення

Особливості непрямого морфогенезу тканин і органів рослин сортів троянди ефіроолійної та формування морфогенних модулів у калюсах. У більшості досліджених зразків морфогенних калюсів троянди ефіроолійної промеристемні зони, що представлені дрібними клітинами з густою цитоплазмою, знаходилися в оточенні великих клітин із відкладеннями в клітинних стінках β -(1,3)-глюканів (калози). За просторово-структурною організацією морфогенні зони в системі калюсних тканин троянди ефіроолійної представлені меристемоїдами (рис. 7).

Кожен із новоутворених модулів частково або повністю виокремлений від неморфогенної зони калюсу великими паренхімними клітинами з розвинутими вторинними клітинними стінками (рис. 7, д, ж). Морфогенні зони в системі калюсних тканин троянди ефіроолійної представлені меристемоїдами.

На початкових стадіях гомогенез завершувався утворенням структур з аномальною будовою, для яких характерна відсутність чіткої мережі провідних пучків, атипова просторова організація клітин у тканинах.

Подальша реалізація морфогенного потенціалу даних структур залежить від умов культивування культури, а також від функціональної активності меристемоїдних зон.

Прямий морфогенез та власне мікроклональне розмноження сортів троянди ефіроолійної. Для масового мікроклонального розмноження троянди ефіроолійної методом активації вже наявних у рослині меристем, використовували живильні середовища Андерсона, MS, QL та WPM із додаванням до їхнього складу цитокинінів та ауксинів: 6-бензиламінопурин,

тідіазурон, нафтилоцтова кислота та β -індоліл-3-оцтова кислота як окремо, так і комбінуючи між собою.

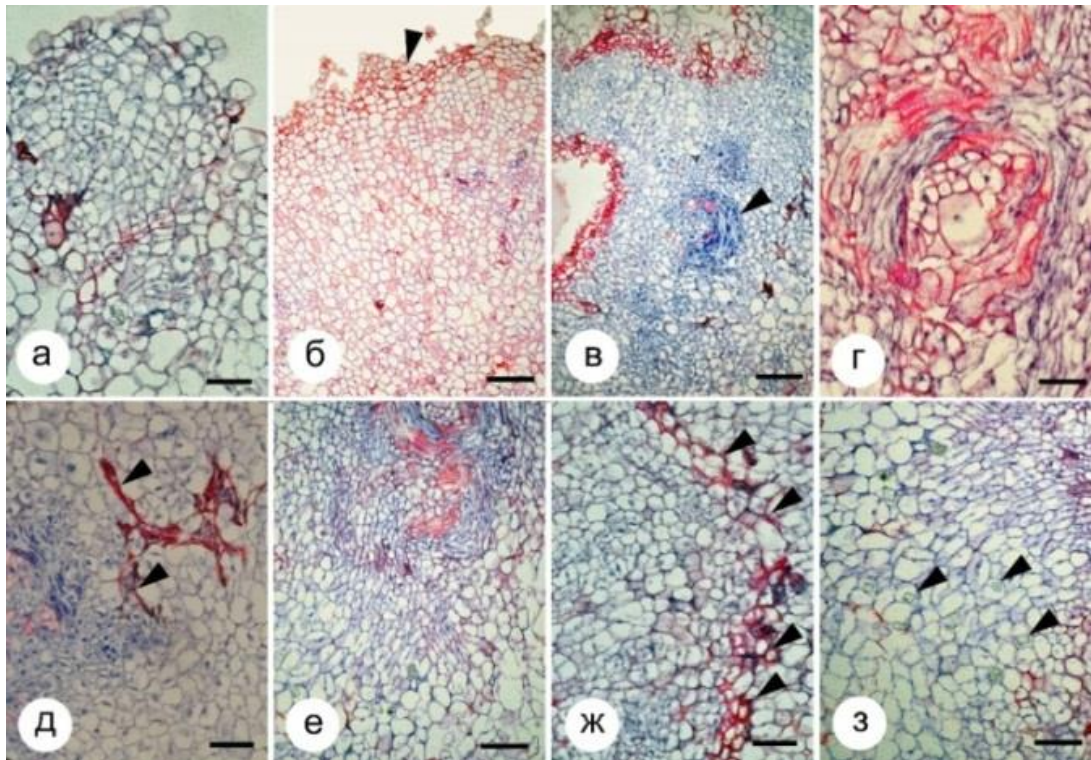


Рис. 7. Просторова організація й гістогенез морфогенних структур у калюсах троянди ефіроолійної сорту Лань: а–б – проліферація клітин неморфогенного калюсу; в – утворення промеристемних зон в оточенні прошарків клітин з лігніфікованими клітинними стінками; г, е – диференціація клітин з утворенням проваскулярних тканин; д – облітерація клітин паренхіми; ж – формування гістохімічних бар'єрів (показано стрілками), що розділяють паренхіму калюсу на окремі зони; з – відкладення в клітинах калюсу (ідіобластах) крупних призматичних кристалів солей щавлевої кислоти (показано стрілками); лінійка: б, в, е – 100 мкм; а, г, д, ж, з – 50 мкм

Для мікроклонального розмноження і отримання рослин – регенерантів сорту Лань застосовували MS+0,5 мг/л 6-бензиламінопурину + 0,01 мг/л β -індоліл-3-оцтової кислоти, MS+0,1 мг/л тідіазурону та QL+0,5 мг/л 6-бензиламінопурину. Мінімальний коефіцієнт розмноження становив 1:8, максимальний – 1:14, довжина пагонів від 3,0 до 5,0 см. Для формування кореневої системи рослини-регенеранти субкультивували на безгормональних живильних середовищах $\frac{1}{2}$ MS, MS та QL (рис. 8), довжина коренів – 2,5–8,0 см. Загальна тривалість циклу культивування становила 50 діб.

Для мікроклонального розмноження сорту Радуга експлантати переносили на живильні середовища MS+0,1 мг/л тідіазурону. За таких умов культивування мінімальний коефіцієнт розмноження становив 1:3, максимальний – 1:7, довжина пагонів сягала від 1,0 до 2,0 см. Ризогенез відбувався на живильному середовищі $\frac{1}{2}$ MS б/г та Андерсона з подвійним

вмістом $\text{Fe}^{2+}+2,0$ мг/л 6-бензиламінопурину, довжина кореневої системи – 1,0–1,5 см. Тривалість циклу культивування складала 50–65 діб.

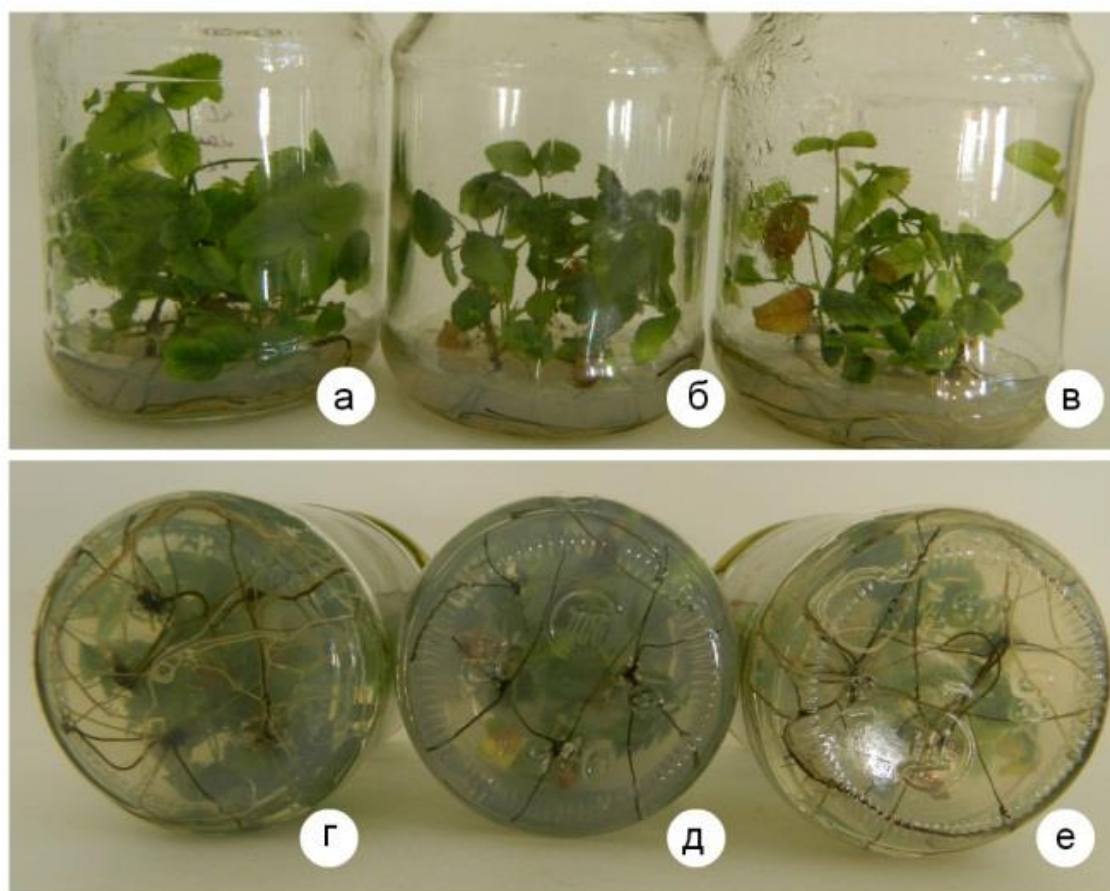


Рис. 8 Сформовані рослини-регенеранти троянди ефіроолійної й ризогенез мікропагонів: а, г – сорт Лань (середовище $\frac{1}{2}$ MS б/г, MS б/г та QL б/г); б, д – сорт Лада (середовищі $\frac{1}{2}$ MS б/г); в, е – сорт Радуга (середовище $\frac{1}{2}$ MS б/г)

Мікроклональне розмноження рослин-регенерантів сорту Лада відбувалося на живильних середовищах Андерсона + 0,5 мг/л 6-бензиламінопурину; QL+2,0 мг/л 6-бензиламінопурину; WPM+1,5 мг/л 6-бензиламінопурину + 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти. Коренева система формувалася на середовищі $\frac{1}{2}$ MS б/г, але розвинута недостатньо (2–3 кореня довжиною від 1,0 до 2,0 см), висота пагонів між тим дорівнювала від 2,0 до 3,5 см. Мінімальний коефіцієнт розмноження – 1:2, максимальний – 1:4. У сорту Лада був найбільш тривалий цикл культивування – 80–90 діб.

Вплив оксикоричних та оксибензойних кислот на стан фотосинтетичного апарату рослин-регенерантів троянди ефіроолійної. З часом у регенераційно здатних експлантатів синтез фенольних сполук знижувався, рослини адаптувалися до компонентів живильного середовища і заданих умов. Доведено, що майже всі без винятку фенольні кислоти в троянди ефіроолійної індукують калюсогенез. За умов додавання ванілінової кислоти ріст пагонів у культурі *in vitro* дещо уповільнився, втім, кислота стимулювала калюсогенез на фоні пригнічення ризогенезу. Додавання сирінгової кислоти

гальмувало процеси закладання міжвузлів, формування пагонів суттєво знижувалося. Значну перебудову фенольного синтезу в листках зумовлювала галова кислота. Так, на фоні зменшення загального пулу фенолів значно знижувався показник співвідношення кількості фенолів до катехинів. З огляду на той факт, що катехіни за окиснювання створюють токсичні сполуки і значно ускладнюють живлення тканин, використання галової кислоти в мінімальних концентраціях може бути перспективним на перших етапах введення сортів троянди ефіроолійної в умови *in vitro*.

РОЗРОБЛЕННЯ ЦИКЛІЧНИХ МОДЕЛЕЙ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ ДЛЯ ОПТИМІЗАЦІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

У процесі культивування модельних сортів троянди ефіроолійної виявлено тенденцію до швидкого зростання регенераційної здатності експлантатів із подальшим її зниженням. Для сорту Лань, який має широку амплітуду пристосувальних реакцій, зниження регенераційної здатності було уповільненим. Динаміку процесу мікроклонального розмноження рослин протягом двох років достатньо точно описують рівняння Гауса і логнормальна функція, тому вони розглядалися як прийнятні для оптимізації біотехнології промислового отримання високоякісного садивного матеріалу троянди ефіроолійної.

За використання підібраних математичних моделей розроблено дизайн циклічного введення в культуру *in vitro* троянди ефіроолійної з урахуванням фізіологічних особливостей сортів (рис. 9).

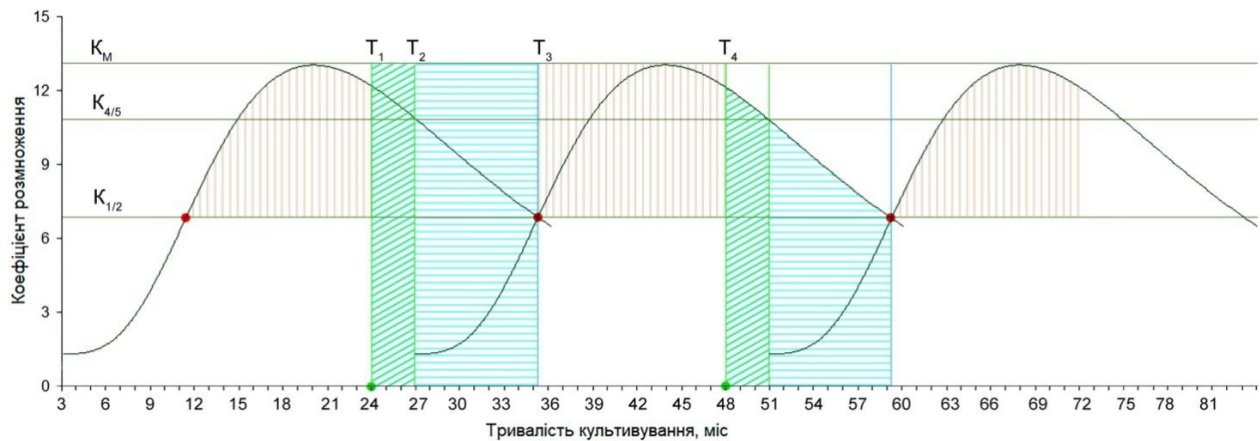


Рис. 9. Модель циклічного процесу мікроклонального розмноження рослин-регенерантів троянди ефіроолійної сорту Лань: K_M , $K_{4/5}$, $K_{1/2}$ – коефіцієнти розмноження максимальний та відповідно; T_1 – T_2 – період між введенням експлантатів в культуру і активацією морфогенезу *in vitro*; T_2 – T_3 – період сумісного культивування попередньої і нової генерації; T_4 – час завершення попередньої і початок нової генерації

Перший етап (T_1) – введення первинних експлантатів з рослин-донорів у культуру *in vitro*. Другий етап (T_2) – початок активізації регенераційного

процесу пагонів з формуванням міжвузлів. Інтервал часу між T_2 і T_3 розглядається як період сумісного росту попередньої і нової генерацій. У даний відрізок часу попередня генерація починає поступово знижувати продуктивність культури, водночас, як нова – прискорювати. Визначено, що показники коефіцієнтів розмноження культури в період T_2 – T_3 наближено співпадають з відповідними показниками в період T_3 – T_4 . Логнормальна модель найточніше описує тенденцію до зниження регенераційного потенціалу рослин за умов довготривалого культивування. Її зручно використовувати у якості робочої моделі у разі необхідності екстраполяції отриманих результатів.

АДАПТАЦІЯ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ ДО УМОВ *EX SITU*

Добір основних типів субстратів та оптимальних співвідношень ґрунтових сумішей для адаптації рослин-регенерантів троянди ефіроолійної до умов закритого ґрунту. Аналіз експериментальних даних свідчить, що використання для адаптації рослин-регенерантів однокомпонентного субстрату недоцільне, оскільки має незначну ефективність. Адаптацію регенерантів проводили в теплиці за температури 22–25 °С. Посадженим рослинам створювали умови підвищеної вологості (95–98 %) дрібнодисперсним дощуванням. Перед висаджуванням і два наступних тижні регенеранти підживлювали розчином $\frac{1}{2}$ MS. На другий тиждень адаптації частка життєздатних рослин становила 92 % на субстраті торф – перліт (2:1), кокосовому субстраті без домішок – 90 %, на суміші кокосовий субстрат – перліт (1:1) – 88 %. Приблизно 5 % рослин гинули в першу добу адаптації через втрату вологи. Даний процес пов'язаний із механічним пошкодженням кореневих волосків унаслідок відмивання коренів від залишків живильного середовища, через що знижувалася інтенсивність всмоктування. Рослини в умовах закритого ґрунту витримували упродовж 25–30 діб, після чого у кінці серпня на початку вересня їх висаджували у відкритий ґрунт за схемою 0,25×0,25 м (рис. 10).

За умов використання наявної методики адаптації рослин-регенерантів одержували надзвичайно високу приживлюваність (понад 92 %) та їхній активний середньомісячний приріст (10–15 см). Найбільш оптимальним способом адаптації й дорощування рослин перед закладанням плантацій є метод адаптації в умовах теплиці, що спричиняє швидку приживлюваність клонів. Найвдалішим періодом перенесення рослин з умов *in vitro* до умов *ex vitro* виявився кінець травня – початок червня, а з умов *ex vitro* до *ex situ* кінець липня – початок серпня.

Біохімічне профілювання вторинних метаболітів та пігментних комплексів адаптованих рослин троянди ефіроолійної. Електромагнітні спектри абсорбції енергії пластидними пігментами показали, що в умовах відкритого ґрунту рослини троянди ефіроолійної у 2,0–2,3 рази збільшують здатність поглинати світло. Максимуми поглинання електромагнітної енергії не змінюються.



Рис. 10. Адаптація рослин троянди ефіроолійної до умов розсадника: 1) контейнерна культура перед висаджуванням в умови *ex situ*; 2) загальний вигляд маточника (7 доба); 3) адаптована троянда ефіроолійна з приростом 15 см на 25 добу; 4) загальний вигляд маточника (25 доба)

Це значить, що склад і співвідношення пластидних пігментів залишається майже незмінним, проте, в складі каротиноїдів зростає доля ксантофілів. Кількісні співвідношення хлорофілів в адаптаційний період пропорційно збільшуються. У рослин, які після первинної адаптації було перенесено в умови дрібноділянкового дослідження, спостерігалось зменшення суми хлорофілів (табл. 2).

Таблиця 2

Вміст пластидних пігментів у листках у процесі адаптації рослин-регенерантів троянди ефіроолійної після культури *in vitro* (сорт Лань)

Пігменти та їх співвідношення	Т	ПА	Д
Хла, мг/г	3,7±0,10	8,4±0,02	7,4±0,02
Хлb, мг/г	1,2±0,04	3,3±0,01	2,7±0,03
Хла+b, мг/г	4,9±0,3	11,7±0,05	10,1±0,06
Хла/b	3,1	2,5	2,7
Кр, мг/г	1,5±0,02	2,8±0,02	3±0,02
Хл (a+b)/Кр	3,3	4,2	3,4

Примітка. Хл – хлорофіл; Кр – каротиноїди; Т – тепличні умови; ПА – первинна адаптація; Д – умови дрібної ділянки; $p \leq 0,05$

Поступове збільшення електромагнітного навантаження високоенергетичними потоками зумовлює фотохімічне закалювання рослин, унаслідок якого активується їхня здатність до трансформування надлишкової енергії й захисту компонентів клітин від руйнування. Стає очевидним, що на

фоні зменшення вмісту хлорофілів у листках відбувається лінійне зростання загальної кількості фенольних сполук і фенольних антиоксидантів. Це свідчить про мобільність системи їхнього синтезу (табл. 3). Кількість фенолів за період адаптації збільшувалася у 6 разів, катехінів і фенольних антиоксидантів – у 7 разів. Контроль рослин-регенерантів у процесі їхньої адаптації за біохімічними маркерами дозволяє оптимізувати режим утримання рослин з урахуванням сортоспецифічних особливостей.

Таблиця 3

Вміст фенольних сполук у листках рослин-регенерантів троянди ефіроолійної в процесі адаптації після культури *in vitro* (сорт Лань)

Умови адаптації	Феноли	Флавоноїди	Катехіни	АА
Т*	5,3±0,15	1,1±0,05	3,1±0,07	40,5±2,2
ПА	18,0±0,90	3,4±0,14	9,1±0,04	160,4±2,5
Д	32,0±0,25	3,4±0,17	21,3±0,23	279,7±3,4

Примітка. *Т – адаптація в умовах теплиці; ПА – первинна адаптація; Д – адаптація в умовах відкритого ґрунту; АА – антиоксидантна активність; $p \leq 0,05$

Порівняльний анатомічний і гістохімічний аналізи однорічних пагонів троянди ефіроолійної сорту Лань показали, що в рослин після розмноження через культуру *in vitro* відбуваються чіткі зміни в процесах розвитку тканин стебла, локалізації й розподілу метаболітів. Зокрема, значні відмінності пов'язані з тим, що на фоні розвиненої, достатньо лігніфікованої розсіяно-судинної ксилеми (рис. 11, б) відбувалося уповільнення розвитку флоєми.

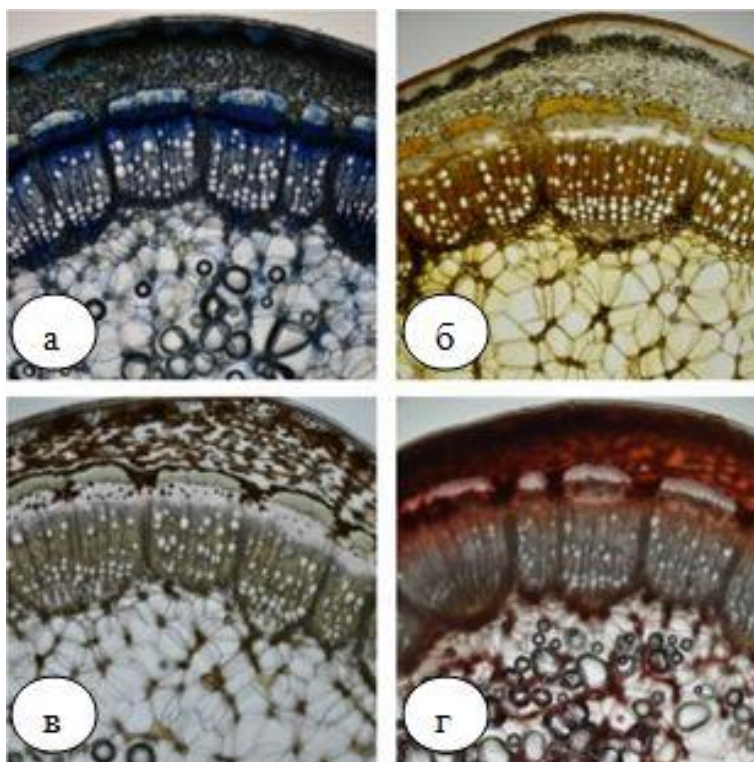


Рис. 11. Локалізація білків (а), крохмалю (б), катехінів (в) та М-лігніну (г) у однорічних пагонах троянди ефіроолійної сорту Лань

У рослин після мікроклонального розмноження локалізація білків у флоемі мала чітку диференціацію на ранню й пізню зони. Клітини пізньої зони містили значно більшу кількість білків, яку визначали інтенсивною гістохімічною реакцією. Наявний факт підтверджує високу метаболічну активність, здатність суттєво регулювати структурно-захисні й транспортні функції. Також у тканинах флоєми визначено чіткий зонально-просторовий характер розподілу катехінів – основних у загальному пулі фенольних сполук троянди ефіроолійної. Після культури *in vitro* катехіни були розподілені в клітинах паренхіми кори не спорадично, як до культивування, а впорядкованими рядками (див. рис. 11 в). Крім того, клітини, що примикали до екстраксіяльних волокон, а також паренхіма серцевинних променів між пучками склеренхіми була заповнена катехінами і складала суцільне гістохімічне кільце (див. рис. 11 в). Серед досліджених рослин дана специфіка просторового розподілу фенольних сполук була характерна виключно для рослин після культури *in vitro*. Даний показник є достатньо інформативним та може бути використаний як маркерна ознака для оцінки загального стану рослин, їхньої потенційної адаптивності, ефективності способів розмноження та умов культивування.

ВИСНОВКИ

Оптимізовано біотехнологічний процес отримання посадкового матеріалу перспективних для вирощування високопродуктивних сортів троянди ефіроолійної із врахуванням морфогенетичного і адаптаційного потенціалу тканин і органів рослин *in vitro*.

1. Показник вмісту фенольних сполук у листках є високоінформативним маркером потенційної здатності рослин до регенерації в умовах *in vitro*.

2. Значно вищу регенераційну здатність в умовах *in vitro* відзначено експлантатами інтактних рослин троянди ефіроолійної на початку вегетації, коли загальний пул фенольних сполук у листках є найнижчим. Показано, що даний показник для сорту Лань, що містив 63,0 мг/г фенолів, був у 2,0 рази вищим, ніж у сортів Лада (118,9 мг/г) і Радуга (109,1 мг/г).

3. Для введення в культуру *in vitro* троянди ефіроолійної доцільно використовувати: для сорту Лань – апікальні меристеми вегетативних бруньок та частини пагонів із бруньками, Радуга – лише частини пагонів із бруньками, Лади – апікальні меристеми вегетативних бруньок. Для кожного сорту і етапу мікроклонального розмноження розроблено склад живильного середовища, а етапу стимуляції утворення адвентивних бруньок сортів Лань, Лада й Радуга *in vitro* – MS+0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти та 0,2 мг/л бензиламінопурину.

4. На калюсах, які утворені із фрагментів листкової пластинки і мікропагонів, на середовищі $\frac{1}{2}$ MS+0,150 мг/л тидіазурону та 0,05 мг/л нафтилоцтової кислоти, визначено активне наростання калюсних тканин. Установлено, що морфогенний калюс утворюється на середовищі QL+0,5 мг/л бензиламінопурину. Регенерація мікропагонів відбувається на 45 добу культивування.

5. Для промислового мікроклонального розмноження і отримання рослин-регенерантів сорту Лань застосовано живильне середовище MS+0,5 мг/л бензиламінопурину + 0,01 мг/л індоліл-3-оцтової кислоти, Радуга – Андерсона з подвійним вмістом Fe^{2+} +2,0 мг/л бензиламінопурину і Лань – QL+2,0 мг/л бензиламінопурину. Ризогенез мікропагонів проявлявся на середовищі $\frac{1}{2}$ MS без додавання регуляторів росту.

6. Сортоспецифічні цикли культивування рослин-регенерантів залежать від генотипів троянди і складу живильних середовищ. Найкоротший цикл – 50 діб, характерний для сорту Лань, а найтриваліший Лада – 90 діб.

7. Розроблено математичну модель циклічного біотехнологічного процесу мікроклонального розмноження сортів троянди ефіроолійної, яка ґрунтується на інтегральних фізіологічних ознаках і дозволяє оптимізувати технологію безперервного отримання якісного садивного матеріалу.

8. Наявність у складі живильного середовища (1 мМ/л) оксибензойних (ванілінова, сирінгова, галова) й оксикоричних (р-кумарова, кадова, ферулова) кислот ініціює калюсогенез і диференціацію клітин у зоні контакту тканин з живильним середовищем.

9. Підібрано оптимальну композицію субстратної суміші для адаптації рослин-регенерантів сортів троянди ефіроолійної до умов закритого ґрунту. Оптимізовано технологічні заходи ступінчатої адаптації сортів троянди ефіроолійної на твердих субстратах (2:1 торф-перліт) в умовах *ex situ*, що дозволяє отримувати контейнерні культури з ефективністю адаптації 92 %.

10. В процесі адаптації у листках і стеблах рослин-регенерантів троянди ефіроолійної поступово накопичувалися фенольні сполуки, зокрема катехіни, просторовий розподіл яких в тканинах однорічних пагонів супроводжувався утворенням захисних гістохімічних бар'єрів.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Відбір рослин-донорів троянди ефіроолійної для мікроклонального розмноження необхідно проводити за спектрофотометричними показниками й за розробленою шкалою вмісту фенольних сполук.

2. Для мікроклонального розмноження сортів троянди ефіроолійної рекомендується технологія поетапного прямого органогенезу. Культивування рослин-регенерантів доцільно здійснювати на розроблених живильних середовищах. Для ризогенезу пагонів використовувати експлантати сортів троянди розміром від 1,0 см.

3. Запропоновано способи оцінки технологічності сортів та модель оптимізації циклічного процесу мікроклонального розмноження рослин-регенерантів троянди ефіроолійної.

4. Для адаптації регенерантів сорту Лань рекомендовано застосовувати двокомпонентні субстрати.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Олійник О. О., Клюваденко А. А., Ліханов А. Ф., Мельничук М. Д. Вплив фенольних сполук на ефективність уведення сортів *Rosa damascena* Mill. у культуру *in vitro*. Вісник аграрної науки. 2016. № 2. С. 28–31. *(Здобувачем особисто визначено кількість фенольних сполук у рослинному матеріалі, отримано асептичний матеріал).*
2. Олійник О. О. Особливості добору субстратів для адаптації рослин-регенерантів троянди ефіроолійної до умов *in vivo*. Вісник Полтавської державної аграрної академії. 2018. № 1. С. 143–146.

Статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних:

3. Олійник О. О., Клюваденко А. А., Мельничук М. Д. Покращення складу живильних середовищ для прискорення росту і розвитку троянди ефіроолійної в культурі *in vitro*. Науковий вісник Національного лісотехнічного університету України. 2016. Вип. 26.7. С. 134–139. *(Здобувачем особисто підібрано живильні середовища та їх компоненти, підготовлено матеріали до друку).*
4. Олійник О. О., Мельничук М. Д., Клюваденко А. А., Ліханов А. Ф. Анатомо-гістохімічні особливості пагонів перспективних сортів троянди ефіроолійної. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів та природокористування України. 2016. № 7. 2016. Режим доступу до статті: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nd_2016_7_5. *(Здобувачем особисто зроблено анатомічні зрізи пагонів рослин та проведено гістохімічні реакції).*
5. Олійник О. О. Непрямий морфогенез та регенераційна здатність тканин троянди ефіроолійної. Науковий вісник Національного лісотехнічного університету України 2017. Т. 27. № 1. С. 69–72.

Статті в інших наукових виданнях України:

6. Олійник О. О., Клюваденко А. А., Ліханов А. Ф., Мельничук М. Д. Особливості нагромадження фенольних сполук у експлантатах троянди ефіроолійної в умовах *in vitro*. Інтродукція рослин. 2017. № 1 (73). С. 97–102. *(Здобувачем визначено кількість фенольних сполук у рослинному матеріалі, зроблено анатомічні зрізи пагонів, підготовлено матеріали до друку).*
7. Олійник О. О., Ліханов А. Ф., Мельничук М. Д. Вплив оксикоричних і оксibenзойних кислот на метаболізм та регенераційні процеси в експлантатах троянди ефіроолійної у культурі *in vitro*. Біологічні системи. 2017. Т. 9. Вип. 1. С. 33–38. *(Здобувачем підібрано різні оксibenзойні і оксикоричні кислоти та приготовано середовище з їхніми різними концентраціями, субкультивовано рослини, підготовлено матеріали до друку).*

Науково-методичні рекомендації

8. Клюваденко А. А., Ліханов А. Ф., **Олійник О. О.**, Костенко С. М., Оверченко О. В. Науково-методичні рекомендації з використання біотехнологічних методів в одержанні безвірусного посадкового матеріалу троянди ефіроолійної: спосіб регенерації *in vitro* безвірусних рослин цінних сортів троянди ефіроолійної. К. 2016. 82 с. *(Здобувачем особисто отримано асептичний матеріал троянди ефіроолійної, підібрано живильні середовища та їх компоненти для мікроклонального розмноження рослин, підібрано субстрати та спосіб адаптації, адаптовано рослини до умов in vivo, підготовлено матеріали до друку).*

Патент України на корисну модель

9. Клюваденко А. А., **Олійник О. О.**, Ліханов А. Ф., Костенко С. М. Патент 107143 UA, МПК А01Н 5/00 (2016.01) А01Н 4/00 (2016.01) Спосіб стерилізації експлантатів троянди ефіроолійної; власник Національний університет біоресурсів та природокористування України. № 201511157; заявлено 13.11.2015; опубліковано 25.05.2016; Бюл. № 10.

Тези наукових доповідей:

10. **Олійник О. О.**, Клюваденко А. А., Мельничук М. Д. Отримання асептичної культури троянди ефіроолійної. Біотехнологія: звершення та надії: IV Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених, м. Київ, 21–22 травня 2015 року: тези доповіді. К., 2015. С. 155–156. *(Здобувачем особисто підібрано схему стерилізації рослинного матеріалу, отримано асептичний матеріал).*

11. **Олійник О. О.**, Клюваденко А. А., Ліханов А. Ф., Мельничук М. Д. Вплив сортоспецифічності вторинного метаболізму троянди ефіроолійної на регенераційну здатність у культурі *in vitro*. Охорона біорізноманіття та історико-культурної спадщини у ботанічних садах та дендропарках: Міжнародна наукова конференція, м. Умань, 6–8 жовтня 2015 року: тези доповіді. Умань, 2015. С. 111–112. *(Здобувачем особисто отримано дані спектрофотометричного аналізу загального вмісту фенольних сполук у рослинному матеріалі, підготовлено матеріали до друку).*

12. **Олійник О. О.**, Клюваденко А. А., Мельничук М. Д. Розробка біотехнологічних прийомів розмноження троянди ефіроолійної (*Rosa damascena* Mill). Молодь і поступ біології: XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, м. Львів, 19–21 квітня 2016 року: тези доповіді. Львів, 2016. С. 130–131. *(Здобувачем особисто підібрано живильні середовища та їх компоненти для культивування рослин в умовах in vitro).*

13. Олійник О. О. Особливості введення в культуру *in vitro* сортів троянди ефіроолійної (*Rosa damascena* Mill.). Лікарські рослини: традиції та перспективи досліджень: III Міжнародна наукова конференція, с. Березоточа, 14–16 липня 2016 року: тези доповіді. К., 2016. С. 181–185.

14. **Олійник О. О.**, Клюваденко А. А., Мельничук М. Д. Розробка та оптимізація методики отримання калюсних культур сортів троянди

ефіроолійної. Біотехнологія: звершення та надії: V Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених, м. Київ, 12–13 травня 2016 року: тези доповіді, К., 2016. С. 85–86. (Здобувачем особисто отримано калюсну культуру троянди ефіроолійної, інтерпритовано результат та підготовлено матеріали до друку).

15. Олійник О. О. Стан фотосинтетичного апарату при адаптації рослин троянди ефіроолійної після культури *in vitro*. Наука у контексті сучасних глобалізаційних процесів: Міжнародна науково-практична конференція, м. Полтава, 19 листопада 2017 року: тези доповіді. Полтава, 2017. Т. 9. С. 7.

АНОТАЦІЯ

Олійник О. О. Оптимізація біотехнологічного процесу мікроклонального розмноження троянди ефіроолійної (*Rosa damascena* Mill.). – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата сільсько-господарських наук зі спеціальності 03.00.20 «Біотехнологія». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2019.

Оптимізовано біотехнологічний процес мікроклонального розмноження рослин сортів троянди ефіроолійної, яка включає активацію росту меристем експлантата, прямий і непрямий морфогенез та дозволяє одержувати в стислі строки значну кількість рослин-регенерантів. Підібрано оптимальні концентрації регуляторів росту, мінеральних і вуглеводних компонентів живильного середовища для різних етапів та типів морфогенезу. Визначено оптимальні умови індукції калюсоутворення та показано морфогенетичну здатність отриманого калюсу. Підібрано умови ризогенезу, ґрунтові суміші та субстрати для поетапної процедури ступеневої адаптації рослин-регенерантів до умов відкритого ґрунту із приживлюваністю 95–98 % для сортів троянди ефіроолійної Лань, Лада та Радуга. Розроблено математичну модель циклічного біотехнологічного процесу мікроклонального розмноження троянди ефіроолійної, яка ґрунтується на базових фізіологічних ознаках модельних сортів і дозволяє оптимізувати технологію безперервного отримання якісного садивного матеріалу протягом тривалого часу.

Ключові слова: троянда ефіроолійна, мікроклональне розмноження, *in vitro*, рослини-регенеранти, прямий морфогенез, калюс, вторинні метаболіти, фенольні сполуки, *ex situ*.

АННОТАЦИЯ

Олейник О. А. Оптимизация биотехнологического процесса микроклонального размножения розы эфиромасличной (*Rosa damascena* Mill.). – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 03.00.20 «Биотехнология». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2019.

Оптимизирован биотехнологический процесс микроклонального размножения растений сортов розы эфиромасличной, которая включает активацию роста меристем эксплантата, прямой и непрямой морфогенез и позволяет получить в сжатые сроки значительное количество растений-регенерантов. Подобраны оптимальные концентрации регуляторов роста, минеральных и углеводородных компонентов питательной среды для различных этапов и типов морфогенеза. Определены оптимальные условия индукции калюсообразования и показана морфогенетическая способность полученного каллуса. Подобраны условия ризогенеза, грунтовые смеси и субстраты для поэтапной процедуры ступенчатой адаптации растений-регенерантов к условиям открытого грунта с приживаемостью 95–98 % для сортов розы эфиромасличной Лань, Лада и Радуга. Разработана математическая модель цикличного биотехнологического процесса микроклонального размножения розы эфиромасличной, которая основывается на базовых физиологических признаках модельных сортов и позволяет оптимизировать технологию непрерывного получения качественного посадочного материала в течение длительного времени.

Ключевые слова: роза эфиромасличная, микроклональное размножение, *in vitro*, растения-регенеранты, прямой морфогенез, каллус, вторичные метаболиты, фенольные соединения, *ex situ*.

ANNOTATION

Oliynyk O. O. Optimization of Biotechnological Process of Microclonal Propagation for Rose Essential Oil (*Rosa Damascena* Mill.). – The Manuscript.

The thesis for a Candidate Degree of Agricultural Sciences, in specialty 03.00.20 Biotechnology. National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2019.

The Thesis presents theoretical justification according to biochemical, physiological and histochemical features of the *Rosa damascena* Mill. varieties influence on its morphogenetic potential in the *in vitro* culture and explores the possibility of using the method of microclonal propagation for getting high-quality planting material as an element of intensive technologies for introduction into production. The biotechnological process of planting material obtaining for high-yielding varieties of rose essential oil cultivation has been optimized with the study of the morphogenetic, physiological and anatomical potential of their tissues and organs *in vitro*. The research materials were the model varieties *Lan'*, *Lada* and *Raduga* of *Rosa damascena* Mill. It has been shown that the activation of polyphenol synthesis occurs responding to traumatic damage of primary explants tissues under conditions of plant introduction into *in vitro* culture. The qualitative composition and the amount of polyphenols and condensed tannins the leaves of *Rosa damascena* Mill. were a marker for shoots as potential ability to the regeneration. It was found that in case if the concentration phenolic compounds in the leaves of primary explants were below 60 mg/g, the efficiency of plants introduction into *in vitro* culture increases significantly. The analysis of the donor material on the occurrence of the secondary

metabolites made it possible to predict how the plant would adapt to the *in vitro* culture conditions.

For *Rosa damascena* Mill. mass microclonal propagation by method of meristem activation Anderson medium, MS, QL, and WPM were used, using cytokinins and auxins: BAP, TDZ, NAA and IAA both individually and in combination. For microclonal propagation and getting plant-regenerant of *Lan'* varieties were used MS+0.5 mg/l BAP+0.01 mg/l IAA, MS+0.1 mg/l TDZ and QL+0.5 mg/l BAP. The minimum multiplication factor was 1:8, the maximum – 1:14, the length of shoots was from 3.0 to 5.0 cm. For the root system formation regenerating plants were subcultured on the hormonal nutrient media ½ MS, MS, and QL, root length 2.5–8.0 cm. The total duration of the cultivation cycle was 50 days. Microclonal propagation of *Lada* variety was performed on Anderson media+0.5 mg/l BAP; QL+2.0 mg/l BAP; WPM+1.5 mg/l BAP+0.1 mg/l NAA. The root system was formed on the medium ½ MS, but not developed good (2–3 roots with a length of 1.0 to 2.0 cm), meanwhile the shoots height ranged from 2.0 to 3.5 cm. The minimum breeding factor is 1:2, the maximum is 1:4. The *Lada* variety had the longest cultivation cycle which lasted 80–90 days. For the microclonal propagation of the *Raduga* variety, the explants were transferred to MS medium+0.1 mg/l TDZ. Under these cultivation conditions the minimum multiplication factor was 1:3, the maximum – 1:7, the shoots length ranged from 1.0 to 2.0 cm. Rhizogenesis occurred on the medium ½ MS and Anderson medium with a double Fe²⁺+2.0 mg/l BAP, root length 1.0–1.5 cm. The cultivation cycle was 50–65 days. It was proved that in the zone of contact with living tissues oxybenzoic (vanillic, syringic, gallic) and oxycynamic (p-coumaric, caffeic, ferulic) acids in the composition of the nutrient medium (conc. 1 mM/l) initiate callusogenesis. In the process of *Rosa damascena* Mill. model varieties cultivation a tendency of explants regenerative capacity increased rapidly with its subsequent decrease. This sort-specific feature makes it possible to consider the *Lan'* variety are technologically attractive, since the intensity of regenerating plants production has remained high (13.5) for up to 24 months. In contrast, the high-phenolic varieties *Raduga* and *Lada* showed relatively low reproduction rates of 4.2 and 5.7, respectively. According to the results of propagation, we have developed a mathematical model of cyclic biotechnological process of *Rosa damascena* Mill. microclonal propagation, which is based on the basic physiological characteristics of model varieties and allows to optimize the technology of continuous production of quality planting material for a long time. The conditions of rhizogenesis, soil mixtures and substrates for the step-by-step procedure of stepwise adaptation of regenerated plants for the open ground conditions with a survival rate of 95–98 % for species of *Rosa damascena* Mill. *Lan'*, *Lada* and *Raduga* were selected.

Key words: *Rosa damascena* Mill., microclonal propagation, *in vitro*, regenerant plants, direct morphogenesis, callus, secondary metabolites, phenolic compounds, *ex situ*.