

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ПОГОДЖЕНО
Декан факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології
_____ Коломієць Ю.В.
“ ___ ” _____ 20__ р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття
_____ Кваско О.Ю.
“ ___ ” _____ 20__ р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему «Мікроклональне розмноження горицвіту весняного
Adonis vernalis L.»**

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Екологічна біотехнологія та біоенергетика _____

Орієнтація освітньої програми ___ освітньо-професійна _____

Гарант освітньої програми
д.с.-г.н., професор

_____ **Лісовий М.М.**

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи
д.с.-г.н., професор

_____ **Коломієць Ю.В.**

Виконав

_____ **Бутко М.О.**

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри екобіотехнології та
біорізноманіття

к.б.н., доцент _____ Кваско О.Ю.
“ _____ ” _____ 20__ року

З А В Д А Н Н Я

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Бутко Михайлу Олександровичу

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Екологічна біотехнологія та біоенергетика

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Мікроклональне розмноження горицвіту
весняного *Adonis vernalis* L.»

затверджена наказом від “07” листопада 2024 р. №2005 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру «14» листопада 2025 року

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Дослідження впливу мінерального складу живильного середовища та регуляторів
росту на морфогенез *Adonis vernalis*
2. Регенерація пазушних бруньок *Adonis vernalis*
3. Формування кореневої системи *Adonis vernalis*
4. Одержання рослин-регенерантів *Adonis vernalis* та адаптація до умов *ex vitro*

Перелік графічного матеріалу: рисунки, таблиці

Дата видачі завдання “01” жовтня 2024 р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи _____ Коломієць Ю.В.

Завдання прийняв до виконання _____ Бутко М.О.

РЕФЕРАТ

Магістерська кваліфікаційна робота виконана на 55 сторінках, містить 6 таблиць, 6 рисунків, 63 джерела використаної літератури.

Метою роботи було мікроклональне розмноження горицвіту весняного *Adonis vernalis* L.

Для регенерації мікропагонів *Adonis vernalis* використовували різні концентрації комбінацій регуляторів росту 6-БАП, ІОК, НОК 0,5. На живильному середовищі МС за комбінації 6-БАП 0,1 мг/л та НОК 0,1 мг/л спостерігали проліферацію калюсної тканини *Adonis vernalis* в умовах *in vitro*. Показано, що додавання 0,5 мг/л НОК, 0,5 мг/л ІОК, 0,5 мг/л ІМК у живильне середовищі індукувало утворення коренів інтенсивніше порівняно із середовищем без регуляторів росту. У дослідженні було виявлено, що збільшення концентрації сахарози призвело до прискорення росту коренів у рослин-регенерантів *Adonis vernalis*. Адаптація рослин-регенерантів *Adonis vernalis*, вирощених у різних умовах, показала, що найоптимальнішим субстратом була суміш кокосового субстрату та піску (3:1).

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Дослідження вторинних метаболітів лікарських рослин	9
1.1.1. Вторинні метаболіти в культурах рослинних клітин і тканин	12
1.2. Фітохімія сполук рослин <i>Adonis L.</i>	15
1.3. Мікророзмноження лікарських рослин <i>in vitro</i> методом культури тканин	20
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	28
2.1. Об'єкт дослідження	28
2.2. Вирощування рослини-донора	29
2.3. Стерилізація живильного середовища та посадкового матеріалу	29
2.4. Вибір живильного середовища та регуляторів росту для розмноження експлантатів <i>Adonis vernalis in vitro</i>	30
2.5. Мікроклональне розмноження та укорінення експлантатів <i>Adonis vernalis</i>	32
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ	33
3.1. Вплив мінерального складу живильного середовища та регуляторів росту на морфогенез <i>Adonis vernalis</i>	33
3.2. Регенерація пазушних бруньок <i>Adonis vernalis</i>	37
3.3. Формування кореневої системи <i>Adonis vernalis</i>	39
3.4. Одержання рослин-регенерантів <i>Adonis vernalis</i> та адаптація до умов <i>ex vitro</i>	44
ВИСНОВКИ	48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	49

ВСТУП

Рід *Adonis L. (Ranunculaceae)*, що походить з Європи та Азії, включає 32 однорічні або багаторічні трав'янисті види та росте в помірних регіонах північного півкулі [15, 16]. Рід був назв на честь грецького міфологічного персонажа, а види *Adonis* здавна використовують у європейській та китайській народній медицині завдяки їх серцево-судинній дії. Через виражене вплив на серцеві захворювання дослідники почали зосереджувати увагу на роді *Adonis* [18]. З розвитком досліджень фітохімії з рослин цього роду було виділено більшу кількість сполук. Сполуки, що виявляють значну серцево-судинну активність, були в першу чергу класифіковані як серцеві глікозиди. Ці звіти додатково підтвердили традиційне використання цих рослин для покращення серцевої діяльності [18]. Крім того, були ідентифіковані флавоноїди, каротиноїди, кумарини та інші структурні класи, а також виявлена додаткова фармакологічна активність, включаючи антиангіогенну, антибактеріальну, антиоксидантну та протизапальну активність, а також вплив на центральну нервову систему, сечогінний ефект та акарицидну активність. Ці нещодавно відкриті сполуки та їхня раніше невідома біоактивність сприяли розвитку роду *Adonis*.

Наприкінці 19 століття спостерігалася серцево-судинна активність горицвіту весняного (*Adonis vernalis L.*), поширеного у Євразійському регіоні. А з початку 20 століття екстракти цього рослини, збагачені серцевими глікозидами, готували для лікування хронічної серцевої недостатності у Німеччині. У Китаї та інших країнах Східної Азії, включаючи Корею та Японію, *A. amurensis* Regel & Radde вивчали та використовували для лікування серцевих захворювань у середині 20 століття через дефіцит кардіотонічних засобів. Крім того, стала очевидною токсичність цих рослин, і спостерігалися випадки отруєння, викликаного горицвітом весняним, як у людей, так і у тварин.

Adonis vernalis L. (*Ranunculaceae* Juss.), горицвіт весняний – трав'янистий багаторічник, криптофіт. *A. vernalis* – раритетний вид, занесений до Червоної книги України; охоронний статус – «неоцінений». Наукове значення – Євролісостеповий вид. В Україні росте на півдні Полісся (рідко), у Лісостепу, Степу, Криму. Приурочений переважно до лучних степів, рідше росте у справжніх степах, на узліссях, у світлих розріджених лісах; мезоксерофіт [22]. Щодо вирощування на інших континентах світу, то *A. vernalis* інтродукований у Нью-Йорку, США (POWO, 2023). Вид внесений до Додатку II «Конвенції про міжнародну торгівлю видами дикої фауни і флори, що перебувають під загрозою зникнення» (CITES, 2023).

A. vernalis – декоративна та лікарська рослина. З лікувальною метою використовують надземні пагони, які містять серцеві глікозиди: адонітоксин, цимарин, К-строфантин- β , ацетиладонітоксин, адонітоксол, вернадигін та інші. Трава містить геніни: β -строфантин, строфадогенін, ацетил-строфадогенін та інші; флавоноїди: адоніверніт, вітексин, гомоадоніверніт, фітостерин, спирт адоніт тощо. *A. vernalis* має кардіотонічну дію, уповільнює ритм серця, подовжує діастолу, посилює систолу, збільшує ударний об'єм крові, помірно гальмує внутрішню серцеву провідність. В останні п'ять років наводився детальний огляд глікозидів та інших сполук *A. vernalis* [18]. Рослини *A. vernalis*, їхні екстракти та активні компоненти мають серцево-судинну, антиангіогенну, антибактеріальну, антиоксидантну, протизапальну, акарицидну та сечогінну дію і впливають на центральну нервову систему [18]. Наночастинки срібла, біосинтезовані екстрактом *A. vernalis*, можна застосовувати для лікування раку [19]. *A. vernalis* використовується у гомеопатії [12], має алелопатичні ефекти [5].

В Україні проводились дослідження *A. vernalis* у природі та культурі. Природні запаси *A. vernalis* сильно скоротилися через

розорювання степів, терасування та заліснення схилів, великі об'єми заготівлі, збирання на букети. Тому, актуальним є вирощування та збереження цього виду у спеціально створених умовах, зокрема у ботанічних садах. В Україні *A. vernalis* представлений у багатьох ботанічних установах, як декоративна рослина [15].

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Дослідження вторинних метаболітів лікарських рослин

Adonis L. – це рід рослин батьківщини лютикових (*Ranunculaceae*), широко визнаний у традиційній медицині за свій вплив на серцево-судинну систему. Рід назв на честь Адоніса, персонажа грецької міфології, коханця богині Афродіти (Венери). Види Адоніса, що походять з Європи та Азії, також були інтродуковані до Північної Америки. Вони процвітають у різноманітних екологічних умовах, починаючи від високогірних регіонів та континентальних чи середземноморських напівпустель та закінчуючи помірними зонами. Їх поширення охоплює західний край Європи (наприклад, Британські острови) до Західного та Східного, із кліматом, що варіюється від континентального та різко континентального до регіонів Далекого Сходу з впливом мусонів [1, 2].

Відповідно до Переліку рослин, рід Адоніс налічує 35 видів однорічних та багаторічних трав'янистих квіткових рослин. Серед них сім видів зареєстровано: *Adonis apennina* L., *Adonis villosa* Ledeb., *Adonis tianschanica* (Adolf.) Lipsch., *Adonis chryzocyathus* Hook. f. та ін., *Adonis vernalis* L., *Adonis wolgensis* Siev., *Adonis aestivalis* L. [3, 4].

Цей рід привернув значну увагу завдяки своїм кардіотонічним ефектам. Досягнення фітохімії призвели до ідентифікації чисельних біологічно активних сполук, включаючи понад 50 сердечних глікозидів, які є ключовими факторами його терапевтичного потенціалу. Інші сполуки, такі як флавони, каротиноїди та кумарини, були виділені та виявляють різноманітні фармакологічні властивості, включаючи антибактеріальну, антиоксидантну та протизапальну активність. На сьогоднішній день у видів *Adonis* було виявлено понад 120 різних хімічних сполук, що підкреслює їх цінність як джерела лікарських засобів [5].

Фармакологічний потенціал адонісу, особливо у серцево-судинній медицині, давно визнаний. Ранні дослідження, такі як дослідження Хейла та ін. [6], підкреслили кардіотонічний ефект *A. vernalis*, продемонструвавши його здатність викликати систолу у препаратах серця жаби. Подальші дослідження підтвердили ці висновки, показавши ефективність, порівнянну з ефективністю дигіталісу у різних біологічних аналізах [7, 8]. Дослідження також поширилися на інші види, такі як *A. amurensis*, який посилює скоротливість серця та замедлює атріовентрикулярну провідність [9], а також *A. brevistyla* та *A. pseudoamurensis*, обидва з яких є перспективними у лікуванні серцевої недостатності [10, 11].

Крім кардіотонічної дії, види горицвіту демонструють різноманітні фармакологічні властивості. Наприклад, протизапальні властивості, включаючи пригнічення фактора некрозу опухли- α (TNF- α), спостерігалися в екстрактах *A. vernalis* [12]. Екстракти *A. wolgensis* демонструють антимікробну ефективність проти таких патогенів, як *Salmonella enteritidis* та *Escherichia coli*. Крім того, антиоксидантна активність, що пояснюється фенольними сполуками, очевидна в аналізах поглинання вільних радикалів [13].

Рослини адонісу також демонструють цитотоксичну дію проти злоякісних клітинних ліній, при цьому такі сполуки, як амуренсіозиди та цимарині, демонструють значну активність [14, 15]. Ці антиангіогенні властивості [16] пропонують потенційне застосування у терапії раку. Інші помітні властивості включають сечогінну дію, що спостерігається у *A. coerulea* як традиційного тибетського засобу, та акарицидні властивості, що ще раз підкреслює терапевтичну універсальність роду [17, 18].

Ці висновки свідчать про те, що адоніс є цінним джерелом біологічно активних сполук і підкреслюють необхідність подальшого вивчення його фармакологічного потенціалу.

Наразі актуальним є пошук нових біологічно активних сполук та альтернативних методів їх отримання. Цінними джерелами є рослинна сировина та продукти її переробки. Цінність визначається вмістом як первинних, так і вторинних метаболітів, зокрема алкалоїдів, глікозидів, танінів, сапонінів, фенольних сполук, вітамінів тощо. Більшість із цих речовин важко синтезувати, оскільки вони мають складну хімічну структуру, тому єдиним місцем знаходження біологічно активних речовин є вищі рослини. Високий споживчий ефект препаратів, що містять сполуки природного походження, зумовлений багатьма перевагами, такими як низька токсичність, висока ефективність, низькі побічні ефекти та наявність вторинних метаболітів. Сировинною базою для отримання цих сполук є природні ресурси лікарських рослин. Наразі арсенал лікарської рослинної сировини обмежений, оскільки антропогенний вплив швидко зростає, кліматичні умови змінюються, і це значно впливає на біологічні особливості рослин. Сучасні методи біотехнології пропонують вирішення проблеми шляхом отримання біомаси *in vitro*, як альтернативного джерела вторинних метаболітів. Цей метод має багато переваг: біомаса зростає в контрольованих умовах, є екологічно чистим, метод не залежить від кліматичних умов, тому біомаса може накопичуватися швидше та цілий рік.

Лікарська рослина горицвіт весняний має особливу цінність як джерело вторинних метаболітів. Ця рослина знаходиться під загрозою зникнення, тому використання біотехнологічного методу для отримання калюсної біомаси є доцільним та перспективним. Горицвіт весняний має високу кардіологічну активність завдяки вмісту серцевих глікозидів (цимарин, К-строфантин- β), кумаринів. Він також містить сапоніни, бензохінони, флавоноїди, органічні кислоти, стероїдні сапоніни, аскорбінову кислоту, провітамін А, мікро- та макроелементи.

1.1.1. Вторинні метаболіти в культурах рослинних клітин і тканин

На відміну від людей і тварин, рослини не є рухливими, що робить їх дуже вразливими до атак шкідників і хижаків. Щоб подолати цю проблему, під час метаболізму рослини виробляють величезну кількість сполук як частину захисного механізму [8, 50]. Ці сполуки не є необхідними для основних функцій, таких як ріст, фотосинтез і розмноження, і називаються вторинними метаболітами. Вторинні метаболіти використовуються як фармацевтичні препарати, агрохімікати, ароматичні речовини та харчові добавки [8, 31]. Сполуки рослинного походження включають багато терпенів, поліфенолів, карденолідів, стероїдів, алкалоїдів та глікозидів [6, 43].

Хімічний синтез багатьох із цих метаболітів можливий лише у рослин [41], що призводить до надмірної експлуатації та загрози зникнення багатьох видів лікарських рослин [8]. Тотипотентність рослинних клітин гарантує, що вони містять повні генетичні характеристики рослини, що дає змогу синтезувати ці сполуки *in vitro*. Культура тканин пропонує ефективну та потенційну альтернативу виробництву метаболітів, оскільки кількість вторинних метаболітів, що утворюються в культурах тканин, може бути навіть вищою, ніж у материнських рослинах [41-42]. Досягнення в культурі рослинних тканин дозволили виробництво рослинних метаболітів у промислових масштабах.

Через брак знань про біосинтетичні шляхи, які утворюють метаболіти в рослинах, лише невелика кількість сполук отримують з тканинних культур у промислових масштабах [21-22]. Необхідно вирішити певні проблеми, щоб тканинні культури можна було використовувати для збільшення виробництва вторинних метаболітів у більшій кількості видів рослин. Однією з основних проблем є гетерогенність рослинних клітин та відмінність морфологічних характеристик кожної окремої клітини від інших [63], що має величезний вплив на вихід метаболітів. Щоб подолати цю проблему, високопродуктивні

клітини ідентифікують, а потім клонують для отримання більшої кількості клітин з подібними характеристиками. Повідомляється, що ретельний відбір може збільшити виробництво метаболітів у кілька разів [21]. Ще одна проблема полягає в тому, що рослинні клітини великі, а негнучка клітинна стінка часто може бути схильна до пошкоджень промисловим обладнанням [63]. Клітини в культурах мають тривалий час росту та розмноження, тому виробничі процеси є дуже трудомісткими. У клітинних культурах вторинні метаболіти зберігаються у вакуолях, а їх вивільнення можливе лише через проникні мембрани. Було проведено значні дослідження для підтримки життя клітин при одночасному індукуванні проникності [21, 23].

Фактори, що впливають на виробництво вторинних метаболітів

Синтез вторинних метаболітів безпосередньо пов'язаний з фізичними та хімічними умовами [6, 53]. Багато дослідників повідомляли про значний вплив маніпуляцій зі складом середовищ, гормонами росту, температурою та фотоперіодом на виробництво метаболітів [6].

Джерело вуглецю: Сахароза є поширеним джерелом вуглецю та має значний вплив на вихід метаболітів з культур *in vitro* [27]. Виробництво розмарінова кислоти посилювалося зі збільшенням рівня сахарози в культуральному середовищі [28]. Було також виявлено, що використання глюкози (у середовищі MS) замість сахарози як джерела вуглецю посилює вироблення подофілотоксину в клітинних культурах *Podophyllum hexandrum* [29].

Формула середовища: Склад культурального середовища може впливати на вихід активних інгредієнтів [6, 20]. У суспензійних культурах *Catharanthus roseus* повідомлялося, що середовище MS найкраще підходить для виробництва серпентину [21]. Ці ефекти залежать від типу середовища та виду рослин.

Температура: Коливання температури, фотоперіоду та рН можуть спричинити значну різницю у виході продукту [57]. У культурах *Podophyllum*

hexandrum культури, вирощені в темряві, утворювали кращі пухкі калюси та вищий вміст подофілотоксину, ніж ті, що вирощувалися на світлі [15].

Перемішування: Повідомляється, що швидкість перемішування культивованих клітин впливає на життєздатність клітин та синтез продукту. Клітини *Podophyllum hexandrum*, вирощені *in vitro*, показали набагато більше пошкоджень при 200 об/хв, а більше життєздатних клітин було виявлено між швидкостями 125-150 об/хв [15].

Фосфат: Було доведено, що рівень фосфату в середовищах для культивування рослинних клітин впливає на виробництво вторинних метаболітів. У різних культурах рослинних клітин було помічено, що ріст клітин стимулюється, але вихід метаболітів знижується при вищих кількостях фосфату [21]. Повідомлялося, що виробництво аймаліцину та фенолів у *Cath. roseus*, кофеоїлпутресцинів у *Nicotiana tabacum* та алкалоїдів гарману у *Reganum harmala* збільшується при нижчих рівнях фосфату [41].

Азот: Як спостерігалось, вихід метаболітів, що містять білки або амінокислоти, залежить від кількості азоту в середовищах для культивування. Джерело азоту є важливим компонентом деяких середовищ для культивування, наприклад, для MS, LS або B5 [38, 41, 43].

Гормони росту рослин: Відомо, що рівень гормонів росту впливає на вироблення метаболітів [54]. Наприклад, повідомлялося, що PGR 2,4-Д припиняє вироблення метаболітів [43], тоді як при застосуванні НОК або ІОК спостерігалось збільшення синтезу метаболітів [61]. У *Catharanthus roseus* ауксини сприяли індукції калюсу, але видалення ауксину та цитокініни окремо збільшували вироблення вторинних метаболітів [53]. Завдяки поєднанню 2,5 мг/л ІМК та 0,1 мг/л кінетину, вироблення гінзенозидних сапонінів у клітинних культурах *Panax quinquefolium* було навіть вищим, ніж у дорослих рослин [17].

Склад газу: Концентрація газів у середовищі культури може суттєво впливати на вихід метаболітів [6, 8]. У культурах женьшеню *Panax* в

біореакторі спостерігалось, що 40% кисню в середовищі культури давало найвищий вихід сапоніну, тоді як вихід знижувався при вищих (50%) та нижчих (20,8% та 30%) концентраціях [18].

Добавка попередників: додавання до клітинних культур сполуки, яка також утворюється під час шляху виробництва вторинних метаболітів, називається підживленням прекурсорів. Повідомлялося, що цей процес підвищує вихід кінцевих продуктів у багатьох клітинних культурах [21].

1.2. Фітохімія сполук рослин *Adonis L.*

З моменту виділення першої сполуки з рослин Адоніса на початку 19 століття на сьогоднішній день було виділено та ідентифіковано понад 120 сполук. П'ятдесят чотири сполуки серцевого глікозиду були ідентифіковані як активні компоненти. Крім того, були також виділені та описані флавонони, каротиноїди, кумарини та інші сполуки.

Серцеві глікозиди та інші глікозиди

Серцеві глікозиди є важливими активними сполуками роду *Adonis*. З моменту введення екстракту *A. vernalis* у медицину в 1879 році, було виділено та ідентифіковано все більшу кількість сполук. У 1918 році був розроблений метод отримання активного дигіталісоподібного глікозиду з *A. vernalis*. Згодом були виділені цимарин (1), адонітоксин (2), 16-гідроксифлаванон (3), ацетиладонітоксин (4), вернадігін (5) та 3-ацетилстрофадогенін (6). У 1965 році з листя *A. vernalis* був виділений новий глікозид, речовина N (7). Додаткові ізольовані сполуки включають строфантин фукозид (8), 3-*eni*-периплогенін (9), 17 β -(2',5'-дигідро-5'-оксо-3'-фурил)-5 β -14 β -андростан-3 α ,5 β ,14 β -тріол (10), адоніт оксигенін 2-*O*-ацетилрамнозидоксилосид (11), адонітоксигенін 3-*O*-ацетилрамнозидоксилосид (12), адонітоксигенін рамнозидоксилосид оксилосид (13) та цимарин [47]. Також були ідентифіковані адонітоксигенін 3-*O*-[β -D-глюкопіранозил-(1 \rightarrow 4)- α -L-рамнопіранозид (14),

адонітоксігенін 3- *O*- [β- D -глюкопіранозил-(1→4)-α- L- (3'- *O* -ацетил)-рамнопіранозид (15), адонітоксігенін-3-[*O* - α- L (2'- *O* -ацетил)рамнозидо-β- D -глюкозид (16) та 17β-(2',5'-дигідро-5'-оксо-3'-фурил)-5β-14β-андростан-3α,5β,14β-тріол (17) [53].

Адоніс алеппіка є ендемічним у Месопотамії та південно-східній Анатолії та тісно пов'язаний з *A. vernalis*, який використовується як серцевий тонік. У 1985 році були виділені 3- *eni* -периплогенін, периплорамнозид (18) та строфантин-дигінозид (19) [38]. Згодом був ідентифікований перший карденолід-сульфат узаригенін-3- *O* -сульфат (20), а також алепозиди А (21), В (22), С (23) та D (24); сарментоцимарин (25); та глікозидний кон'югат під назвою алепотріолозид (26), які також були виділені з усієї рослини [25].

Дослідження хімічних складових коренів *A. amurensis* триває з 1960-х років, за цей час було виділено та ідентифіковано понад 20 прегнанів та карденолідів. У 1971 році Пономаренко та ін. виділили вісім карденолідів, включаючи цимарин (1), сомалін (27), цимарол (28), строфантин (29), строфантидол (30), корхорозид А (31), конвалатоксин (32) та к-строфантин-β (33). Згодом з цієї рослини були ідентифіковані дигітоксігенін (34) та конвалозид (35). Кубо та ін. (2015) виділили п'ять нових карденолідових глікозидів, амуренсіозидів LP (36–40). У 2003 році фракціонування та виділення метанольного екстракту *A. amurensis* з урахуванням антиангіогенної активності призвели до ідентифікації трьох сполук, а саме: цимарину, цимаролу та цимарилової кислоти (41). Дигітоксігенін (34) був виділений як з *A. vernalis*, так і з *A. amurensis*.

Адоніс звичайний (Adonis aestivalis) – однорічна рослина з малиною квіткою, поширена по всій південній Європі та Азії. Яцюк та ін. вперше дослідили епігеальні фітохімічні речовини *A. aestivalis*, які включали строфантин та к-строфантин-β. У 1992 році з надземної частини рослин вперше було виділено чотири карденоліди, включаючи 3- *eni* -периплогенін, гелветикозид (42), строфантин-3- *O* -β- D -дигітоксозидо-α- L -

цимарозидо- β -D-глюкозид (43) та строфантин-3-O- β -D-дигітоксозидо- β -D-дигітоксозидо- β -D-дигінозидо- β -D-глюкозид (44); перші дві сполуки також були виділені з інших видів. Кубо та ін. (2012) досліджували хімічні сполуки в насінні *A. aestivalis*, і було виявлено новий карденолід $3\beta,5\alpha,14\beta,17\beta$ -тетрагідроксикард-20,22-енолід (45) разом з двома новими глікозидами 3β -[(O- β -D-глюкопіранозил)окси]- $5\alpha,14\beta,17\beta$ -тригідроксикард-20(22)-енолідом (46) та 3β -[(O- β -D-глюкопіранозил-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-глюкопіранозил)окси]- $5\alpha,14\beta,17\beta$ -тригідроксикард-20(22)-енолідом (47). Також було виділено новий гексаглікозид строфантину, строфантин 3-O- β -D-глюкопіранозил-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-глюкопіранозил-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-дигінопіранозил-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-олеандропіранозил-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-дигітоксопіранозил-(1 \rightarrow 4)- β -D-дигітоксопіранозил (48), а також строфантин 3-O- β -D-глюкопіранозид (49) [22].

A. multiflora походить з Кореї, Японії та Маньчжурії. У 2015 році амуренсіозид L (36) був виділений з усієї рослини [26]. *A. leiiosepala* дав цимарин та к-строфантин- β . Ці дві сполуки, разом зі строфантидином та конвалатоксином, були виділені з *A. wolgensis*. Строфантин, цимарин, к-строфантин- β , к-строфантозид (50) та адонітоксин були ідентифіковані в екстрактах *A. chrysocyathus*. Потім споріднена рослина *A. sibiricus* дала строфантин, к-строфантин- β , конвалатоксин та гкстуагоксин (51).

Ламжав (1975) виділив цимарин, адонітоксин, корхорозид А, к-строфантин- β , к-строфантозид, еризимозид (52), оліторозид (53) та глюкооліторозид (54) з *A. mongolica*. Комісаренко та ін. виділили карденоліди строфантин, цимарин та к-строфантин- β з *A. tianschanicus* та *A. turkestanicus*. Нарешті, сомалін, цимарин та конвалатоксин були ідентифіковані в *A. pseudoamurensis*.

Інші глікозиди

Shimizu та ін. ідентифікували аглікон-адонілід (55); три нові сполуки, а саме фукуджузон, складний ефір А (56) і складний ефір В (57); і похідне 18-

норпрегнану фукуджусонорон (58) у *A. amurensis*. Адонілід (55), фукуджузон (59), 12- *O*-нікотиноїлізолінеолон (лінеолон, 60), 12- *O*-бензоїлізолінеолон (61) і фукуюзонорон (58), разом з нікотиноїлізораманом (62), дигітоксігеніном та ізораманом (дигіпурпрогенін-II, 63) були виділені з *A. vernalis* і *A. amurensis*. Ізолінеолон (64) також був виділений з цієї рослини.

У 2010 році з екстрактів MeOH коренів *A. amurensis* було виділено п'ять нових прегнанових тетраглікозидів, відомих як амуренсіозиди А–Е (65–69); два нових прегнанових гексаглікозиди, амуренсіозиди F (70) та I (71); два нових 18-норпрегнанових гексаглікозиди, амуренсіозиди G (72) та H (73); та два нових прегнанових октаглікозиди, амуренсіозиди J (74) та K (75) [35]. Новий прегнановий гексаглікозид було виділено з усієї рослини [46].

Флавоони

Поряд з ізольованими серцевими сполуками було також ідентифіковано багато флавонів. Адоніверніт (лютеолін-8-гекситилмонооксид) (76), гомоадоніверніт (77), орієнтин (78), гомоорієнтин (79), ізоорієнтин (80), лютеолін (81) та вітексин (82) були виділені з *A. vernalis* [58], а адоніверніт також був знайдений в *A. leiosepala* [62].

Орієнтин, апігенін (83), лютеолін, ізоорієнтин і лютеолін 7-глюкозид (84) були виділені з *A. coerulea* Maxim. Ламжав виділив лютеолін, кемпферол (85), лютеоліну 7-глюкозид і орієнтин β-глюкозид (86) з *A. mongolica*, і були знайдені лютеолін, апігенін, апігенін-7-*O*-β-*D*-глюкуронід (87), орієнтин і ізокверцитрин (88). у *A. amurensis* [47]. Orientin був ідентифікований з *A. sibiricus*. Комісаренко та ін. ідентифікував флавоноїд орієнтин з *A. wolgensis*, тоді як орієнтин та адонівернітол були виділені з трав *A. tianschanicus* та *A. turkestanicus* [43].

Каротиноїди

У 1965 році астаксантин (90), разом із трьома другорядними червоними сполуками, відомими як гідроксіехіненон (91), адонірубін (4,4'-дикето-3-

гідрокси- β -каротин) (92) і адоніксантин (3,3'-гідрокси-4-кето- β -каротин) (93), були ідентифіковані з червоних квітів *A. annua* [50]. Астаксантин також було виявлено в *A. amurensis* [40]. Також було виділено 3,4-дикето- та 3,4,4'-трикето- β -каротин (94, 95) [44]. Також досліджували жирнокислотні компоненти кетокаротиноїдних ефірів, включаючи ефіри астаксантину (96), 3-гідроксиехіненону (97), 3,3'-дигідроксиехіненону (98) та 3-гідроксикантаксантину (99) [51]. У 1981 році було з'ясовано каротиноїдний склад пелюсток червоних квіток *A. annua*, який включав діестер адоніксантину (100), ефір 3-гідроксиехіненону (101), діестер *цис*-астаксантину (102), діестер *транс*-астаксантину (103), ефір адонірубіну (104), моноефір *цис*-астаксантину (105) та моноефір *транс*-астаксантину (106) [52]. У 1987 році з *A. aestivalis* також було виділено діестер астаксантину [45].

Кумарини

Два кумарини умбелліферон (107) і скополетин (108) були виділені з коренів *A. amurensis*, *A. wolgensis*, *A. leiosepala* і *A. mongolica*.

Мохаджерані та ін. (2014) вивчали жирні кислоти *A. wolgensis*, і результати показали, що ліноленова кислота (45,83%, 109) та олеїнова кислота (47,54%, 110) були найпоширенішими жирними кислотами, знайденими відповідно в листі та стеблах. Чжан та ін. виявили, що стигмаст-4-ен-3,6-діон (111), стигмаст-4-ен-3-он 6 β -гідрокси (112), β -D-глюкопіранозид (113), пальмітинова кислота (114), адонітол (115) та β -ситостерол (116) присутні в *A. coerulea*. 1-Гентріаконтанол (117) та *n*-формілциннамінова кислота (118) також були виявлені в цій рослині [24].

Новий тетраозид, цугорозид (119), був ідентифікований в екстрактах *A. chrysocyathus*, а п'ятиатомний спирт адонітол був знайдений в *A. mongolica* та *A. leiosepala*. З *A. aleppica* було виділено п'ять нових три-, тетра- та пентасахаридів, названих адолігозами АЕ (120–124), що складаються з рідкісних дидезоксицукрів та їх 3-ОМе ефірів.

Три лігнани, а саме: пінорезінол (125), пінорезінол-8-*O*- β -D-глюкопіранозид (126) та 9'-декарбоксірозмаринова кислота-4'-*O*-(1 \rightarrow 4)-галактозилрамнозид (127), були виділені з *A. amurensis* [26].

1.3. Мікророзмноження лікарських рослин *in vitro* методом культури тканин

З давніх часів людство залежало від рослин для харчування, смаку, лікування та багатьох інших цілей. Стародавні письмові записи багатьох цивілізацій (наприклад, єгипетської, римської, китайської) надають вагомі докази щодо використання лікарських рослин [1], наприклад, документи Аюрведи фіксують використання лікарських рослин для лікування багатьох захворювань [2-3].

Наразі існує багато добре зарекомендували себе методи лікування травами та рослинами (аюрведична медицина в Індії), які популярні в багатьох частинах світу. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) повідомила, що 80% людей у країнах, що розвиваються, використовують лікарські рослини для первинної медичної допомоги [4].

Використання лікарських засобів рослинного походження зростає в розвинених країнах, наразі 25% населення Великобританії використовують лікарські засоби рослинного походження [4-5]. Близько 40% сполук, що використовуються у фармацевтичній промисловості, прямо чи опосередковано походять з рослин [6-7], оскільки хімічний синтез таких сполук або неможливий, та/або економічно не вигідний [8]. Таким чином, велика кількість видів рослин (особливо лікарських) знаходиться під загрозою зникнення через їх надмірну експлуатацію [4, 7, 9].

За останні два десятиліття спостерігається значне зростання досліджень лікарських рослин. Було відкрито низку нових лікарських засобів та досягнуто прогресу в технології виробництва для збору важливих

фармацевтичних метаболітів. Протягом цього періоду також спостерігається збільшення кількості публікацій досліджень лікарських рослин.

Продовольча та сільськогосподарська організація ООН (ФАО) повідомила про збільшення експорту лікарських рослин з 375 000 тонн до вражаючих 600 000 тонн [30]. Світовий експорт, який оцінювався в 1,12 мільярда доларів США, зріс до 1,51 мільярда доларів США. Падіння цін за одиницю продукції було зумовлене збільшенням виробництва продукції [30]. Імпорт лікарських рослин також продемонстрував подібну тенденцію зростання за цей період. Китай, Гонконг, Сполучені Штати та Японія є основними імпортерами лікарських рослин та рослинних продуктів. В Європі Німеччина є найбільшим імпортером, оскільки там базується багато провідних світових фармацевтичних компаній [30]. Китай та Індія є найбільшими ринками лікарських рослин у світі. Іншими великими експортерами є Республіка Корея, Чилі, Бразилія та Таїланд [30].

Мікророзмноження

Мікророзмноження – це процес вегетативного росту та розмноження з тканин рослин або насіння. Він здійснюється в асептичних та сприятливих умовах на ростових середовищах, використовуючи різні методи культивування тканин рослин [5, 33-34]. Культивування тканин базується на концепції тотипотентності; здатності рослинних клітин і тканин розвиватися в цілісну нову рослину [35]. Готліб Хаберландт (1854-1945), німецький ботанік, вважається батьком культивування тканин рослин, першим відокремив і культивував рослинні клітини на розчині солі Кнопа в 1898 році [36].

При звичайному культивуванні багато рослин не проростають, не цвітуть і не дають насіння за певних кліматичних умов або мають тривалі періоди росту та розмноження. Мікророзмноження забезпечує хороше регулярне постачання лікарських рослин, використовуючи мінімальний простір і час [37]. Переваги мікророзмноження лікарських рослин *in vitro*:

1. Вища швидкість розмноження.
2. Навколишнє середовище можна контролювати або змінювати для задоволення конкретних потреб рослини.
3. Рослина доступна цілий рік (незалежно від регіональних чи сезонних коливань).
4. Ідентифікація та виробництво клонів з бажаними характеристиками.
5. Виробництво вторинних метаболітів.
6. Можливість отримання нових та покращених генетично модифікованих рослин.
7. Збереження видів рослин, що знаходяться під загрозою зникнення.
8. Збереження генетичного матеріалу шляхом кріоконсервації.

Експлант – це матеріал, який використовується як початкове джерело культури тканин. Успіх культури тканин головним чином залежить від віку, типу та положення експлантатів [38], оскільки не всі клітини рослин мають однакову здатність до прояву тотипотентності [10, 39-40]. Найчастіше використовуються експлантати – це кінчики пагонів, вузлові бруньки та кінчики коренів. Великі експлантати можуть збільшити ймовірність зараження, а малі експлантати, такі як меристеми, іноді можуть демонструвати менший ріст [35, 40].

Стерилізація. Мікробне забруднення культури рослинних тканин є поширеною проблемою [7, 35, 41]. Поширеними бактеріальними забруднювачами є *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* та *Lactobacillus* [33, 41-42]. Мікроби розмножуються та конкурують із зростаючими експлантатами за поживні речовини, вивільняючи при цьому хімічні речовини, які можуть змінювати середовище культивування, наприклад, рН, та пригнічувати ріст експлантатів або спричиняти їх загибель [40-41]. Експлантати очищують дистильованою водою та стерилізують за допомогою хлориду ртуті, етилового спирту та рідкого відбілювача [7, 37, 43]. Стерилізація лабораторних інструментів проводиться за допомогою

автоклавування, промивання спиртом, випікання, опромінення, полум'я та фумігації [44]. Значне зниження бактеріального забруднення спостерігалось за допомогою ультразвукового сонікатора [45].

Середовища для культивування містять життєво важливі поживні речовини та елементи для росту рослинних тканин *in vitro* [35, 38-39]. Вибір правильного складу середовища важливий для успішного культивування тканин [34, 38, 46]. Середовище містить джерело вуглецю (сахарозу), макро- та мікроелементи, вітаміни, гормони та інші органічні речовини [34-35]. Для культивування рослинних тканин доступний широкий спектр середовищ, але зазвичай використовується середовище MS [39] [34, 38-39]. Інші середовища, що використовуються, - це середовище Лінсмайєра-Скога (LS) [47], Шенка та Гільдербрандта (SH) [48], WPM (середовище для деревних рослин) [49] та середовище Нітша та Нітша (NN) [50]. Агар-агар не є необхідним компонентом середовища, але використовується як гелеутворювач [34, 44]. Він запобігає загибелі культивованих клітин через занурення та брак кисню в рідкому середовищі [34]. рН середовища для культивування зазвичай становить від 5,0 до 6,0, і також є дуже важливим, оскільки впливає на поглинання іонів [34].

Експлантати в культурах вивільняють фенольні сполуки, які окислюються ферментами, відомими як поліфенолоксидаза, і викликають побуріння середовища [7, 51]. Побуріння можна мінімізувати, додаючи антиоксиданти або фенольні абсорбенти, наприклад, аскорбінову кислоту, глутатіон, активоване вугілля та полівінілпіролідон [43], або переносячи експлантати в нові середовища для культивування через регулярні проміжки часу [7, 13].

Гормони росту регулюють різні фізіологічні та морфологічні процеси в рослинах і також відомі як регулятори росту рослин (PPR) або фітогормони [32, 52]. PPR синтезуються рослинами; тому багато видів рослин можуть успішно рости без добавок зовнішнього середовища [53-55].

Гормони також можна додавати в культури для покращення росту рослин та посилення синтезу метаболітів [34, 44]. Як спостерігалось у *V. Montanum* та багатьох інших видів, ріст та формування пагонів *in vitro* не досягалися без адекватних концентрацій екзогенних гормонів [10]. Однак недостатня або надмірна кількість гормонів росту може спричинити морфологічні та фізіологічні аномалії [56]. У таблиці 3 наведено різні типи гормонів та їх функції в рослинах.

Методи культивування тканин

Існує багато типів методів культивування тканин, доступних для мікророзмноження та регенерації рослин.

Калюсні культури

Калюс – це недиференційована маса тканини, яка з'являється на експлантатах протягом кількох тижнів після перенесення на середовище для росту з відповідними гормонами [34].

Утворення калюсу відбувається в результаті шанованого процесу диференціації клітин, відомого як дедиференціація або редиференціація [35]. Різні гормони росту використовуються для стимулювання індукції та розвитку калюсу. Нові рослини можна успішно регенерувати з калюсу шляхом органогенезу [58].

Суспензійні культури

Суспензійні культури утворюються *in vitro*, коли пухкі калюси вирощують на рідкому середовищі у відповідному контейнері та постійно перемішують, щоб забезпечити суспензію вільних клітин [34-35]. Конічні колби використовуються через їхню велику площу поверхні, що допомагає підтримувати рідке середовище та безперервний газообмін [35].

Суспензійні культури бувають двох типів: періодичні та безперервні. У періодичних культурах частина початкової клітинної суспензії береться та пересівається на свіже середовище через регулярні проміжки часу [34]. У безперервних культурах свіже середовище додається до існуючої культури, а

надлишки клітинних суспензій видаляються через регулярні проміжки часу [35].

Суспензійні культури широко використовуються у великомасштабному виробництві вторинних метаболітів [6]. Біореактори, такі як Chemostat, – це спеціально розроблені інструменти для проведення безперервних культур у великих масштабах [34].

Соматичний ембріогенез

Соматичний ембріогенез – це процес, за допомогою якого з рослинної тканини або клітини утворюється незиготичний ембріон, який може розвинути в нову рослину [59-60].

Формування соматичних ембріонів відбувається у два етапи: спочатку калюс культивується на середовищі, багатому на ауксини (зазвичай використовується 2,4-Д), утворюючи ембріогенні грудки, потім ці грудки переносяться в середовище без ауксинів, що призводить до утворення зрілих ембріонів [34, 59].

Ріст і формування зрілих ембріонів залежить від рівня ауксинів та азоту в середовищі [34]. Успішна регенерація рослин була досягнута у алое та винограду шляхом соматичного ембріогенезу [45, 61].

Культури протопластів

Протопласти – це рослинні клітини, в яких клітинна стінка була видалена ферментативним розщепленням або механічним процесом [34]. Протопласти виділяють шляхом занурення рослинної тканини в гіпертонічний розчин, що призводить до віддалення плазматичної мембрани від клітинної стінки [62]. Тепер клітинну стінку можна видалити ферментативним розщепленням (пектиназа та целюлоза) або механічними методами [34, 62]. Успішна регенерація рослин була досягнута шляхом культури протопластів у *A. judaica* та *E. spinosissimus* [63].

Формування пагонів

Для успішної регенерації рослин методом тканинної культури перші пагони формуються шляхом культивування експлантатів або калюсу на середовищах, що містять гормони росту (переважно цитокініни, але іноді також ауксини).

Для формування пагонів використовуються різні типи та концентрації гормонів росту. Навіть у одного виду рослин активність пагонів залежить від типу та рівня гормонів росту. Наприклад, найкраща індукція пагонів спостерігалася для *Aloe barbadensis* на середовищі MS, доповненому 2 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК [55]. Базове середовище, що містить 4 мг/л БАП та 1 мг/л ІОК, збільшувало кількість та швидкість росту кількох пагонів [61]. У той же час, вищі показники проліферації пагонів також були зареєстровані у *Aloe barbadensis* на середовищі MS, що містить 0,8 мг/л ІОК та 2,25 мг/л БА [62]. У випадку з алое вера, середовище MS, що містило 2,0 мг/л БА, 0,5 мг/л Кін та 0,2 мг/л НОК, показало швидке розмноження пагонів [66], а середовище MS, що містило 1,0 мг/л БА та 0,2 мг/л, показало найкращий ріст та найбільшу кількість пагонів у алое вера [63].

Утворення коренів

Після утворення здорових пагонів рослини пересаджують на різні середовища для утворення коренів. Ауксини в основному використовуються для індукції коренеутворення, і їхній ефект залежить від типу та концентрації, що використовуються в різних видах рослин [63]. НОК та ІМК є найчастіше використовуваними ауксинами [34]. Наприклад, у середовищі *Aloe barbadensis* MS, що містило 0,5 мг/л НОК, спостерігалася 95% вкорінення зі здоровим та товстим корінням, проте збільшення концентрації НОК знижувало якість та кількість коренів [55], а середовище MS, що містило 1 мг/л ІОК, було ефективнішим для вкорінення, ніж середовище без будь-яких гормонів росту [61]. У *Aloe vera* ІОК демонструвала дуже слабкий ефект при всіх концентраціях, тоді як середовище MS, що містило 0,2 мг/л НОК, дало найбільшу кількість коренів порівняно з 0,2 мг/л ІОК [60].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження

Горицвіт весняний, садовий різновид: *Adonis vernalis*

Загальний опис: Трав'яниста, багаторічна рослина із декоративним листям та квітами, висотою до 40 см., шириною до 60 см. Листя ажурне, поділене на довгі та вузькі частини. Квіти насичено-жовті, з блискучими пелюстками, з'являються з початку квітня. Рослина найбільш декоративна з квітня по червень.



Рис. 2.1. Зовнішній вигляд *Adonis vernalis*

Зона морозостійкості: 4а – рослина морозостійка на території всієї України.

Освітлення: Найкраще росте на яскравому сонці з легким притінення в полуденні години.

Грунт: Найкраще росте на суглинистому ґрунті з додаванням вапна. Потребує регулярного зволоження, витримує пересушення ґрунту. Погано реагує на застій вологи, особливо у холодну пору року. рН 6,5 – 8

Використання: Передній план міксбордерів та клумб. Кам'янисті гірки. Лікарська рослина.

Безпека рослини для людини: Рослина становить середню ступінь небезпеки для людини. Горицвіт весняний використовується як лікарська рослина, однак її неправильне вживання або застосування може спричинити отруєння.

2.2. Вирощування рослини-донора

У дослідженнях материнські рослини *Adonis vernalis* вирощували в теплицях за захищених умов. Збір посадкового матеріалу проводили за стандартною технологією вирощування квіткових культур [8]. Середовище, обране для вирощування рослин *Adonis vernalis*, повинно мати насичений збалансований склад поживних речовин [13]. Субстрат містив торф'яні частинки розміром 0–5 мм, суха речовина становила не менше 10% від об'єму субстрату. Вологоємність становила 78–82%, повітроємність – 8–12%, рН – 5,5. Для покращення структурних властивостей до торфу додавали 15% перліту [10, 15]. Для забезпечення швидкого вкорінення кореневища та підтримки високої вологості проводили щоденний полив рослин [14, 15, 16]. Вкорінену рослину висаджували в більшу ємність (0,7–1,0 л) з такою ж кількістю субстрату та поживних речовин, як і на стадії вкорінення, створюючи співвідношення N:P:K = 140:160:180 мг/л. Під час досліджень температуру повітря підтримували в межах 18–22 °С.

2.3. Стерилізація живильного середовища та посадкового матеріалу

Відповідно до сучасних методичних рекомендацій, усі роботи зі стерилізацією живильних середовищ та посадкового матеріалу проводили в умовах суворої асептики. Живильне середовище Мурасіге та Скуга (MS), яке застосовували для культивування рослин *in vitro*, піддавали стерилізації в

автоклаві: 30 хвилин при тиску 1,0 атм і температурі 120 °С, що забезпечувало повне знищення мікроорганізмів і стабільність компонентів середовища.

Для отримання стерильних експлантатів рослинний матеріал проходив багатоступеневу стерилізаційну обробку із використанням різних дезінфікуючих розчинів. Початкову стерилізацію здійснювали у 70% етанолі, а потім застосовували 0,5%, 1% та 2% розчини гіпохлориту кальцію з експозицією від 5 до 15 хвилин, залежно від типу та щільності тканин.

Процес підготовки експлантатів включав такі етапи:

1. Попереднє очищення рослинного матеріалу від механічних домішок і забруднень;
2. Замочування у мильному розчині протягом 30 хвилин для видалення поверхневих частинок пилу та мікроорганізмів;
3. Ретельне промивання під проточною водою;
4. Обробка 70% етанолом упродовж 5 хвилин для первинної дезінфекції;
5. Подальша стерилізація у розчинах гіпохлориту кальцію (0,5–2%) з експозицією 7–10 хвилин;
6. Завершальне промивання стерильною дистильованою водою 3–5 разів для усунення залишків дезінфікуючих агентів.

2.4. Вибір живильного середовища та регуляторів росту для розмноження експлантатів *Adonis vernalis in vitro*

Оптимальний час для відбору експлантатів з рослин-донорів був у період активного росту. Зразки експлантатів рослин вирощували на середовищі МС (сахароза 30 г/л, агар 6 г/л; 6-БАП 2,0 мг/л, НОК 0,1 мг/л). Морфогенетичну активність оцінювали за кількістю експлантатів, що утворилися протягом періоду спостереження (17–21 доба). Склад

модифікованого середовища МС змінювали поетапно під час досліджень (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Склад компонентів живильного середовища для регенерації пагонів

Adonis vernalis in vitro

Компоненти	Концентрація речовини (мг/л)		
	Введення експлантатів в умови <i>in vitro</i> (МСВЕУ)	Мікроклональне розмноження (МСМК)	Укорінення (МСРИЗ)
NH_4NO_3	16,5	16,5	8,25
KNO_3	19,0	19,0	9,5
KH_2PO_4	1,7	1,7	0,85
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,4	4,4	2,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7	3,7	1,85
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8	27,8
$\text{Na}_2\text{ЕДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	37,3	37,3
H_3BO_3	0,63	0,63	0,315
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,86	0,86	0,43
KI	0,83	0,83	0,415
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,0125
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,223	0,223	0,115
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,0125
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,0125
Нікотинова кислота	0,5	0,5	0,25
Піридоксин	0,5	0,5	0,25
Тіаміну	0,1	0,1	0,05

Гідролізат казеїну	100	100	100
Інозит	100	100	100
Сахароза	30	30	30
Агар	7	7	7
pH	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8

Культивування експлантатів *in vitro* проводили на живильних середовищах МС з двома різними регуляторами росту: 6-БАП від 2 до 6 мг/л та НОК від 0,01 до 0,2 мг/л. При культивуванні експлантатів ми використовували різні співвідношення концентрацій 6-БАП та НОК як регуляторів росту (табл. 2.2).

Крім того, також вивчали вплив різних концентрацій 6-БАП, кінетину та тидіазурону (ТДЗ) (0,1 та 0,5 мг/л) на життєздатність культур, регенерацію пагонів та збільшення кількості стебел. На початковому етапі культивування *in vitro* культури вирощували на агаризованому середовищі, доповненому 5,0 мг/л 6-БАП та 2,0 мг/л НОК згідно зі складом середовища В5, на додаток до МС. За культивування експлантатів *in vitro* додавали до середовища розчин аскорбінової кислоти для зменшення негативного впливу фенольних сполук, що вивільняються під час процесу культивування [15-17]. Ізольовані експлантати переносили на живильне середовище в пробірки для культивування *in vitro* [18].

2.5. Мікроклональне розмноження та укорінення експлантатів *Adonis vernalis*

Мікроклонування проводилося в кілька етапів. Введені в культуру *in vitro* пагони переносили на нове живильне середовище в пробірки зі зменшеною концентрацією регуляторів росту для розмноження. Один пасаж тривав від 14 до 21 доби. Умови культивування відповідають умовам за культивування експлантатів. Одержані конгломерати рослин-регенерантів,

розділяли на окремі пагони у стерильних умовах та висаджували для укорінення. Для укорінення пагони з 3–4 листками, довжиною 1,5–2,0 см, відділяли від основи та переносили на середовище без регуляторів росту $\frac{1}{2}$ MS зі зниженою в 2 рази концентрацією живильних речовин та фіксованою кількістю сахарози (10 г/л). У досліджуваних зразках спостерігали показники вкорінення, середню частоту вкорінення, 100% частоту вкорінення рослин, висаджених для вкорінення або вкорінення в гормональних та негормональних середовищах, а також за наявності ауксинів у різних концентраціях – НОК, ІОК, ІМК – на мінеральних основах $\frac{1}{2}$ Уайта та $\frac{1}{2}$ MS. Коренеутворення починалося в середньому через 14 діб. Вкорінені рослини-регенеранти були готові до висаджування *in vitro* через 21–28 добу. Для поступової акліматизації рослин-регенерантів протягом 1-2 тижнів рослини вирощували в попередньо стерилізованому, зволоженому торф'яному субстраті, умови культивування підтримували за температури 24 ± 1 °C та 100% вологості. Починаючи з початку інтенсивного росту, рослини-регенеранти розміщували у звичайних умовах. Період від висаджування експлантату до отримання адаптованих регенерантів становив у середньому 4 тижні.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Вплив мінерального складу живильного середовища та регуляторів росту на морфогенез *Adonis vernalis*

Для введення в культуру використовували апікальні і пазушні меристеми рослин-донорів *Adonis vernalis*. Регенерація мікропагонів *Adonis vernalis* відбувалася у всіх досліджуваних варіантах. На 21–28 добу культивування діаметр мікропагонів досягав 2,5–3,2 мм. Їх переносили на нове середовище без регуляторів росту для подальшого росту. Спостерігали, що на середовищі Уайта та МС мікророслини характеризувалися подібною швидкістю регенерації. З огляду на це, подальша робота була проведена з використанням мінеральних основ саме цих середовищ. Подібні результати були отримані при культивуванні інших досліджуваних видів. У контрольних зразках, на середовищі Уайта без регуляторів росту частота регенерації сягала 38,4%, кількість пагонів – $3,5 \pm 0,2$ од./екз., протягом періоду культивування, спостерігали позитивні показники росту та розвитку пагонів. Було виявлено, що додавання екзогенних регуляторів росту до живильного середовища для росту *in vitro* дещо збільшило активність утворення мікропагонів *Adonis vernalis*, а активність регенерації в деяких зразках була вищою, ніж на контрольному середовищі (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Вплив вмісту мінеральних речовин у живильному середовищі та регуляторів росту на регенерацію мікропагонів *Adonis vernalis* у культурі *in vitro*

Регулятори росту	Мінеральна основа	
	Середовище Уайта	
	Частота регенерації, %	Кількість пагонів, од./екз
Контроль (без регуляторів росту)	38,4	$3,5 \pm 0,2$
6-БАП 0,1 мг/л	42,1	$3,8 \pm 0,2$

6-БАП 0,25 мг/л	48,9	4,3±0,1
6-БАП 0,5 мг/л	54,7	4,5±0,2
6-БАП 0,5 мг/л + НОК 0,2 мг/л	61,2	4,7±0,1
6-БАП 0,5 мг/л + НОК 0,5 мг/л	63,4	5,1±0,2
ТДЗ 0,1 мг/л	44,2	3,7±0,2
ТДЗ 0,25 мг/л	49,3	4,0±0,2
ТДЗ 0,5 мг/л	54,5	4,4±0,2
ТДЗ 0,5 мг/л + НОК 0,2 мг/л	58,6	4,8±0,2
Кін 0,5 мг/л	60,4	5,1±0,2
6-БАП 0,5 мг/л + ІОК 0,5 мг/л	65,2	5,4±0,2
6-БАП 0,5 мг/л + ІОК 0,5 мг/л + НОК 0,5 мг/л	64,3	5,2±0,2
	Середовище МС	
Контроль (без регуляторів росту)	42,5	3,8±0,2
6-БАП 0,1 мг/л	58,7	4,0±0,2
6-БАП 0,25 мг/л	61,4	4,5±0,1
6-БАП 0,5 мг/л	65,3	4,7±0,2
6-БАП 0,5 мг/л + НОК 0,2 мг/л	69,4	5,2±0,1
6-БАП 0,5 мг/л + НОК 0,5 мг/л	71,2	6,5±0,2
ТДЗ 0,1 мг/л	45,1	4,1±0,2

ТДЗ 0,25 мг/л	53,2	4,6±0,2
ТДЗ 0,5 мг/л	57,6	5,2±0,2
ТДЗ 0,5 мг/л + НОК 0,2 мг/л	60,1	5,4±0,2
Кін 0,5 мг/л	63,8	6,2±0,2
6-БАП 0,5 мг/л + ІОК 0,5 мг/л	67,4	6,5±0,2
6-БАП 0,5 мг/л + ІОК 0,5 мг/л + НОК 0,5 мг/л	72,6	6,7±0,2

Додавання регуляторів росту 0,5 мг/л 6-БАП та 0,2 мг/л НОК до середовища Уайта призвело до утворення додаткових пагонів на 14–18 добу культивування порівняно з 21–28 добами на середовищі Уайта без регуляторів росту. Середня кількість мікропагонів на кожному експлантаті становила 4,7±0,1, частота регенерації – 61,2%. Вищі темпи росту та розвитку також спостерігалися в середовищі Уайта, доповненому 0,5 мг/л 6-БАП та 0,5 мг/л НОК. Частота регенерації становила 63,4%, і на один експлантат утворилося 5,1±0,2 додаткових пагонів. Використання в середовищі різних концентрацій регуляторів росту 6-БАП, Кін та ТДЗ призвело до утворення жовтого морфогенного калюсу, незалежно від мінерального складу живильного середовища. Водночас частота утворення морфогенного калюсу не перевищувала 35,0%. Утворення мікропагонів на поверхні калюсу спостерігали лише через 6 тижнів культивування, що відбувалося значно пізніше, ніж на середовищі, доповненому цитокінінами та ауксинами. З цих пагонів з'являлися нові пагони, тобто опосередковано продовжувався органогенез. Це було особливо помітно на середовищі Уайта, доповненому 0,5 мг/л ТДЗ. Додавання 0,5 мг/л 6-БАП та 0,2 мг/л НОК до живильного середовища Уайта збільшило регенерацію порівняно з контролем та

середовищем, доповненим лише цитокинінами. Було виявлено, що вона прискорюється майже 1,5 рази.

Додавання 0,1 мг/л 6-БАР до середовища МС призвело до росту тканини експлантата та найбільшої кількості експлантатів на його поверхні з частотою 58,7%. Це дозволило вважати, що це підібране середовище оптимальним для формування мікропагонів (рис. 3.1).

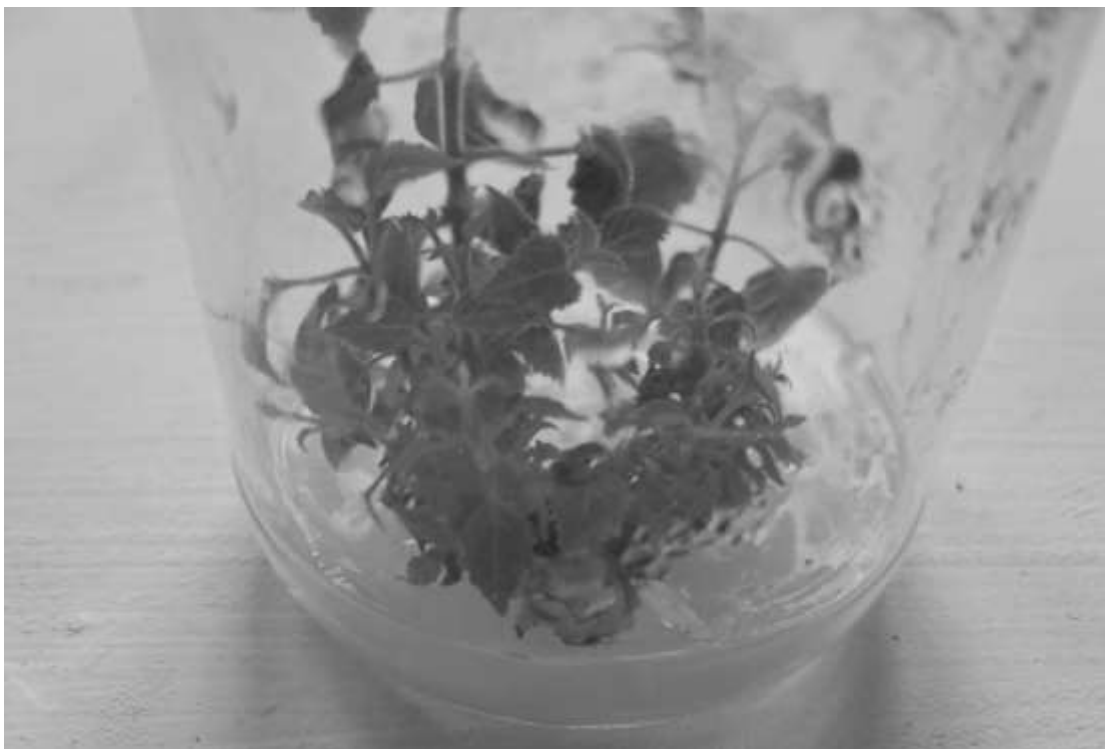


Рис. 3.1. Формування мікропагонів на середовищі МС.

Під час дослідження було визначено вплив мінерального вмісту живильного середовища (Уайта та МС) на регенераційну активність мікропагонів *Adonis vernalis*. Водночас було проаналізовано вплив регуляторів росту на кількість утворених пагонів (табл. 3.1).

Аналізуючи результати, було виявлено, що найвищі концентрації 6-БАП 0,5 мг/л + ІОК 0,5 мг/л + НОК 0,5 мг/л були більш ефективними. Ця комбінація регуляторів росту була ефективною для регенерації мікропагонів *Adonis vernalis*.

3.2. Регенерація пазушних бруньок *Adonis vernalis*

Розвиток пазушних бруньок *Adonis vernalis* продовжувався безпосередньо в процесі органогенезу. Культивування в середовищі, доповненому регуляторами росту, покращило формування пагонів, а швидкість регенерації збільшилася з 40,5 до 71,2% порівняно з контролем. Використання живильного середовища Уайта, що містило 0,5 мг/л 6-ВАР та 0,5 мг/л ІОК, 0,5 мг/л НОК, вважалось найефективнішим. У цьому середовищі було отримано максимальну частоту регенерації та кількість додаткових пагонів на експлантат (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вплив регуляторів росту на регенерацію пагонів *Adonis vernalis* у культурі *in vitro* на середовищі Уайта

Регулятори росту	Частота регенерації, %	Кількість бруньок, од./екз
Контроль (без регуляторів росту)	40,5	3,2±0,2
6-БАП 0,5 мг/л + НОК 0,5 мг/л	66,8	4,5±0,4
6-БАП 0,5 мг/л + ІОК 0,5 мг/л + НОК 0,5 мг/л	71,2	5,6±0,2

Зазначено, що реакція розвитку рослин в умовах *in vitro* при використанні мінеральних середовищ різного складу варіюється у різних рослин [25]. Поєднання 0,5 мг/л 6-БАП та 0,2 мг/л НОК та мінеральної основи середовища Уайта вважалось найефективнішим для мікроцвітіння *Adonis vernalis*. Таке поєднання регуляторів росту в живильному середовищі Уайта призвело до прискорення формування пагонів у культурі *Adonis vernalis*. При поєднанні 0,5 мг/л 6-БАП з 0,5 мг/л ІОК, 0,5 мг/л НОК

спостерігалася висока частота гомогенезу *Adonis vernalis* у живильному середовищі Уайта.

Під час культивування 0,5 мг/л ІОК, 0,5 мг/л НОК спостерігався як прямий, так і непрямий органогенез. У культурі *Adonis vernalis* на середовищі з 0,5 мг/л ІОК, 0,5 мг/л НОК у всіх типах живильних середовищ спостерігався лише непрямий органогенез. Це можна пояснити видовими особливостями. Перші видимі зміни на поверхні експлантатів 0,5 мг/л ІОК, 0,5 мг/л НОК спостерігалися через 24–28 діб на живильному середовищі, доповненому 0,5 мг/л 6-БАП та 0,2 мг/л НОК. Через п'ять тижнів культивування на живильному середовищі всі мікробруньки досліджуваних зразків, що утворилися на експлантатах, почали формуватися у вигляді 4–5 листків (рис. 3.2).

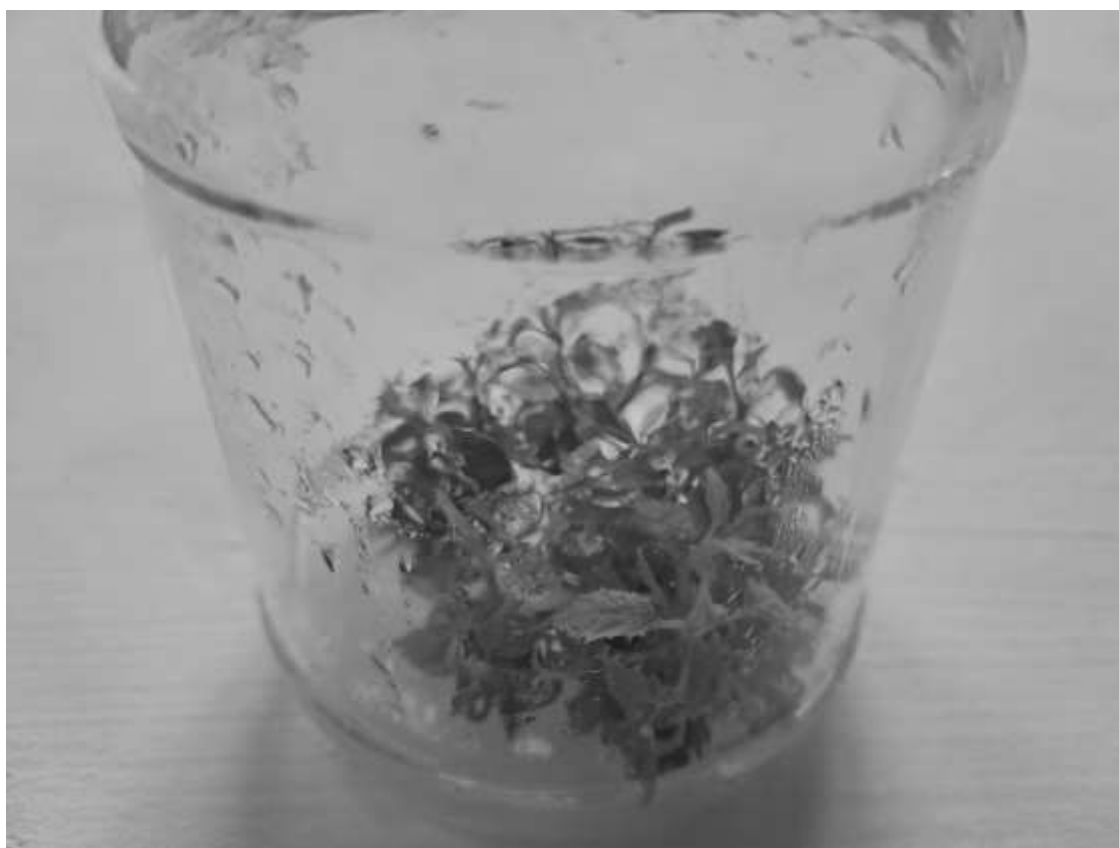


Рис. 3.2. Формування рослин-регенерантів.

3.3. Формування кореневої системи *Adonis vernalis*

Формування кореневої системи *Adonis vernalis in vitro* спостерігали переважно на живильному середовищі з додаванням ауксину та частково без регуляторів росту.

Рослини-регенеранти, отримані в умовах *in vitro*, пересаджували по одному. Тому рослину-регенерант, отриману *in vitro*, висаджували на субстрат у теплиці. Верхній шар субстрату – простий субстрат, на поверхневий шар розміщували деревну стружку.

На живильному середовищі МС за комбінації 6-БАП 0,1 мг/л та НОК 0,1 мг/л спостерігали проліферацію калюсної тканини *Adonis vernalis* в умовах *in vitro*.

На живильному середовищі за комбінації 6-БАП 0,2 мг/л + НОК 0,1 мг/л + ГКЗ 0,5 мг/л спостерігали інтенсивне коренеутворення.

Слід зазначити, що рослини у досліджуваних зразках легко приживалися як на середовищі з регуляторами росту так і без них. Середній коефіцієнт укорінення у всіх протестованих зразках становив 78,7%. 95% укорінення у мікророслинах *Adonis vernalis* спостерігалось лише за наявності ауксинів у мінеральних основах ½ Уайта та ½ МС за концентрації 0,5 мг/л НОК, 0,5 мг/л ІОК, 0,5 мг/л ІМК. Найефективнішим середовищем для індукції ризогенезу у *Adonis vernalis* було ½ Уайта з додаванням 0,5 мг/л НОК (рис. 3.3, 3.4, табл. 3.3, 3.4).

Тип використаних ауксинів не впливав на активність ризогенезу. Нами показано, що додавання 0,5 мг/л НОК, 0,5 мг/л ІОК, 0,5 мг/л ІМК у живильне середовищі індукувало утворення коренів інтенсивніше порівняно із середовищем без регуляторів росту та середовищем, що містило НОК.

У таблиці 3.4 наведено дані, щодо росту та розвитку досліджуваних зразків *Adonis vernalis* за двох температурних режимів. Згідно з отриманими даними, довжина коренів у 1,3–2,0 рази коротша за температури 24 ± 1 °С. Водночас інші показники росту не залежали від температурного режиму.

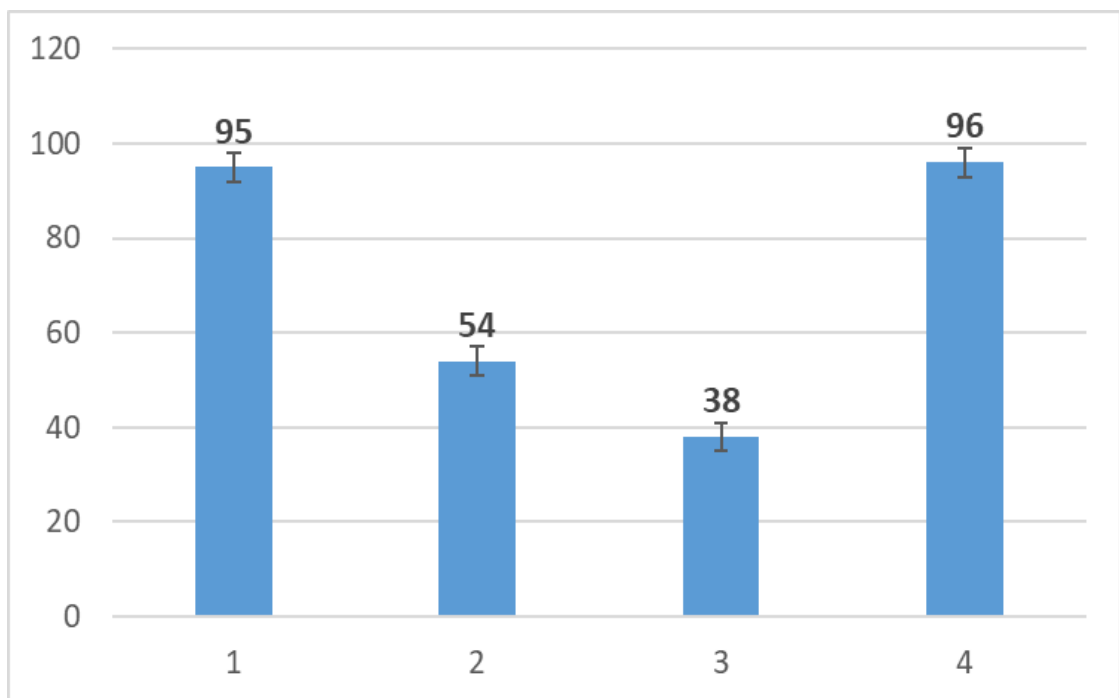
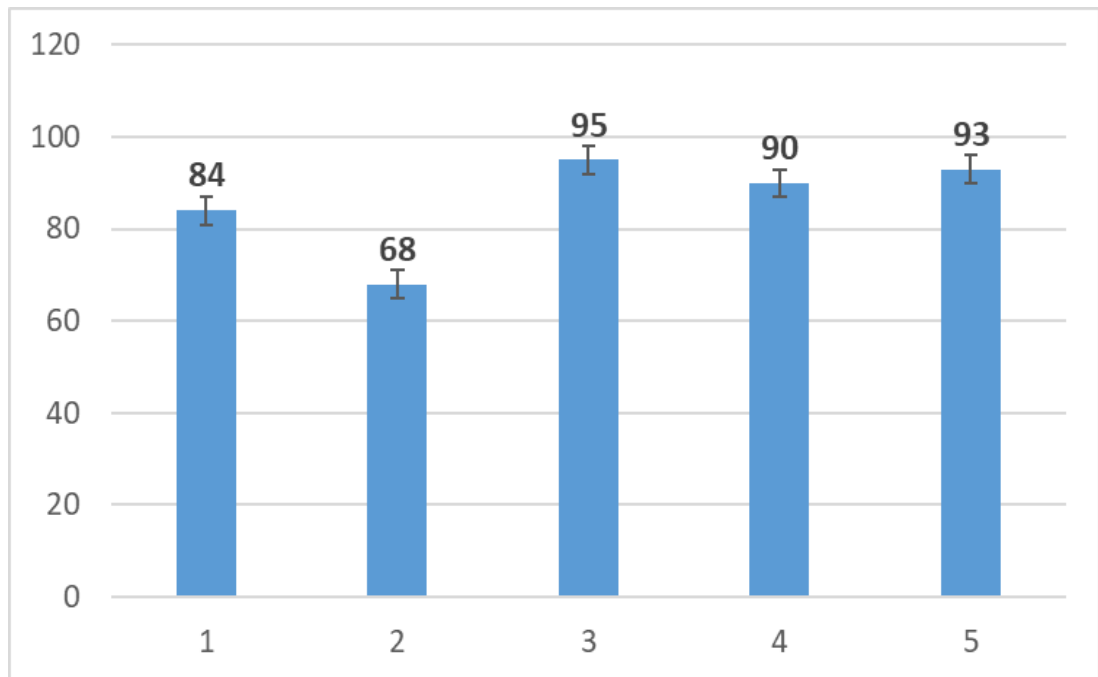


Рис. 3.3. Частота вкорінення експлантів *Adonis vernalis*, отриманих *in vitro*, у % (А – лабораторні умови: 1 – ½ Уайта; 2 – ½ Уайта + 0,1 мг/л НОК; 3 – ½ Уайта + 0,5 мг/л НОК; 4 – ½ МС + 0,5 мг/л ІМК; 5 – ½ МС; В – у тепличних умовах: 1 – ½ Уайта; 2 – ½ Уайта + 0,1 мг/л НОК; 3 – ½ Уайта + 0,5 мг/л НОК; 4 – ½ МС + 0,5 мг/л ІМК).

Таблиця 3.3

Показники росту та розвитку рослин-регенерантів *Adonis vernalis*

Місце, де було взято зразки рослин	Живильне середовище	Кількість коренів	Довжина коренів (мм)
Зразки, вирощені в стерильному середовищі в лабораторних умовах	½ Уайта 0,5 мг/л НОК	5,2±0,2	8,7±0,1
	½ МС 0,5 мг/л ІОК	4,7±0,1	8,4±0,1
	½ МС 0,5 мг/л ІМК	4,5±0,2	7,8±0,2
Зразки, вирощені в тепличних умовах	½ Уайта	3,8±0,3	7,6±0,2
	½ МС 0,5 мг/л ІОК	4,0±0,4	7,9±0,3
Зразки, вирощені в природних умовах	½ Уайта 0,5 мг/л НОК	5,0±0,2	8,5±0,4

Таблиця 3.4

Ріст і розвиток рослин-регенерантів *Adonis vernalis*

Місце, де було взято зразки рослин	Кількість коренів	
	10 °С	24 °С
Зразки, вирощені в стерильному середовищі в лабораторних умовах	4,2±0,3	5,1±0,1
Зразки, вирощені в тепличних умовах	4,5±0,2	5,3±0,1

Зразки, вирощені в природних умовах	4,5±0,1	4,9±0,2
	Довжина коренів (мм)	
Зразки, вирощені в стерильному середовищі в лабораторних умовах	7,3±0,2	8,4±0,1
Зразки, вирощені в тепличних умовах	7,8±0,1	8,7±0,2
Зразки, вирощені в природних умовах	7,5±0,1	8,5±0,2

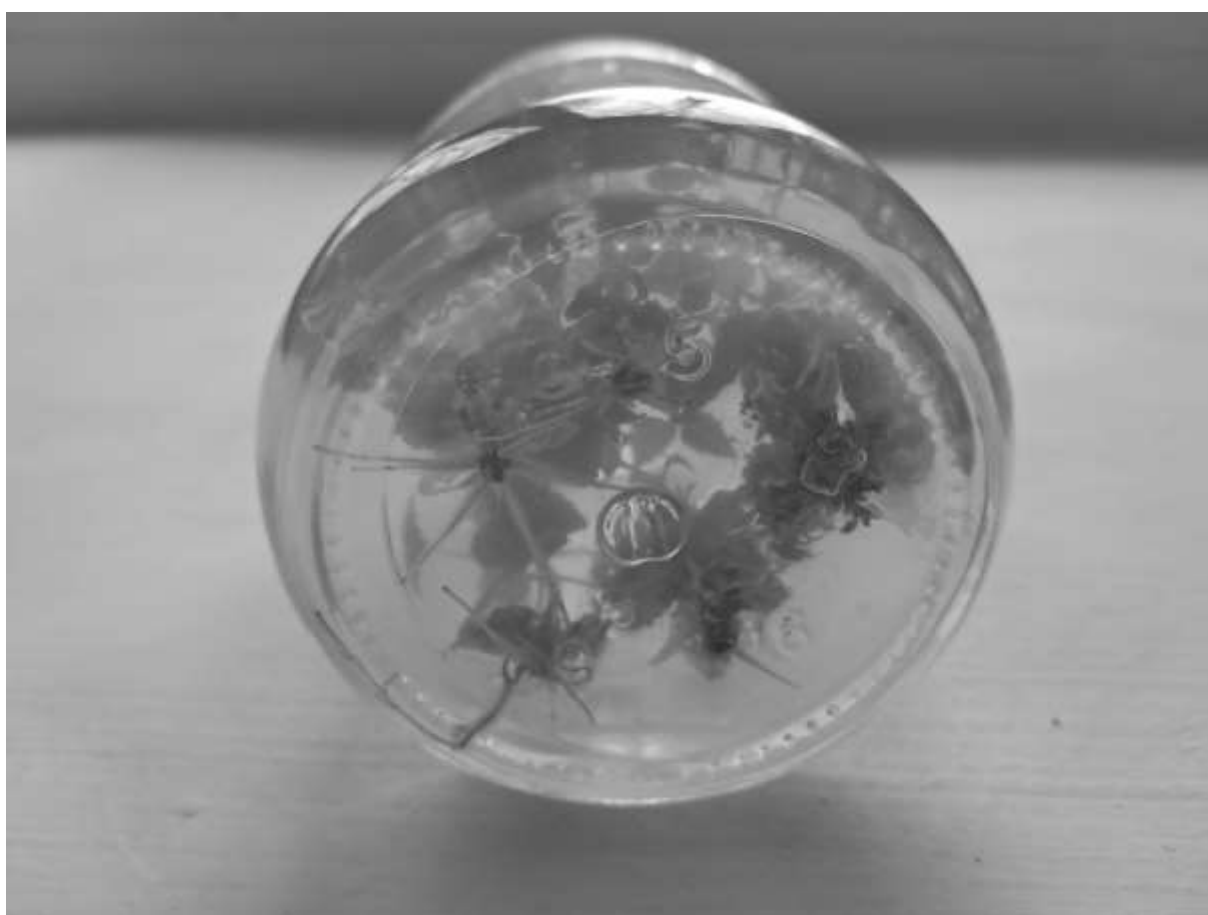


Рис. 3.4. Утворення коренів на середовищі Уайта.

Ще одним явищем, що цікавить культивування мікророслин, є формування пагонів у *Adonis vernalis*. Розвиток пагонів на стадії вкорінення було зафіксовано для мікроживців, вирощених на середовищі $\frac{1}{2}$ Уайта з високим вмістом сахарози, вони мали однакову морфологію. На верхівці сформованого пагону знаходиться брунька регенерації – особлива вегетативна частина, яка формується з материнських особин і згодом може замінити її. Додаткове коріння також починає формуватися біля основи нового пагону. Таким чином, в умовах *in vitro* мікророслини *Adonis vernalis* розвивають мікропагони відповідно до тих, що вирощуються в природних умовах.

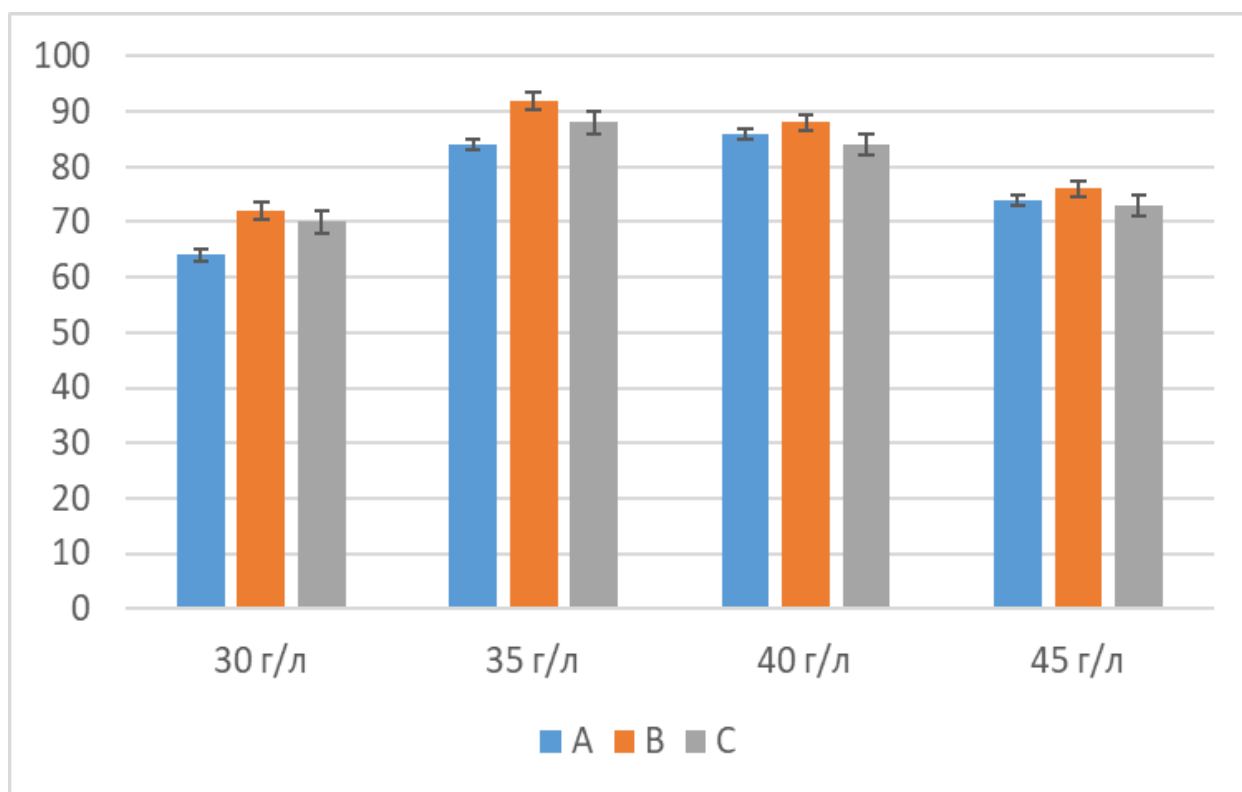


Рис. 3.5. Вплив концентрації сахарози на формування пагонів у рослин *Adonis vernalis* в лабораторних (А), тепличних (В) та природних (С) умовах (n = 3).

Розмір коренів, отриманих *in vitro*, має суттєвий вплив на успішну адаптацію регенерованих рослин до нестерильних умов у майбутньому [28].

Для оцінки впливу концентрації сахарози на ріст і розвиток рослин під час вкорінення як контроль використовували 30,0 г/л (контроль), в досліді використовували 35,0, 40,0 та 45,0 г/л сахарози. У дослідженні було виявлено, що збільшення концентрації сахарози призвело до прискорення росту коренів у рослин-регенерантів *Adonis vernalis* (рис. 3.5).

3.4. Одержані рослини-регенеранти *Adonis vernalis* та адаптація до умов *ex vitro*

Для адаптації до нестерильних умов були відібрані рослини-регенеранти *Adonis vernalis* розміром більше шести сантиметрів з розвиненою кореневою системою. У цьому випадку в якості субстрату використовувалася кокосового субстрату, торфу та піску (3:1). Рослини-регенеранти *Adonis vernalis* досліджуваних зразків культивували в лабораторних та тепличних умовах за температури 24 ± 1 °С, протягом відповідного терміну культивування спостерігали ріст рослин і розвиток нового листя, що свідчило про успішну адаптацію рослин до умов *ex vitro*. Подібний результат спостерігався на етапі утворення коренів від використаного субстрату. У цьому випадку період спокою був визначений при температурі 24 ± 1 °С. Використання сфагнуму як субстрату було придатне для початкового етапу адаптації. Це пов'язано з необхідністю пересадки рослин-регенерантів у більш збагачений субстрат при вирощуванні в теплиці або у відкритому ґрунті [18]. У цьому субстраті спостерігалось збільшення довжини коренів та поява корневих волосків, а також процес відростання листя після 2 місяців вирощування. Ефективнішим було використання суміші торфу та піску, а також подрібненої зелені та піску. Водночас адаптація до тепличних умов шляхом чергування високих та низьких температур здійснювалася на основі додавання до суміші субстрату регуляторів росту. Так, вирощування висаджених рослин-регенерантів у субстраті протягом 4 тижнів у темному місці за температури 10 ± 1 °С та

переведення їх на температурний режим 24 ± 1 °C, що виводило їх із періоду спокою та прискорювало формування листків. Листки інтенсивніше розвивалися у зразків з розвинутою кореневою системою. Слід зазначити, що при вирощуванні в тепличних умовах навіть після холодної стратифікації листя швидко відмирало і наставав повторний стан спокою. Це можна пояснити відносно високою температурою та сухістю повітря. Така адаптація дозволила ліквідувати вторинний період спокою і вирощувати рослини в теплиці.

В теплиці спостерігали активацію ростових процесів рослин-регенерантів за позитивних температур (у теплиці). При цьому зразки *Adonis vernalis* демонстрували нормальний сезонний ритм розвитку. Водночас, синхронне проростання тканин характерне для всіх досліджуваних зразків. Ступінь адаптації рослин оцінювали за кількістю пагонів зі сформованими *ex vitro* листками (табл. 3.5).

Згідно з отриманими даними, оптимальним субстратом для адаптації рослин-регенерантів досліджуваних зразків *Adonis vernalis*, що ростуть у різних умовах, є суміш кокосового субстрату та піску (3:1). На даному субстраті спостерігали 92,3% адаптованих рослин-регенерантів до помірного клімату з добре розвиненим листям та кореневою системою. Тип субстрату також впливав на рівень розвитку листових пластин рослин. Так, при використанні суміші торфу та піску (3:1) наявність першого листка у досліджуваних зразках *Adonis vernalis* була зафіксована через 4 тижні культивування. При використанні суміші торфу та піску (3:1) ефективність адаптації всіх досліджуваних зразків, що росли за різних умов, була в межах від 78,5 до 90,4%. Залежно від зразка, відростання першого асиміляційного листка спостерігали через 4 тижні після перенесення рослин-регенерантів *Adonis vernalis*, вкорінених в умовах *in vitro*, у нестерильні умови. Рослини-регенеранти, вирощені за температурного режиму 24 ± 1 °C, індукували

по 1-2 асиміляційних листків, залежно від зразків, вирощених у різних умовах.

Таблиця 3.5

Ефективність адаптації рослин-регенерантів *Adonis vernalis* до умов *ex vitro*

Варіанти	Адаптація, %	
	кокосовий субстрат + пісок (3:1)	торф + пісок (3:1)
Зразки, вирощені в стерильному середовищі в лабораторних умовах	90,7	78,5
Зразки, вирощені в тепличних умовах	92,4	86,7
Зразки, вирощені в природних умовах	94,5	90,4

Протягом періоду адаптації вивчали вплив холодної стратифікації (10 °С) на вкорінення пагонів, одержаних *in vitro*. Сприятливі температурні умови позитивно вплинули на розвиток пагонів рослини *ex vitro*. Ріст першого листка у *Adonis vernalis* спостерігався через 42–49 день після початку адаптації в суміші кокосового субстрату та піску. Відростання відбувалося 1,5 рази повільніше через у зразках без обробки температурою. Тому, можна відмітити, що понижені температури *ex vitro*, сприяють усуненню стану спокою вегетативних органів та їх проростанню. Період спокою необхідний для нормального розвитку геофітів, без нього протягом річного циклу ріст тканин сповільнюється, а розвиток генеративних органів не відбувається. Вибір оптимальної тривалості періоду з правильною температурою сприяє швидкому розвитку листя та коренів [35]. Таким чином, метод культивування за позитивної температури (10 °С) є найефективнішим з точки зору вкорінення та формування тканин, оскільки

дозволяє отримати оновлені рослини з розвиненою кореневою системою. Водночас використання живильного середовища, доповненого ауксинами (0,5 мг/л НОК або ІМК), сприяє формуванню більш розвиненої кореневої системи у рослин-регенерантів *Adonis vernalis*. Зміни концентрації сахарози в поживному середовищі майже не впливають на ріст і розвиток мікророслин на стадії вкорінення.

Результати нашого дослідження показали, що розвиток рослин за правильної температури не тільки сприяє інтенсивнішому ризогенезу, але й швидшому розвитку рослин-регенерантів в умовах *ex vitro*. Водночас адаптація рослин-регенерантів *Adonis vernalis*, вирощених у різних умовах, показала, що найоптимальнішим субстратом була суміш кокосового субстрату та піску (3:1).

ВИСНОВКИ

1. Для регенерації мікропагонів *Adonis vernalis* найвищі концентрації комбінацій регуляторів росту 6-БАП 0,5 мг/л + ІОК 0,5 мг/л + НОК 0,5 мг/л були більш ефективними.

2. На живильному середовищі МС за комбінації 6-БАП 0,1 мг/л та НОК 0,1 мг/л спостерігали проліферацію калюсної тканини *Adonis vernalis* в умовах *in vitro*.

3. Показано, що додавання 0,5 мг/л НОК, 0,5 мг/л ІОК, 0,5 мг/л ІМК у живильне середовищі індукувало утворення коренів інтенсивніше порівняно із середовищем без регуляторів росту.

4. У дослідженні було виявлено, що збільшення концентрації сахарози призвело до прискорення росту коренів у рослин-регенерантів *Adonis vernalis*

5. Адаптація рослин-регенерантів *Adonis vernalis*, вирощених у різних умовах, показала, що найоптимальнішим субстратом була суміш кокосового субстрату та піску (3:1).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Orhan, I.E.; Gokbulut, A.; Senol, F.S. *Adonis* sp., *Convallaria* sp., *Strophanthus* sp., *Thevetia* sp., and *Leonurus* sp.—Cardiotonic plants with known traditional use and a few preclinical and clinical studies. *Curr. Pharm. Dec.* 2017, 23, 1051–1059.
2. Plants of the World Online. Available online: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30104191-2> (accessed on 18 July 2024).
3. The Plant List. Available online: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=adonis> (accessed on 20 July 2024).
4. Shang, X.; Miao, X.; Yang, F.; Wang, C.; Li, B.; Wang, W.; Pan, H.; Guo, X.; Zhang, Y.; Zhang, J. The Genus *Adonis* as an important cardiac folk medicine: A review of the ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *Front. Pharmacol.* 2019, 10, 25.
5. Das, H.; Raghav, S.; Gupta, B.; Das, R.H. Anti-inflammatory compounds from the medicinal plant *Ruta graveolens*. *Acta Horticult.* 2007, 756, 389–398.
6. Üçüncü, O.; Baltacı, C.; Akar, Z.; Duzgun, A.; Cuce, M.; Kandemir, A. Biological activities and phytochemical screening of ethanol extracts from *Adonis paryadricea* (Ranunculaceae). *Farmacia* 2020, 68, 1062–1068.
7. Kuroda, M.; Kubo, S.; Uchida, S.; Sakagami, H.; Mimaki, Y. Amurensiosides A–K, 11 new pregnane glycosides from the roots of *Adonis amurensis*. *Steroids* 2010, 75, 83–94.
8. Kubo, S.; Kuroda, M.; Yokosuka, A.; Sakagami, H.; Mimaki, Y. Amurensiosides L–P, five new cardenolide glycosides from the roots of *Adonis amurensis*. *Nat. Prod. Commun.* 2015, 10, 27–32.
9. You, Y.-J.; Kim, Y.; Nam, N.-H.; Ahn, B.-Z. Inhibitory effect of *Adonis amurensis* components on tube-like formation of human umbilical venous cells. *Phytother. Res.* 2003, 17, 568–570.

10. Shang, X.F.; Tao, C.X.; Miao, X. L.; Wang, D.S.; Tangmuke; Dawa; Wang, Y.; Yang, Y.; Pan, H. Ethno-veterinary survey of medicinal plants in Ruoergai region, Sichuan province. *China J. Ethnopharmacol.* 2012, 142, 390–400.
11. Shang, X.F.; Miao, X. L.; Wang, D.S.; Li, J.X.; Wang, X. Z.; Yan, Z.T.; Wang, C.-M.; Wang, Y.; He, X.-R.; Pan, H. Acaricidal activity of extracts from *Adonis coerulea maxim.* against *Psoroptes cuniculi* in vitro and in vivo. *Vet. Parasitol.* 2013, 195, 136–141.
12. Kulymbet, K.; Mukhitdinov, N.; Kubentayev, S.; Tynybayeva, K.; Tastanbekova, A.; Kurmanbayeva, M.; Gafforov, Y.; Kaparbay, R.; Zhumagul, M. Current state of the soil in the area of distribution of the cenopopulation of *Adonis tianschanica* Lipch (Adolf). *Soil Sci. Agrochem.* 2020, 4, 5–15.
13. Son, D.C.; Ko, S.C. Aggregated achenes and achene morphology of the Korean *Adonis* L. and its related taxa in East Asia. *Korean J. Plant Taxon.* 2013, 43, 312–318.
14. Park, H.-J.; Kim, H.-N.; Kim, C. Y.; Seo, M.-D.; Baek, S.-H. Synergistic Protection by Isoquercitrin and Quercetin against Glutamate-Induced Oxidative Cell Death in HT22 Cells via Activating Nrf2 and HO-1 Signaling Pathway: Neuroprotective Principles and Mechanisms of *Dendropanax morbifera* Leaves. *Antioxidants* 2021, 10, 554.
15. Pharmacopée Française. 11e Edition. Droit D’auteur ANSM. Available online: www.ansm.sante.fr (accessed on 12 March 2024).
16. Medpharm Scientific. German Homoeopathic Pharmacopoeia, 10th ed.; Medpharm: Bayern, Germany, 2013. [Google Scholar]
17. Tian, X.; Gu, L.; Zeng, F.; Liu, X.; Zhou, Y.; Dou, Y.; Han, J.; Zhao, Y.; Zhang, Y.; Luo, Q.; et al. Strophanthidin Induces Apoptosis of Human Lung Adenocarcinoma Cells by Promoting TRAIL-DR5 Signaling. *Molecules* 2024, 29, 877.

18. Krvavych, A.; Konechna, R. Optimization of parameters of the extraction process of biologically active substances of grass *Adonis vernalis*. *Technol. Audit. Prod. Reserves* 2021, 3, 59.
19. Morsy, N. Cardiac Glycosides in Medicinal Plants. In *Aromatic Medicinal Plants: Back to Nature*; IntechOpen: London, UK, 2017; pp. 29–45.
20. Kubo S., Kuroda M., Yokosuka A., Sakagami H., Mimaki Y. (2015). Amurensiosides L-P, five new cardenolide glycosides from the roots of *Adonis amurensis*. *Nat. Prod. Commun.* 10 27–32.
21. Kubo S., Kuroda M., Matsuo Y., Masatani D., Sakagami H., Mimaki Y. (2012). New cardenolides from the seeds of *Adonis aestivalis*. *Chem. Pharm. Bull.* 60 1275–1282. 10.1248/cpb.c12-00489
22. Denisow B., Wrzesie M., Cwener A. (2014). Pollination and floral biology of *Adonis vernalis* L. (*Ranunculaceae*) -a case study of threatened species. *Acta Soc. Bot. Pol.* 83 29–37.
23. Gostin I. N. (2011). Anatomical and micromorphological peculiarities of *Adonis vernalis* L. (*Ranunculaceae*). *Pak. J. Bot.* 43 811–820.
24. Hirsch H., Wagner V., Danihelka J., Ruprecht E., Sánchez-Gomez P., Seifert M., et al. (2015). High genetic diversity declines towards the geographic range periphery of *Adonis vernalis*, a eurasian dry grassland plant. *Plant Biol.* 17 1233–1241. 10.1111/plb.12362
25. Lateef T., Riaz A., Zehra A., Qureshi S. A. (2012). Antihyperlipidemic effect of *Adonis vernalis*. *J. Dow Univ. Health Sci.* 6 47–51.
26. Latté K. P. (2018). *Adonis vernalis* L. das frühlingssonnenröschen. *Z. Phytother.* 39 45–51. 10.1055/s-0044-100153
27. Mohadjerani M., Tavakoli R., Hosseinzadeh R. (2014). Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial activities of *Adonis wolgensis* L. extract. *Avicenna J. Phytomed.* 4 24–30.
28. Dai Y., Zhang B. B., Xu Y., Liao Z. X. (2010). Chemical constituents of *Adonis coerulea* Maxim. *Nat. Prod. Res. Dev.* 22 594–596.

29. Yin L., Zhang Y., Tian H. Y., Jiang R. W. (2014). Chemical constituents from *Adonis amurensis*. *Chin. Trad. Herb. Drugs* 45:3361.
30. Linsmaier, E.M. and F. Skoog, 1965. Organic growth factor requirement of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 18, 100-127.
31. Schenk, R.V. and A.C. Hilderbrandt, 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*. 50, 199-204.
32. Zhou, L.G. and J.Y. Wu, 2006. Development and Application of Medicinal Plant Tissue Cultures for Production of Drugs and Herbal Medicinals in China. *Natural Product Reports*, 23, 789-810.
33. Rout, G.R., S. Samantaray, and P. Das, 2000. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, 18, 91-120.
34. Oksman-Caldentey, K. M. and D. Inzé, 2004. Plant cell factories in the post- genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 9, 433-440.
35. Sasikumar, S., S. Raveendar, A. Premkumar, S. Ignacimuthu, P. Agastian. 2009. Micropropagation of *Baliospermum montanum* (Willd.) Muell. Ara.-A threatened medicinal plant. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 223-226.
36. Singh, P., A. Singh, A.K. Shukla, L. Singh, V. Pande and T.K. Nailwal. 2009. Somatic embryogenesis and in vitro regeneration of an endangered medicinal plant sarpagandha (*Rauvolfia serpentina* L.). *Life Science Journal*, 6, 57-62.
37. Mehta, S.R. and R.B. Subramanian. 2005. Direct In vitro Propagation of *Asparagus adscendens* Roxb. *Plant Tissue Culture*, 15, 25-32.
38. Mathews, J.N., P.R. Flatt, and Y.H. Abdel-Wahab, 2006. *Asparagus adscendens* (Shweta musali) stimulates insulin secretion, insulin action and inhibits starch digestion. *British Journal of Nutrition*, 95, 576-581.
39. Hartinie, M. and G.A. Jualang, 2007. In vitro germination and plantlet establishment of *Labisia pumila* (Bl.) F. Vill. *Scientia Horticulturae*, 115, 91-97.

40. Beena, M.R. and K.P. Martin, 2003. In Vitro Propagation of the rare medicinal plant *Ceropegia candelabrum* L. through Somatic embryogenesis. *Society for In Vitro Biology*, 39, 510-513.

41. Mondello, F., F. De Bernardis, A. Girolamo, G. Salvatore and A. Cassone, 2003. In vitro and in vivo activity of tea tree oil against azole-susceptible and - resistant human pathogenic yeasts. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 1223-1229.

42. Terzi, V., C. Morcia, P. Faccioli, G. Vale, G. Tacconi and M. Malnati, 2007. In vitro antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 613-618.

43. Koh, K.J., A.L. Pearce, G. Marshman, J.J. Finlay-Jones and P.H. Hart, 2002. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. 82nd Annual Meeting of the British Association of Dermatologists. Blackwell Publishing Ltd, Edinburgh, Pages 1080-1095.

44. Lu, M.C., 2005. Micropropagation of *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc., a medicinal herb, through high-frequency shoot tip culture. *Scientia Horticulturae*, 107, 64-69.

45. Chen, L.G. and C.C. Wang, 2009. Preparative separation of oligostilbenes from *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana* by centrifugal partition chromatography followed by Sephadex LH-20 column chromatography. *Separation and Purification Technology*, 66, 65-70.

46. Aziz, Z.A., M.R. Davey, K.C. Lowe and J.B. Power, 2006. Isolation and culture of protoplasts from the medicinal plant *Centella asiatica*. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, 8, 105-109.

47. Bhavisha, B.W. and Y.T. Jasrai, 2003. Micropropagation of an Endangered Medicinal Plant :*Curculigo orchioides* Gaertn. *Plant tissue Culture*, 13, 13-19.

48. Craker, E.L., Editors- J. Janick and A. Whipkey. 2017. Medicinal and Aromatic Plants—Future Opportunities. Issues in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, Page 232.
49. Ujjwala, J.S., 2017. In vitro Regeneration of Aloe barbadensis. *Biotechnology*, 6, 601-603.
50. Ahmed, S., A.H. Kabir, M.B. Ahmed, M.A. Razvy and S. Ganesan, 2017. Development of Rapid micropropagation method of Aloe vera L. *Seed Science Journal*, 24, 121-128.
51. Aggarwal, D. and K.S. Barna, 2014. Tissue culture propagation of elite plant of Aloe vera Linn. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 13, 77-80.
52. Saritha, K.V. and C.V. Naidu, 2017. In vitro flowering of Withania somnifera Dunal. - An important antitumor medicinal plant. *Plant Science*, 172, 847-851.
53. Swamy, S.L., S. Puri and A.K. Singh, 2012. Effects of auxins (IBA and NAA) and seasons on rooting of juvenile and mature hardwood cuttings of Robinia pseudoacacia and Grewia optiva. *New Forest*, 23, 143-157.
54. Giri, A., V. Dhingra, C.C. Giri, A. Singh, Owen P. Ward and M. Lakshami Nasaru. 2011. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances*, 19, 175-199.
55. Zhong, J.J. 2012. Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, 591-599.
56. Chasseaud, L.F. and D.R. Hawkins, 2016. Biotransformation of Drugs. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology: Third Edition*. Pages 310 – 324.
57. Trung Thanh, N., H. Niranjana Murthy, Kee-Won Yu, C. Seung Jeong, Eun- Joo Hahn and Kee-Youp Paek. 2006. Effect of oxygen supply on cell growth

and saponin production in bioreactor cultures of *Panax ginseng*. *Journal of Plant Physiology*, 163, 1337-1341.

58. Parr, A.J., 2009. The Production of Secondary Metabolites by Plant cell cultures. *Journal of Biotechnology*, 10, 1-26.

59. DiCosmo, F. and M. Misawa, 2015. *Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production*. *Biotechnology Advances*, 13: p. 425-453.

60. Ramachandra Rao, S. and G.A. Ravishankar, 2012. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20, 101-153.

61. Bennett, R.N. and R.M. Wallsgrove, 2014. Secondary metabolites in Plant Defence mechanisms. *New Phytologist*, 127, 617-633.

62. Garro-Monge, G., A.M. Gatica-Arias, and Valdez-Melara, 2008. Somatic embryogenesis, Plant regeneration and Acemannan detection in Aloe (*Aloe barbadensis* MILL.). *Agronomia Costarricense*, 32, 41-52.

63. Matkowski, A. 2000. Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review. *Biotechnology Advances*, 26, 548-560.