

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ВРУБЛЕВСЬКИЙ Андрій Темурович

УДК 663.62:631.5/9

ДИСЕРТАЦІЯ
УДОСКОНАЛЕННЯ ІСНУЮЧИХ ТА РОЗРОБКА НОВИХ
ТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРИЙОМІВ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО
РОЗМНОЖЕННЯ ГОРІХОПЛІДНИХ КУЛЬТУР

Спеціальність 201 – агрономія
20 Аграрні науки та продовольство

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 201 – агрономія.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



Врублевський А.Т.

Науковий керівник **Мацкевич В'ячеслав Вікторович** доктор сільськогосподарських наук, доцент.

Біла Церква - 2021

АНОТАЦІЯ

Врублевський А. Т. Удосконалення існуючих та розробка нових технологічних прийомів мікроклонального розмноження горіхоплідних культур. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 201 – агрономія (20 Аграрні науки та продовольство). – Білоцерківський національний аграрний університет, Біла Церква, 2021.

Вирощування горіхоплідних культур є потужним перспективним напрямом вирощування в Україні аграрної продукції на експорт. Попит на продукцію горіхоплідних, так само як і олійних культур, перевищує пропозицію. Однак на сьогодні в державі є незадоволений попит на внутрішньому ринку, що створює умови для інтервенції імпортованих плодів. Ефективний захист вітчизняного виробника горіхоплідної продукції полягає не в збільшенні на неї ввізного мита, а у створенні нових конкурентноспроможних сортів та у розробці технологій їх прискореного розмноження.

Процес вегетативного розмноження деревних культур тривалий, і особливо горіхоплідних, трудомісткий, а для грецького горіха майже неможливий. Тому зусилля багатьох дослідників спрямовані на розробку промислових технологій мікроклонального розмноження (МКР) фундука та грецького горіха. Їх застосування дозволить збільшити обсяги виробництва і розширити асортимент посадкового матеріалу та експортної продукції.

Проте мікроклональне розмноження горіхоплідних культур досі не вийшло за межі наукових лабораторій. Стримують розробку та впровадження складність таких технологічних прийомів як введення в асептичні умови (самоотруєння фенольними ексудатами, гіпергідратація в результаті травматичного шоку та ін.), стабілізація рослинних об'єктів у процесі мультиплікації (підбір оптимальних трофічних та гормональних детермінант, способів поділу донорних рослин на експланти), індукція ризогенезу та постасептична адаптація (в т.ч. мікоризація рослин *in vitro/ex vitro*).

Це обумовлює активізацію наукового пошуку цитологічних, фізіологічних, технологічних і організаційних прийомів удосконалення технологій і доведення її до промислового рівня.

Також важливим питанням залишається створення вихідного матеріалу здатного ефективно виживати в умовах посухи, особливо на ранніх етапах розвитку рослин. Адже посухи уже трапляються на всій території України, а за незначного розвитку кореневої системи саджанці фундука та горіху мають досить низький відсоток виживання за висаджування їх в відкритий ґрунт. А тому вивчення цих та інших питань є досить актуальним.

Уперше розроблені та запропоновані схеми клітинної селекції та індукованого мутагенезу *in vitro* для фундука та грецького горіха, які дозволяють одержувати калюсні лінії і рослини-регенеранти з підвищеною стійкістю до осмотичного стресу.

Дістали подальшого розвитку: питання використання в клітинній селекції фундука та грецького горіха на стійкість до посухи γ -опромінення з подальшим культивуванням калюсних культур з поліетиленгліколем та манітом.

Експериментально встановлено, що підвищення стійкості на клітинному та тканинному рівнях, зберігається на рівні рослин-регенерантів фундука та грецького горіха.

На основі результатів лабораторних досліджень та їх експериментальної перевірки розроблено науково обґрунтовану систему застосування у селекції фундука та грецького горіха з попереднім використанням індукованого мутагенезу, що дозволяють отримати та зберегти ознаку посухостійкості на рівні регенерантів зі збереженням господарсько-цінних ознак.

Результати роботи можуть бути використані для створення нових високопродуктивних посухостійких сортів фундука та грецького горіха.

Культивування рослин проводять на середовищі DKW, що забезпечує формування найбільшої кількості мікропагонів – 3,6 шт. порівняно з 1,8 шт. на середовищах QL та 2,1 шт. на MS.

Для подолання проблем фенолоутворення пропонуємо ряд заходів: культивування маточних рослин за розсіяного світла в умовах депозитарію; використання антиоксиданта аскорбінової кислоти для замочування експлантатів перед стерилізацією; введення рослин шляхом виділення меристем, пробуджених бруньок; додавання в живильне середовище біоциду PPM (Plant Preservative Mixture); додавання в живильне середовище ПВП (полівінілпіролідон).

На етапі мультиплікації в живильне середовище додають 1,5 мг/л бензиламінопурину. Ця концентрація сприяла формуванню у середньому 4,8 шт. мікропагонів з високим темпом росту і з низьким відсотком вітрифікації 2 %.

Для успішного ризогенезу середовище модифікують додаванням 2,5 г активованого вугілля та ауксину індолілмасляної кислоти в кількості 3,0 мг/л. Додавання 2,5 г активованого вугілля забезпечує формування найбільшої кількості коренів – 2,3 шт. на 3 мг/л ІМК у складі живильного середовища і сприяє збільшенню кількості коренів із 0 на контролі до 2,5 шт.

На початку постасептичної адаптації рослини та субстрат обприскують фунгіцидом Превікур Енерджі 840 sl в.р.к., що забезпечує кращу приживлюваність рослин. Окрім фунгіцидного захисту, препарат стимулює ростові процеси, що проявляється у збільшенні маси рослин.

Визначено, що схема асептичної обробки насіння з використанням концентрованої сірчаної кислоти найбільш ефективна як за обробки сім'ядоль фундука так і грецького горіха.

Після проведення асептичної обробки та посадки на безгормональне живильне середовище Мурасіге-Скуга з половинним складом макро- та мікроелементів спостерігали проростання в середньому 61,8 % сім'ядоль фундука, та 48,3 % сім'ядоль грецького горіха. Також за застосування даної обробки ми спостерігали зменшення показників наявності продуктів окислення фенолів з рівня трьох-двох балів до переважно одно-двох балів.

Досліджено, що на середовищі Мурасіге і Скуга сорти фундука мали ростовий індекс 6,2 та формували калюс масою 159,8 мг, а за застосування

середовища за приписом Драйвера і Куніюкі відповідно ростовий індекс 9,7 та формували калюс масою 237,3 мг. Кращий ростовий індекс за середовища на базі припису Драйвера і Куніюкі ми спостерігали при отриманні калюсу в сортів фундука: Барселонський, Трапезунд, Косфорд та Болградська новинка. А от краща середня маса сформованого калюсу була у сортів фундука: Пірожок та Степовий 83.

Також було визначено, що кращий ростовий індекс за застосування середовища на базі припису Драйвера і Куніюкі був при отриманні калюсу в сортів грецького горіха: Фернет, Буковинський 2, Кишиневський, Кордене та Ярівський. А от краща середня маса сформованого калюсу була у сортів грецького горіха: Буковинський 2, Чернівецький 1 та Фернет.

Експериментально доведено, що для отримання великої кількості калюсних тканин різних генотипів фундука та грецького горіха та проведення з ними відповідної подальшої селекційної роботи кращим варіантом живильного середовища є середовище за прописом Драйвера і Куніюкі. Адже воно ефективно працює за вирощування обох культур в умовах *in vitro*.

Аналіз індексу співвідношення ядра до розміру цитоплазми (N/C) фундука сорту Трапезунд показує, що найменшим він був в паренхіми периферійної зони – 1,8 %, а найбільшим відповідно в клітин апікальної меристеми – 27,0 %.

Порівняння динаміки суспензійних культур окремих сортів фундука з середніми значеннями показує, що показники кількості клітин в 1 мл суспензії ($Ч10^5$) для сортів: Дар Павленка, Лозівський шаровидний, Пірожок, Степовий 83, Боровський та Серебристий були нижчі середньої кількості клітин, а в сортів: Болградська новинка, Косфорд, Барселонський та Трапезунд – вищі.

Досліджено, що за порівняння динаміки зміни чисельності клітин в суспензійних культурах окремих сортів грецького горіха з середніми значеннями по досліді встановлено, що показники кількості клітин в 1 мл суспензії ($Ч10^5$) для сортів: Коржеуцький, Кордене, Ферджан та Клішківський були нижчі середньої кількості клітин, а в сортів: Кишиневський, Чернівецький 1, Ярівський, Буковинський 2 та Фернет – відповідно вищі.

Вивчено, що на живильному середовищі за прописом Драйвера і Куніюкі спостерігався не лише високий відсоток регенерації рослин фундука, але й частота регенерації, від 44 до 63 %. Так, краща регенераційна здатність була у сорту Болградська новинка, Косфорд та Барселонський. При цьому кількість отриманих регенерантів становила 54, 56 та 55 %, а частота регенерації рослин з морфогенних калюсів – 63, 61 та 60 % відповідно.

Визначено, що на живильному середовищі за прописом Мурасіге і Скуга спостерігався високий відсоток регенерації рослин грецького горіха, а також і частота регенерації, від 50 до 68 %. Краща регенераційна здатність була у сорту грецького горіха Буковинський 2, Коржеуцький, Клішківський та Фернет. При цьому кількість отриманих регенерантів становила 65, 62, 62 та 62 %, а частота регенерації рослин з морфогенних калюсів – 68, 68, 64 та 63 % відповідно.

Визначено, що для проведення клітинної селекції та створення посухостійкого матеріалу фундука та грецького горіха слід використовувати сублетальну концентрацію маніту 6 %, або ж ПЕГ 6000 – 20 %.

Встановлено, що за застосування селективних систем інтенсивне формування колоній клітин було притаманним таким сортам фундука як: Трапезунд, Барселонський, Косфорд та Лозівський шаровидний. А от в грецького горіха інтенсивне формування колоній клітин було притаманним таким сортам як: Ярівський, Чернівецький 1, Кишиневський та Буковинський 2.

За результатами проведених досліджень встановлено, що найбільше значення ростового індексу при застосуванні сублетальних концентрацій маніту було у сортів: Трапезунд, Косфорд та Серебристий, а за застосування ПЕГ 6000 у: Трапезунд, Барселонський, Серебристий та Косфорд. Також встановлено, що найбільше значення ростового індексу при застосуванні сублетальних концентрацій маніту було у сортів грецького горіха: Ярівський, Фернет, Чернівецький 1 та Буковинський 2, а за застосування ПЕГ 6000 у: Фернет, Чернівецький 1, Буковинський 2 та Ярівський.

Визначено, що виживання калюсних ліній фундука на середовищі без селективного фактору становило 85,4 %, а от при культивуванні калюсних

тканин різних сортів на селективному середовищі з манітом виживання їх було в межах 4,4-5,4 %, тоді коли за застосування селективної системи з ПЕГ 6000 виживало калюсів 7,7-10,3 %. При цьому кращі показники виживання за селективного середовища з манітом були в сортів: Косфорд, Степовий 83, Барселонський, Трапезунд та Пірожок, а за застосування ПЕГ 6000: Трапезунд, Косфорд, Барселонський та Степовий 83.

Досліджено, що максимальне число посухостійких калюсних ліній формували сорти Трапезунд, Косфорд, Барселонський та Пірожок за додавання селективного агенту маніту, та сорти Барселонський, Трапезунд та Косфорд за додавання в якості селективного агенту ПЕГ 6000. Отже, сорт фундука Барселонський та Косфорд однаково добре підходять для селекції на посухостійкість з використанням обох селективних середовищ – маніту та ПЕГ 6000.

Досліджено, що кращі показники відсотку числа посухостійких рослин регенерантів було отримано на селекційному середовищі з використанням маніту в сортів Кишиневський, Коржеуцький та Ферджан. А от за використання середовища з додаванням ПЕГ 6000 більше посухостійких рослин регенерантів формувалось в сортів грецького горіха Буковинський 2, Ярівський та Фернет.

Визначено, що за застосування гама опромінювання або сечовини та культивування калюсу на селективному середовищі з додаванням маніту найбільша частота утворення морфогенного калюсу спостерігалась в сортів фундуку: Косфорд, Трапезунд, Дар Павленка, Степовий 83 та Барселонський, а за аналогічних умов опромінення та культивування на середовищі з додаванням ПЕГ – в сортів: Барселонський, Трапезунд, Косфорд, Пірожок та Степовий 83.

Також вивчено, що за застосування сечовини та культивування калюсу на селективному середовищі з додаванням маніту найбільша частота утворення морфогенного калюсу спостерігалась в сортів грецького горіха: Буковинський 2, Чернівецький 1, Фернет, Ярівський та Кордене, а за аналогічних умов опромінення та культивування на середовищі з додаванням ПЕГ – в сортів: Буковинський 2, Фернет, Клішківський, Ярівський та Чернівецький 1.

Результатами використання селективних агентів: сечовини та випромінювання було відібрано чотири генотипи фундука та ще чотири генотипи грецького горіха, які зарекомендували високу посухостійкість в лабораторних умовах.

Краще укорінення генотипів фундука спостерігалось на середовищі Драйвера і Кунюкі – 25 шт., що становило 61 % від загальної кількості експлантів, а в горіха 32 шт. та 71 %. Укорінення генотипів фундука на середовищі Мурасіге і Скуга в середньому становило 46 % від загальної кількості експлантів, а в горіха 22 шт. та 49 %. За використання живильного середовища Мурасіге і Скуга в фундука прижилося 75,8 %, а в грецького горіха 58,3 %. А от за застосування для ризогенезу середовища Драйвера і Кунюкі – 81,8 % та 83,3 % відповідно.

Досліджено, що ризогенез краще відбувався в рослин фундука за висаджування їх на перліт та вермикуліт. Так, у рослин цих варіантів збільшувалась кількість корінців на 26 та 51 %, та маса на 15 і 31 % порівняно з стандартом. Також в рослин грецького горіха за висаджування їх на перліт та вермикуліт збільшувалась кількість корінців на 40 та 83 %, та маса на 13 і 26 % порівняно з стандартом. А довжина корінців в розрахунку на одну рослину становила лише 87 та 77 % від довжини корінців на контролі, при цьому їх маса була більшою за показники контрольного варіанту. Аналогічно кращі варіанти за біометричним розвитком сприяли формуванню більшої за масою, але меншої за довжиною кореневої системи.

Середня довжина пагону рослин фундука за вирощування їх на перліті становила 81,23 мм, а на вермикуліті – 95,63 мм. Аналогічно застосування перліту та вермикуліту сприяло більш кращому росту стебла, тобто збільшенню діаметра пагона. Також встановлено, що за висаджування рослин грецького горіха на перліт та вермикуліт, довжина їх пагонів збільшилась до 85,98 та 99,26 мм, а діаметр до 6,78 та 7,23 мм.

Ключові слова: фундук, грецький горіх, клітинна селекція, індукований мутагенез, рослини-регенеранти, осмотичний стрес.

SUMMARY

Vrublevskiy A. T. Improvement of existing and development of new technological methods of microclonal propagation of nut crops. - Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

The dissertation on competition of a scientific degree of the doctor of philosophy on a specialty 201 - agronomy (20 Agrarian sciences and food). - Bila Tserkva National Agrarian University, Bila Tserkva, Kyiv, 2021.

Growing nut crops is a powerful promising area for growing agricultural products for export in Ukraine. Demand for nut products, as well as oilseeds, exceeds supply. However, today the country has unmet demand in the domestic market, which creates conditions for the intervention of imported fruits. Effective protection of the domestic producer of nut products is not to increase the import duty on it, but to create new competitive varieties and to develop technologies for their accelerated reproduction.

The process of vegetative propagation of woody crops is long, and especially nut, labor-intensive, and for the walnut is almost impossible. Therefore, the efforts of many researchers are aimed at developing industrial technologies for microclonal propagation (MCR) of hazelnuts and walnuts. Their use will increase production and expand the range of planting material and export products.

However, the microclonal propagation of nut crops has not yet gone beyond scientific laboratories. The complexity of such technological methods as introduction into aseptic conditions (self-poisoning by phenolic exudates, hyperhydration as a result of traumatic shock, etc.), stabilization of plant objects in the process of multiplication (selection of optimal trophic and hormonal determinants, methods of division of donors), induction of rhizogenesis and post-septic adaptation (including mycorrhiza of plants *in vitro* / *ex vitro*).

This leads to the intensification of scientific research of cytological, physiological, technological and organizational methods of improving technology and bringing it to the industrial level.

Another important issue is the creation of source material that can survive effectively in drought, especially in the early stages of plant development. After all, droughts are already occurring throughout Ukraine, and with little development of the root system, hazelnut and walnut seedlings have a fairly low survival rate when planted in open ground. Therefore, the study of these and other issues is quite relevant.

For the first time, schemes of cell selection and induced mutagenesis in vitro for hazelnuts and walnuts were developed and proposed, which allow to obtain callus lines and regenerating plants with increased resistance to osmotic stress.

Received further development: the use of hazelnut and walnut in cell selection for drought resistance of γ -irradiation with subsequent cultivation of callus cultures with polyethylene glycol and mannitol.

It has been experimentally established that the increase in resistance at the cellular and tissue levels is preserved at the level of regenerating plants of hazelnuts and walnuts.

Based on the results of laboratory studies and their experimental verification, a scientifically sound system of application in the selection of hazelnuts and walnuts with prior use of induced mutagenesis has been developed. The results of the work can be used to create new high-yielding drought-resistant varieties of hazelnuts and walnuts.

Cultivation of plants is carried out on DKW medium, which provides the formation of the largest number of micro-shoots - 3.6 pcs. compared to 1.8 pcs. on QL media and 2.1 pcs. of MS.

To overcome the problems of phenol production, we offer a number of measures: cultivation of mother plants in diffused light in the depository; the use of the antioxidant ascorbic acid for soaking explants before sterilization; introduction of plants by allocation of meristems, awakened buds; addition of PPM (Plant Preservative Mixture) biocide to the nutrient medium; adding to the nutrient medium PVP (polyvinylpyrrolidone).

At the stage of multiplication, 1.5 mg/l of benzylaminopurine is added to the nutrient medium. This concentration contributed to the formation of an average of 4.8

pieces. micro shoots with a high growth rate and a low percentage of vitrification of 2 %.

For successful rhizogenesis, the medium is modified by adding 2.5 g of activated carbon and auxin of indolylbutyric acid in the amount of 3.0 mg/l. Adding 2.5 g of activated carbon provides the formation of the largest number of roots – 2.3 pcs. at 3 mg/l IMC in the nutrient medium and increases the number of roots from 0 in the control to 2.5 pcs.

At the beginning of post-septic adaptation, the plants and the substrate are sprayed with the fungicide Previkur Energy 840 sl v.r.k., which provides better survival of plants. In addition to fungicidal protection, the drug stimulates growth processes, which is manifested in an increase in plant mass.

Aseptic seed treatment with concentrated sulfuric acid has been shown to be most effective in treating both hazelnut and walnut cotyledons.

After aseptic treatment and planting on the non-hormonal nutrient medium Murashige-Skuga with half the composition of macro- and micronutrients, germination of an average of 61.8 % of hazelnut cotyledons and 48.3 % of walnut cotyledons was observed. Also, using this treatment, we observed a decrease in the presence of phenol oxidation products from the level of three or two points to preferably one or two points.

It was studied that on the medium of Murashige and Skuga hazelnut varieties had a growth index of 6.2 and formed a callus weighing 159.8 mg, and when using the medium prescribed by Driver and Kuniuki, respectively, a growth index of 9.7 and formed a callus weighing 237.3 mg. The best growth index for the environment based on the instructions of the Driver and Kuniuki we observed when receiving callus in varieties of hazelnuts: Barcelona, Trabzon, Cosford and Bolgrad novelty. But the best average weight of the formed callus was in the varieties of hazelnuts: Pie and Steppe 83.

It was also determined that the best growth index for the use of the environment on the basis of the instructions of the Driver and Kuniuki was when receiving callus in walnut varieties: Fernet, Bukovynian 2, Chisinau, Kordene and Yarivsky. But the best

average weight of the formed callus was in walnut varieties: Bukovynsky 2, Chernivtsi 1 and Fernet.

It has been experimentally proven that in order to obtain a large number of callus tissues of different genotypes of hazelnuts and walnuts and to carry out appropriate further selection work with them, the best medium is a medium prescribed by Driver and Kuniuki. After all, it works effectively for growing both crops in vitro.

Analysis of the index of the ratio of the nucleus to the size of the cytoplasm (N/C) of hazelnuts Trapezund shows that it was the smallest in the parenchyma of the peripheral zone - 1.8 %, and the largest in the cells of the apical meristem - 27.0 %.

Comparison of the dynamics of suspension cultures of individual varieties of hazelnuts with average values shows that the number of cells in 1 ml of suspension (Ch105) for varieties: Dar Pavlenko, Lozovsky spherical, Pie, Steppe 83, Borovsky and Silver were lower than the average number of cells, and in varieties: The novelty of Bolgrad, Cosford, Barcelona and Trebizond are higher.

It was investigated that by comparing the dynamics of cell number change in suspension cultures of individual walnut varieties with the average values of the experiment, it was found that the number of cells in 1 ml of suspension (Ch105) for varieties: Korzheutsky, Kordene, Ferjan and Klishkovsky were lower than the average number of cells. and in varieties: Chisinau, Chernivtsi 1, Yariv, Bukovyna 2 and Fernet - respectively higher.

It was studied that in the nutrient medium according to the recipe of Driver and Kuniuki not only a high percentage of regeneration of hazelnut plants was observed, but also the frequency of regeneration, from 44 to 63 %. Yes, the best regenerative ability was in the varieties Bolgrad novelty, Cosford and Barcelona. The number of regenerants obtained was 54, 56 and 55 %, and the frequency of regeneration of plants from morphogenic calluses was 63, 61 and 60 %, respectively.

It was determined that in the nutrient medium according to the recipe of Murashige and Skuga there was a high percentage of regeneration of walnut plants, as well as the frequency of regeneration, from 50 to 68 %. The best regenerative ability was in the walnut variety Bukovynsky 2, Korzheutsky, Klishkivsky and Fernet. The

number of regenerants obtained was 65, 62, 62 and 62 %, and the frequency of regeneration of plants from morphogenic calluses was 68, 68, 64 and 63 %, respectively.

It has been determined that sublethal concentration of mannitol 6% or PEG 6000 - 20 % should be used for cell selection and creation of drought-resistant material of hazelnuts and walnuts.

It was found that the use of selective systems intensive formation of cell colonies was characteristic of such varieties of hazelnuts as: Trapezund, Barcelona, Cosford and Lozovsky spherical. But in walnut intensive formation of cell colonies was characteristic of such varieties as: Yariv, Chernivtsi 1, Chisinau and Bukovyna 2.

According to the results of the research, it was found that the highest value of the growth index when using sublethal concentrations of mannitol was in the varieties: Trapezund, Cosford and Silver, and when using PEG 6000 in: Trapezund, Barcelona, Silver and Cosford. It was also found that the highest value of the growth index when using sublethal concentrations of mannitol was in walnut varieties: Yarivsky, Fernet, Chernivtsi 1 and Bukovynsky 2, and when using PEG 6000 in: Fernet, Chernivtsi 1, Bukovynsky 2 and Yarivsky.

It was determined that the survival of callus lines of hazelnuts on medium without selective factor was 85.4%, but in the cultivation of callus tissues of different varieties on selective medium with mannitol their survival was in the range of 4.4-5.4%, while the use of selective systems with PEG 6000 callus survived 7.7-10.3%. The best survival rates in a selective environment with mannitol were in the varieties: Cosford, Steppe 83, Barcelona, Trapezund and Pie, and when using PEG 6000: Trapezund, Cosford, Barcelona and Steppe 83.

It was studied that the maximum number of drought-resistant callus lines was formed by Varieties Trapezund, Cosford, Barcelona and Pie with the addition of selective mannitol agent, and varieties Barcelona, Trapezund and Cosford by adding PEG 6000 as selective agent. selection for drought resistance using both selective media - mannitol and PEG 6000.

It is investigated that the best percentages of the number of drought - resistant regenerating plants were obtained on a breeding medium using mannitol in the varieties Chisinau, Korzheutsky and Ferjan. But with the use of medium with the addition of PEG 6000 more drought-resistant regenerating plants were formed in walnut varieties Bukovynsky 2, Yarivsky and Fernet.

It was determined that with the use of gamma irradiation or urea and cultivation of callus on a selective medium with the addition of mannitol, the highest frequency of morphogenic callus was observed in hazelnut varieties: Cosford, Trapezund, Dar Pavlenko, Steppe 83 and Barcelona, and under similar irradiation and culture conditions. by adding PEG - in the varieties: Barcelona, Trabzon, Cosford, Pie and Steppe 83.

It was also studied that when using urea and cultivating callus on a selective medium with the addition of mannitol, the highest frequency of morphogenic callus was observed in walnut varieties: Bukovynsky 2, Chernivtsi 1, Fernet, Yarivsky and Kordene, and under similar conditions of irradiation and cultivation on medium PEG - in varieties: Bukovynsky 2, Fernet, Klishkivsky, Yarivsky and Chernivtsi 1.

As a result of the use of selective agents: urea and radiation, four hazelnut genotypes and four more walnut genotypes were selected, which proved to be high drought resistance in the laboratory.

The best rooting of hazelnut genotypes was observed in the environment of Driver and Kuniuki - 25 pieces, which was 61% of the total number of explants, and in nuts 32 pieces. and 71%. Rooting of hazelnut genotypes in the environment of Murashige and Skuga averaged 46% of the total number of explants, and in the nut 22 pcs. and 49%. For the use of nutrient medium Murashige and Skuga in hazelnuts took root 75.8%, and walnuts 58.3%. But for the use of the driver and Kuniuki environment for rhizogenesis - 81.8% and 83.3%, respectively.

It was studied that rhizogenesis occurred better in hazelnut plants than planting them on perlite and vermiculite. Thus, the plants of these variants increased the number of roots by 26 and 51%, and the weight by 15 and 31% compared to the standard. Also, walnut plants increased the number of roots by 40 and 83%, and weight by 13 and 26%

compared to the standard when planted on perlite and vermiculite. And the length of the roots per plant was only 87 and 77% of the length of the roots in the control, and their weight was greater than the control variant. Similarly, the best options for biometric development contributed to the formation of a larger mass, but smaller in length of the root system.

The average length of the shoot of hazelnut plants for growing them on perlite was 81.23 mm, and on vermiculite - 95.63 mm. Similarly, the use of perlite and vermiculite contributed to better stem growth, ie increasing the diameter of the shoot. It was also found that when planting walnut plants on perlite and vermiculite, the length of their shoots increased to 85.98 and 99.26 mm, and the diameter to 6.78 and 7.23 mm.

Key words: hazelnuts, walnut, cell selection, induced mutagenesis, regenerating plants, osmotic stress.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті в наукових фахових виданнях:

1. Подгаєцький А.А., Мацкевич В.В., **Врублевський А.Т.** Використання біоциду РРМ як додаткового деконтамінанта в процесі мікроклонального розмноження рослинних об'єктів. Вісник Сумського національного аграрного університету. Агрономія і біологія. 2016. Вип. 9(32). С. 156-160. *(здобувач організував проведення досліджень, виконав біотехнологічні дослідження, 0,29 д.а.).*

2. Андрієвський В.В., **Врублевський А.Т.**, Філіпова Л.М., Мацкевич В.В., Мацкевич О.В. Проблеми мікроклонального розмноження фундука. Агробіологія. 1'2019. С. 74-84. *(здобувач організував проведення досліджень, виконав біотехнологічні дослідження, 0,46 д.а.).*

3. Larysa M. Filipova, Vyacheslav V. Matskevych, Lesia M. Karpuk*, Anatolii P. Stadnyk, Viktor V. Andriievsky, **Andriy T. Vrublevsky**, Natalia M. Krupa, Andriy A. Pavlichenko. Features of Rooting Paulownia in vitro. Egypt.J.Chem. Volume 62, pp. 57-63. DOI: 10.21608/EJCHEM.2019.18333.2127 *(здобувач*

організував проведення досліджень, виконав біотехнологічні дослідження, 0,29 д.а.).

Публікації у наукових виданнях іноземних держав:

4. Vrublevskyi A.T. Selection of drought-resistant plant material in *in vitro* culture. Norwegian Journal of development of the International Science. Vol. 1. № 75. 2021.P. 8-14 (0,29 д.а.).

Матеріали науково-практичних конференцій:

5. **Врублевський А.Т.**, Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Особливості боротьби із фенолоутворенням за введення ліщини *in vitro*. «Аграрна наука – виробництву». Тези доповідей державної науково-практичної конференції. М. Біла Церква, 17 листопада 2016 року. Біла Церква, 2016. Ч. 2. С. 65-67 (здобувач організував проведення досліджень, виконав біотехнологічні дослідження, 0,13 д.а.).

6. Filipova L., Matskevych V., Karpuk L., Andriievsky V., **Vrublevsky A.**, Pavlichenko A. Features of paulownia plants post-septic adaptation. Abstract is a part of Multidisciplinary Conference for Young Researchers held in Bila Tserkva on 22nd November 2019 within the framework of the project: «Support of young university capacity in education and research and science activities in Ukraine» (2019), financed by Czech Republic Development Cooperation. P. 50-53 (здобувач організував проведення досліджень, виконав біотехнологічні дослідження, 0,17 д.а.).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	19
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ ПРИЙОМІВ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ТА СТВОРЕННЯ ПОСУХОСТІЙКОГО ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	25
1.1. Біотехнологічні аспекти вивчення культури тканин в умовах <i>in vitro</i>	25
1.2. Селекція <i>in vitro</i> на посухостійкість	39
1.3. Оцінка посухостійкості вихідного селекційного матеріалу	44
Висновки до розділу 1	47
РОЗДІЛ 2. УМОВИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	48
2.1. Вихідний матеріал	48
2.2. Отримання асептичного рослинного матеріалу та його культивування	56
2.3. Отримання суспензійних культур	60
2.4. Цитологічні дослідження калюсогенезу	61
2.5. Індукований мутагенез	62
Висновки до розділу 2	63
РОЗДІЛ 3. ОПТИМІЗАЦІЯ ПАРАМЕТРІВ КУЛЬТИВУВАННЯ РОСЛИН В КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i>	64
Висновки до розділу 3	77
РОЗДІЛ 4. МОРФОГЕНЕЗ РОСЛИН В КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i>	78
4.1. Отримання асептичного рослинного матеріалу	78
4.2. Особливості калюсогенезу експлантатів	83
4.2.1. Особливості формування морфогенетично активних модулів в калюсах фундука	93
4.3. Особливості культивування клітинних суспензій	97

4.4. Морфогенетичні відмінності рослин-регенерантів різних генотипів в залежності від гормонального складу живильного середовища	100
Висновки до розділу 4	102
РОЗДІЛ 5. СТВОРЕННЯ ПОСУХОСТІЙКОГО ВИХІДНОГО СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ В КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i>	105
5.1. Використання клітинної селекції для створення посухостійких форм	105
5.2. Підбір селективних агентів та рівня їх концентрацій для створення посухостійких форм в умовах <i>in vitro</i>	107
5.3. Оцінка виживаємості калюсних тканин та ефективність регенерації резистентних рослин в культурі <i>in vitro</i>	112
5.4. Використання індукованого мутагенезу в процесі отримання вихідного посухостійкого селекційного матеріалу	117
Висновки до розділу 5	120
РОЗДІЛ 6. АДАПТАЦІЯ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ ДО УМОВ ВІДКРИТОГО ҐРУНТУ	123
Висновки до розділу 6	130
ВИСНОВКИ	132
РЕКОМЕНДАЦІЇ	135
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	136
ДОДАТОК	174

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

2,4-Д – дихлорфеноксыоцтова кислота

Ex vitro – перше постасептичне вирощування рослин *in vitro*

In vivo – вирощування матеріалу у природних умовах

MS – середовище за прописом Мурасіге і Скуга

MS_{1/2} – середовище за прописом Мурасіге і Скуга із половинним набором мінеральних елементів

N-НМС –N-нітросо-N-метилсечовина

QL – середовище за прописом Куаріна і Лепувра

а.в. – активоване вугілля

АБК – абсцизова кислота

БАП – бензиламінопурин

ГК – гіберелова кислота, гіберелін

ЕМС – етил метил сульфонат

ІМК – індолілмасляна кислота

ІОК – індолілоцтова кислота

МКР – МКР рослин, в умовах *in vitro* з мікогетеротрофним живленням

НГ – N-метил-N-нітро-N-нітросогуанідін

НЕС – N-етил-N-нітрососечовина

НОК – нафтилоцтова кислота

НОК – нафтилоцтова кислота

ПВП – полівінілпіролідон

ПЕГ – поліетиленгліколь

ФАМКР – фотоавтотрофний метод МКР.

ВСТУП

В Україні інтенсивний розвиток сільського господарства вимагає застосування сучасних біотехнологічних методів, адже потенційно можливі класичні ресурси збільшення продуктивності сільськогосподарських культур вичерпані. Причому використання високотехнологічних методів поліпшення сортів культур часто ускладнене в зв'язку з їх дороговартісністю та неможливістю ефективного запровадження отриманих результатів в масове виробництво.

Біотехнологія оперуючи системою знань та методів які можна віднести як і до спеціальної так і класичної науки здатна істотно розширити можливості сучасної селекції та задовольнити виробників високоякісним посадковим матеріалом сільськогосподарських культур.

Формування нових знань та способів розмноження сільськогосподарсько цінних культур дозволить більш ефективно їх вирощувати з значно меншими витратами на отримання високоякісного посадкового матеріалу.

Актуальність теми вирощування горіхоплідних культур є потужним перспективним напрямом вирощування в Україні аграрної продукції на експорт. Попит на продукцію горіхоплідних, так само як і олійних культур, перевищує пропозицію. Однак на сьогодні в державі є незадоволений попит на внутрішньому ринку, що створює умови для інтервенції імпортованих плодів. Ефективний захист вітчизняного виробника горіхоплідної продукції полягає не в збільшенні на неї ввізного мита, а у створенні нових конкурентноспроможних сортів та у розробці технологій їх прискореного розмноження (Косенко І.С. та ін., 2008).

Процес вегетативного розмноження деревних культур тривалий, і особливо горіхоплідних, трудомісткий, а для грецького горіха майже неможливий. Тому зусилля багатьох дослідників спрямовані на розробку промислових технологій мікроклонального розмноження (МКР) фундука та грецького горіха. Їх застосування дозволить збільшити обсяги виробництва і розширити асортимент посадкового матеріалу та експортної продукції.

Проте мікроклональне розмноження горіхоплідних культур досі не вийшло за межі наукових лабораторій. Стримують розробку та впровадження складність таких технологічних прийомів як введення в асептичні умови (самоотруєння фенольними ексудатами, гіпергідратація в результаті травматичного шоку та ін.), стабілізація рослинних об'єктів у процесі мультиплікації (підбір оптимальних трофічних та гормональних детермінант, способів поділу донорних рослин на експланти), індукція ризогенезу та постасептична адаптація (в т.ч. мікоризація рослин *in vitro/ex vitro*).

Це обумовлює активізацію наукового пошуку цитологічних, фізіологічних, технологічних і організаційних прийомів удосконалення технологій і доведення її до промислового рівня.

Також важливим питанням залишається створення вихідного матеріалу здатного ефективно виживати в умовах посухи, особливо на ранніх етапах розвитку рослин. Адже посухи уже трапляються на всій території України, а за незначного розвитку кореневої системи саджанці фундука та горіху мають досить низький відсоток виживання за висаджування їх в відкритий ґрунт.

А тому вивчення цих та інших питань є досить актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Дослідження за темою дисертаційної роботи виконані впродовж 2016–2020 рр. і є складовою частиною досліджень Білоцерківського національного аграрного університету згідно з тематикою: «Удосконалення існуючих та розробка нових технологічних прийомів мікроклонального розмноження горіхоплідних культур» на 2017–2021 рр. (номер державної реєстрації 0117U004673).

Мета досліджень полягає у одержанні посухостійких ліній фундука та грецького горіха та вивченні особливостей перебігу фізіологічних процесів в рослинах під впливом осмотичного стресу. Для досягнення цієї мети були поставлені наступні основні задачі:

- вивчити морфогенетичну активність фундука та грецького горіха в культурі *in vitro* в залежності від генотипу;

- провести ідентифікацію та диференціацію генотипів фундука та грецького горіха;
- розробити схему клітинної селекції фундука та грецького горіха в культурі *in vitro*;
- підібрати осмотично активні речовин та їх концентрації;
- отримати посухостійкі лінії фундука та грецького горіха;
- провести оцінку вихідного матеріалу за основними елементами, що визначають посухостійкість;
- визначити рівень посухостійкості кращих ліній фундука та грецького горіха і перевірити господарсько-цінні ознаки;
- дати економічну оцінку біотехнологічним методам розмноження фундука та грецького горіха.

Об'єкт дослідження – фізіологічні процеси росту, розвитку фундука та грецького горіха під впливом осмотичного стресу.

Предмет дослідження – сорти фундука та грецького горіха.

Методи досліджень. В роботі застосовували як загально наукові так і спеціальні методи проведення досліджень. Серед загально загальнонаукових були використані наступні: *гіпотеза; експеримент; спостереження*. Серед спеціальних методів застосовували в роботі такі як: *біотехнологічні; біохімічні; молекулярно-генетичні; математично-статистичні; порівняльно-розрахункові*.

Наукова новизна дослідження *Уперше* розроблені та запропоновані схеми клітинної селекції та індукованого мутагенезу *in vitro* для фундука та грецького горіха, які дозволяють одержувати калюсні лінії і рослини-регенеранти з підвищеною стійкістю до осмотичного стресу.

Дістали подальшого розвитку: питання використання в клітинній селекції фундука та грецького горіха на стійкість до посухи γ -опромінення з подальшим культивуванням калюсних культур з поліетиленгліколем та манітом.

Експериментально встановлено, що підвищення стійкості на клітинному та тканинному рівнях, зберігається на рівні рослин-регенерантів фундука та грецького горіха.

Практичне значення отриманих результатів. На основі результатів лабораторних досліджень та їх експериментальної перевірки розроблено науково обґрунтовану систему застосування у селекції фундука та грецького горіха з попереднім використанням індукованого мутагенезу, що дозволяють отримати та зберегти ознаку посухостійкості на рівні регенерантів зі збереженням господарсько-цінних ознак.

Результати роботи можуть бути використані для створення нових високопродуктивних посухостійких сортів фундука та грецького горіха.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційну роботу виконано самостійно і для цього: здійснено аналіз літературних джерел за темою дисертації, розроблено програму і схему дослідів, закладено і проведено польові, лабораторні досліді, визначено економічну й біоенергетичну ефективність досліджень, сформовано загальні висновки та пропозиції виробництву. За результатами проведених досліджень підготовлено наукові публікації.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень доповідались на засіданнях кафедри лісівництва, ботаніки і фізіології рослин та агробіотехнологічному факультеті Білоцерківського національного аграрного університету МОН України (2016–2019 рр.), та наукових конференціях: Державній науково-практичній конференції «Аграрна наука – виробництву», (Біла Церква, 17 листопада 2016 року); Міжнародній науково-практичній конференції «Новітні агротехнології: теорія та практика» (м. Київ, 11 липня 2017 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту. Інноваційні технології в агрономії, агрохімії та екології» (м. Біла Церква, 27-28 вересня 2018 р.); Multidisciplinary Conference for Young Researchers (Bila Tserkva on 22nd November 2019).

Публікації результатів досліджень. Основні результати досліджень висвітлено у 6 наукових праць у фахових виданнях, з яких 3 публікації в виданнях включених до міжнародних наукометричних баз даних, у тому числі Scopus, 1 – у закордонному виданні та 2 тез доповідей нанауково-практичних конференціях.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена на 175 сторінках машинописного тексту, містить 39 таблиць, 4 рисунків. Робота складається зі вступу, 6 розділів, висновків, рекомендацій та 1 додатку. Список використаних джерел налічує 350 найменувань, з яких 146 латиницею.

РОЗДІЛ 1
ОСОБЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ ПРИЙОМІВ
МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ТА СТВОРЕННЯ
ПОСУХОСТІЙКОГО ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ
(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Біотехнологічні аспекти вивчення культури тканин в умовах *in vitro*

В даний час культура ізольованих клітин, тканин та органів досить широко використовується в дослідженнях для вивчення закономірностей клітинної диференціації, гісто- і морфогенезу, механізмів реалізації генетичної інформації та ролі у цих процесах окремих груп фітогормонів [50; 10].

Фактично термін культура клітин рослин відноситься до усіх робіт *in vitro* (у стерильному штучному середовищі) з культурами ізольованих клітин, тканин, органів та рослин-регенерантів [166].

На сьогодні, актуальним для селекції на посухостійкість, є створення та прискорене розмноження вихідного матеріалу методами, що дозволяють не лише створити посухостійкі лінії, але й зберегти господарсько-цінні ознаки.

Причому якраз методи роботи з рослинним матеріалом в умовах *in vitro* істотно різняться між собою з огляду на подальше використання матеріалу. Адже для мікророзмноження та селекційної роботи потрібна генетична стабільність, а для інших (створення вихідного матеріалу з заданими ознаками), навпаки, краща мінливість регенерантів [113; 15; 95; 82; 21].

Розвиток науки потребує вдосконалення традиційних методів та розробки нових схем селекції на посухостійкість. Ефективним при цьому є застосування біотехнологічних методів, або ж властивість соматичних клітин реалізувати тотипотентність [235; 248; 347; 105].

Водночас значно розширити генетичну різноманітність рослинного селекційного матеріалу може використання соматичної мінливості, змін що індукуються культивуванням тканин *in vitro* та які можуть виявлятися у рослин-

регенерантів [11; 14; 24].

Генна інженерія, клітинна селекція, культура ізольованих тканин, клітин та органів рослин дозволяють за відносно короткі терміни створити та розмножити вихідний матеріал з необхідними показниками відповідності [97].

Прикладів ефективного застосування таких методів можна наводити безліч. Так, використання біотехнологічних методів дозволило за короткий строк отримати лінії стевії що мають більш інтенсивний ріст та приживання в умовах відкритого ґрунту. Отримано лінії проса з короткою тривалістю вегетаційного періоду, кращою врожайністю та високим вмістом білка і сухої речовини. Виділено рослини пшениці м'якої з істотно вищими показниками продуктивної куцтності, озерненості головного колосу та маси 1000 зерен [9; 27; 25; 30; 31; 36].

Також отримано вихідний матеріал рису, картоплі, ефіроолійних та лікарських рослин: лаванди, шавлії, коріандру, полину, м'яти, рути, маку, женьшеню та інших. Тобто на ряду з традиційними культурами все більшу частку в культивуванні *in vitro* займають види малопоширені, такі що складно розмножуються або піддаються селекційному впливу традиційними способами [17; 16; 19; 20; 22].

А тому культура культури клітин, тканин і органів здатна ефективно задовольняти потреби сучасної селекції [93; 97] а також сприяти не тільки прискореному розмноженню а й збереженню цінних генотипів [252; 253; 254; 257; 331; 346; 13; 98].

В умовах *in vitro* проводиться соматональний добір [272; 51], індукований мутагенез [277; 313; 337; 43; 101; 141; 183; 186], тренсгенез [215; 238; 251; 258; 340; 100; 168], роботи по формуванню гаплоїдів, подвоєних гаплоїдів та поліплоїдів [313].

В умовах *in vitro* після добору на селективних середовищах клітин та подальшого формування рослини-регенерантів, їх можна залучати у селекційний процес як джерела стійкості досить за короткий час. Тоді створення стійких до певних абіотичних чи біотичних факторів рослин класичними методами досить

тривалий в часі та складний процес [155].

Також в культурі ізольованих тканин можуть виникати епігенетичні варіації, які не становлять інтересу для селекції. Однак, аналіз потомства регенерантів слід проводити за 2-3 цикли клонального мікророзмноження, щоб уникнути хибних висновків щодо природи отриманих змін [26; 28; 29].

Калюс на даний час є основним типом культивованої рослинної клітини. Адже для тканин рослин в умовах *in vitro* формування калюсу пов'язані з індукцією клітинного поділу та є природною реакцією на ушкодження, а за нормальних умов росту та розвитку така функція організму блокована [20, 120, 154].

Калюсні клітини зберігають багато властивостей притаманним нормальним клітинам: стійкість до факторів навколишнього середовища, синтез вторинних метаболітів, а окрім того мають необмежений та не організований ріст. Швидке отримання рослинного матеріалу дає можливість використовувати калюсні тканини для виконання мутагенезу *in vitro*, клітинної селекції, соматоклональної селекції [34; 35; 37; 38].

Окрім того, калюсні культури можуть бути джерелом масового біотехнологічного отримання глікозидів, сапонінів, алкалоїдів, фенольних сполук, ефірних олій [40; 126; 44; 45].

Наявність у складі живильного середовища ауксинів та цитокінінів є однією з важливих умов перетворення рослинної клітини на калюсну. Адже ауксин сприяє дедиференціації а цитокініни проліферації клітин [49; 64; 77; 67; 65; 66].

Перехід клітини *in vitro* з диференційованого в дедиференційований стан призводить до зміни в білковому складі і у цих клітинах з'являються специфічні білки, не характерні для фотосинтезуючих клітин рослин [59; 60; 76].

На калюсоутворення впливає: генотип, тип експланту, гормональний склад живильного середовища, вік та стан рослини з якої взяті частини для розмноження їх *in vitro* [68; 58; 54; 79; 84; 85].

Також важливим питанням при вивченні калусогенезу все ж залишається оптимізація складу живильного середовища [56; 57; 86; 87].

В якості експлантів можна використовувати сегменти листків, черешків, стебел, суцвіття, пиляки, а також інші вегетативні та генеративні органи рослин [75; 78; 72; 88].

На індукцію калусогенезу впливає з яких частин рослин отримують експланти, причому максимальну частоту індукції калусогенезу мали експланти з верхівкових пагонів. При цьому простежується вплив типу експланту на процес утворення калусної тканини [61; 62; 89; 52; 90].

Причому ключовим моментом реалізації клітинних технологій є індукція морфогенезу та отримання цілих рослин. Регенерація рослин відбувається за рахунок тотипотентності клітин або ж властивості соматичної клітини в повній мірі реалізувати програму розвитку та започаткувати розвиток цілого рослинного організму [74; 69; 103; 106].

Морфогенез або ж формування клітин, органів, частин організму супроводжується диференціацією клітин та тканин. В умовах *in vitro* бувають наступні типи морфогенезу: гістогенез, або ж ріст не організованих калусних клітин та тканинних елементів – провідних, механічних, трахеїд та ін.; органогенез – утворення органів рослин; соматичний ембріогенез або ж формування ембріодів подібних у своєму розвитку зиготичним зародками [63; 70; 73; 46].

Органогенез та ембріогенез можуть відбуватись двома способами: безпосередньо з тканин експланту (прямий), а також через стадію утворення калюсу (непрямий) [117; 118; 119; 120].

Індукція органогенезу починається з формування в калюсі осередків морфогенезу (груп меристематичних клітин). У меристематичному осередку спочатку формується брунька (у випадку геммогенезу), з якої потім розвивається ціла рослина. У той же час при соматичному ембріогенезі розвивається біполярна ембріодна структура, яка бере початок із однієї клітини [124; 127; 128; 132].

Процес перебудови клітин калюсу в організовані структури супроводжується низкою генетичних, біохімічних та морфологічних змін. Адже здатність до регенерації рослин з калюсу контролюється полігенною системою. Так, вивчення сигналів та механізмів, що активують процеси морфогенезу у дедиференційованих клітин тютюну *in vitro* показало, що морфогенез у калюсі характеризувався включенням чи виключенням синтезу певних білків [131; 130; 133; 134].

Процеси морфогенезу в культурі *in vitro* детально вивчені для багатьох видів рослин, у тому числі для основних сільськогосподарських культур [115; 142], ефіроолійних та лікарських рослин [135; 137; 142].

Морфогенетичний потенціал рослин визначається завдяки основним лімітуючим факторами: генотипу і складу живильного середовища, або взаємодії цих факторів. Так, формування ембріогенного калюсу у стерильних ліній кукурудзи було значно нижчим, ніж у фертильних форм, а от у різних генотипів лаванди з семи вивчених генотипів здатністю до регенерації рослин з калусів мали лише сорти № 337-9, № 75-11, № 310-17. У калусів герані ефіроолійної регенераційна здатність калусів стеблового та черешкового походження була істотно вищою, ніж у калусів, отриманих з експлантів листка [144; 145; 81; 181].

Важливим фактором, який впливає на частоту індукції морфогенезу, є тривалість культивування калюсу. Згідно даними, зі збільшенням віку калусних культур знижується їх здатність до регенерації, що, ймовірно, пов'язано зі зміною рівня ендогенних гормонів, накопиченням негативних генетичних змін у клітинах або іншими причинами. У більшості вивчених видів рослин індукція морфогенезу обмежувалася 3-4 пасажами каллусов [147; 149; 151]. Є дані, згідно з якими морфогенетичний потенціал калусів полину естрагон зберігався протягом 4-5 пасажів [192].

Калуси фенхелю зберігали здатність до регенерації на живильному середовищі, доповненому 1,0 мг/л НУК та 0,5 мг/л БАП до 4-5-го пасажу, при підвищенні концентрації БАП до 1,0 мг/л – до 9-12 пасажів, а заміні БАП на кінетин – до 16 пасажу [39].

У лаванди та коріандру формувалися морфогенні штами, що зберігають здатність до регенерації протягом 1,5-2,5 років. А ось у шавлії мускатної в калусних культурах, отриманих з бруньок та мікрочеренків, регенерацію рослин відзначали лише протягом 6-10 пасажів [71; 75].

Серед клітинних технологій найбільш активно використовуваним у рослинницькій та селекційно-насінницькій практиці є клональне мікророзмноження, яке безстатевим розмноженням рослин у культурі *in vitro*, що дозволяє отримати форми, генетично ідентичні вихідному генотипу [153; 158; 129].

В даний час мікроклоналка має уже промислову основу і на лабораторному рівні відпрацьована для більш ніж тисячі видів деревних, чагарникових та трав'янистих рослин [161; 162; 94; 342; 345].

Інтенсивне впровадження розмноження *in vitro* обумовлено його перевагами порівняно з традиційно використовуваними методами насінневого та вегетативного розмноження, що дозволяють вирішити багато проблем насінництва, а також полегшити та прискорити селекційний процес. Серед основних переваг можна виділити такі: високий коефіцієнт розмноження, отримання генетично однорідного та оздоровленого посадкового матеріалу, можливість створення банків цінних, рідкісних та зникаючих форм рослин, здійснення цілорічного розмноження в лабораторних умовах, що дозволяє виключити вплив погоди та клімату [167; 170; 332; 339; 341].

Основною перевагою розмноження *in vitro* є швидке розмноження цінних генотипів та нових сортів та їх прискорене впровадження у виробництво, особливо у деревних, плодово-ягідних, декоративних та хвойних культур [169; 173; 326; 329; 330].

В культурі *in vitro* використання сомаклональних варіантів має широке практичне застосування. Використання його в процесі створення нових сортів дозволяє отримувати рослини, що відрізняються від вихідних за рядом господарсько цінних ознак, морфології, біохімічних показників, хромосом, стійкості до хвороб і абіотичних стресів [99; 109; 108; 111].

Існує декілька причин виникнення соматклональної мінливості, перш за все вона зумовлена природною генетичною гетерогенністю клітин вихідного експланту – коли у меристематичних тканинах рослини може відбуватися ендоредуплікація хромосом та формування тканин різного рівня плоїдності, внаслідок чого з них можуть утворюватися хімери та міксоплоїди [174; 177; 319; 323]. Друга причина пов'язана із генетичною мінливістю в умовах *in vitro*, що виникає в основному у зв'язку з тривалим культивуванням калюсних культур, а також під впливом екзогенних гормонів у складі живильного середовища [179; 180; 182].

Дані отримані з літературних джерел засвідчують що частота виникнення соматклональних варіацій залежить від генотипу, типу експланту, тривалості культивування калюсу, гормонального складу живильного середовища та інших факторів [184; 185; 315; 318]. Причому було виявлено відмінності щодо здатності до отримання соматклонів у різних видів та сортів рослин [152; 188; 312].

Тривалість культивування калюсних тканин є важливим фактором, що впливає на мінливість клітин *in vitro*. Причому дія цього фактору у багатьох видів посилюється зі збільшенням пасажу [190; 191]. Слід зазначити, що при цьому важливо зберегти морфогенетичний потенціал, однак у багатьох культур калюси вищого пасажу втрачають здатність до регенерації [193; 307]. Однак, є дослідження, що підтверджують протилежне і у фенхелю були виділені калусні штами, які на середовищах, доповнених кінетином та аденіном, зберігали здатність до морфогенезу протягом 12-16 пасажів. Клітинні популяції лаванди та коріандру зберігали морфогенетичну активність протягом 1,5-2,5 років, хоча у деяких генотипів лаванди спостерігали суттєве зниження регенераційної здатності калюсів до 4-5 пасажів [204; 301; 308].

Тип морфогенезу впливає також на прояв соматклональної мінливості. Є дані про те, що рослини, отримані шляхом геммогенезу, мають більшу генетичну мінливість, ніж регенеранти із соматичних зародків [196; 299; 300]. Тому соматичний ембріогенез частіше використовують для клонального розмноження та отримання штучного насіння [294; 295; 297].

Використання соматоклональної мінливості в селекційних завданнях має низку переваг: поява з високою частотою важливих ознак; виникнення мутацій, які неможливо одержати при використанні традиційних методів селекції; поєднання в межах одного соматоклону кількох цінних ознак.

В методу соматоклональної мінливості існує і ряд недоліків, таких як відсутність надійних методик регенерації, зниження морфогенного потенціалу зі збільшенням пасажу калюсів, відсутність «спрямованості» соматоклональних змін, і навіть висока ймовірність прояви небажаних ознак [197; 198].

Незважаючи на недоліки, застосування клітинних технологій, що базуються на соматоклональної мінливості, дозволяє підвищити ефективність селекційного процесу. Тому поглиблене вивчення механізмів індукції певних господарсько-цінних ознак та регуляції та визначення умов збільшення спектру мінливості досить актуальне завдання.

Важлива роль клітинної інженерії відведена методу індукованого мутагенезу *in vitro*, який надає широкі можливості збільшення мінливості культивованих клітин [199; 203; 195].

Мутагенез – процес виникнення спонтанних змін – мутацій. Умовно виділяють природний або ж спонтанний мутагенез, що виникає під впливом факторів навколишнього середовища та фізіолого-біологічних змін у самому організмі, та штучний або ж індукований, експериментальний мутагенез, причиною якого є певні фактори впливу людини – мутагени [290; 293].

У культурі *in vitro*, для мутагенної обробки застосовують фізичні впливи: електромагнітне, ультрафіолетове та іонізуюче випромінювання, хімічні агенти: колхіцин, етилметансульфат, етиленемін, N-нітрозно-N-метилсечовина, та ін., та біологічні активатори: бактерії, віруси, плазмідни та ін. фактори [262; 264].

Колхіцин є традиційним мутагеном та він дозволяє стабільно отримувати більше змінених рослин порівняно з іншими варіантами впливу, а також його вплив призводить до підвищення морфогенетичного потенціалу [203].

Кунахом В.А. за допомогою хімічного мутагенезу були отримані високопродуктивні клітинні штами раувольфії зміїної, що перевершують

контрольні клітинні лінії накопичення біомаси і вмісту алкалоїдів в 1,4-1,6 разів [95].

Використання гамма-випромінювання сприяло збільшенню варіацій у потомстві рису за довжиною і вагою зерна, а також за рівнем вмісту в ньому білка і щільності крохмального гелю, що утворюється. Обробка калюсів незрілих зародків ячменю дозволило виділити витривалі форми рослин, здатні рости на забруднених алюмінієм кислих ґрунтах [194; 207].

Перевагою мутагенезу *in vitro* є те, що як об'єкт мутагенної обробки можуть служити як ізольовані органи рослин так і калюсні та суспензійні культури або протопласти [200; 286; 288; 287].

Також при роботі з мутагенами необхідно враховувати їх негативний вплив на процеси калусо- та морфогенезу, а також їх можливу взаємодію з компонентами живильного середовища. Тому розрахунки оптимальної дози мутагенної речовини передбачають визначення не тільки максимального мутагенного впливу, а й необхідність підтримки процесів клітинної диференціації на певному рівні [282; 283; 285].

Мутагенез використовують як самостійний біотехнологічний прийом для створення мутантних клонів, а також мутагенна обробка часто застосовується як один з етапів клітинної селекції, що дозволяє підвищити рівень мінливості клітин і, відповідно, ефективність відбору цінних для селекції генотипів [202; 208].

Особливо важлива роль відведена методам клітинної селекції серед клітинних технологій, що дозволяють розширити генетичну різноманітність, які, на відміну від використання соматоклональної варіабельності, дозволяють вести спрямований скринінг генотипів із заздалегідь заданими властивостями [201].

Серед основних методів клітинної селекції можна виділити п'ять основних методів: пряма (виживає лише мутантний тип клітин), непряма (вибіркова загибель клітин, що діляться, вимагає додаткової ідентифікації мутацій), тотальна (що вимагає індивідуального тестування всіх клітинних клонів), а також візуальна селекція, неселективна варіантна лінія може бути

ідентифікована у всій популяції візуально або при використанні біохімічних методів) [271; 279; 278].

У селекції для отримання форм, стійких до засолення, посухи, екстремальних температур, хвороб зазвичай використовують пряму селекцію. За такого підходу до складу живильного середовища додають селективний чинник, що дозволяє моделювати дію стресу [4; 209].

У клітинній селекції важливу роль відіграє вибір об'єктів для відбору. Найбільш доступним об'єктом є калусна культура, яку часто використовують при відборі генотипів, стійких до біотичних та абіотичних стресів у багатьох сільськогосподарських культур [80; 212; 213].

Ряд досліджень з клітинної селекції пов'язані з вивченням стресових чинників, які завдають величезної шкоди сільському господарству, як от посуха, засолення ґрунтів, низькі температури, хвороби. Для імітації засолення до складу живильного середовища зазвичай додають такі речовини як NaCl, KCl, Na₂SO₄ або морську сіль, а посухи – маніт, сорбіт, ПЕГ, а іноді іонний осмотик NaCl, який дозволяє одержати соле- та посухостійкі генотипи [5; 6; 13; 217; 219].

Представлені дослідження, в яких використовували метод ступінчастої селекції, при якому до складу живильного середовища додавали стресові фактори протягом кількох пасажів, зазвичай, з підвищенням концентрації селективного агенту. Таким чином були отримані клітинні лінії кормових буряків, стійкі до збудника токсину бактеріозу, посухи та засолення ґрунтів. Застосування біотехнологічної схеми ступінчастої селекції дозволило отримати фузаріозостійкі регенеранти люцерни та м'якої пшениці [269; 270].

Також клітинна селекція стикається з цілою низкою труднощів: не всі селективні ознаки, що виявляються на рівні клітини, зберігаються загалом у рослині; зниження частоти регенерації у стійких ліній під впливом стресового фактора; іноді стійкість виявлялася не в усіх рослин-регенерантів або не успадковувалась у потомстві.

Однак, незважаючи на вище описані недоліки, за допомогою клітинних технологій, заснованих на соматональній мінливості, мутагенезі *in vitro* та

клітинній селекції отримано цінний селекційний матеріал у багатьох видів рослин [266; 267; 268].

Залежно від характеру морфогенетичних процесів *in vitro* основними методами розмноження є: активація меристем, що вже існують на рослині (апикальних, пазушних або сплячих бруньок стебла); індукція адвентивних бруньок із тканин експланту; індукція непрямого морфогенезу з калюсних або суспензійних культур; мікрочеренкування пагонів *in vitro* [250; 260].

Найчастіше використовується активація розвитку вже існуючих у рослині меристем, яка із найбільшою ймовірністю дозволяє отримати генетично стабільний рослинний матеріал. Меристематичні тканини підтримуються в безперервно проліферуючому стані, вони стійкі до генетичних змін, внаслідок високої активності систем реплікації ДНК, а також негативної селекції клітин, що змінюються. Крім того, використання культури меристем дозволяє отримати рослинний матеріал, звільнений від вірусних, грибних та бактеріальних інфекцій [1; 2; 7; 116; 143; 247; 249].

Використання меристем для оздоровлення рослинного матеріалу пов'язане зі специфікою їх будови: незначний розмір (діаметр - 200, і висоту від 20 до 150 мкм) і утворення прокамбію в нижніх шарах клітини меристеми. Однак цей метод не завжди сприяє оздоровленню рослинного матеріалу, у зв'язку з чим для підвищення ефективності даного процесу часто використовують термотерапію (витримуючи експланти при температурах 35-60°C протягом деякого часу в гарячій воді або спеціальних термокамерах з регульованою температурою), або хемотерапію (з використанням хімічних інгібіторів, таких як аміксин та ін., що блокують репродукцію вірусів та подальше зараження рослин). Такими способами зокрема було отримано безвірусний матеріал картоплі, томатів, тютюну, хризантем, яблуні та ін. [244; 245; 246].

Як правило, процес клонального мікророзмноження складається із чотирьох етапів. Метою першого етапу (введення в культуру *in vitro*) є отримання асептичної культури, ініціація росту тканин експлантів, а також забезпечення високої частоти їхньої приживаності. Метою другого етапу (власне

розмноження) є отримання максимальної кількості пагонів за один пасаж, яке, головним чином, здійснюється за рахунок регуляції співвідношення цитокінінів і ауксинів у складі живильного середовища при черенкуванні мікропагонів, отриманих на першому етапі, і утворенні пазушних і адвентивних бруньок.

Пагони, отримані на середовищах із цитокінінами, як правило, не мають коріння. Тому основним завданням третього етапу мікророзмноження є індукція та розвиток коренів, в основному, за допомогою додавання до складу живильного середовища регуляторів росту ауксинового типу дії. Адаптація одержаних *in vitro* мікропагонів до умов *in vivo* – заключний етап клонального мікророзмноження рослин, який виконують шляхом перенесення пагонів у теплиці з контрольованими умовами (високою відносною вологістю повітря, зменшеною інтенсивністю освітлення, оптимальною температурою) [241; 243].

На морфогенез у культурі меристем важливий вплив має генотип, розмір та фізіологічний стан експланту, вік донорної рослини, сезон ізоляції, склад живильного середовища, умови культивування *in vitro* [237; 239].

При цьому встановлено, що тканини та органи дводольних рослин мають великий морфогенетичний потенціал у порівнянні з однодольними рослинами. Також є дані про кращу здатність до морфогенезу апексів з термінальних бруньок, порівняно з апексами з латеральних бруньок. А в деяких роботах, навпаки, показано доцільність використання латеральних меристем як первинний експлант [220].

Ефективність клонального мікророзмноження значною мірою залежить від вмісту гормонів у складі живильного середовища. При цьому на кожному етапі потрібно певне співвідношення та концентрації регуляторів росту різного типу дії. Так, на першому та другому етапах для збільшення коефіцієнта розмноження в середовище додають цитокініни, іноді у поєднанні з ауксинами або гібереловою кислотою [227].

Необхідно підбирати оптимальні концентрації гормонів кожного виду, іноді під окремі сорти рослини. Так, для активації меристем хризантеми оптимальним було середовище, доповнене 0,5 μM кінетину та 0,25 μM ІМК [53].

На етапі мікророзмноження бруслини карликової використовували 1,0 мг/л БАП у поєднанні з 0,5 мг/л НУК, діоскорей кавказької – 1,0 мг/л 2ір та 1,0 мг/л НУК [91]. При мікророзмноженні сортів лохини використання 2,0 мг/л 2ір у поєднанні з 0,2-0,4 мг/л ІУК дозволяло прискорити проліферацію пагонів, коефіцієнт розмноження при цьому становив 1:10 і більше [93].

Для сортів соняшнику використовували різні концентрації цитокінінів та ауксинів, при цьому максимальну частоту регенерації спостерігали у сортів Злива та Одеський 504 (до 94-98%) [25]. У той час при введенні в культуру *in vitro* гірчиці у складі живильного середовища використовували лише БАП концентрації 1-4 мг/л, оскільки додавання до цього цитокиніну НУК повністю придушувало процеси пагоноутворення в усіх сортів [40].

При культивуванні пазушних бруньок представників роду *Digitalis* sp. до складу середовища В5 вводили 4,0 мг/л БАП, а збільшення або зниження концентрації цього регулятора росту інгібувало ростові процеси [93].

Вплив складу живильного середовища та генотипу на першому та другому етапах клонального розмноження спостерігали у багатьох інших рослин, у тому числі *Ribes aureum*, *Vaccinium uliginosum*, *Labirnum anagyroides*, *Iris sibirica*, *Cotinus coggygia*, *Berberis iliensis*, *Oxycoccus palust* [228; 230; 232; 234].

При культивуванні сосни сибірської *in vitro* максимальний коефіцієнт розмноження (1:4,2) відзначали на середовищі з додаванням 2,0 мг/л 2,4-Д і 1,0 мг/л БАП [78]. В іншій роботі на другому етапі мікророзмноження сосни звичайної кращі результати мікророзмноження були на середовищі, доповненому 1,2 мг/л зеатину та 5,0 мг/л 2ір, при цьому формувалося до 7-8 пагонів на експлант [46].

На третьому етапі мікророзмноження як індуктори коренеутворення використовують регулятори зростання ауксинового типу дії (ІУК, НУК, ІМК) або їх комбінації. Часто в ризогенному середовищі знижують у 2-4 рази вміст мінеральних солей та цукрів, а іноді для вкорінення використовують безгормональне живильне середовище [97; 252].

Процес укорінення значною мірою залежить від генотипу, так, залежно від сорту, мікропагони лохини укоріняли на середовищах з ІМК або ІУК. Частота ризогенезу *S. coggygia* становила 50-62% при використанні як ауксинів 1,0 мг/л ІУК або ІМК, тоді як застосування НУК було неефективним [146; 155; 156].

Максимальна частота ризогенезу (100%) у скорцонери була серед $\frac{1}{2}$ МС з додаванням 0,2 мг/л ІМК. Стимулюючий вплив на коренеутворення пагонів яблуні мало поєднання ІУК та ІМК. У бобовника анагіроподібного на середовищах з 0,5 мг/л ІМК або НУК на 10-14 добу культивування формувалося 3-5 коренів. При цьому на середовищі з НУК рослини були розвиненішими, а при використанні ІУК автори спостерігали некроз надземної частини рослини [9; 50; 113; 10].

Альтернативним способом укорінення для деяких культур може бути витримування мікропагонів у стерильному концентрованому розчині ауксину та їх подальше культивування на середовищі без гормонів або безпосередньо у ґрунтовому чи інших видах субстрату [93].

Черенки бузку попередньо витримували в стерильному водному розчині двох ауксинів (1,0 мг/л ІУК та 1,0 мг/л ІМК), після чого проводили укорінення та подальшу адаптацію рослин у теплиці на субстраті вермікуліту при 100% вологості [42].

Ще одним варіантом укорінення для деяких видів є використання у складі живильного середовища ризосферних мікроорганізмів. Так, у картоплі підвищення ефективності клонального мікророзмноження успішно використовували штами ризосферних азотфіксируючих бактерій [48; 47; 53].

Не зважаючи на широке практичне використання методів мікророзмноження *in vitro* та їх значні переваги, є й низка труднощів, що перешкоджають поширенню цих технологій. Деякі види рослин при введенні в культуру продукують велику кількість фенольних сполук, продукти окислення яких призводять до потемніння та подальшої загибелі експлантів [56; 57; 78].

На етапах мікророзмноження іноді утворюється калюс в основі мікропагонів, що є небажаним, оскільки при морфогенезі він може призвести до появи генетично змінених форм рослин [13; 93; 97; 98].

Також вчені часто стикаються з проблемою підвищеної обводненості пагонів *in vitro*, що виникає, в основному, через високий вміст гормонів цитокінінового типу дії у складі живильного середовища, або, у деяких генотипів, через тривале мікрочергування. У вітрифікованих рослин порушується процес утворення хлорофілу, а життєздатність при пересадці практично дорівнює нулю [257; 274; 137].

Крім того, багатоетапність і велика трудомісткість процесу розмноження в культурі тканин, а також низький коефіцієнт розмноження, у деяких видів, зумовлюють високу вартість рослин, особливо при отриманні оздоровленого садивного матеріалу [21; 25; 28].

У зв'язку із вищезазначеним особливу увагу слід приділяти пошуку шляхів підвищення ефективності клонального мікророзмноження. Одним із способів підвищення ефективності є об'єднання другого та третього етапів мікророзмноження *in vitro* [51; 27; 31; 152; 161; 283; 288; 293].

Незважаючи на перелічені труднощі, прийоми клонального мікророзмноження є дуже ефективними для прискореного розмноження та оздоровлення від вірусних, бактеріальних та грибних інфекцій цінних сортів та гібридів сільськогосподарських культур.

1.2. Селекція *in vitro* на посухостійкість

Біотехнологічні прийоми, поряд з традиційними генетико-селекційними методами створення високопродуктивних сортів і гібридів дозволяють розширити спектр генетичної різноманітності, скоротити терміни проведення і підвищити ефективність селекційного процесу.

При створенні вихідного селекційного матеріалу, стійкого до екстремальних факторів навколишнього середовища, токсинів, патогенів та

інших несприятливих чинників використовують клітинну селекцію, за допомогою якої отримують генетично різноманітні форми на рівні соматичних клітин [214].

Зростаючий негативний тиск антропогенних факторів, викликає потребу в створенні нових форм рослин, здатних рости та плодоносити у несприятливих умовах [206]. А тому, на сьогоднішній день розробка селекційних систем і вибір ефективних селективних агентів для виділення стійких до водного стресу рослин є актуальним завданням [255].

Схеми селекції клітинних ліній стійких до водного стресу засновані на культивуванні рослинних клітин на живильних середовищах з осмотично активними речовинами, які знижують зовнішній водний потенціал та імітують умови посухи. Селективні умови для відбору клітин на стійкість до несприятливих біотичних і абіотичних чинників зовнішнього середовища створюють при додаванні в живильне середовище підвищених концентрацій селективного фактора, або перенесенні висіяних на поверхні агаризованого середовища клітин в екстремальні температурні умови [155].

Культивування *in vitro* рослинних клітин в присутності летальних доз стресових факторів в кінцевому підсумку призводить до їх загибелі. Разом з тим життєдіяльними можуть залишатися клітини, в геномі яких найбільш ймовірно, відбулись мутації по генах, які контролюють ключові шляхи метаболізму, біосинтез макромолекул і відповідають за стійкість до біотичних і абіотичних стресів [344; 159; 176].

Клітинна селекція базується на селекції соматоклонів, індукованому мутагенезі *in vitro*, що дозволяє значно розширити спектр соматоклональної мінливості, трансформації та перенесенні окремих генів.

У відповідь на несприятливі умови навколишнього середовища виробляються адаптивні механізми захисту, які проявляються як на рівні організму, так і на клітинному рівні. На всі відхилення від норми клітина реагує зміною ряду фізіологічних і біохімічних параметрів, наприклад, збільшенням або зменшенням синтезу тих чи інших ферментів, іншими словами - зміною експресії

генів. Це дозволяє проводити селекцію на стійкість, використовуючи відбір в культурі *in vitro* із врахуванням даних ознак [155; 156].

Серед різноманітних механізмів стійкості до стресів велику роль відіграють особливості метаболізму, які проявляються на рівні організму та клітин [221; 261; 292; 324; 350]. Це дозволяє використовувати методи культури клітин рослин для тестування ліній та сортів на ранніх етапах онтогенезу, а також проводити селекцію на стійкість, використовуючи добір в умовах *in vitro* [47].

Для проведення робіт з клітинної селекції рослин в культурі *in vitro* в якості об'єкта досліджень використовують калюсні, суспензійні культури та ізольовані протопласти. Отримання посухостійких клітинних культур - процес тривалий.

Зазвичай, селекція починається з отримання достатньої кількості калюсної маси з ізольованих рослинних експлантів, яка використовується для визначення концентрації селективного фактору, при якій спостерігається одночасний ріст маси калюсної тканини, і в той же час частина калюсних тканин гине.

Обрана концентрація селективного фактору визнається оптимальною і використовується в подальших дослідженнях. У наступних 4-6 пасажах на селективному середовищі перевіряється стабільність ознаки посухостійкості отриманих клонів, тому що зміни могли виникнути в наслідок фізіологічної адаптації. Потім калюсні тканини переносять на середовище без селективного фактору і субкультивують 2-3 пасажі. Після повторного повернення в селективні умови відбираються стабільні клони з яких надалі отримують рослини-регенеранти.

На даний час розроблені селективні системи для отримання форм вищих рослин, толерантних до різних біотичних та абіотичних стресів [302; 333; 55; 83; 172]. Зазвичай при селекції *in vitro* в якості селективного компоненту використовується поліетиленгліколь (ПЕГ) [240; 4], маніт [4; 5; 6; 53] або сорбіт [183].

Застосування культури ізольованих клітин у вивченні стійкості до різних стресових чинників дозволяє розглядати дію селективних чинників на клітину в

контрольованих умовах вирощування, полегшити дослідження безпосередньої дії стресового чинника на клітинний метаболізм, а також дає можливість уникнути складних корелятивних взаємовідносин між різними органами та тканинами.

Вченими була помічена позитивна кореляція між здатністю насіння до проростання на середовищі з ПЕГ та ростом рослин в умовах стресу [206; 238; 280]. Також була зафіксована здатність ПЕГ виступати в ролі селективного агенту для створення осмотичного стресу у рослин при селекції *in vitro*. ПЕГ може застосовуватись для симуляції посухи через його здатність до перешкоджання потрапляння води до соматичних клітин, окрім калюсних чи соматичних клітин, які мають певний механізм для абсорбування води [236; 303]. Лише стійкі калюсні тканини, які піддаються селекції на середовищі з ПЕГ можуть підвищити свою посухостійкість [206].

Значно підвищує ефективність клітинної селекції індукований мутагенез, адже накопичені значні експериментальні дані про мутагенну активність різних хімічних речовин, а також іонізуючих (рентгенівські і γ -промені) і ультрафіолетових випромінювань [104].

Із хімічних мутагенів найчастіше використовують *N*-нітрозометилсечовину і *N*-метил-*N*-нітро-*N*-нітрозогуанідін. Ці хімічні сполуки нестабільні, швидко руйнуються в живильному середовищі і можуть застосовуватись для обробки клітин без попереднього їх відмивання [101].

Найбільш широкий спектр мутацій спостерігається при використанні, як мутагену іонізуючого опромінення. Вживання клітинних колоній залежить від стадії розвитку культури, на якій застосовується обробка мутагеном. При роботі з одиночними клітинами (суспензійна культура) проводять обробку їх мутагеном до першого поділу клітин, оскільки в іншому випадку можливе виникнення химерних ліній. Необхідно зазначити, що іонізуюче випромінювання викликає менший токсичний ефект, ніж дія хімічних мутагенів. Більше того, навіть високі дози опромінення пригнічують лише репродуктивну і регенераційну здатність клітин, зберігаючи при цьому їх метаболічну активність [91].

Серед механізмів мінливості виділяють генетичні, епігенетичні та морфофізіологічні зміни клітин при селекції *in vitro*. Виникнення одиночних домінантних і напівдомінантних мутацій, зміни в хлоропластних і особливо мітохондріальних генах, хромосомні перебудови в тому числі мітотичний кросинговер обумовлені генетичними механізмами і епігенетичною мінливістю, яка індукується умовами культивування *in vitro*, перш за все, складом живильних середовищ, рівнем концентрації солей і регуляторів росту, а також залежить від генотипу і вихідного експлантату [155].

Крім соматональної варіабельності, пов'язаної із спадковими перебудовами геному відмічені морфофізіологічні зміни (епігенетичні), які можуть стабільно передаватись дочірнім клітинам [289; 80; 156].

Основним лімітуючим фактором для широкого застосування біотехнології в генетико-селекційному процесі є відсутність ефективних прийомів масової регенерації рослин із клітинних ліній, стійких до несприятливих факторів середовища [186; 187].

Особливої уваги заслуговує використання методів експериментального мутагенезу і клітинної селекції на рівні популяції соматичних клітин *in vitro*, які дозволяють одержувати клітини зі стійким генотипом до фітопатогенів [91].

Опираючись на дослідження генетичних закономірностей імунітету з допомогою нових методик селекції створено багато стійких гібридів. Разом з тим селекція з використанням традиційних методів є складним і довготривалим процесом, пов'язана з пошуком генетичних джерел стійкості, донорів важливих ознак та властивостей, виділення яких потребує розвитку теоретичних та практичних досліджень, є складним, трудомістким і довготривалим процесом.

Базуючись на індукованій і спонтанній соматональній мінливості в культурі клітинних популяцій *in vitro* можна відбирати в селективних умовах резистентні клітини, які обумовлюють стійкість до патогенів – збудників грибних або бактеріальних хвороб. Подальша регенерація із них рослин, які зберігають толерантність до хвороб, дає можливість використовувати одержані резистентні рослини-регенеранти, як вихідний матеріал в селекції на стійкість.

Існує декілька способів відбору резистентних клітинних ліній: жорстка селекція з використанням сублетальних доз стресового фактора і багаторазовим пасуванням в селективних умовах; м'яка селекція на адаптованих концентраціях селективного агента протягом декількох пасажів; ступінчата селекція з поступовим підвищенням концентрації стресового фактора і чергуванням селективних і неселективних умов [155].

Незважаючи на той факт, що на сьогоднішній день вітчизняними та зарубіжними дослідниками розроблена досить велика кількість селективних схем з метою відбору ліній стійких до абіотичних та біотичних стресів, актуальним залишається розробка схем клітинної селекції на посухостійкість. Ця актуальність обумовлена тим, що при використанні вже розроблених схем селекції не завжди можливо отримати стабільні резистентні лінії і в подальшому успішно індукувати регенерацію з них рослин.

1.3. Оцінка посухостійкості вихідного селекційного матеріалу

В умовах сучасних змін клімату з різкими перепадами температур та тривалими посухами, різкими відлигами і заморозками, а також нерівномірним випаданням опадів все більшої актуальності набувають дослідження механізмів стійкості рослин до абіотичних стресів [242; 259].

Посуха є одним із найбільш лімітуючих факторів росту рослин, а також фактором, що впливає на їх урожайність та якість продукції. Дефіцит води являється комплексним чинником так як впливає на всі метаболічні процеси в рослині.

При дослідженні природи посухостійкості рослин особливу увагу слід приділити вивченню взаємозв'язку фізіологічних процесів та їх динамічності при адаптації до осмотичного стресу [206]. Багаторічними дослідженнями були встановлені закономірності змін метаболічних процесів рослинного організму, що детермінуються особливостями генотипу та умовами дії посухи [41; 42].

Найважливішим елементом адаптації рослин до несприятливих погодних умов є синтез вторинних метаболітів, відповідальних за формування конституційної стійкості рослинного організму [226; 281; 348]. Істотну роль в регуляції метаболічних процесів, а також у розвитку адаптивних і захисних реакцій рослин грають сапоніни. Це унікальна група біологічно активних сполук, що складаються з сапогеніну стероїдної або тритерпенової природи та глікозидного глюкону, представленого цукрами (глюкоза, ксилоза та ін.) [338].

Роль тритерпенових глікозидів в рослинному організмі досить різноманітна і ще недостатньо вивчена. Завдяки наявності ліпофільного аглікону сапоніни здатні вбудовуватися в клітинні мембрани і регулювати трансмембранний перенос іонів [205].

Сапоніни володіють вираженими поверхнево-активними властивостями, збільшують активність деяких ферментів, виконують антиоксидантну функцію. Відомо також про противірусну [263] і фунгіцидну [321] дію сапонінів, що в цілому визначає їх істотну роль у формуванні загальної неспецифічної системи стійкості рослин.

Так, скажімо цукрові буряки містить сапоніни тритерпеноїдного типу [23; 110], розподіл яких в тканинах вегетативних органів нерівномірний. Найбільша кількість сапонінів зосереджена в зовнішній частині коренеплодів, проте відносно велика кількість тритерпенових глікозидів виявляється також і в листках, що робить їх непридатними для використання в якості корму [18]. Є дані про те, що якісний склад сапонінів в коренях і листках цукрових буряків різний, маючи один загальний аглікон - олеанолову кислоту, вони відрізняються складом цукрових залишків, в число яких входять D-глюкуронова кислота, D-глюкоза і D-ксилоза [325].

Важливе значення для аналізу взаємодії рослини з умовами навколишнього середовища, а також для дослідження адаптації рослин до факторів посухи відводиться вивченню фізіологічних функцій рослин - фотосинтезу, дихання, транспорту асимілятів тощо. Вміст хлорофілів у листку є однією з найвизначніших характеристик адаптації фотосинтетичного апарату

рослин до умов навколишнього середовища, але менш дослідженою є група каротиноїдів [138].

Каротиноїди за фізико-хімічними властивостями належать до похідних ізопропену, або до групи нейтральних ліпідів, де їх визначають як поліізопреноїдні вуглеводні, спирти, епоксиди та карбоксиліові кислоти, що містять 40 атомів вуглецю. За пізнішими класифікаціями каротиноїди - ліпорозчинні пігменти, належать до групи ненасичених вуглеводнів із системою спряжених подвійних зв'язків

За останні роки досягнуто значних успіхів у хімії каротиноїдів: кількість тих, структура яких точно встановлена, збільшилась від 60 до 550; отримано принципово нові дані про каротиноїди, вуглецевий скелет яких містить 45-50 атомів вуглецю замість традиційно відомих 40; відкрито глікозидні каротиноїди, що містять цукровий залишок; встановлено, що молекула каротиноїдів може включати жирні кислоти поряд з цукровими залишками; ефіри каротиноїдів можуть містити і ненасичені жирні кислоти [163].

З досліджень відомо, що за умов дії стресових факторів у організмі рослин змінюється рівень пероксидного окиснення ліпідів. Будь-яка зовнішня дія викликає в клітині посилення вільно радикальних процесів та зсув рівноваги в бік активації пер оксидного окиснення. Вважається, що активація процесу окиснення ліпідів є однією з перших ланок у стрес-реакції організму рослини і може ініціювати включення інших механізмів захисту, залежно від характеру конкретного чинника [125; 154].

При дослідженні такого несприятливого чинника як водний стрес поглинання хлорофілом світла призводить до зростання надлишку енергії збудженого хлорофілу та вільних радикалів. Це викликає необхідність посилення захисту, котрий і можуть здійснювати каротиноїди, які є пігментами ксантофілового циклу, при цьому їх кількість зростає [328].

Посуха та осмотичний стрес впливають на швидкість фотосинтезу, знижуючи його інтенсивність [218; 231; 317]. Рослини в умовах недостатнього зволоження мають меншу провідність продохів у зв'язку зі зменшенням витрат

води [265]. Відповідно, зменшується фіксація CO₂, що знижує інтенсивність фотосинтезу в умовах посухи. Сильна посуха також інгібує фотосинтез у рослин впливаючи на компоненти хлорофілів та спричинюючи зміни у їх кількісному вмісті.

Зменшення вмісту хлорофілів в листках є результатом осмотичного стресу [225; 298; 160]. Посуха спричиняє різке зниження вмісту хлорофілу *a*, хлорофілу *b* та загальний вміст хлорофілів [276; 284], що є результатом пошкодження хлоропластів. Захисною реакцією рослини на умови посухи являється акумуляція осмолітів [256; 343]. Пролін є одним з найінформативніших осмолітів при оцінці посухостійкості рослин [274; 112; 189].

Акумуляції проліну також може спостерігатися при дії інших стрес-факторів, наприклад, під впливом високих температур [314]. Однак, метаболізм проліну в рослинах вивчається в основному при дослідження, пов'язаних з дією осмотичного стресу [335]. Пролін не порушує нормальні біохімічні реакції, але дозволяє рослині вижити за умов посухи та недостатнього зволоження. Акумуляція проліну може також бути частиною сигнальної системи, що реагує на адаптивну відповідь рослинного організму [275].

Висновки до розділу 1

Отже, огляд літературних джерел показує нам надзвичайну важливість створення схем клітинної селекції з використанням біотехнологічних методів та індукованого мутагенезу для одержання форм фундуку та грецького горіху, стійких до осмотичного стресу. Крім того, важливим є розробка методів з оцінки отриманого посухостійкого матеріалу. Вивченню цієї проблеми і присвячена дана дисертаційна робота.

РОЗДІЛ 2

УМОВИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження за темою дисертаційної роботи виконували в умовах міжкафедральної лабораторії біотехнології рослин Білоцерківського національного аграрного університету МОН України впродовж 2016–2020 рр., а також ТОВ «Укр-Агро Мрія» Київської області, Васильківського району в 2020–2021 рр.

2.1. Вихідний матеріал

Для проведення експериментальних досліджень з вивчення особливостей мікроклонального розмноження фундука та грецького горіха ми використовували наступні сорти рослин.

Сорти фундука (ліщини великої)

Болградська новинка – отримано в Українському НДІ лісового господарства та агролісомеліорації ім. Г.М. Висоцького, та в Україні районований із 1981 р. для зони Степу. Середньорослий кущ з розлогою кроною і пагонами, що відходять під прямим кутом. Плоди середньої величини (1,4 г), округлі, слабкоробристі, з невеликим загостренням до вершини. Шкаралупа середньої товщини, тверда, коричнева, трохи смугаста. Ядро щільне, на зламі кремове.

Сорт має середній строк дозрівання та високий рівень зимостійкості. Середня врожайність становить 1,3 т/га, максимальна – 2,38 т/га. Потребує захисту від горіхового довгоносика.

Дар Павленка – середньостиглий сорт селекції Українського НДІ лісового господарства та агролісомеліорації ім. Г.М. Висоцького, селекції Павленко Ф.А.,

районований з 1991 року для Степу України. Знімна та споживча зрілість горіхів у зоні Північного Лісостепу України настає з третьої декади серпня та по першу декаду вересня. Відрізняється помірною, стабільною врожайністю, зимостійкістю. Кущ сильно-рослий, порослі дає мало. Добре вдається в штаббовій культурі, в якій цей сорт більш врожайний. Горіхи зібрані в супліддя по 3-6 штук. Обгортка щільно облягає горіх, трохи довше за горіхи. Горіхи середньої маси 2,4 г, циліндричні, із загостреною вершиною. Шкаралупа насиченого коричневого кольору, блискуча, тонка. Ядро видовжене, світло-кремове, чудового смаку. Вихід ядра 49 %, містить 67 % олії. Висока морозостійкість, до - 30°C.

Лозівський шаровидний – районований з 1987 року сорт, занесений до Державного реєстру України для вирощування в умовах Степу та Лісостепу України. Сильнорослий розлогий кущ висотою до 5 м з густою кроною. Середнього терміну дозрівання. Обгортка рівна або трохи довше горіха, цільна або розсічена з одного боку, зубчаста. Горіхи майже кулястої форми, довжиною 2 см, золотисто-жовті з темними довгастими смужками, масою 2,1-2,5 г Маса 100 шт. - 210 гр. Вихід ядра 50 %, жирність 68 %, вміст білка 17 %. Урожайність 2,5 т/га. Зимостійкість висока.

Степовий 83 – районований з 1985 року сорт, занесений до Державного реєстру України для вирощування в умовах Степу. Кущ досить розлогий, досягає в 14-ти літньому віці 3,5 м висоти та 4,3 м у діаметрі. Листя широкоовальне або яйцевидне, темно-зелене, злегка поникле, з загорнутими краями, 8-10 см довжини, 6-8 см ширини, з гострим закінченням довжиною 1,5 см. Листки на молодих пагонах часто в основі воронкоподібні. Прилистки подовжені, з широкою основою та загостреною верхівкою. Черешки густо опушені залізистими та простими волосками. Плоди зібрані по 2-5, іноді поодинокі. Обгортка в основі м'ясиста, залізисто-опушена, по довжині дорівнює горіху або перевищує його в 1,5 рази, цільна або розсічена з одного боку, по краю розділена на зубчасті частки, горіх зверху завжди відкритий. Горіхи довгасті, до основи трохи звужені, блискучі, з сірим опушенням у верхній частині і великою, майже

круглою основою. Шкаралупа коричнева, з добре помітними темнішими поздовжніми смужками, середньої товщини. Довжина горіха 2 см, ширина 1,3 см і товщина 1,2 см, масою 1,7 г. Вихід ядра 47 %. Ядро має високі смакові якості і містить 62,1% олії. Пізнього терміну дозрівання. Горіхи дозрівають у першій декаді вересня.

Боровський – районований з 1991 року сорт, занесений до Державного реєстру України для вирощування в умовах Лісостепу та Полісся. Високоврожайний сорт фундуку вітчизняної селекції. Дозрівання відбувається в ранні терміни, збирання плодів - кінець серпня. Кущ середньорослий, густий, висота 3.5-4,5 м заввишки, ширина крони до 2 м. Добре піддається штабловому формуванню. У суплідді – від 2 до 6 горіхів. Горіхи довжиною 2 см, масою 2.5 – 3 г. Висока морозостійкість.

Пірожок – районований з 1996 року сорт, занесений до Державного реєстру України для вирощування в умовах Степу. Сорт середнього терміну дозрівання. Характеризується високою та стабільною врожайністю, гарними смаковими характеристиками та високою якістю плодів. Кущ середньо-рослий, висотою 3,5 м із округлою кроною середньої густоти. Горіхи зібрані в супліддя по 3-5 шт., Великі, середньою масою 2,6-3,2 г, округлі, плескаті з боків. Вихід ядра 47 %, вміст жиру 66 %, білка – 15 %. Морозостійкість, посухостійкість висока.

Серебристий – районований з 1991 року сорт, занесений до Державного реєстру України для вирощування в умовах Степу та Лісостепу України. Високорослий сорт, що досягає 4,5 м заввишки. Горіхи дозрівають у середині вересня. Обгортка горіха виростає цільною, за розмірами вдвічі довшою за сам горіх, на дотик липка. Форма горіха округла, злегка витягнута, нагадує конус з великою опуклою основою. Належить до слаборебристих, в довжину досягає 2 см. Активне плодоношення настає на 4-5 рік, тоді врожайність досягає 10 кг з куща.

Косфорд – районований з 2010 року сорт, занесений до Державного реєстру України для вирощування в умовах Лісостепу та Полісся України.

Селекція Англії, Оксфорд. Кущ великої сили зросту до 5 метрів заввишки, крона густа, широка. У плодоношення вступає з четвертого року, врожайність дуже висока. Листя темно-зеленого кольору, широкі, овальні, восени набувають червоного відтінку. Цвітіння раннє. Сорт самозапильний, за наявності запилювача (Галле) врожайність вища. Є відмінним запилювачем для інших сортів. Горіхи великі, видовжені, з дуже тонкою шкаралупою (можна розколювати пальцями). Вага 100 горіхів 330-350 г, вихід ядра 55-56 %. Плоди легко випадають. Шкаралупа тонка, жовто-коричнева, по мірі дозрівання набуває червоно-коричневого відтінку. Ядро дуже щільно прилягає до шкаралупи, світло-кремове, соковите, смачне. Урожай можна збирати з другої декади вересня. Висока морозостійкість.

Барселонський – районований з 2010 року сорт, занесений до Державного реєстру України для вирощування в умовах Лісостепу та Полісся України. Кущ виростає середніх розмірів близько 4 метрів заввишки, середньо розлогий. Горіхи округлої форми, зібрані по 3-5 шт. у гронах великі, середньою масою 3 – 3,5 г, гарної товарної якості. Шкаралупа майже повністю заповнена ядром. Дозрівання відбувається з перших чисел вересня. Висока морозостійкість.

Трапезунд – зарекомендував себе як один із найкращих для вирощування та території України культивується на присадибних ділянках та на плантаціях у промислових цілях. Саджанці висаджують за схемою 4x4 метри. Горіх високої якості, ядро округлої форми із темно-коричневою шкаралупою, відрізняється високим вмістом жирів до 72 %. Середня маса горіха 2.6-3 г. Плодоношення відбувається у суплодні 2-6 шт. Середня врожайність становить 2,24 т/га, максимальна – 3,76 т/га.

У плодоношення рослини даного сорту вступають на 3-4 рік після посадки. Кущ сильнорослий, з середньою розлогою кроною, висотою – 5 м, діаметр – 4,8 м. Першими розквітають жіночі квіти. Дозрівання з перших чисел вересня. Морозостійкість висока до – 32°C.

Сорти грецького горіха

Коржеуцький – районований з 2009 року сорт, занесений до Державного реєстру України для вирощування в умовах Лісостепу України. Дерево середньої росту зростання, з округло кроною, середньої густоти. Цвіте у ранні терміни, зазвичай наприкінці квітня. Тип цвітіння протогенічний. Пестичні квітки цвітуть на 5-6 днів раніше за тичинкові. Дозрівання відбувається у першій половині вересня. Вегетаційний період – 150 днів.

Горіхи порівняно невеликі, 10-12 г. Форма плода циліндрична – елонгата. Вершина плоду слабовитягнута, основа плоска. Шкаралупа тонка, пухка, поверхня гладка або слабошорстка, блискуча, білувато - сірого кольору. Ядро біле, покрите шкіркою кремового кольору, легко відокремлюється повністю. Вага ядра 48-50 % в ньому міститься 67,5 % жиру.

Відрізняється підвищеною зимостійкістю, стабільно високою врожайністю. При належному агротехнічному догляді частина плодів формується у гронах по 7-15 штук. Сорт використовується більшою мірою для запилення, але і може бути використаний для формування плантацій. Плоди відповідають європейським стандартам.

Кордене – районований з 2009 року сорт, занесений до Державного реєстру України для вирощування в умовах Лісостепу України. Дерево сильноросле (висотою до 20 м), самоплідне зі змішаним типом плодоношення та стабільно високою врожайністю. Плодоносить у віці 3-4 років.

Пагони коричневого кольору, біля основи – сіруваті. Кут відходження скелетних гілок дорівнює 450 і менше. Листки продовгуватої форми з рівним краєм, зеленого, матового забарвлення. Квітки: жіночі та чоловічі квітки, цвітуть одночасно. Квітки жіночої статі цвітуть у період з 27 квітня по 5 травня, а маточкові - зацвітають на 6-7 днів раніше тичинкових.

Горіхи великого розміру (більше 17 г), дозрівають пізно. Ядро білого кольору відмінно заповнює внутрішню частину плодів і становить більше 50 %

від їх маси. Мають золотисто-жовту шкірку ядра. За продуктивний рік урожайність становить близько 3,5-4 т/га.

Ферджан – районований з 2009 року сорт, занесений до Державного реєстру України для вирощування в умовах Лісостепу України. Сорт з плодоутворенням на бічних гілках, продуктивний. Горіх середнього розміру, дозрівання плода досить пізніше. Форма плода куляста, оболонка досить тонка і злегка шишкувата. Половинки міцно з'єднані між собою. Розмір плода середній, маленький, зазвичай від 28 до 32 мм. Ядро добре відокремлюється від шкаралупи і становить 46-50 % від загальної ваги горіха. Має гарну смакову якість і добре зберігається. Завдяки тому, що плоди утворюються на бічних гілках, плодоутворення відбувається швидко 5-7 років. Відповідно урожайність становить в середньому 4 т/га.

Кишиневський – районований з 2009 року сорт, занесений до Державного реєстру України для вирощування в умовах Лісостепу України. Дерево середньої сили росту, із округлою кроною; у вегетацію вступає на два тижні пізніше в порівнянні з сортами, що рано розпускаються. Тичинкові та маточкові квітки зацвітають одночасно. Відрізняється високою зимостійкістю та хорошим, рясним плодоношенням.

Відходження скелетних гілок 30 – 80 %. Гілки коричневого кольору, біля основи – сіруваті. Листя продовгуватої форми з рівним краєм листа, зеленого, матового забарвлення. Горіхи довгасті, середньої величини близько 10 г з тонкою шкаралупою та гладкою поверхнею солом'яно-жовтого кольору вихід ядра перевищує 50 % маси плода і легко відокремлюється повністю.

За один продуктивний рік урожайність становить близько 2-2,5 т/га.

Чернівецький 1 – районований з 1997 року сорт, занесений до Державного реєстру України для вирощування в умовах Лісостепу України. Високоврожайний, гарний сорт волоського горіха, виведений на Придністровській дослідній станції садівництва УААН.

Сорт характеризується стабільною високою врожайністю, чудовим імунітетом, стійкістю до марсонії, що для всіх сортів придністровської селекції.

Сорт добре приживається у всіх регіонах України. Дерево: сильноросле, формує велику крону, кора сірого кольору. Листя: овально - подовжені, що звужуються до кінчика, що ростуть у формі подовженого ковшика. Плоди світло-коричневого кольору, високої якості, округлої форми. Оболонка тонка, що легко розчавлюється, внутрішні перегородки тонкі, добре відокремлюються від ядра. Ядро ніжного кремового кольору, хороша заповнюваність, смакові якості - високі.

Плодоношення починається на 4-6 рік. Дозрівання: середина вересня. Врожайність, у роки найкращого плодоношення (15-20 років), 130-140 кг із дерева.

Переваги сорту: середні плоди з тонкою оболонкою, вагою 10,6-12,8 г, відмінного товарного вигляду, що мають гарні смакові якості; високі показники виходу ядра: 50,7-54,6 % від маси плода.

Клішківський – районований з 1995 року сорт, занесений до Державного реєстру України для вирощування в умовах Лісостепу України.

Сорт високоврожайний, відносно стійкий до марсонії. Дерево утворює велику крону. Жіночі квітки цвітуть на початку травня, раніше чоловічих на 4-5 днів. Плодоношення верхівкове. Плоди формуються на верхівкових бруньках минулорічних приростів. Плоди середньої маси – 10,9-13,3 г, видовжено-овальної форми.

Оболонка середньої товщини, міцна. Внутрішні перегородки тонкі. Ядро складає 48,85-49,96 % від маси плоду, містить: жирів 67,4-71,04%, білків 14,36-15,78%, цукрів 8,24-9,6%, органічних кислот 0,4-0,54%, дубильних речовин 0,71-0,86%, пектинів 0,88-1,31%, вітаміну С 3,66-5,06 мг на 100 г повітряно-сухої маси.

Знімальна стиглість плодів настає в кінці серпня – на початку вересня. Урожайність 70 кг/дер..

Ярівський – районований з 1995 року сорт, занесений до Державного реєстру України для вирощування в умовах Лісостепу України. Сорт волоського горіха, виведений на Придністровській дослідній станції садівництва УААН.

Сорт популярний серед садівників України, завдяки своїй високій урожайності, хорошій зимостійкості та високому імунітету, що властиво всім сортам даної селекції. Дерево: сильноросле, невибагливе у догляді. Крона дерева: округла, середньої загущеності. Кора сірого кольору.

Листя: овально-подовжені, не дуже симетричні, що звужуються до кінчика, що ростуть у формі подовженого ковзанка.

Плоди великі, 16,5-18,5 г, відмінного товарного вигляду, мають гарні смакові характеристики, видовжено-еліптичної форми.

Однією з переваг цього сорту є його споживча стиглість, адже плоди придатні для вживання протягом усього року, при цьому не втрачають своїх смакових якостей. Шкаралупа не дуже тонка, але добре відокремлюється, не ушкоджуючи ядро. Ядро легко відокремлюване, темно - кремового кольору, хороша заповнюваність, смакові якості - високі.

Плодоношення починається на 4-6 рік. Дозрівання: кінець вересня. Врожайність, у роки найкращого плодоношення (15-20 років), 140-150 кг із дерева.

Буковинський 2 – районований з 1995 року сорт, занесений до Державного реєстру України для вирощування в умовах Лісостепу України. Високоврожайний, дуже гарний сорт грецького горіха, виведений на Придністровській дослідній станції садівництва УААН.

Сорт характеризується стабільною високою врожайністю, чудовим імунітетом, стійкістю до марсонії. Сорт добре приживається у всіх регіонах України. Дерево: сильноросле, з великою округлою кроною. Кора сірого кольору. Листя: овально-подовжені, що звужуються до кінчика, що ростуть у формі подовженого ковшика.

Плоди світло-коричневого кольору, високої якості, видовжено-еліптичної форми. Оболонка середньої товщини, міцна, але при цьому добре відокремлюється, не ушкоджуючи ядро. Ядро легко відокремлюване, насиченого кремового кольору, хороша заповнюваність, смакові якості - високі.

Плодоношення починається на 4-6 рік. Дозрівання: кінець вересня – початок жовтня. Врожайність, у роки найкращого плодоношення (15-20 років), 140-150 кг із дерева. Переваги сорту: великі плоди, 13,7-15,4 г, відмінного товарного вигляду, що мають гарні смакові якості.

Фернет – районований з 2011 року сорт, занесений до Державного реєстру України для вирощування в умовах Степу та Лісостепу України. Створений французькими селекціонерами та має високу якість горіхів.

Плоди мають видовжені ядра, колір ядра світла пшениця. Швидкорослі, середньорослі дерева, висота до 8 метрів, крона розлога. Знімна стиглість на початку вересня. Плодоносить на 4-5 рік. Врожайність із гектара 3-4 тони.

Морозостійкий, та стійкий до хвороб та шкідників.

2.2. Отримання асептичного рослинного матеріалу та його культивування

Стерилізація є важливим етапом, який забезпечує успіх біотехнологічних досліджень, а тому перш за все, при роботі з культурою тканин слід правильно здійснити підбір дієвої та ефективної схеми асептичної обробки рослинного матеріалу.

Вихідним матеріалом для введення у культуру *in vitro* служили м'ясисті сім'ядолі плоду грецького горіха та фундука. Для отримання асептичних культур стерилізацію власне самого плоду проводили 96 % етанолом з наступним випалюванням спирту на полум'ї спиртування.

Стерилізація відбувалася в ламінар-боксі, потім плоди розкривали, виймали сім'ядолі з кісточки, нарізали на декілька частин та висаджували на живильні середовища.

Стерилізацію сім'ядоль проводили використовуючи дві схеми асептичної обробки:

1. Занурення сім'ядоль у 70 % етиловий спирт (2 хвилини), а потім в гіпохлорит натрію, розчин комерційного препарату «Білизна» 1:2 (10 хв).

2. Занурення сім'ядоль у концентровану сірчану кислоту ($\text{кН}_2\text{SO}_4$) (5 хвилин).

Стерилізовані таким чином сім'ядолі промивали тричі у дистильованій воді для змивання залишків препаратів з рослинного матеріалу.

Для культивування рослин в умовах *in vitro* використовували на початкових етапах скринінгу кращих варіантів середовищ штучні живильні середовища наступних загальновідомих прописів: MS (Murashige and Skoog); QL (Quoirin & Lepoivre medium); DKW (Driver and Kuniyuki Walnut Medium); WPM (Woody Plant Medium); NRM (Nas and Read Medium). А от уже на наступних експериментальних варіантах застосовували кращі з досліджуваних штучних живильних середовищ наведені нижче.

Через 6 діб після посадки на живильні середовища проводили оцінювання ефективності знезараження, виконуючи підрахунок кількості життєздатних стерильних та інфікованих експлантів.

Одночасно з визначенням ефективності знезараження виконували обчислення інтенсивності утворення меристематичними тканинами продуктів окиснення фенолів (ПОФ). Даний показник визначали в балах візуально за появою забарвлення агару, при цьому за базовий або нульовий колір обирали забарвленість поживного середовища без експлантів:

- 0 – зміна кольору поживного середовища відсутня;
- 1 – поява кольору в місцях контакту експлантата з поживним середовищем;
- 2 – забарвлення проникає вглиб поживного середовища;
- 3 – більше половини об'єму поживного середовища забарвлено в коричневий колір.

Для вивчення ефективності речовин із гормональною активністю на етапі мультиплікації використовували:

кінетин – речовина з класу цитокінінів, рослинний гормон, який сприяє діленню клітин, індукції калюсогенезу (у поєднанні з ауксином) та регенерації тканин з калюса;

бензиламінопурин – синтетичний аналог б-амінопурина, переважно

використовують при формуванні калюсних культур;

форхлорфенурон (ФХФУ, CPPU, КТ-30) – рослинний фітогормон класу цитокінінів;

тідазурон – новий високоефективний цитокінін та дефоліант бавовника.

Для розмноження та укорінення експлантів досліджуваних сортів фундука та грецького горіха використовували модифіковані середовища за приписами Мурасіге і Скуга (таблиця 2.1) а також за прописом Драйвера і Куніюкі (таблиця 2.2).

Таблиця 2.1

**Модифіковане середовище за прописом Мурасіге і Скуга для
культивування експлантів**

Компонент	Кількість мг/л		Компонент	Кількість мг/л	
	розмноження	укорінення		розмноження	укорінення
NH_4NO_3	1550	1050	$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	37,0	37,0
KNO_3	1800	1000	Тіамін-НСL	1,0	1,0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	420	240	Піридоксин-НСL	0,9	0,4
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	400	200	Аскорбінова кислота	1,4	-
KH_2PO_4	270	100	Нікотинова кислота	0,9	0,4
H_3BO_3	6,0	3,2	Мезоінозит	100	100
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	22,0	11,0	Гліцин (амінооцтова кислота)	0,9	0,9
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,013	Сульфат аденіну	48,0	-
$\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,025	0,013	БАП	0,4	-
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,4	4,2	ІМК	0,1	0,5
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,13	Сахароза	30000	18000
KJ	0,82	0,41	Агар-агар	7000	7000
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,5	27,5	pH середовища	5,6	

Таблиця 2.2

**Модифіковане середовище за прописом Драйвера і Куніюкі для
культивування експлантів**

Компонент	Кількість мг/л		Компонент	Кількість мг/л	
	розмноження	укорінення		розмноження	укорінення
NH_4NO_3	1420	710	Тіамін-НСL	1,0	1,0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1930	970	Піридоксин-НСL	0,9	0,4
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	144	144	Аскорбінова кислота	0,5	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	730	730	Нікотинова кислота	1,05	0,52
KH_2PO_4	262	262	Пантотенат каль- цію	1,0	-
K_2SO_4	1552	1552	Мезоінозит	100	100
$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	16,0	16,0	Гліцин (амінооцтова кислота)	0,95	0,95
H_3BO_3	4,9	4,9	L-цистеїн	1,0	-
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	33,2	33,2	БАП	2,0	-
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,26	0,26	ІМК	0,52	0,52
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,38	0,38	Глюкоза	30000	-
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,005	0,005	Сахароза	-	20000
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	32,8	32,8	Агар-агар	7000	7000
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	45,6	45,6	pH середовища	5,8	

Культивування експлантів сортів фундука та грецького горіха виконували в пробірках та банках об'ємом в 370 мл та 200 мл.

Усі роботи за асептичних умов виконували на стерильних чашках Петрі та за допомогою інструментів стерилізованих за температури 250°C. Відповідно усі

операції по дослідах *in vitro* проводились в ламінарній шафі з горизонтальним потоком повітря.

Вплив на ризогенез фундука активованого вугілля досліджували за його концентрації 0,5-3,0 г/л.

За вивчення впливу синтетичних ауксинів на ризогенез досліджували дію ІМК, НОК у концентраціях 0,5-3,0 мг/л.

Адаптацію мікроклонів проводили в умовах парника. Рослини висаджували в касети. На етапі постасептичної адаптації для захисту від патогенної та сарофітної грибною інфекції застосовували наступні препарати: Амістар тріо 255 ЕС, Фалькон 460 ЕС, Імпакт 25SC, Агат 25К, Превікур Енерджі8 40 sl в.р.к.

В якості світлоносіїв використовували світлодіодні світильники Bellson 20 W, розміщені паралельними рядами над рослинами, потужність одного світильника – 20 Вт, світловий потік – 1780 Лм (аналог ЛБ-36). Освітлення поступово протягом двох тижнів підвищували із 1500 до 3000 lux.

Підрахунок маси калюсної тканини проводили в кінці циклу вирощування, а приріст тканин розраховували за наступною формулою:

$$PI = \frac{W_t}{W_0},$$

W_t - кінцева маса калюсної культури, мг;

W_0 - початкова маса експлантату, мг.

Для укорінення рослин фундука та грецького горіха використовували перлітові, вермикулітові та кокосові субстрати.

2.3. Отримання суспензійних культур

Отримання суспензійної культури. Для ініціації росту клітинної суспензії використана проліферуюча калюсна тканина рихлої консистенції масою 2-3 грами, яку подрібнювали стерильним пінцетом і поміщали в колби Ерленмейера з рідким живильним середовищем об'ємом 100 мл за прописом

Мурасіге-Скуга (1962) з додаванням вітаміну С (2,5 мг/мл), 6-БАП (0,4 мг/мл) та НОК (2 мг/мл) і культивували на качалці зі швидкістю перемішування 120 об/хв.

При першому переносі на свіже живильне середовище видаляли крупні агрегати шляхом фільтрації через нейлонове сито. Культивування суспензійних культур різних генотипів проводили за температури +26°C у абсолютній темряві.

Через 14 діб клітинну суспензію фільтрували через нейлонове сито та ділили фільтрат на три частини, які розливали в колби. До клітинної суспензії додавали 100 мл свіжого живильного середовища аналогічного складу. Колби поміщали на шейкер та проводили субкультивування суспензій кожні 14 діб.

Для визначення життєздатності клітин суспензію зафарбовували 0,1 % розчином Еванса і мікроскопіювали. Мертві клітини набували синього кольору, а живі клітини не забарвлювались взагалі.

Кількість клітин на 1 мл суспензії визначали в камері Фукса-Розенталя, мацеруючи за допомогою 20 % хромової кислоти при температурі 70°C впродовж 18 хв.

Кількість клітин визначали згідно наступної формули:

$$X = \frac{1000M}{3,2} ,$$

M - середнє число на камеру із 6-ти повторів.

2.4. Цитологічні дослідження калюсогенезу

Відбирали морфогенні калюси, культивовані продовж трьох пасажів (9 тижнів). Рослинний матеріал фіксували 24 год за прописом Чемберлена. Зрізи тканин фарбували залізним гематоксилином за Гейденгайном [146].

Відкладення калози виявляли методом флуоресцентної мікроскопії за використання барвника флуорохрому анілінового синього (розведення – 1:10000) на мікроскопі Axioscope A-1 Carl Zeiss.

Калюсні тканини фарбували флуорохромом 30 хв. у фосфатному буфері (рН – 12,0), далі відмивали у буфері двічі по 5 хв.

Обробку експериментальних даних виконували в програмі AxioVision 40V Carl Zeiss.

2.5. Індукований мутагенез

Калюсні тканини що знаходились в експоненціальній фазі клітинного росту були об'єктами для індукованого мутагенезу.

Індукцію мутацій в калюсах проводили за впливу - N-нітрозо-N-метилсечовина (N-НМС) та γ -опромінення.

Обробку калюсних клітин N-нітрозо-N-метилсечовиною здійснювали в рідкому живильному середовищі для калюсогенезу при рН = 5,8.

Маточний розчин мутагену стерилізували фільтруванням через фільтри «Synpro» і додавали в асептичних умовах до клітинної суспензії.

При індукованому мутагенезі з використанням N-нітрозо-N-метилсечовини були обрані різні дози хімічного мутагену від 2 до 20 мМ \times год.

Клітини витримували в розчині мутагену впродовж 1 години з подальшим п'ятикратним відмиванням надлишком свіжого живильного середовища та поміщали на агаризоване стандартне і селективні живильні середовища (по 10 чашок Петрі на варіант).

Обробку калюсних клітин γ -опроміненням здійснювали в декількох варіантах (10 повторень для кожного з варіантів) з різною дозою опромінення (від 5 до 50 Гр) з проведенням подальшої селекції на середовищах з селективними агентами.

Висновки до розділу 2

Методики проведення досліджень використовувані в науковій роботі придатні для ефективного та точного виконання відповідних обсягів наукової роботи та отримання достовірних висновків.

В процесі виконання наукових досліджень були створені оптимальні умови для вирощування пробіркових рослин сортів фундука та грецького горіха на усіх етапах.

Вихідним матеріалом слугували сорти фундука та грецького горіха вітчизняної та закордонної селекції придатні до вирощування в умовах України.

РОЗДІЛ 3

ОПТИМІЗАЦІЯ ПАРАМЕТРІВ КУЛЬТИВУВАННЯ РОСЛИН В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

На сьогодні горіх та фундук переходять із малопоширеної нішевої культури в стратегічну культуру, з якою аграрний бізнес України виходить на міжнародні ринки. Однак стримуючим чинником для масштабного його вирощування є малі коефіцієнти розмноження звичайними методами [12]. Новітні методи мікроклонального розмноження (далі – МКР) фундука лише починають виходити за межі суто наукових лабораторій *in vitro*. Серед наукових установ України відомі праці науковців Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАНУ [150; 107], Українського науково-дослідного інституту лісового господарства та агролісомеліорації ім. Г.М. Висоцького [102], БНАУ[148]. Водночас сучасний бізнес працює над розробкою технологій МКР, часом випереджаючи вітчизняну науку. В останні роки МКР фундука успішно займається ряд комерційних лабораторій, зокрема, ТОВ «НВЦ «Ін Вітро Планта» (Одеська обл.) [121], екоферма «Ковчег» (Дніпропетровська обл.) [32], ТОВ «Lucky PLANTS» (м. Київ) [273].

Проблемні ділянки МКР фундука є на кожному з етапів цієї технології: 1) введення в асептичні умови; 2) мультиплікація *in vitro*; 3) індукція ризогенезу; 4) постасептична адаптація.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. На першому етапі постає необхідність не просто ввести в асептичні умови, а й оздоровити рослинний матеріал. За проведеними Г.А. Тарасенко обстеженнями дослідних, виробничих та декоративних насаджень представників роду *Corylus* на території НДП «Софіївка» НАНУ, а також завдяки використаним автором методам досліджень встановлено, що найпоширенішими були віруси: вірус мозаїки яблуні (ВМЯ), вірус хлоротичної кільцевої плямистості, вірус некротичної кільцевої плямистості, а також змішана вірусна інфекція [164; 165]. Колчанова О. В.,

Обозний О. І., що високе ураження грибною інфекцією зародків та сім'ядоль фундука, тому як експланти використовували апікальні меристеми бруньок. Також відомо, що не всі меристеми є вільними від вірусів [140; 122]. У частині донорних рослин меристеми бруньок фундука, окрім вірусів і грибів, можуть бути ушкоджені кліщем, який є переносником вказаних патогенів [222].

Про шкодочинність вірусів свідчить багато досліджень. Так, Agrambogu J. і Rovira M., порівнюючи протягом чотирьох років урожай безвірусних рослин і рослин уражених вірусом яблучної мозаїки встановили, що урожай вільних від вірусів рослин був на 77 % вищим. Головним чином це пов'язано з утворенням більшої кількості горіхів, а не з різницею в масі горіха [211]. Також авторами було встановлено, що в Каталонії в середньому 15 % дерев у десятирічному віці містять цей вірус [210]. Часто більшість інфікованих клонів є безсимптомними. Підвищує ефективність оздоровлення фундука через меристему застосування теплової терапії заражених рослин на 21 або більше діб при температурах, що змінюються кожні 4 години між 30 та 38 °C [306]. Це свідчить про те, що не достатньо виділити певну кількість меристем, а й серед регенованих з них ліній необхідно за результатами методів тестування відібрати безвірусні.

Для фундука, як і для інших деревних культур, проблемним є отримання первинних експлантів (для подальшого культивування або ізоляції меристем), вільних від контамінуючої мікрофлори. Досягають цього шляхом випробувань різних методів: від обробки ультрафіолетовим промінням [327] до застосування біоцидів. Зокрема, щоб звільнити ядро від *Aspergillus flavus* і *Aspergillus parasiticus* застосовували азотну плазму [229]. Перші ознаки контамінування найчастіше проявляються вже на 5-7 добу культивування. При відборі зразків на бактеріологічне забруднення швидкозростаючі бактерії проявлялися на тестових середовищах вже на 3 добу, а повільноростучі – на 7 добу культивування. Забруднення не завжди видно на стадії створення культури; деякі ендогенні контамінанти стають очевидними в більш пізніх субкультурах, і їх важко усунути [309].

Меншу кількість контамінантів відмічено за вирощування донорів первинних експлантів в теплиці [349]. Біоцид PPM (Plant Preservative Mixture) [310] в останні роки успішно використовують як основний або додатковий деконтамінант при введенні фундука та інших культур [304; 123; 178].

Рослини фундука в природних умовах містять багато фенолоподібних речовин [311]. Ці речовини виконують захисну функцію, зберігаючи рослини від патогенів. Зокрема Oliveira I., в листях ліщини виявлено вісім фенольних сполук, які мали антимікробну здатність на грампозитивні (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) та грамнегативні бактерії (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) і гриби (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) [316].

Однак в умовах *in vitro* спостерігають ряд проблем. Зокрема, у фундука, як і більшості видів рослин, при переведенні з умов *in vivo* в *in vitro* відбувається фенольна інтоксикація експлантів. Після введення в культуру експланти виділяють у середовище продукти вторинного обміну, які потім пригнічують їх ріст і розвиток. Це особливо актуально для таких деревних видів як дуб та горіх. Фенольні сполуки є одними із найбільш поширених вторинних метаболітів у тканинах вищих рослин. Їх синтез зберігається й за культивування клітин і тканин в умовах *in vitro*. Встановлено, що зростання рівня диференціації клітин супроводжується збільшенням їх здатності до утворення поліфенолів. Так, у мікропагонах рослин-регенерантів, що знаходилися на стадії стійкої проліферації, вміст фенольних сполук вище, ніж в калюсних тканинах. У тканинах інтактних рослин та ініційованих з них рослин-регенерантів фенольні сполуки виявлено переважно в епідермі та зоні провідних пучків.

Дані окремих дослідників щодо впливу фенольних сполук на процеси ризогенезу неоднозначні. Одні вважають, що під час ризогенезу фенольні речовини відіграють другорядну роль порівняно з фітогормонами, але вони здатні змінювати рівень ауксинів, виступаючи про-текторами чи активаторами процесів їх окиснення. У модельних дослідах показано, що моногідроксильні феноли, руйнуючи ауксин, виступають коферментом ауксиноксидази і в такий

спосіб гальмують ріст рослин. За даними ряду дослідників дигідроксильні феноли, навпаки, виявляють інгібуючу дію на ауксиноксидазу і стимулюють ростові процеси [296; 8].

Вплив фенолів та інших подібних речовин обумовлює зменшення регенераційного потенціалу за тривалого субкультивування. Щоб нейтралізувати виділені феноли, рекомендують додавати в середовище активоване вугілля (1-2 г/л), адсорбційні властивості якого сприяють рівномірному розподілу елементів живлення в середовищі та видаленню продуктів метаболізму [171; 96; 136].

Поширеним на практиці є часте пересаджування експлантів. Щодо горіха встановлено, що інтенсивне виділення фенольних речовин у живильне середовище спостерігали у 8–35 % експлантів, але часті пересадки (через 2-7 діб) дозволяли мінімізувати негативний вплив цього явища. Тобто для кожного окремого виду рослин для усунення фенолоутворення експлантами застосовують різноманітні способи нейтралізації цих речовин, і тим самим запобігають негативному їх впливу на ріст і розвиток матеріалу *in vitro*.

Грецький горіх і фундук є складними культурами для введення *in vitro*, особливо внаслідок активного контамінування та самоотруєння фенолоподібними речовинами. Нами досліджено нові підходи до двох представників роду *Corylus* – ліщини ведмежої та двох сортів фундука – Трапезунд і Сірена, які, на нашу думку, можуть вирішити проблему введення в культуру фундука стебловими експлантами. Це заміна гіпохлориту натрію на РРМ^{MT} (Plant Preservative Mixture), часті субкультивування, підготовка донорних рослин. Зміна технології деконтамінації шляхом додавання 2,5 мл РРМ^{MT} у живильне середовище без попередньої обробки гіпохлоритом натрію мала методичні складнощі. Зокрема, на живильне середовище висаджували нестерильний матеріал, який може контактувати як із інструментами (пінцети, ланцети та ін.), так і культуральними ємностями. Це спричинило появу контамінуючих агентів у пробірках, які не контактували із біоцидами. Тому відсоток стерильних експлантів від прояву контамінантів у цьому варіанті

досліді, порівняно із тим, що передбачав обробку експлантів NaClO та додавання у середовище PPM^{MT} , зменшувався в сорту Трапезунд з 81 до 56, а в сорту Сірена – з 87 до 63. Водночас зменшувалася кількість експлантів із опіками поверхневих тканин із 79 до 5 % у сорту Сірена та з 67 до 9 % у сорту Трапезунд. Також випробувано обробку експлантів на шейкері 50 % розчином PPM^{MT} . Проте, зміна лише підходу в деконтамінації не вирішувала проблему в цілому.

Експланти, які не мали опіків, утворювали фенолоподібні речовини, що локалізувалися переважно в тканинах експлантів і менше виділялися у живильне середовище. Живці, які виглядали ззовні зеленими, при розтині мали коричневі за забарвленням тканини внаслідок самоотруєння точки росту та листків, що прокривають меристемний купол (рис. 3.1).

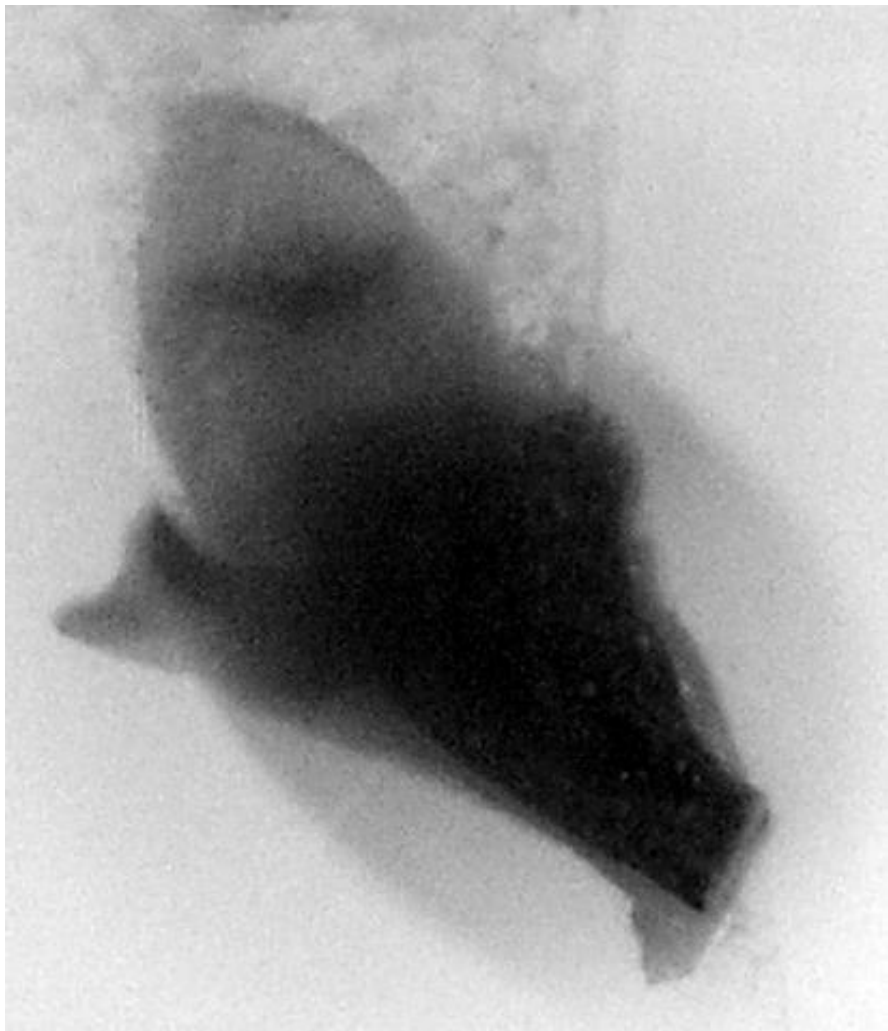


Рис. 3.1. Експлант з фенольними виділеннями

Одним із поширених заходів попередження фенолоподібних утворень є застосування частих пересадок. Зокрема, це дозволяє отримати морфогенні експланти фундука та грецького горіха. Нами проведено пересадку експлантів із наступними інтервалами: 5, 10 та 15 діб. Встановлено, що часті пересадки уповільнюють відмирання експлантів, проте на 45 добу лише за умови частих пересадок (через 5 діб) вижило 5 % експлантів.

Отже, пересадками неможливо вирішити проблему самоотруєння культури *in vitro* фенолоподібними речовинами. Для вивчення впливу на фенолоутворення віку рослин-донорів нами випробувано експланти, ізольовані із рослин-донорів 2 і 18 років. Встановлено, що з 18-річних рослин, за умови їх пересадки через 5 діб, виживало: у фундука сорту Трапезунд – 4 %. У разі використання дворічних донорних рослин виживання експлантів, відповідно, зростало до 11, 7 %.

У процесі дослідження також випробовували умови вирощування дворічних донорних рослин: а) у відкритому ґрунті; б) у теплиці.

Експланти цих варіантів відрізнялися за приживанням, що, в першу чергу, залежало від самоотруєння фенолоподібним ексудатом. Перевага в усіх варіантах була при вирощуванні донорів у контрольованих умовах депозитарію. Наприклад, у сорту Трапезунд виживало 37,1 % (з яких контаміновано 16,5 % експлантів) ізольованих із маточних рослин, що росли у депозитарії. Із донорів, які росли у відкритому ґрунті, ці показники становили 12,9 та 11,6 % відповідно.

Отже, для виділення експлантів рослини-донори доцільно вирощувати у контрольованих умовах закритого ґрунту (депозитарії), що забезпечить підвищення відсотку деконтамінації та зменшення фенолоутворення.

Отримані результати для фундука підтверджено в процесі введення в асептичні умови горіха грецького. Первинні експланти формували повноцінні листки та бруньки. В базальній частині фенольний ексудат був майже відсутнім. Незважаючи на те, що ранева поверхня мала коричневий колір (рис. 3.2), під нею формувався щільний зелений калюс.



Рис. 2. Базальна частина первинного експланта грецького горіха.

Для грецького горіха та фундука, з метою подолання проблем фенолоутворення, пропонуємо наступні заходи: культивування маточних рослин за розсіяного світла в умовах депозитарію; використання антиоксиданта аскорбінової кислоти для замочування експлантатів перед стерилізацією, введення рослин шляхом виділення меристем, пробуджених бруньок; додавання біоциду PPM (Plant Preservative Mixture) в живильне середовище; додавання в живильне середовище ПВП (полівінілпіролідон).

Найпопулярнішими середовищами для мультиплікації фундука є середовище WPM + PVP модифіковане за вмістом 6-BAР для фундука – 1,0 мг/л [157].

У культурі ізольованих тканин і органів спостерігають різну поведінку рослин різних видів, що обумовлене, у першу чергу, генетичною детермінацією здатності їх до розмноження, як і будь-якої іншої ознаки. На практиці створити відповідні умови, необхідні для конкретного генотипу, які індукують процеси регенерації або проліферації пагонів, не завжди вдається. До того ж, здатність до розмноження у рослин різних сортів у межах виду також варіює [92].

На перших етапах вирощування експланта важливим є успішне проходження процесів де- диференціації і вступу клітин у ембріональний стан, початок активних клітинних поділів, утворення калюсу, гісто- та органогенез. У цей час особливу увагу слід приділити оптимізації умов живлення. Для цього до складу живильного середовища додають, крім мінеральних солей і вуглеводів, амінокислоти, вітаміни, ауксини, цитокініни, гібереліни. У подальшому, для індукції росту стебла і формування кореня, склад живильного середовища спрощують [114].

На цьому етапі культивування як якісний, так і кількісний вміст елементів мінерального живлення детермінує інтенсивність того чи іншого напрямку росту і розвитку. В наших дослідженнях рослини *in vitro* культивували на таких штучних живильних середовищах: MS, QL, DKW, WPM, NRM.

Встановлено, що на вказаних середовищах регенеранти формували конгломерати мікропагонів з різною кількістю (рис. 3.3). Найбільше мікропагонів було на середовищі DKW 3,6 при 1,8 на QL та 2,1 на MS.

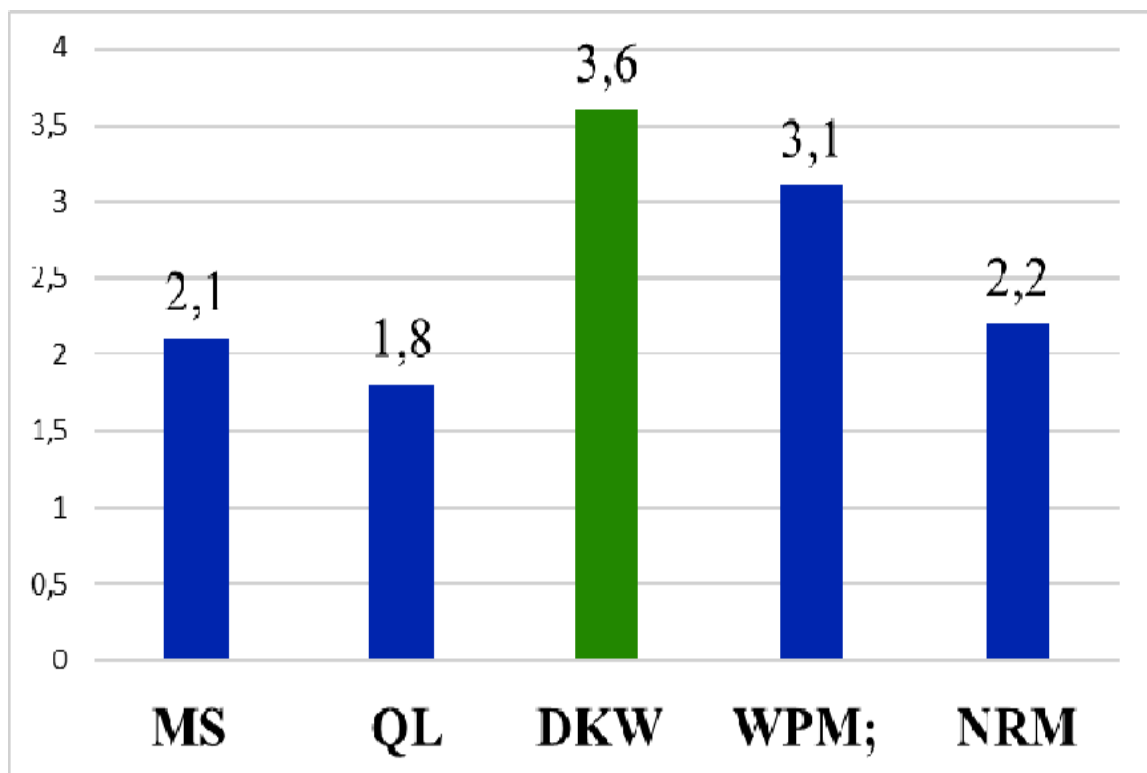


Рис. 3.3. Кількість мікропагонів в конгломераті *in vitro*.

Також живильне середовище впливало на розміри регенерантів. Зокрема, найменші регенеранти були на середовищі WPM (рис. 3.3), яке, на нашу думку, є непридатним для фундука.

Цитокиніни беруть участь у багатьох фізіологічних процесах рослин, регулюють ділення клітин, морфогенез пагона і кореня, дозрівання хлоропластів лінійний ріст клітини, утворення додаткових бруньок і старіння. Співвідношення ауксинів та цитокинінів є ключовим чинником поділу клітин і диференціювання тканин рослини. У той час, як ефект цитокинінів на судинні рослини є плейотропним, цитокиніни викликають зміни інтенсивності росту протонеми у мохів. Утворення бруньок можна вважати варіантом диференціювання клітин, і цей процес є специфічним ефектом цитокинінів. Цитокиніни сприяють синтезу нової ДНК в клітині і контролюють S- фазу клітинного циклу у клітин [175].

За порівняння ефективності застосування синтетичних фітогормонів із цитокиніноюю активністю, встановлено різний вплив на кількість мікропагонів в конгломераті та їх висоту (табл. 3.1).

Таблиця 3.1.

Вплив синтетичних цитокинінів на розвиток конгломерату пагонів фундука *in vitro* сорту Трапезунд

Цитокинін, оптимальна концентрація, мг/л	Кількість мікропагонів у конгломераті, шт.	Висота конгломерату, мм	Кількість вітрифікованих регенерантів, %
Без цитокинінів (контроль)	3,5±0,3	64±4	-
Кінетин 2,5	3,7±0,3	66±5	-
Бензиламінопурин (БАП) 1,5	4,8±0,3	51±6	2
Форхлорфенурон (ФХФУ), 0,2	4,1±0,4	55±4	18
Тідазурон, 0,015	5,3±	27±4	42

Кінетин за впливом на кількість мікропагонів і їх висоту не відрізнявся від контролю без цитокінінів. Найбільша кількість мікропагонів (5,3 при 3,5 на контролі) в конгломераті була за використання тідіазурону (0,015 мг/л), однак 42 % регенерантів були з ознаками гіпергідратації тканин. Також регенеранти за використання цього цитокініну мали найменші розміри.

Дещо меншу кількість мікропагонів, але високі і з низьким відсотком вітрифікації – 2 %, отримано за додавання в середовище бензиламінопурину.

Щодо впливу концентрації активованого вугілля на ризогенез фундука встановили, що в асептичних умовах, так само як і проліферація, ризогенез детермінується трофічними та гормональними детермінантами. З трофічних детермінантів порівняно ризогенез на середовищах із повною та половинними концентраціями мінеральних елементів. Це для багатьох культур стимулює ризогенез. Проте для фундука, який є досить важкою культурою за своїми фізіологічними і біологічними властивостями, такий метод виявився не доцільним. Регенеранти на середовищі із половинною концентрацією відставали від рослин, що вирости на стандартному середовищі.

Випробувано вплив різних концентрацій активованого вугілля на коренеутворення на фоні 3 мг/л ауксину індолілмасляної кислоти (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вплив різних концентрацій активованого вугілля на коренеутворення на 30-ту добу культивування фундука сорту Трапезунд

Концентрація, г/л	Кількість коренів, шт.	Довжина коренів, мм
0 (контроль)	0,3 ±0,1	1 ±2
0,5	0,5 ±0,2	1 ±1
1,5	1,0 ±0,3	12 ±2
2,0	1,1 ±0,2	13 ±4
2,5	2,3 ±0,4	36 ±4
3,0	0,8 ±0,5	5 ±3

Активоване вугілля затінює живильне середовище, адсорбує токсини, тому ефективно впливає на ризогенез. Серед порівнюваних оптимальною була концентрація в 2,5 г/л середовища. У цьому варіанті кількість коренів була найбільшою – 2,3 штуки на регенерант. Також за цієї концентрації коренева система (вимірювали по довжині найдовшого кореня) була 36 мм за 1 мм на контролі.

Вищі концентрації були більш токсичними. В регенерантів формувалася менша кількість коренів. Вони були вкороченими без розгалужень.

Отже, оптимальною концентрацією активованого вугілля є 2,5 г/л середовища.

Також встановлено вплив походження живців на розвиток регенерантів. Найменші регенеранти виростили із живців з ізольованою базальною частиною пагона. А найбільші, із кращими показниками ризогенезу, пагони отримано з апікальних живців. На нашу думку, це пов'язано із природнім накопиченням ауксинів в апікальній частині пагона.

За вивчення впливу різних концентрацій синтетичних ауксинів на ризогенез (табл. 3.3) встановлено, що найбільша кількість коренів була за додавання ауксину індолілмасляної кислоти (далі ІМК) в кількості 3,0 мг/л.

Проте у цьому варіанті корені були короткими та аномально потовщеними, схожими на туберидії орхідних. Найбільша довжина коренів була за концентрації ІМК 3,0 мг/л – 9,3 мм. За кількістю коренів та їх довжиною нафтилоцтова кислота (НОК) не поступається контролю, проте дає гірші показники, ніж ІМК.

Отже, додавання в живильне середовище 3 мг/л ІМК збільшує кількість коренів із 0,0 на контролі до 2,5.

Для акліматизації мікропагонів (етап постасептичної адаптації), розмножених в культурі *in vitro*, застосовують дві основні стратегії, що базуються на зменшенні водного стресу при зміні умов культивування і стимулюванні фотоавтотрофного росту культури.

Позбавити мікропагони стресу дає можливість акліматизація з використанням аквакультури, що позитивно впливає на відсоток адаптованих рослин.

Таблиця 3.3

Вплив різних концентрацій синтетичних ауксинів коренеутворення на 30-ту добу культивування фундука сорту Трапезунд

Ауксин, концентрація, мг/л	Кількість коренів, шт.	Довжина коренів, мм
Без ауксинів (контроль)	0,0	0,0
ІМК, 0,5	0,0	0,0
ІМК, 1,0	0,7 ± 0,3	0,2±0,1
ІМК, 2,0	1,1±0,4	0,4±0,2
ІМК, 3,0	2,5 ±0,7	9,3±0,5
НОК, 0,5	0,0	0,0
НОК, 1,0	0,8±0,3	0,1±0,1
НОК, 2,0	0,9±0,4	0,3±0,2
НОК, 3,0	1,6±0,5	6,0±0,2

Адаптацію проводили в умовах парника. Рослини висаджували в касети. Протягом 1,5–2,0 місяців регенеранти були придатними для висадки у відкритий ґрунт.

На завершення літа – початок осені рослини мали здерев'яніле стебло, розвинуті корені та листки і були придатними для перезимівлі.

Найскладнішим періодом адаптації є перші 2–3 тижні. На цьому етапі рослини пригнічуються й можуть уражатися як патогенними, так і сапрофітними грибами.

Встановлено неоднакову приживлюваність рослин в умовах вологої камери (табл. 3.4).

**Вплив одноразової обробки регенерантів фунгіцидами на їх приживання
(45-та доба культивування)**

Фунгіцид	Прижилося, %	Маса рослини, г
Обробка дистильованою водою (контроль)	31±4	16±3
Амістар тріо 255 ЕС	14±2	11±3
Фалькон 460 ЕС	91±3	18±2
Імпакт 25SC	33±2	15±2
Агат 25К	36±2	17±4
Превікур Енерджі 840 sl в.р.к	93±4	28±2

Фунгіцид Амістар тріо 255 ЕС зумовив порівняно із контролем зменшення відсотку приживання та зменшення ваги рослин. Найбільше рослин приживалося за обробки фунгіцидами Фалькон та Превікур Енерджі 840 sl в.р.к. Останній, окрім фунгіцидного захисту, стимулював ростові процеси, що проявилось в збільшенні маси рослини із 16 г на контролі до 28 г у цьому варіанті.

Висновки до розділу 3

Культивування рослин проводять на середовищі DKW, що забезпечує формування найбільшої кількості мікропагонів – 3,6 шт. порівняно з 1,8 шт. на середовищах QL та 2,1 шт. на MS.

Для подолання проблем фенолоутворення пропонуємо ряд заходів: культивування маточних рослин за розсіяного світла в умовах депозитарію; використання антиоксиданта аскорбінової кислоти для замочування експлантатів перед стерилізацією; введення рослин шляхом виділення меристем, пробуджених бруньок; додавання в живильне середовище біоциду PPM (Plant Preservative Mixture); додавання в живильне середовище ПВП (полівінілпіролідон).

На етапі мультиплікації в живильне середовище додають 1,5 мг/л бензиламінопурину. Ця концентрація сприяла формуванню у середньому 4,8 шт. мікропагонів з високим темпом росту і з низьким відсотком вітрифікації 2 %.

Для успішного ризогенезу середовище модифікують додаванням 2,5 г активованого вугілля та ауксину індолілмасляної кислоти в кількості 3,0 мг/л. Додавання 2,5 г активованого вугілля забезпечує формування найбільшої кількості коренів – 2,3 шт. на 3 мг/л ІМК у складі живильного середовища і сприяє збільшенню кількості коренів із 0 на контролі до 2,5 шт.

На початку постасептичної адаптації рослини та субстрат обприскують фунгіцидом Превікур Енерджі 840 sl в.р.к., що забезпечує кращу приживлюваність рослин. Окрім фунгіцидного захисту, препарат стимулює ростові процеси, що проявляється у збільшенні маси рослин.

РОЗДІЛ 4

МОРФОГЕНЕЗ РОСЛИН В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Морфогенез із подальшою регенерацією рослин в умовах *in vitro* може відбуватися за рахунок органогенезу, або ж розвитку стеблової меристеми та кореневої системи, або ж соматичного ембріогенезу, розвитку біполярної структури, що має точки росту стебла та кореня і подібна за будовою до зиготичного зародка.

Диференціація рослинних клітин відбувається на основі позиційного принципу завдяки фізичним і хімічним сигналам, що надходять від сусідніх клітин. *In vitro* клітини рослин постійно виділяють у середовище певні екстраклітинні молекули які необхідні як для підтримки проліферативної активності клітин, так і для збереження їх морфогенних потенцій.

4.1. Отримання асептичного рослинного матеріалу

На першому етапі проведення робіт з розмноження фундука та грецького горіха в умовах *in vitro* важливим є отримання здорового асептичного рослинного матеріалу. Адже поживне середовище є хорошим місцем розмноження не тільки частинок рослин а й цілого спектру бактеріальних та грибних видів здатних надзвичайно агресивно конкурувати та знищувати зародки рослин.

В багатьох публікаціях були відмічені серйозні труднощі, що виникали при отриманні стерильної культури фундука та грецького горіха. Тому, нами було обрано два найбільш ефективні варіанти асептичної обробки сім'ядоль та в результаті спостережень проведений порівняльний аналіз схожості сім'ядоль різних генотипів фундука (табл. 3.1) та грецького горіха (табл. 4.1).

Отже, для знезараження сім'ядоль фундука ми використовували дві різні схеми асептичної обробки насіння описані раніше.

Порівняльний аналіз схожості сім'ядоль фундука різних генотипів з використанням різних схем асептичної обробки

Сорт	Варіанти асептичної обробки			
	1		2	
	Всього, шт.	Кількість пророслих сім'ядоль, шт.	Всього, шт.	Кількість пророслих сім'ядоль, шт.
Болградська новинка	100	50	100	61
Дар Павленка	100	46	100	57
Лозівський шаровидний	100	55	100	71
Пірожок	100	40	100	52
Степовий 83	100	46	100	58
Боровський	100	53	100	62
Серебристий	100	48	100	59
Косфорд	100	52	100	64
Барселонський	100	50	100	61
Трапезунд	100	61	100	73
НІР _{0,05}	-	1,0	-	1,0

Отже, після виконання асептичної обробки та висадки на безгормональне живильне середовище Мурасіге-Скуга з половинним складом макро- та мікроелементів спостерігали проростання в середньому 50,1 % сім'ядоль усіх досліджуваних генотипів фундука при асептичній обробці що включала послідовне застосування 70 % етилового спирту і гіпохлориту натрію, комерційний препарат «Білизна».

Після обробки концентрованою сірчаною кислотою (другий варіант) проростання сім'ядоль в досліді було 61,8 %.

Також, нами була проведена оцінка ефективності стерилізації за використання різних варіантів асептичної обробки. Введені в культуру *in vitro* сім'ядолі фундука перевірялись на наявність чи відсутність зараження, результати наведені в таблиці 4.2.

Таблиця 4.2

Ефективність стерилізації сім'ядоль фундука різних генотипів з використанням різних схем асептичної обробки

Сорт, гібрид	Стерильних експлантів, %		Продуктів окислення фенолів, балів	
	1	2	1	2
Болградська новинка	26±1,3	35±1,5	2	1
Дар Павленка	40±1,4	47±1,9	1	1
Лозівський шаровидний	18±1,6	28±2,0	3	2
Пірожок	23±1,2	25±1,4	3	3
Степовий 83	22±1,2	27±1,0	3	2
Боровський	26±1,0	33±0,9	2	2
Серебристий	30±2,0	36±1,8	1	1
Косфорд	18±1,2	24±1,4	3	2
Барселонський	25±1,9	30±1,8	2	1
Трапезунд	34±1,4	39±1,6	1	1

Отже, проаналізувавши отримані дані можна зробити висновок про те, що друга схема асептичної обробки сім'ядолі фундука з використанням концентрованої сірчаної кислоти є найбільш ефективною. При використанні даного типу стерилізації ми отримали значно вищий відсоток стерильних експлантів по усіх досліджуваних генотипах.

Також при цьому спостерігали менші показники наявності продуктів окислення фенолів, що важливо для розмноження *in vitro* горіхоплідних культур.

Також нами було випробувано два найбільш ефективні варіанти асептичної обробки сім'ядоль та на основі спостережень проведений порівняльний аналіз схожості сім'ядоль різних генотипів грецького горіха (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Порівняльний аналіз схожості сім'ядоль грецького горіха різних генотипів з використанням різних схем асептичної обробки

Сорт	Варіанти асептичної обробки			
	1		2	
	Всього, шт.	Кількість пророслих сім'ядоль, шт.	Всього, шт.	Кількість пророслих сім'ядоль, шт.
Коржеуцкый	100	43	100	58
Кордене	100	45	100	54
Ферджан	100	50	100	63
Кишиневский	100	53	100	62
Чернівецький 1	100	44	100	57
Клішківський	100	54	100	68
Ярівський	100	46	100	49
Буковинський 2	100	48	100	54
Фернет	100	52	100	54
НІР _{0,05}	-	1,0	-	1,0

Визначено, що після проведення асептичної обробки та посадки на безгормональне живильне середовище Мурасіге-Скуга з половинним складом макро- та мікроелементів спостерігали проростання в середньому 48,3 % сім'ядоль усіх досліджуваних генотипів грецького горіха за умов застосування

обробки що включала послідовне використання 70 % етилового спирту і гіпохлориту натрію, комерційний препарат «Білизна».

Також визначено, що після обробки концентрованою сірчаною кислотою (другий варіант) проростання сім'ядоль в досліді було 57,7 %, що істотно вище першого варіанту обробки.

Окрім того ми виконали оцінку ефективності стерилізації за застосування різних варіантів асептичної обробки. Введені в культуру *in vitro* сім'ядолі грецького горіха перевірялись на наявність чи відсутність зараження, результати наведені в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4

Ефективність стерилізації сім'ядоль грецького горіха різних генотипів з використанням різних схем асептичної обробки

Сорт, гібрид	Стерильних експлантів, %		Продуктів окислення фенолів, балів	
	1	2	1	2
Коржеуцкый	22±0,7	30±1,0	3	2
Кордене	31±0,9	37±1,1	1	1
Ферджан	14±0,6	25±1,3	3	2
Кишиневский	18±1,4	26±1,2	3	2
Чернівецький 1	21±1,0	28±1,0	3	2
Клішківський	23±0,8	30±1,0	3	1
Ярівський	26±1,1	33±1,2	2	1
Буковинський 2	34±1,3	40±1,0	1	1
Фернет	30±1,4	39±1,6	1	1

Аналогічно результатам отриманим для фундука друга схема асептичної обробки сім'ядолі грецького горіха, з використанням концентрованої сірчаної кислоти, є найбільш ефективною. При використанні даного типу стерилізації ми

отримали значно вищий відсоток стерильних експлантів по усіх досліджуваних генотипах.

Також ми спостерігали зменшення показників наявності продуктів окислення фенолів з рівня трьох-двох балів до переважно одно-двох балів.

4.2. Особливості калюсогенезу експлантатів

Основою клітинної селекції є культивування калюсних та суспензійних культур *in vitro* під впливом певних селективних агентів. Тому, важливим є вивчення впливу генотипу, експлантату та складу живильного середовища на процеси дедиференціації при калюсогенезі та диференціації при органогенезі.

Інтенсивність та ефективність непрямого морфогенезу у рослин вирощуваних в умовах *in vitro* істотною мірою залежать від зовнішніх факторів середовища. Перш за все, це умови вирощування та власне гормональний склад живильного середовища. Адже саме гормони викликають численні зміни в клітинах та тканинах, тобто вони є генератором трансформації при непрямому морфогенезі.

Генетична варіабельність, що притаманна калюсним культурам, дає можливість проводити ефективну клітинну селекцію *in vitro*. Але, кожен окремий генотип має свої особливості та складнощі у процесі отримання та культивування калюсних тканин. Тому, актуальною є проблема підбору гормонального складу живильного середовища та умов культивування для кращого формування приросту калюсної маси за обмежені терміни культивування. Також важливим є отримання калюсної маси з високою проліферативною активністю.

При дослідженні ми використовували живильні середовища для ініціації калюсогенезу на основі середовища за прописом Мурасіге-Скуга (МС) а також за прописом Драйвера і Куніюкі. Експеримент виконувався за двадцятикратного повторювання культивування усіх досліджуваних нами генотипів фундука.

Нами було визначено, що на початку культивування експлантатів у темряві на всіх варіантах живильного середовища спостерігалось набухання первинного експлантату, збільшення розмірів, а також його часткове знебарвлення. А от уже на 10-ту добу культивування у практично половини первинних експлантатів спостерігався початок калюсоутворення, тоді як на 20-ту добу калюс формувався в практично усіх експлантів.

В залежності від складу живильного середовища та генотипу ми спостерігали різну інтенсивність калюсоутворення, а також відмінності в масі, а також різний характер формування калюсних тканин.

При використанні живильного середовища на базі Драйвера і Куніюкі, нами було відзначено зниження ростового індексу у всіх сортів фундука, а також спостерігалася менша маса калюсних тканин порівняно з варіантом калюсогенного середовища Мурасіге-Скуга (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

Інтенсивність калюсоутворення і приріст калюсної маси фундука на середовищі за прописом Мурасіге і Скуга

№ п/п	Сорт	Ростовий індекс (PI)	Середня маса калюсу, мг
1	Болградська новинка	6,5±0,8	174,3±14,3
2	Дар Павленка	5,3±1,2	149,5±18,8
3	Лозівський шаровидний	6,6±0,6	205,4±16,9
4	Пірожок	7,0±0,5	167,4±12,2
5	Степовий 83	3,4±0,2	140,1±12,0
6	Боровський	6,0±0,3	126,6±12,0
7	Серебристий	6,5±0,5	175,4±17,5
8	Косфорд	6,8±0,4	163,8±14,5
9	Барселонський	8,1±0,9	170,1±15,0
10	Трапезунд	6,0±0,3	125,1±21,0

При такому варіанті культивування відмічено, що формувався калюс щільного дрібнозернистого типу, який не формував подальшої регенерації проростків.

Кращий ростовий індекс за застосування середовища на базі припису Мурасіге і Скуга ми спостерігали при отриманні калюсу в сортів фундука: Барселонський та Пірожок. А от краща середня маса сформованого калюсу була у сортів фундука: Лозівський шаровидний, Серебристий, Болградська новинка та Барселонський.

При культивуванні рослин-регенерантів фундука на середовищі за прописом Драйвера і Куніюкі спостерігався найменший приріст калюсної маси (табл. 4.6).

Таблиця 4.6

Інтенсивність калюсоутворення і приріст калюсної маси фундука на середовищі за прописом Драйвера і Куніюкі

№ п/п	Сорт	Ростовий індекс (PI)	Середня маса калюсу, мг
1	Болградська новинка	10,2±0,4	193,5±11,2
2	Дар Павленка	9,8±0,5	242,8±14,5
3	Лозівський шаровидний	8,5±0,6	227,6±15,7
4	Пірожок	9,5±0,4	340,1±17,8
5	Степовий 83	9,8±0,3	324,0±15,6
6	Боровський	7,9±0,6	198,8±15,2
7	Серебристий	8,6±0,3	185,1±19,5
8	Косфорд	10,2±0,6	242,4±18,1
9	Барселонський	11,2±0,7	176,9±16,8
10	Трапезунд	10,8±0,8	241,5±13,7

При цьому мінімальний приріст калюсної маси був в сорту Барселонський і становив 176,9 мг, а найбільший приріст був у сорту Пірожок – 340,1 мг.

Кращий ростовий індекс за застосування середовища на базі припису Драйвера і Куніюкі ми спостерігали при отриманні калюсу в сортів фундука: Барселонський, Трапезунд, Косфорд та Болградська новинка. А от краща середня маса сформованого калюсу була у сортів фундука: Пірожок та Степовий 83.

Варто відмітити, що в середньому, на середовищі Мурасіге і Скуга сорти фундука мали ростовий індекс 6,2 та формували калюс масою 159,8 мг, а за застосування середовища за приписом Драйвера і Куніюкі відповідно мали ростовий індекс 9,7 та формували калюс масою 237,3 мг.

При культивуванні експлантатів досліджуваних генотипів грецького горіха на варіанті живильного середовища за прописом Мурасіге і Скуга в середньому по культивованих сортах ростовий індекс становив 6,9 та вони формували калюс масою 193,2 мг (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

Інтенсивність калюсоутворення і приріст калюсної маси грецького горіха на середовищі за прописом Мурасіге і Скуга

№ п/п	Сорт, гібрид	Ростовий індекс (PI)	Середня маса калюсу, мг
1	Коржеуцкий	7,1±1,0	200,4±12,0
2	Кордене	6,4±0,8	194,6±14,3
3	Ферджан	6,3±1,0	172,2±15,5
4	Кишиневский	6,9±0,9	249,9±14,3
5	Чернівецький 1	7,2±0,8	153,1±16,7
6	Клішківський	6,5±1,0	254,3±15,0
7	Ярівський	6,4±0,9	141,4±18,0
8	Буковинський 2	7,4±0,7	219,0±13,5
9	Фернет	7,8±1,0	153,6±18,4

При цьому кращий ростовий індекс за застосування середовища на базі припису Мурасіге і Скуга ми спостерігали при отриманні калюсу в сортів

грецького горіха: Фернет, Буковинський 2, Чернівецький 1 та Коржеуцький. А от краща середня маса сформованого калюсу була у сортів грецького горіха: Клішківський, Кишиневський, Буковинський 2 та Коржеуцький.

Найбільш ефективним живильним середовищем при отриманні калюсних тканин досліджуваних сортів грецького горіха, в наших дослідженнях, виявився варіант живильного середовища за прописом Драйвера і Куніюкі.

При культивуванні рослинних експлантатів на даному варіанті живильного середовища спостерігався інтенсивний калюсогенез: ростовий індекс в середньому становив 11,9. Маса калюсної тканини також була значно більшою у порівнянні з культивуванням на попередньому варіанті середовища і становила 426,1 мг (табл. 4.8).

Таблиця 4.8

Інтенсивність калюсоутворення і приріст калюсної маси грецького горіха на середовищі за прописом Драйвера і Куніюкі

№ п/п	Сорт, гібрид	Ростовий індекс (PI)	Середня маса калюсу, мг
1	Коржеуцький	11,8±0,8	390,3±23,6
2	Кордене	12,3±1,2	424,6±22,0
3	Ферджан	10,1±1,0	378,4±24,1
4	Кишиневський	13,2±1,2	437,9±20,0
5	Чернівецький 1	11,3±1,0	505,1±17,3
6	Клішківський	9,3±0,7	320,2±20,1
7	Ярівський	12,2±1,1	350,5±28,0
8	Буковинський 2	13,3±1,0	526,2±20,4
9	Фернет	14,0±0,9	502,0±25,0

Також нами було визначено, що кращий ростовий індекс за застосування середовища на базі припису Драйвера і Куніюкі був при отриманні калюсу в сортів грецького горіха: Фернет, Буковинський 2, Кишиневський, Кордене та

Ярівський. А от краща середня маса сформованого калюсу була у сортів грецького горіха: Буковинський 2, Чернівецький 1 та Фернет.

Отже, за результатами аналізу експериментальних даних можна зробити висновок, що найбільш хорошим для ініціації калюсогенезу та подальшої культивуації калюсних тканин було середовище за приписом Драйвера і Куніюкі.

При культивуванні експлантатів різних генотипів фундуку на другий тиждень культивування у 50 % експлантатів спостерігалась ініціація калюсогенезу, а до кінця третього тижня калюс формувався у переважної більшості експлантатів.

Прояв морфофізіологічних характеристик калюсних тканин є важливим в клітинній селекції, особливу увагу при цьому звертають на структуру, колір, та тип калюсу.

Колір калюсу може диференційовано змінюватись від білого, жовтого чи зеленого до коричневого та чорного.

А от за типом розрізняють декілька наступні зовнішні прояви формувань калюсів:

- щільний з дрібними клітинами та зонами лігніфікації;
- середньої щільності з наявністю меристематичних осередків;
- рихлий, оводнений з великими шароподібними клітинами.

З точки зору подальшого формулювання морфологічно нормальних пагонів цінним є калюс з явними зеленими меристематичними осередками. Однак, для отримання клітинних суспензій найбільш цікавим є формування власне рихлих калюсів, що мають добре оводнені клітини та жовто-світлого кольору. Саме вищезгадувані калюсні тканин найкраще підходять для формування клітинних суспензій.

За результатами проведених експериментальних досліджень ми сформували опис калюсних тканин різних сортів фундука залежно від впливу на них різних варіантів живильних середовищ. Такий підбір середовищ для отримання необхідного для формування клітинних суспензій калюсу істотно полегшив подальше його вивчення.

Нами було досліджено, що на варіанті застосування середовища за прописом Мурасіге і Скуга калюсні тканин досліджуваних генотипів фундука мали дуже щільні характеристики, були дрібнозернистими, а також мали жовто-білуватий колір. При цьому істотної оводненості клітин сортів фундука нами не спостерігалось у жодного з представлених зразків (табл. 4.9).

Таблиця 4.9

Характер калюсних тканин різних генотипів фундука на середовищі за прописом Мурасіге і Скуга

№ п/п	Сорт, гібрид	Щільність	Колір	Розмір та форма клітин
1	Болградська новинка	Дуже щільний	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті
2	Дар Павленка	Дуже щільний	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті
3	Лозівський шаровидний	Дуже щільний	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті
4	Пірожок	Дуже щільний	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті
5	Степовий 83	Дуже щільний	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті
6	Боровський	Дуже щільний	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті
7	Серебристий	Дуже щільний	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті
8	Косфорд	Дуже щільний	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті
9	Барселонський	Дуже щільний	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті
10	Трапезунд	Дуже щільний	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті

В подальшому, при перенесенні отриманих калюсних тканин на свіже живильне середовище вони продовжували стабільну проліферацію, причому у досліджуваних нами генотипів меристематичні осередки не були присутні. Некроз клітин не спостерігався.

Фактично вибір середовища на базі Мурасіге і Скуга призвів до однакового

розвитку калюсу різних генотипів фундуку.

За культивування досліджуваних генотипів фундуку на варіанті калюсогенного середовища за прописом Драйвера і Куніюкі утворювався калюс жовто-світлого кольору, дуже рихлий тип, з шароподібними, великими та оводненими клітинами (табл. 4.10).

Таблиця 4.10

Характер калюсних тканин різних генотипів фундука на середовищі за прописом Драйвера і Куніюкі

№	Сорт, гібрид	Щільність	Колір	Розмір та форма клітин
1	Болградська новинка	Дуже рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні, великі, оводнені
2	Дар Павленка	Дуже рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні, великі, оводнені
3	Лозівський шаровидний	Дуже рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні, великі, оводнені
4	Пірожок	Дуже рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні, великі, оводнені
5	Степовий 83	Дуже рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні, великі, оводнені
6	Боровський	Дуже рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні, великі, оводнені
7	Серебристий	Дуже рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні, великі, оводнені
8	Косфорд	Дуже рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні, великі, оводнені
9	Барселонський	Дуже рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні, великі, оводнені
10	Трапезунд	Дуже рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні, великі, оводнені

Аналогічно основні відмінності в розрізі різних генотипів не були нами ідентифіковані як сортова різниця реакції на середовище вирощування.

При культивуванні калюсних тканин горіха грецького на варіанті живильного середовища за прописом Мурасіге-Скуга, модифікованого нами, калюсні тканини мали жовтувато-білий колір, були дрібнозернисті, оводнені з рихлою структурою (табл. 4.11).

Таблиця 4.11

Характер калюсних тканин різних генотипів грецького горіха на середовищі за прописом Мурасіге і Скуга

№ п/п	Сорт, гібрид	Щільність	Колір	Розмір та форма клітин
1	Коржеуцкий	Рихлий	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті, оводнені
2	Кордене	Рихлий	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті, оводнені
3	Ферджан	Рихлий	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті, оводнені
4	Кишиневский	Рихлий	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті, оводнені
5	Чернівецький 1	Рихлий	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті, оводнені
6	Клішківський	Рихлий	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті, оводнені
7	Ярівський	Рихлий	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті, оводнені
8	Буковинський 2	Рихлий	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті, оводнені
9	Фернет	Рихлий	Жовто-білуватий	Дрібнозернисті, оводнені

При цьому ми встановили, що калюси грецького горіха культивовані на варіанті живильного середовища за прописом Мурасіге-Скуга мали початок ризогенезу при другому субкультивуванні на середовищі аналогічного складу.

Також, можна спостерігати, що для усіх досліджуваних генотипів був притаманний однаковий характер формування калюсних тканин.

В той же час за культивування експлантів досліджуваних генотипів грецького горіха на варіанті живильного середовища за прописом Драйвера і Куніюкі було встановлено, що калюсні тканини мали жовтий світлий колір забарвлення, клітини були оводнені, шароподібні та набували великих розмірів (таблиця 4.12).

Таблиця 4.12

**Характер калюсних тканин різних генотипів грецького горіха на
середовищі за прописом Драйвера і Куніюкі**

№ п/п	Сорт, гібрид	Щільність	Колір	Розмір та форма клітин
1	Коржеуцкий	Рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні великі, оводнені
2	Кордене	Рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні великі, оводнені
3	Ферджан	Рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні великі, оводнені
4	Кишиневский	Рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні великі, оводнені
5	Чернівецький 1	Рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні великі, оводнені
6	Клішківський	Рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні великі, оводнені
7	Ярівський	Рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні великі, оводнені
8	Буковинський 2	Рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні великі, оводнені
9	Фернет	Рихлий	Жовтий світлий	Шароподібні великі, оводнені

При цьому також було досліджено, що характер формування калюсів не залежав від генотипу первинного експлантату. При подальших субкультивуваннях калюсу залишався незмінним, а ризогенез та некротизація не спостерігалися.

Отже, нами було експериментально доведено, що для отримання великої кількості калюсних тканин різних генотипів фундука та грецького горіха та проведення з ними відповідної подальшої селекційної роботи кращим варіантом живильного середовища є середовище за прописом Драйвера і Куніюкі. Адже воно ефективно працює за вирощування обох культур в умовах *in vitro*.

4.2.1. Особливості формування морфогенетично активних модулів в калюсах фундука

Природне звичайне призначення калюсу рослин полягає в забезпеченні функцій відновлення тканин рослини за дії на неї факторів впливу, що викликають механічні або біотичні пошкодження тканин. А от в умовах *in vitro* активний поділ клітин забезпечує основну умову для ефективного мікроклонального розмноження.

На початкових стадіях калюсогенезу приймають участь клітини мезофілу та паренхіми, що активно діляться. Однак, цитокінез не мав чіткої просторової орієнтації та синхронізації, що сприяло утворенню рихлої тканини, клітини в якій паренхімного типу, вакуолізовані, з тонкими клітинними стінками, завдовжки 62-163 мкм, еліпсоїдної форми.

Міжклітинний транспорт речовин, за рахунок просторово не синхронізованого розтягнення клітинних стінок, відбувається по апопласту. Сімпластний зв'язок ускладнювався відсутністю тісних зв'язків між клітинами.

А от в калюсах другого пасажу у зовнішніх шарах клітин паренхіми відбувалося інтенсивне відкладення компонентів лігніну. Тобто у неморфогенному калюсі утворювалися периферична і внутрішня зони, причому в окремих ділянках внутрішньої зони калюсу відокремлювалися невеликі групи клітин з високою проліферативною активністю.

Такі клітини мали густу базофільну цитоплазму і високий показник ядерно-цитоплазменого співвідношення (N/C). Найбільш структурованими були клітини калюсу в оточені крупних без'ядерних клітин паренхіми зі значними відкладеннями у вторинних клітинних стінках калози і компонентів лігніну (161-192 мкм).

При цьому функціонально активні меристемоїди можуть формуватись як на поверхні калюсних тканин, так і в їх середині, однак цей процес не завжди закінчується розвитком аксіальних органів.

Зони морфогенного калюсу, що належали до первинних меристемоїдів склалися з групи дрібних (13-16 мкм) щільно розташованих клітин. Розташування яких та інтенсивність їх поділу визначали первинну морфологію регуляторного центру, що в подальшому уже синхронізував поділ і диференціацію клітин.

За умови васкулярної диференціації клітин утворювалися видовжені клітини гідроцити з потовщення вторинних клітинних стінок сітчастими або спіральними. Розтягнення клітин знижувалось у відцентровому напрямку.

Гідроцитна система мала складну диференціацію клітин, що забезпечували утворення систем для виконання функцій: транспорту і накопичення речовин. Така паренхіма мали більш високе співвідношення довжини до діаметру клітин та закінчувалась біля базальної зони меристемоїдних конусів.

Досліджено, що на калюсах третього пасажу (8-9 тиждень) формувались мікропагони з сформованими типовими за будовою меристемами.

За проведення досліджень з визначення функціональної спеціалізації клітин, до найбільш вагомих параметрів можна віднести їх лінійні розміри, морфологію, а також форму та розмір ядра.

Проведення порівняльної оцінки цитометричних показників дозволило виявити суттєву різницю між клітинами периферійної паренхіми і клітинами проваскулярних тяжів, апікальних меристем і верхівкових меристемоїдів (таблиця 4.13).

Також встановлено, що за індексом ядерно/цитоплазменного співвідношення (індекс N/C), густиною цитоплазми, морфологію та упорядкованою зональністю клітин, апікальні меристеми значно відрізняються від меристемоїдів, та мають менш виражену залежність розміру від розташування в структурі.

Встановлено, що діаметр ядра паренхімних клітин був втричі більший чим у клітинах трахеальних елементів, що є ознакою поліморфності клітин морфогенного калюсу. А от розміри ядер верхівкових меристемоїдів в порівнянні з апікальними меристемами і відрізнялися незначно.

Таблиця 4.13.

**Цитометричні показники морфогенного калюсу і апікальних меристем
фундука сорту Трапезунд**

Тип клітин	Елемент клітини	Метричний показник		M ± m	
Клітини проваскулярної зони (гідроцити)	Ядро	Діаметр, мкм	мін.	5,9 ± 0,28	
			макс.	8,4 ± 0,37	
		Периметр, мкм	24,1 ± 1,17		
	Площа, мкм ²		45,2 ± 3,44		
	Протопласт	Діаметр, мкм	мін.	18,0 ± 1,46	
			макс.	37,1 ± 2,84	
		Периметр, мкм		92,0 ± 6,54	
		Площа, мкм ²		543,2 ± 72,2	
	Індекс N/C, %				8,3 ± 1,15
	Паренхіма периферійної зони	Ядро	Діаметр, мкм	мін.	11,2 ± 1,20
макс.				23,4 ± 1,48	
Периметр, мкм			56,9 ± 2,23		
Площа, мкм ²		199,5 ± 15,4			
Протопласт		Діаметр, мкм	мін.	84,2 ± 11,6	
			макс.	164,2 ± 6,24	
		Периметр, мкм		434,2 ± 16,2	
Площа, мкм ²		10786,1 ± 423,1			
Індекс N/C, %				1,8 ± 0,14	
Клітини апікальної меристеми		Ядро	Діаметр, мкм	мін.	8,9 ± 0,28
	макс.			12,0 ± 0,30	
	Периметр, мкм		32,3 ± 0,77		
	Площа, мкм ²		87,3 ± 3,56		
	Протопласт	Діаметр, мкм	мін.	18,0 ± 0,50	
			макс.	23,0 ± 1,10	
		Периметр, мкм		67,3 ± 1,84	
	Площа, мкм ²		323,1 ± 22,8		
	Індекс N/C, %				27,0 ± 1,00
	Клітини верхівкового меристемоїда	Ядро	Діаметр, мкм	мін.	7,0 ± 0,50
макс.				10,0 ± 1,10	
Периметр, мкм			26,5 ± 2,32		
Площа, мкм ²		61,3 ± 12,1			
Протопласт		Діаметр, мкм	мін.	20,1 ± 1,50	
			макс.	42,1 ± 3,56	
		Периметр, мкм		110,3 ± 8,23	
Площа, мкм ²		673,0 ± 74,5			
Індекс N/C, %				9,1 ± 1,19	

Причому аналіз індексу співвідношення ядра до розміру цитоплазми (N/C) показує, що найменшим він був в паренхіми периферійної зони – 1,8 %, а найбільшим відповідно в клітин апікальної меристеми – 27,0 %.

Дрібні клітини з густою цитоплазмою перебувають в оточені крупних клітин значним вмістом в клітинних стінках калози, що виконує регулюючі та захисні функції.

Синтез калози індукується дією еліситорів або ж механічними впливами в певній точці поверхні цитоплазматичної мембрани, формуючи так звані калозні сайти. При цьому калоза регулює транспорт асимілятів в тканинах, створюють умови для часткової або повної ізоляції протопластів клітини від дії зовнішніх факторів [334].

Завдяки відкладанню калози у клітинній оболонці, та активізації її синтезу за стресових умов, утворюється напівпроникна структура, яка контролює рух води та водних розчинів, що особливо актуально за посухи [336]. Причому помірний дефіцит вологи викликає збільшення вмісту калози у тетрадах мікроспор в суходільних рослин [305; 216]. Також досліджено, що в *Triticum aestivum* гіпоксія викликала посилення синтезу калози (на 58 %) у клітинах ендодерми та перициклу в зоні корневих волосків [3].

Отже, вихідний матеріал для виділення перспективних форм стійких до водного дефіциту в цілому підібрано правильно, оскільки в більшості зразків вихідного матеріалу є клітини із значними відкладенням в клітинних стінках калози.

Отже, ймовірно, що в меристемоїдних конусах, що функціонують як центри синтезу гормонів, запускається процес регуляції розвитку васкулярної системи і диференціації тканин. А от наступна реалізація морфогенного потенціалу структур, які утворені *denovo*, залежить від умов культивування культури, а також від функціональної активності меристемоїдних зон.

4.3. Особливості культивування клітинних суспензій

Отримані нами з рихлих калюсних тканин суспензійні культури клітин в мали типовий клітин в суспензії, що можна описати типовою S-подібною кривою. Також, за результатами досліджень ми визначили, що у всіх генотипів фази ростового циклу починаються в приблизно однаковий проміжок часу.

Для визначення щільності клітинної суспензії досліджуваних генотипів фундука, кожні дві доби нами встановлювалась кількість клітин в суспензії протягом всього ростового циклу (табл. 4.14).

Таблиця 4.14

Динаміка росту клітинних суспензій різних генотипів фундука

№ п/п	Сорт, гібрид	Кількість клітин в 1 мл суспензії ($\text{Ч}10^5$)							
		2 доба	4 доба	6 доба	8 доба	10 доба	12 доба	14 доба	16 доба
1	Болградська новинка	4,82	7,58	10,26	18,87	21,80	24,29	24,70	24,72
2	Дар Павленка	2,64	3,40	4,94	10,29	12,41	12,96	13,26	13,06
3	Лозівський шаровидний	3,02	3,91	6,46	12,06	14,07	14,38	14,96	14,26
4	Пірожок	2,95	3,56	5,51	11,20	13,36	13,65	13,99	13,58
5	Степовий 83	3,05	3,88	5,85	11,31	13,80	14,15	14,86	14,37
6	Боровський	3,62	4,42	7,07	12,63	14,76	15,29	15,79	14,87
7	Серебристий	2,83	3,64	5,39	10,61	13,33	14,54	15,13	14,62
8	Косфорд	3,80	4,75	9,72	16,75	20,17	21,62	22,32	21,74
9	Барселонський	4,99	7,22	12,58	18,32	22,07	23,61	24,14	24,01
10	Трапезунд	3,94	4,76	9,79	15,27	18,02	18,53	20,62	20,30
	$\text{HP}_{0,05}$	0,4	0,6	0,8	1,0	1,1	1,0	1,2	1,4

При цьому було визначено, що максимальна кількість клітин була на 10-14 добу культивування, а от уже після двох тижнів культивування спостерігалось зменшення щільності суспензій у всіх сортів фундука. Причому таке зниження

мало закономірності, що не залежали від біологічних особливостей досліджуваних нами генотипів. Отже, максимальна кількість клітин у суспензіях спостерігалась на 14-ту добу культивування, та в середньому по досліді становила 18,0 в 1 мл суспензії ($Ч10^5$).

За порівняння динаміки суспензійних культур окремих сортів з середніми значеннями встановлено, що показники кількості клітин в 1 мл суспензії ($Ч10^5$) для сортів: Дар Павленка, Лозівський шаровидний, Пірожок, Степовий 83, Боровський та Серебристий були нижчі середньої кількості клітин, а в сортів: Болградська новинка, Косфорд, Барселонський та Трапезунд – вищі.

На 14 добу культивування останні сорти формували на 2,6-6,7 клітин в 1 мл суспензії ($Ч10^5$) більше, коли сорти що розташовувались нижче середнього – на 2,2-4,7 клітин в 1 мл суспензії ($Ч10^5$) менше.

Динаміка росту клітинних суспензій горіха грецького подана в табл. 4.15.

Таблиця 4.15

Динаміка росту клітинних суспензій різних генотипів горіха грецького

№ п/п	Сорт, гібрид	Кількість клітин в 1 мл суспензії ($Ч10^5$)							
		2 доба	4 доба	6 доба	8 доба	10 доба	12 доба	14 доба	16 доба
1	Коржеуцкий	3,03	3,87	5,92	11,03	13,59	13,93	14,75	14,17
2	Кордене	3,61	4,37	6,83	12,58	15,01	15,05	15,63	15,06
3	Ферджан	2,84	3,57	5,36	10,55	13,18	14,50	15,21	14,74
4	Кишиневский	3,86	4,80	9,61	17,11	20,08	21,47	22,39	21,85
5	Чернівецький 1	4,85	7,21	12,66	18,36	23,03	23,40	24,82	24,05
6	Клішківський	3,93	4,74	9,79	15,25	17,78	18,76	20,13	20,11
7	Ярівський	4,96	7,49	13,04	19,02	22,75	24,29	24,71	24,31
8	Буковинський 2	4,06	6,37	11,91	17,69	21,23	25,23	25,80	25,49
9	Фернет	4,40	6,59	11,93	18,07	21,97	27,30	27,13	27,22
НІР _{0,05}		0,3	0,4	0,6	0,7	1,0	1,2	1,3	1,6

Аналогічно результатам отриманим для фундука нами було встановлено, що максимальна кількість клітин була на 12-14 добу культивування, а от після двох тижнів культивування спостерігалось істотне зниження щільності суспензій у всіх сортів горіха грецького.

Також визначено, що в кінці культивування клітинних суспензій зниження їх чисельності мало закономірності, що не залежали від біологічних особливостей досліджуваних нами генотипів горіха грецького.

Також було встановлено, що максимальна кількість клітин у суспензіях спостерігалась на 14-ту добу культивування, та в середньому по досліді становила 21,2 в 1 мл суспензії ($Ч10^5$).

В процесі порівняння динаміки зміни чисельності клітин в суспензійних культурах окремих сортів з середніми значеннями по досліді встановлено, що показники кількості клітин в 1 мл суспензії ($Ч10^5$) для сортів: Коржеуцкый, Кордене, Ферджан та Клішківський були нижчі середньої кількості клітин, а в сортів: Кишиневський, Чернівецький 1, Ярівський, Буковинський 2 та Фернет – відповідно вищі.

Також було визначено, що на 14 добу культивування останні сорти формували на 1,2-6,0 клітин в 1 мл суспензії ($Ч10^5$) більше, коли сорти що розташовувались нижче середнього – на 1,0-6,4 клітин в 1 мл суспензії ($Ч10^5$) менше.

В подальшому ми використовували клітинні колонії для індукції непрямого морфогенезу, а тому суспензійну культуру висівали на агаризоване живильне середовище та культивували 3-4 тижнів для отримання колоній великого розміру, до 2 мм в діаметрі.

Отримані закономірності активності поділу суспензійних культур та власне формування їх щільності дозволяють в наступному спрогнозувати різну поведінку генотипів за селекції їх на посухостійкість.

4.4. Морфогенетичні відмінності рослин-регенерантів різних генотипів в залежності від гормонального складу живильного середовища

Клітинна селекція базується на вивченні впливу на процеси непрямого морфогенезу генотипу та гормонального складу живильного середовища. Причому регенерація пагонів та органогенез в культурі *in vitro* є передумовою успішного проведення експериментів з клітинними культурами. [233].

Задля вивчення морфогенетичного потенціалу регенеранти культивували за температурі 26°C на середовищах відповідних модифікацій впродовж 3-4 тижнів на двох варіантах середовищ (табл. 4.16).

Таблиця 4.16

Органогенез в калюсній культурі фундука різних генотипів

Сорт	Варіант живильного середовища	Кількість досліджуваних калюсів, шт.	Відсоток морфогенних калюсів, %	Кількість отриманих регенерантів, шт.	Частота регенерації, %
Болградська новинка	MS	95	46±1,02	52±1,75	61±1,53
	DKW	97	48±0,72	54±0,84	63±0,83
Дар Павленка	MS	93	29±2,31	35±1,06	42±0,56
	DKW	92	31±1,92	36±0,97	44±0,79
Лозівський шаровидний	MS	88	35±1,04	44±1,39	52±0,52
	DKW	85	37±1,60	46±1,72	54±0,62
Пірожок	MS	93	31±1,23	40±0,95	49±1,07
	DKW	89	35±0,41	42±1,53	51±1,70
Степовий 83	MS	86	33±0,51	41±1,32	47±1,87
	DKW	82	35±0,72	43±1,45	48±0,85
Боровський	MS	80	43±1,42	49±1,28	54±0,27
	DKW	80	45±0,42	51±1,52	57±0,48
Серебристий	MS	91	41±1,40	48±0,83	53±0,73
	DKW	88	44±1,28	51±0,62	55±0,52
Косфорд	MS	96	46±1,37	52±1,63	58±0,36
	DKW	95	49±1,83	56±1,46	61±0,72
Барселонський	MS	85	45±0,85	52±1,21	59±2,35
	DKW	80	47±1,56	55±0,68	60±0,98
Трапезунд	MS	93	37±1,03	42±2,01	47±1,83
	DKW	86	39±1,49	43±1,74	48±0,63

Досліджено, що на живильному середовищі за прописом Драйвера і Куніюкі спостерігався не лише високий відсоток регенерації рослин, але й частота регенерації, від 44 до 63 %.

Встановлено, що краща регенераційна здатність була у сорту Болградська новинка, Косфорд та Барселонський. При цьому кількість отриманих регенерантів становила 54, 56 та 55 %, а частота регенерації рослин з морфогенних калюсів – 63, 61 та 60 % відповідно.

Результати вивчення органогенезу в калюсній культурі горіха грецького різних генотипів наведено нами в таблиці 4.17.

Таблиця 4.17

Органогенез в калюсній культурі горіха грецького різних генотипів

Сорт	Варіант живильного середовища	Кількість досліджуваних калюсів, шт.	Відсоток морфогенних калюсів, %	Кількість отриманих регенерантів, шт.	Частота регенерації, %
Коржеуцкий	MS	95	53±0,70	62±0,89	68±0,60
	DKW	90	52±0,70	58±1,25	67±1,05
Кордене	MS	85	37±1,22	43±1,39	50±1,09
	DKW	86	34±1,08	38±0,75	48±0,75
Ферджан	MS	80	41±0,90	54±1,01	59±1,22
	DKW	84	40±1,23	50±0,41	57±1,11
Кишиневский	MS	88	39±0,82	47±1,06	55±0,75
	DKW	87	37±1,23	42±1,12	54±1,34
Чернівецький 1	MS	85	40±1,30	48±1,07	52±1,40
	DKW	86	35±0,65	46±1,23	52±1,05
Клішківський	MS	80	52±1,46	62±1,11	64±0,83
	DKW	80	48±1,32	56±1,14	62±0,73
Ярівський	MS	90	53±0,92	59±1,05	64±1,26
	DKW	90	48±0,84	56±0,96	60±1,23
Буковинський 2	MS	94	60±1,11	65±1,44	68±1,33
	DKW	96	56±1,32	61±1,84	65±1,30
Фернет	MS	85	53±1,12	62±1,22	63±1,40
	DKW	86	51±1,07	59±1,30	61±0,65

Було досліджено, що на живильному середовищі за прописом Мурасіге і Скуга спостерігався високий відсоток регенерації рослин, а також і частота регенерації, від 50 до 68 %.

Встановлено, що краща регенераційна здатність була у сорту грецького горіха Буковинський 2, Коржеуцький, Клішківський та Фернет. При цьому кількість отриманих регенерантів становила 65, 62, 62 та 62 %, а частота регенерації рослин з морфогенних калюсів – 68, 68, 64 та 63 % відповідно.

Також регенераційна здатність калюсних тканин залежала не лише від генотипу та відсотку морфогенного калюсу, але й від його віку. З віком спостерігалось її зниження, чому може бути соматоклональна мінливість.

Висновки до розділу 4

Визначено, що схема асептичної обробки насіння з використанням концентрованої сірчаної кислоти найбільш ефективна як за обробки сім'ядоль фундука так і грецького горіха.

Після проведення асептичної обробки та посадки на безгормональне живильне середовище Мурасіге-Скуга з половинним складом макро- та мікроелементів спостерігали проростання в середньому 61,8 % сім'ядоль фундука, та 48,3 % сім'ядоль грецького горіха. Також за застосування даної обробки ми спостерігали зменшення показників наявності продуктів окислення фенолів з рівня трьох-двох балів до переважно одно-двох балів.

Досліджено, що на середовищі Мурасіге і Скуга сорти фундука мали ростовий індекс 6,2 та формували калюс масою 159,8 мг, а за застосування середовища за прописом Драйвера і Куніюкі відповідно ростовий індекс 9,7 та формували калюс масою 237,3 мг. Кращий ростовий індекс за середовища на базі припису Драйвера і Куніюкі ми спостерігали при отриманні калюсу в сортів фундука: Барселонський, Трапезунд, Косфорд та Болградська новинка. А от

краща середня маса сформованого калюсу була у сортів фундука: Пірожок та Степовий 83.

Також було визначено, що кращий ростовий індекс за застосування середовища на базі припису Драйвера і Куніюкі був при отриманні калюсу в сортів грецького горіха: Фернет, Буковинський 2, Кишиневський, Кордене та Ярівський. А от краща середня маса сформованого калюсу була у сортів грецького горіха: Буковинський 2, Чернівецький 1 та Фернет.

Експериментально доведено, що для отримання великої кількості калюсних тканин різних генотипів фундука та грецького горіха та проведення з ними відповідної подальшої селекційної роботи кращим варіантом живильного середовища є середовище за прописом Драйвера і Куніюкі. Адже воно ефективно працює за вирощування обох культур в умовах *in vitro*.

Аналіз індексу співвідношення ядра до розміру цитоплазми (N/C) фундука сорту Трапезунд показує, що найменшим він був в паренхіми периферійної зони – 1,8 %, а найбільшим відповідно в клітин апікальної меристеми – 27,0 %.

Порівняння динаміки суспензійних культур окремих сортів фундука з середніми значеннями показує, що показники кількості клітин в 1 мл суспензії ($Ч10^5$) для сортів: Дар Павленка, Лозівський шаровидний, Пірожок, Степовий 83, Боровський та Серебристий були нижчі середньої кількості клітин, а в сортів: Болградська новинка, Косфорд, Барселонський та Трапезунд – вищі.

Досліджено, що за порівняння динаміки зміни чисельності клітин в суспензійних культурах окремих сортів грецького горіха з середніми значеннями по досліді встановлено, що показники кількості клітин в 1 мл суспензії ($Ч10^5$) для сортів: Коржеуцький, Кордене, Ферджан та Клішківський були нижчі середньої кількості клітин, а в сортів: Кишиневський, Чернівецький 1, Ярівський, Буковинський 2 та Фернет – відповідно вищі.

Вивчено, що на живильному середовищі за прописом Драйвера і Куніюкі спостерігався не лише високий відсоток регенерації рослин фундука, але й частота регенерації, від 44 до 63 %. Так, краща регенераційна здатність була у сорту Болградська новинка, Косфорд та Барселонський. При цьому кількість

отриманих регенерантів становила 54, 56 та 55 %, а частота регенерації рослин з морфогенних калюсів – 63, 61 та 60 % відповідно.

Визначено, що на живильному середовищі за прописом Мурасіге і Скуга спостерігався високий відсоток регенерації рослин грецького горіха, а також і частота регенерації, від 50 до 68 %. Краща регенераційна здатність була у сорту грецького горіха Буковинський 2, Коржеуцький, Клішківський та Фернет. При цьому кількість отриманих регенерантів становила 65, 62, 62 та 62 %, а частота регенерації рослин з морфогенних калюсів – 68, 68, 64 та 63 % відповідно.

РОЗДІЛ 5

СТВОРЕННЯ ПОСУХОСТІЙКОГО ВИХІДНОГО СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Питання створення вихідного матеріалу адаптованого до впливу негативних факторів вирощування актуальне для більшості сільськогосподарських культур, а от для культур з переважно вегетативним або ж з ускладненим насіннєвим розмноженням – воно безальтернативне. Адже за умови високої стабільності сортів, або отримання прогнозованого рівня їх запилення з іншими сортами отримання якісно нового матеріалу можливе лише за рахунок виконання робіт в умовах *in vitro*.

5.1. Використання клітинної селекції для створення посухостійких форм

Останнім часом застосування клітинної селекції для створенні ліній стійких до факторів несприятливих умов вирощування актуальне в зв'язку зі значним зростанням негативного впливу потепління та збільшенням кількості, тривалості та інтенсивності впливу негативних факторів, особливо посух [48].

З метою отримання посухостійких форм фундука та грецького горіха на першому етапі клітинної селекції ми підібрали сублетальні концентрації селективних агентів: ПЕГ 6000 та маніт.

Формування передумов для проведення відбору, відбір та подальшу регенерацію посухостійких рослин клітинних ліній проводили в присутності селективного агенту (рис. 5.1).

Спочатку формували рихлий калюс, далі з отриманих калюсів утворювали культуру клітин, що перебуває в логарифмічній фазі росту. На наступному етапі проводили обробку клітин селективними чинниками. Після чого проводили культивування суспензії на живильному середовищі з селективним фактором

(маніт в концентрації 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 та 10% і ПЕГ 6000 в концентрації 5, 10, 15, 20, 25 та 30 %).

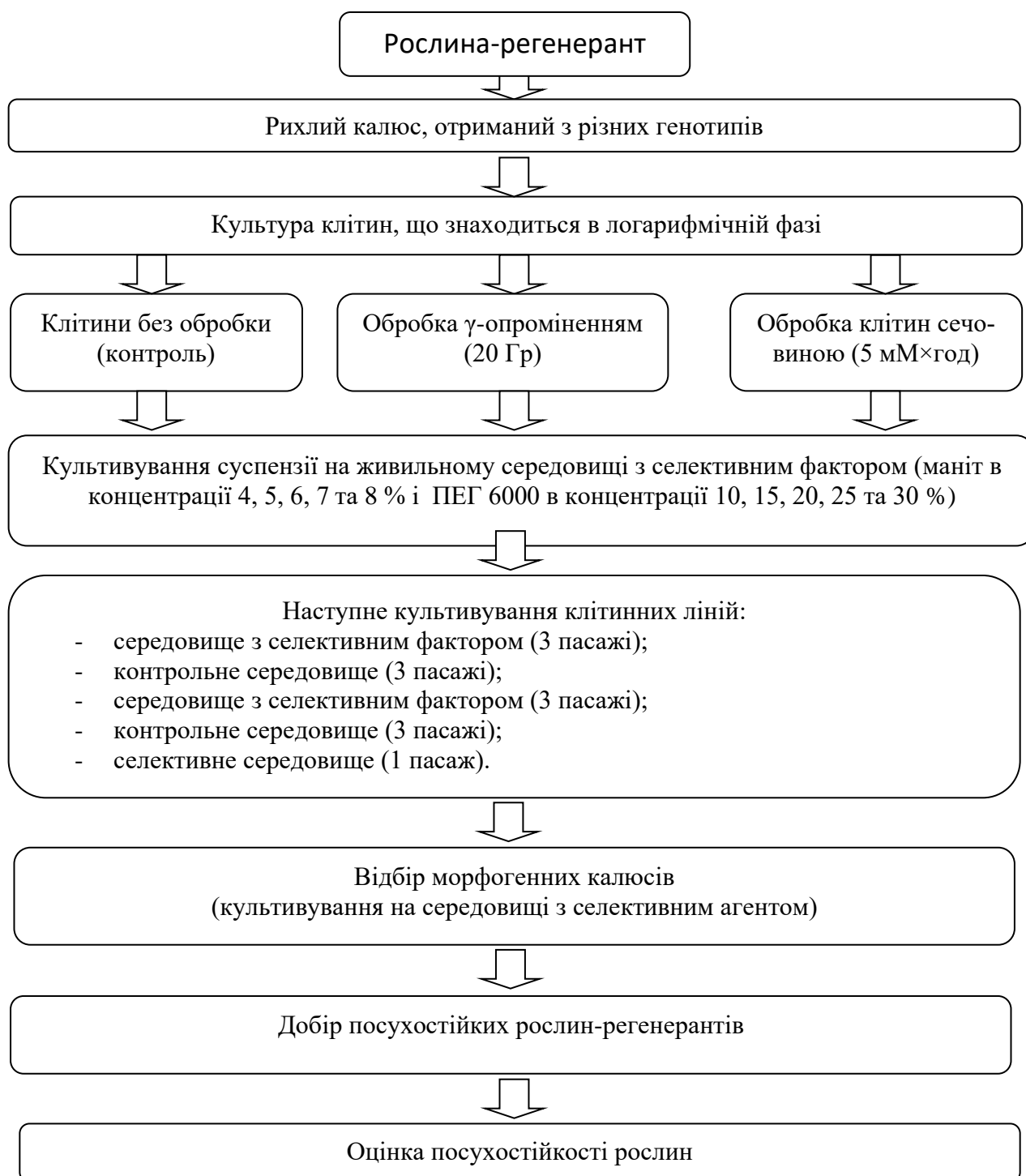


Рис. 5.1. Схема клітинної селекції з метою отримання посухостійких ліній фундука та грецького горіха

На наступному етапі культивування виконували проводили роботу з вирощування клітинних ліній за схемою: селективне середовище з селективним

фактором, контрольне середовище, селективне середовище з селективним фактором, контрольне середовище та знову селективне середовище з селективним фактором.

При цьому важливо провести оцінювання стабільності набутої ознаки посухостійкості, адже в умовах *in vitro* часто спостерігається прояв ознак які не передаються генетично. Тому відібрані калюси вирощували на середовищі в якому селективний фактор мав сублетальну концентрацію.

Генотипи що вижили за дії сублетальної концентрації в подальшому вирощували на середовищі Мурасіге-Скуга за допомогою якого індукували морфогенез.

А от уже добір та оцінювання посухостійких рослин регенерантів та їх стійкості виконувався на останньому етапі селекційної роботи.

5.2. Підбір селективних агентів та рівня їх концентрацій для створення посухостійких форм в умовах *in vitro*

Осмотично активні речовини широко використовуються для проведення клітинної селекції та створення толерантних до посухи рослин [6]. Причому ефективність такої селекції досить сильно залежить від правильного добору та власне встановлення чутливості калюсних клітин до осмотика [5].

А тому на першому етапі ми провели оцінювання селективних агентів застосовуваних для моделювання посухи в умовах *in vitro*: маніт і ПЕГ (поліетиленгліколь) 6000 г/моль. Адже від правильного добору агента та власне його сублетальних концентрацій і істотно залежить ефективність подальшого селективного відбору.

Сублетальну концентрацію стрес-факторів визначали встановлюючи залежність кількості клітинних колоній, що вижили від концентрації селективного агенту. При цьому було встановлено, що сублетальна концентрація маніту в склала 6 %, а от для селективної системи ПЕГ 6000 – 20 %.

Отже, за вирощування калюсу різних сортів фундука було встановлено, що число клітинних колоній різних генотипів при різному селективному тиску відрізнялась, але при цьому сублетальну концентрацію осмотичних речовин можна визначити як константну для досліджуваного обсягу матеріалу (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Число клітинних колоній різних генотипів фундука в залежності від селективної системи

Сорт	Кількість клітинних колоній ($\times 10^5$), шт.											
	концентрація маніту, %						концентрація ПЕГ 6000, %					
	0	4	5	6	7	8	0	10	15	20	25	30
Болградська новинка	126	105	75	64	43	33	224	172	143	110	84	58
Дар Павленка	121	101	72	58	40	30	209	161	134	100	73	52
Лозівський шаровидний	131	109	80	63	50	37	231	178	140	118	88	70
Пірожок	128	107	74	56	42	27	217	167	137	110	76	56
Степовий 83	121	101	72	54	38	25	208	160	132	99	70	50
Боровський	122	102	75	57	37	28	208	160	131	98	65	52
Серебристий	130	108	81	65	44	34	221	170	140	110	87	64
Косфорд	131	109	86	68	50	40	237	182	150	123	95	70
Барселонський	132	110	87	67	50	40	238	183	155	132	103	84
Трапезунд	137	114	89	72	53	47	247	190	162	130	107	88

За застосування селективної системи з манітом (6%), що відповідала сублетальній, число колоній варіювало від 54×10^5 (Степовий 83) до 72×10^5 (Трапезунд). А от при застосуванні сублетальної дози ПЕГ 6000 (20%) кількість клітинних колоній змінювалась від 98×10^5 (Боровський) до 132×10^5 (Барселонський).

За застосування селективних систем інтенсивне формування колоній клітин було притаманним таким сортам фундука як: Трапезунд, Барселонський, Косфорд та Лозівський шаровидний. Причому найменша кількість колоній при додаванні до живильного середовища сублетальної концентрації маніту була в сортів Степовий 83, Пірожок, Боровський та Дар Павленка, кількість колоній становила відповідно 54×10^5 , 56×10^5 , 57×10^5 , та 58×10^5 .

А от при використанні селекційної системи на основі додавання до селективного середовища ПЕГ 6000 найменша кількість колоній формувалась в таких генотіпів як: Боровський, Степовий 83 та Дар Павленка, кількість колоній становила відповідно 98×10^5 , 99×10^5 , та 100×10^5 .

При цьому ми визначили й особливості приросту калюсів в досліджуваних сортів фундука, під впливом концентрації селективного агенту (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

Вплив сублетальної концентрації селективного агенту на приріст калюсної маси у різних генотипів фундука

Сорт	Ростовий індекс (PI) калюсів, %		
	контроль	маніт (6 %)	ПЕГ 6000 (20 %)
Болградська новинка	17,8±1,2	4,3±0,3	6,9±0,8
Дар Павленка	16,3±1,2	3,3±0,5	5,3±1,0
Лозівський шаровидний	18,4±1,4	4,7±0,6	7,8±0,9
Пірожок	17,0±1,5	4,0±0,4	7,0±1,0
Степовий 83	14,5±1,6	3,0±0,5	5,2±0,9
Боровський	17,1±1,4	3,9±0,6	6,3±1,0
Серебристий	19,0±1,3	5,0±0,5	8,2±0,8
Косфорд	20,3±1,1	5,6±0,7	8,1±1,0
Барселонський	19,8±1,2	4,8±0,8	8,6±0,9
Трапезунд	21,6±1,3	5,7±0,5	8,9±1,0

За результатами проведених досліджень встановлено, що найбільше значення ростового індексу при застосуванні сублетальних концентрацій маніту було у сортів: Трапезунд, Косфорд та Сребристый, а за застосування ПЕГ 6000 у: Трапезунд, Барселонський, Сребристый та Косфорд.

За вирощування калюсу різних сортів грецького горіху було встановлено, що число клітинних колоній різних генотипів при різному селективному тиску відрізнялась, але при цьому сублетальну концентрацію осмотичних речовин, аналогічно фундуку, можна визначити як константну для досліджуваного обсягу матеріалу (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

Число клітинних колоній різних генотипів грецького горіха в залежності від селективної системи

Сорт	Кількість клітинних колоній ($\times 10^5$), шт.											
	концентрація маніту, %						концентрація ПЕГ 6000, %					
	0	4	5	6	7	8	0	10	15	20	25	30
Коржеуцкий	123	102	74	57	40	29	199	153	133	106	74	57
Кордене	115	96	62	56	41	26	175	135	118	86	68	49
Ферджан	112	93	77	64	39	23	187	144	122	93	55	46
Кишиневский	121	101	73	68	50	34	219	169	131	111	85	64
Чернівецький 1	130	108	80	69	56	39	226	174	150	111	86	79
Клішківський	129	108	85	67	51	40	223	172	158	106	98	85
Ярівський	154	128	88	78	63	49	226	173	153	116	90	80
Буковинський 2	132	110	86	68	46	44	216	166	139	121	103	71
Фернет	143	120	83	66	54	52	233	179	152	135	91	78

Досліджено, що при використанні системи з манітом (6 %), що відповідала сублетальній, число колоній варіювало від 56×10^5 (Кордене) до 78×10^5 (Ярівський). А от при застосуванні сублетальної дози ПЕГ 6000 (20 %) кількість клітинних колоній змінювалась від 86×10^5 (Кордене) до 135×10^5 (Фернет).

За застосування селективних систем інтенсивне формування колоній клітин було притаманним таким сортам грецького горіха як: Ярівський, Чернівецький 1, Кишиневський та Буковинський 2. Причому найменша кількість колоній при додаванні до живильного середовища сублетальної концентрації маніту була в сортів Кордене, Коржеуцький та Ферджан, кількість колоній становила відповідно 56×10^5 , 57×10^5 , 64×10^5 .

А от при використанні селекційної системи на основі додавання до селективного середовища ПЕГ 6000 найменша кількість колоній формувалась в таких генотипів як: Кордене, Ферджан, Коржеуцький та Клішківський, кількість колоній становила відповідно 86×10^5 , 93×10^5 , 106×10^5 та 106×10^5 .

Також ми визначили й особливості приросту калюсів в досліджуваних сортів грецького горіха, під впливом концентрації селективного агенту (табл. 5.4).

Таблиця 5.4

Вплив сублетальної концентрації селективного агенту на приріст калюсної маси у різних генотипів грецького горіха

Сорт	Ростовий індекс (PI) калюсів, %		
	контроль	маніт (6 %)	ПЕГ 6000 (20 %)
Коржеуцький	17,1±0,9	3,5±0,4	7,0±1,0
Кордене	15,3±0,6	2,9±0,5	5,5±1,1
Ферджан	16,8±1,0	3,3±0,3	6,3±1,0
Кишиневський	17,1±1,5	4,4±0,6	7,2±1,5
Чернівецький 1	18,0±0,7	5,0±0,9	8,9±1,0
Клішківський	18,8±1,4	4,9±0,6	8,0±1,6
Ярівський	20,3±1,6	5,6±0,8	8,2±1,1
Буковинський 2	19,8±1,2	5,0±1,0	8,6±1,2
Фернет	20,0±1,2	5,4±0,9	9,0±1,4

За результатами проведених досліджень встановлено, що найбільше значення ростового індексу при застосуванні сублетальних концентрацій маніту було у сортів грецького горіха: Ярівський, Фернет, Чернівецький 1 та Буковинський 2, а за застосування ПЕГ 6000 у: Фернет, Чернівецький 1, Буковинський 2 та Ярівський.

5.3. Оцінка виживаємості калюсних тканин та ефективність регенерації резистентних рослин в культурі *in vitro*

Оцінка впливу осмотичної речовини на виживання калюсних ліній є важливим етапом селекційної роботи [91].

При цьому виживання калюсних ліній фундуку ми перевіряли після десятого пасажу на відповідному селективному середовищі (табл. 5.5).

Таблиця 5.5

Вживання резистентних калюсних ліній різних генотипів фундуку

Сорт	Вживання калюсних ліній, %		
	контроль	маніт (6 %)	ПЕГ 6000 (20 %)
Болградська новинка	84,5±1,40	4,4±0,40	8,6±1,50
Дар Павленка	85,6±1,40	4,6±0,36	9,2±1,29
Лозівський шаровидний	87,2±1,30	4,7±0,26	8,4±1,91
Пірожок	83,4±1,60	5,0±0,31	9,2±1,90
Степовий 83	86,0±1,42	5,2±0,35	9,6±1,70
Боровський	88,2±1,63	4,6±0,40	7,7±1,50
Серебристий	80,0±1,32	4,9±0,20	8,0±1,40
Косфорд	85,5±1,53	5,4±0,44	10,2±1,69
Барселонський	83,2±1,34	5,2±0,32	9,8±1,42
Трапезунд	90,0±1,40	5,1±0,40	10,3±1,52

Вживання калюсних ліній при культивуванні на середовищі без селективного фактору в середньому по досліді склало 85,4 %, а от вживання більше середніх показників спостерігалось в наступних генотипів: Дар Павленка, Лозівський шаровидний, Степовий 83, Боровський, Косфорд та Трапезунд.

При культивуванні калюсних тканин різних сортів на селективному середовищі з манітом вживання їх було в межах 4,4-5,4 %, тоді коли за застосування селективної системи з ПЕГ 6000 виживало калюсів 7,7-10,3 %.

Кращі показники вживання за селективного середовища з манітом були в сортів: Косфорд, Степовий 83, Барселонський, Трапезунд та Пірожок, а за застосування ПЕГ 6000: Трапезунд, Косфорд, Барселонський та Степовий 83.

Також ми проводили оцінку резистентних калюсних ліній генотипів фундука на середовищах з сублетальними концентраціями (табл. 5.6).

Таблиця 5.6

Оцінка резистентних калюсних ліній генотипів фундука на середовищах з сублетальними концентраціями маніту та ПЕГ 6000

Сорт	Число посухостійких калюсних ліній, %		Число морфогенетично компетентних посухостійких калюсних ліній, %		Число посухостійких рослин-регенерантів, %	
	маніт	ПЕГ 6000	маніт	ПЕГ 6000	маніт	ПЕГ 6000
Болградська новинка	4,3±0,26	8,0±0,65	3,2±0,34	6,6±0,56	9,6±0,90	20,0±0,99
Дар Павленка	4,5±0,33	9,0±0,42	3,7±0,41	7,8±0,47	10,7±0,80	22,6±1,20
Лозівський шаровидний	4,0±0,20	8,4±0,72	3,2±0,42	8,0±0,50	9,0±0,84	17,0±1,38
Пірожок	4,8±0,41	9,2±0,83	3,3±0,52	8,4±0,30	10,1±0,96	23,0±1,32
Степовий 83	4,3±0,35	9,0±0,70	3,1±0,53	8,5±0,61	10,9±0,89	25,2±1,40
Боровський	4,0±0,20	7,7±0,50	2,6±0,21	6,2±0,60	8,9±1,00	22,5±1,30
Серебристий	4,4±0,23	8,7±0,43	2,8±0,33	6,8±0,81	11,5±0,88	23,2±1,41
Косфорд	5,2±0,29	11,1±0,82	3,5±0,48	8,9±0,59	12,4±0,92	24,0±1,20
Барселонський	5,1±0,33	12,0±0,42	3,4±0,29	9,2±0,91	11,4±0,99	26,0±1,22
Трапезунд	5,3±0,24	11,3±0,51	3,8±0,35	9,9±0,90	10,5±1,00	27,4±1,61

Після третього пасажу на селекційному середовищі калюс переносили на середовище без селективного агенту та проводили оцінювання морфогенетичної компетентності резистентних калюсних ліній.

Максимальне число посухостійких калюсних ліній формували сорти Трапезунд, Косфорд, Барселонський та Пірожок за додавання селективного агенту маніту, та сорти Барселонський, Трапезунд та Косфорд за додавання в якості селективного агенту ПЕГ 6000.

На живильному середовищі з додаванням маніту, при культивуванні резистентних калюсних ліній, кількість морфогенетично компетентних посухостійких калюсів не перевищувала 3,8 % (Трапезунд), а при використанні ПЕГ 6000 – 12,4 % (Косфорд).

Найменше морфогенетично компетентних резистентних калюсів при використанні маніту було отримано у сортів: Боровський, Серебристий та Степовий 83 а при використанні ПЕГ у сортів: Боровський, Болградська новинка, Серебристий та Дар Павленка.

На основі селекції клітинних ліній фундуку з використанням в якості селективного агенту середовища з додаванням ПЕГ 6000 було отримано більше життєздатних рослин-регенерантів, ніж при використанні маніту. Так, за першого варіанту в середньому було 23,1 %, а за використання маніту – лише 10,5, або ж в 2,2 раза менше.

Також кращі показники відсотку числа посухостійких рослин регенерантів було нами отримано на селекційному середовищі з використанням маніту в сортів Косфорд, Серебристий та Барселонський. А от за використання середовища з додаванням ПЕГ 6000 більше посухостійких рослин регенерантів формувалось в сортів фундуку Трапезунд, Барселонський, Степовий 83 та Косфорд.

Отже, сорт фундука Барселонський та Косфорд однаково добре підходять для селекції на посухостійкість з використанням обох селективних середовищ – маніту та ПЕГ 6000. Хоча це не свідчить про винятковість отримання цінних посухостійких генотипів виключно з генетичного матеріалу цих сортів.

Після десятого пасажу культивування на селективному середовищі перевіряли виживання калюсних ліній генотипів грецького горіха (табл. 5.7).

Таблиця 5.7

Вживання резистентних калюсних ліній генотипів грецького горіха

Сорт	Вживання калюсних ліній, %		
	контроль	маніт (6 %)	ПЕГ 6000 (20 %)
Коржеуцкий	80,2±1,42	4,6±0,30	10,2±0,80
Кордене	80,4±1,51	4,5±0,40	11,7±0,64
Ферджан	79,0±1,30	4,3±0,23	9,5±0,49
Кишиневский	80,3±1,70	5,2±0,42	10,2±0,92
Чернівецький 1	82,2±1,54	5,1±0,33	11,0±1,00
Клішківський	78,1±1,40	5,4±0,40	12,3±1,00
Ярівський	78,2±1,42	5,9±0,51	14,2±0,89
Буковинський 2	83,2±1,69	5,5±0,34	15,0±0,80
Фернет	87,0±1,60	5,8±0,48	13,7±0,90

Вживання калюсних ліній при культивуванні на середовищі без селективного фактору в середньому по досліді склало 85,4 %, а от виживання більше середніх показників спостерігалось в наступних генотипів: Дар Павленка, Лозівський шаровидний, Степовий 83, Боровський, Косфорд та Трапезунд.

При культивуванні калюсних тканин різних сортів на селективному середовищі з манітом виживання їх було в межах 4,4-5,4 %, тоді коли за застосування селективної системи з ПЕГ 6000 виживало калюсів 7,7-10,3 %.

Кращі показники виживання за селективного середовища з манітом були в сортів: Косфорд, Степовий 83, Барселонський, Трапезунд та Пірожок, а за застосування ПЕГ 6000: Трапезунд, Косфорд, Барселонський та Степовий 83.

Також ми проводили оцінку резистентних калюсних ліній генотипів фундука на середовищах з сублетальними концентраціями (табл. 5.6).

Оцінка резистентних калюсних ліній різних генотипів грецького горіха на середовищах з сублетальними концентраціями маніту та ПЕГ 6000

Сорт	Число посухостійких калюсних ліній, %		Число морфогенетично компетентних посухостійких калюсних ліній, %		Число посухостійких рослин-регенерантів, %	
	маніт	ПЕГ 6000	маніт	ПЕГ 6000	маніт	ПЕГ 6000
Коржеуцький	4,3±0,24	10,0±0,80	2,2±0,33	6,5±0,80	9,7±0,59	18,4±0,69
Кордене	4,7±0,30	8,7±0,79	2,3±0,26	6,2±0,92	9,3±0,54	17,5±0,62
Ферджан	4,2±0,30	9,5±0,69	2,0±0,44	6,8±0,94	9,5±0,51	16,2±0,71
Кишиневський	5,0±0,29	12,2±0,89	3,5±0,48	7,4±0,99	10,9±0,62	20,0±0,65
Чернівецький 1	5,1±0,39	13,0±0,62	3,0±0,39	9,2±0,85	9,4±0,60	22,3±0,72
Клішківський	5,8±0,48	10,3±0,71	3,0±0,35	9,3±0,83	8,1±0,45	20,4±0,71
Ярівський	6,0±0,50	10,1±0,73	4,0±0,28	7,2±0,88	9,4±0,42	26,6±0,81
Буковинський 2	6,7±0,36	10,0±0,78	4,2±0,35	9,0±0,82	9,3±0,43	28,5±0,91
Фернет	6,0±0,32	10,7±0,86	4,0±0,33	8,5±0,92	9,3±0,50	26,0±0,90

Визначено, що максимальне число посухостійких калюсних ліній формували сорти грецького горіху Буковинський 2, Ярівський, Фернет та Клішківський за додавання селективного агенту маніту, та сорти Чернівецький 1 та Кишиневський за додавання в якості селективного агенту ПЕГ 6000.

Встановлено, що на живильному середовищі з додаванням маніту, при культивуванні резистентних калюсних ліній, кількість морфогенетично компетентних посухостійких калюсів не перевищувала 4,2 % (Буковинський 2), а при використанні ПЕГ 6000 – 9,3 % (Клішківський).

Результати досліджень засвідчили, що найменше морфогенетично компетентних резистентних калюсів в грецького горіха при використанні маніту було отримано у сортів: Ферджан, Коржеуцький та Кордене а при використанні ПЕГ у сортів: Кордене, Коржеуцький, Ферджан та Ярівський.

Визначено, що на основі селекції клітинних ліній грецького горіха з використанням в якості селективного агенту середовища з додаванням ПЕГ 6000 було отримано більше життєздатних рослин-регенерантів, ніж при використанні маніту. Так, за першого варіанту в середньому було 21,8 %, а за використання маніту – лише 9,4, або ж в 2,3 рази менше.

Кращі показники відсотку числа посухостійких рослин регенерантів було нами отримано на селекційному середовищі з використанням маніту в сортів Кишиневский, Коржеуцкий та Ферджан. А от за використання середовища з додаванням ПЕГ 6000 більше посухостійких рослин регенерантів формувалось в сортів грецького горіха Буковинський 2, Ярівський та Фернет.

5.4. Використання індукованого мутагенезу в процесі отримання вихідного посухостійкого селекційного матеріалу

Мутагенна активність різних хімічних речовин та фізичних факторів на даний час широко застосовується в селекційній роботі, особливо актуальною є при проведенні клітинної селекції в умовах *in vitro* [156; 155].

Саме для потреб клітинної селекції широко застосовується іонізуюче та ультрафіолетове опромінення [156], і особливо широкий спектр мутацій притаманний за застосування іонізуючого гама опромінення [223; 224; 322].

А тому з огляду на ефективність застосування іонізуючого опромінення нами для обробки клітинних суспензій цей тип мутагену був обраний до використання в роботі. Причому впродовж подальшого культивування калюсів, після їх обробки мутагенами, формувались три типи відмінних один від одного калюсів: такі в яких були практично відсутні ростові процеси; калюси що мали світлий жовтий колір та ростові процеси в яких не зупинились; морфогенні щільні калюси.

Дані частоти утворення морфогенного калюсу фундука після дії селективних агентів подані в табл. 5.9.

Частота утворення морфогенного калюсу фундука після дії селективних агентів

Сорт, гібрид	К-ть культивованих калюсів	Частота утворення морфогенного калюсу, % (γ опромінення)		Частота утворення морфогенного калюсу % (сечовина)	
		маніт 6 %	ПЕГ 20 %	маніт 6 %	ПЕГ 20 %
Болградська новинка	135	18,5	26,4	16,2	24,3
Дар Павленка	132	19,9	29,3	17,9	27,1
Лозівський шаровидний	134	15,1	21,9	13,0	19,6
Пірожок	130	19,0	31,2	16,8	29,0
Степовий 83	129	19,9	30,7	17,6	28,4
Боровський	137	15,4	19,6	13,3	17,5
Серебристий	128	15,7	20,5	13,5	18,2
Косфорд	135	22,0	32,2	19,9	30,0
Барселонський	133	19,5	35,4	17,4	33,3
Трапезунд	130	20,3	32,7	18,1	30,4
НІР _{0,05}	8	1,0	1,2	1,1	1,4

Встановлено, що за застосування гама опромінювання та культивування калюсу на селективному середовищі з додаванням маніту найбільша частота утворення морфогенного калюсу спостерігалась в сортів фундуку: Косфорд, Трапезунд, Дар Павленка, Степовий 83 та Барселонський, а за аналогічних умов опромінення та культивування на середовищі з додаванням ПЕГ – в сортів: Барселонський, Трапезунд, Косфорд, Пірожок та Степовий 83.

А от за застосування сечовини та культивування калюсу на селективному середовищі з додаванням маніту найбільша частота утворення морфогенного калюсу спостерігалась в сортів фундуку: Косфорд, Трапезунд, Дар Павленка,

Степовий 83 та Барселонський, а за аналогічних умов опромінення та культивування на середовищі з додаванням ПЕГ – в сортів: Барселонський, Трапезунд, Косфорд, Пірожок та Степовий 83.

Тобто обробка мутагенами та подальше культивування калюсних ліній в селективних умовах протягом 6-ти пасажей дозволило відібрати стійкі лінії сортів з найбільшою частотою формування морфогенного калюсу.

Дані частоти утворення морфогенного калюсу грецького горіха після дії селективних агентів подані в табл. 5.9.

Таблиця 5.10

Частота утворення морфогенного калюсу грецького горіха після дії селективних агентів

Сорт, гібрид	К-ть культивованих калюсів	Частота утворення морфогенного калюсу, % (γ опромінення)		Частота утворення морфогенного калюсу % (сечовина)	
		маніт	ПЕГ	маніт	ПЕГ
		6 %	20 %	6 %	20 %
Коржеуцкий	130	19,0	31,2	16,8	29,0
Кордене	129	19,9	30,7	17,6	28,4
Ферджан	137	15,4	19,6	13,3	17,5
Кишиневський	128	15,7	20,5	13,5	18,2
Чернівецький 1	135	22,0	32,2	19,9	30,0
Клішківський	133	19,5	35,4	17,4	33,3
Ярівський	130	20,3	32,7	18,1	30,4
Буковинський 2	132	24,6	40,8	22,4	38,6
Фернет	130	21,4	38,7	19,3	36,5
НІР _{0,05}	7	1,0	1,2	1,0	1,3

Досліджено, що за застосування гама опромінювання та культивування калюсу на селективному середовищі з додаванням маніту найбільша частота утворення морфогенного калюсу спостерігалась в сортів грецького горіха: Буковинський 2, Чернівецький 1, Фернет, Ярівський та Кордене, а за аналогічних умов опромінення та культивування на середовищі з додаванням ПЕГ – в сортів: Буковинський 2, Фернет, Клішківський, Ярівський та Чернівецький 1.

Також вивчено, що за застосування сечовини та культивування калюсу на селективному середовищі з додаванням маніту найбільша частота утворення морфогенного калюсу спостерігалась в сортів грецького горіха: Буковинський 2, Чернівецький 1, Фернет, Ярівський та Кордене, а за аналогічних умов опромінення та культивування на середовищі з додаванням ПЕГ – в сортів: Буковинський 2, Фернет, Клішківський, Ярівський та Чернівецький 1.

Отже, аналогічно сортам фундука, обробка мутагенами та подальше культивування калюсних ліній грецького горіха в селективних умовах протягом 6-ти пасажей дозволило відібрати стійкі лінії з найбільшою частотою формування морфогенного калюсу.

Висновки до розділу 5

Визначено, що для проведення клітинної селекції та створення посухостійкого матеріалу фундука та грецького горіха слід використовувати сублетальну концентрацію маніту 6 %, або ж ПЕГ 6000 – 20 %.

Встановлено, що за застосування селективних систем інтенсивне формування колоній клітин було притаманним таким сортам фундука як: Трапезунд, Барселонський, Косфорд та Лозівський шаровидний. А от в грецького горіха інтенсивне формування колоній клітин було притаманним таким сортам як: Ярівський, Чернівецький 1, Кишиневський та Буковинський 2.

За результатами проведених досліджень встановлено, що найбільше значення ростового індексу при застосуванні сублетальних концентрацій маніту

було у сортів: Трапезунд, Косфорд та Сребристый, а за застосування ПЕГ 6000 у: Трапезунд, Барселонський, Сребристый та Косфорд. Також встановлено, що найбільше значення ростового індексу при застосуванні сублетальних концентрацій маніту було у сортів грецького горіха: Ярівський, Фернет, Чернівецький 1 та Буковинський 2, а за застосування ПЕГ 6000 у: Фернет, Чернівецький 1, Буковинський 2 та Ярівський.

Визначено, що виживання калюсних ліній фундука на середовищі без селективного фактору становило 85,4 %, а от при культивуванні калюсних тканин різних сортів на селективному середовищі з манітом виживання їх було в межах 4,4-5,4 %, тоді коли за застосування селективної системи з ПЕГ 6000 виживало калюсів 7,7-10,3 %. При цьому кращі показники виживання за селективного середовища з манітом були в сортів: Косфорд, Степовий 83, Барселонський, Трапезунд та Пірожок, а за застосування ПЕГ 6000: Трапезунд, Косфорд, Барселонський та Степовий 83.

Досліджено, що максимальне число посухостійких калюсних ліній формували сорти Трапезунд, Косфорд, Барселонський та Пірожок за додавання селективного агенту маніту, та сорти Барселонський, Трапезунд та Косфорд за додавання в якості селективного агенту ПЕГ 6000. Отже, сорт фундука Барселонський та Косфорд однаково добре підходять для селекції на посухостійкість з використанням обох селективних середовищ – маніту та ПЕГ 6000.

Досліджено, що кращі показники відсотку числа посухостійких рослин регенерантів було отримано на селекційному середовищі з використанням маніту в сортів Кишиневський, Коржеуцький та Ферджан. А от за використання середовища з додаванням ПЕГ 6000 більше посухостійких рослин регенерантів формувалось в сортів грецького горіха Буковинський 2, Ярівський та Фернет.

Визначено, що за застосування гама опромінювання або сечовини та культивування калюсу на селективному середовищі з додаванням маніту найбільша частота утворення морфогенного калюсу спостерігалась в сортів фундука: Косфорд, Трапезунд, Дар Павленка, Степовий 83 та Барселонський, а

за аналогічних умов опромінення та культивування на середовищі з додаванням ПЕГ – в сортів: Барселонський, Трапезунд, Косфорд, Пірожок та Степовий 83.

Також вивчено, що за застосування сечовини та культивування калюсу на селективному середовищі з додаванням маніту найбільша частота утворення морфогенного калюсу спостерігалась в сортів грецького горіха: Буковинський 2, Чернівецький 1, Фернет, Ярівський та Кордене, а за аналогічних умов опромінення та культивування на середовищі з додаванням ПЕГ – в сортів: Буковинський 2, Фернет, Клішківський, Ярівський та Чернівецький 1.

РОЗДІЛ 6

АДАПТАЦІЯ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ ДО УМОВ ВІДКРИТОГО ҐРУНТУ

Адаптація рослин-регенерантів важливий етап робіт по виконанню програми мікроклонального розмноження рослин фундука та грецького горіха в культурі *in vitro*. Адже технологія мікроклонального розмноження усіх без виключення культур умовно розділяється на чотири основні етапи: формування стерильної культури, культивування рослин в умовах *in vitro*, ризогенез та укорінення рослин. А от завершальним етапом є проведення робіт з адаптації рослин до подальшого їх вирощування в ґрунті та особливо умовах відкритого ґрунту [10; 97; 98].

А тому є багато наукових досліджень, які засвідчують власне важливість останнього етапу мікроклонального розмноження, особливо правильний підбір способу та умов адаптації рослин [8; 13; 14; 85; 88; 90; 92]. Причому адаптація рослин до принципово іншого середовища, в якому їх культивували декілька пасажів, гармонійно методи *in vitro* так і класичні способи культивування *in vivo*.

А от серед важливих факторів, обов'язкових до уваги при адаптації рослин-регенерантів до висаджування в умови ґрунтового середовища є: терміни висаджування, довжина коренів рослин, висота рослини, спосіб перенесення, субстрат [10]. Також, важливе значення, для адаптації рослин-регенерантів до умов закритого ґрунту, має створення достатнього рівня мінерального живлення рослин [92; 94; 95; 97].

Причому правильний підбір субстрату для адаптації рослин важливий не тільки з точки достатньої його місткості елементами мінерального живлення, а й хороших показників водо- та повітропроникність і теплопровідність [131]. Причому не останню роль при виборі субстрату, для вирощування культур які адаптують до умов навколишнього середовища, відіграє економічна складова вартості. Адже дороговартісні матеріали істотно знижують ефективність технології загалом. Також необхідно враховувати, що окремі матеріали можуть

бути недоступними в певному регіоні, або обмеженими до потреби. Зважаючи на те, що мікроклональне розмноження культур потребує постійного надходження необхідних компонентів в певні строки – слід планувати в тому числі і логістику та доступність сировини та матеріалів.

Застосування селективних агентів окрім позитивних варіантів відбору потрібних нам властивостей рослин має і негативну складову. Адже переважна більшість агентів істотно знижують регенераційну здатність калюсів у всіх досліджуваних генотипів фундука та грецького горіха.

Показники регенерації резистентних рослин-регенерантів в умовах *in vitro* висвітлено в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Регенерація резистентних рослин-регенерантів в умовах *in vitro*

Селекційний номер	Без розвитку, %		Життєздатних рослин	
	маніт 5	ПЕГ 20	маніт 5	ПЕГ 20
фундук				
Ф2045	54	50	6	5
Ф2048	52	48	5	6
Ф2064	57	49	9	3
Ф2078	60	55	6	6
Грецький горіх				
Г2356	49	49	5	5
Г2347	41	39	9	6
Г2366	43	43	4	3
Г2383	44	42	5	3

Так, в зв'язку з тиском селективних агентів, нами визначено, що лише окремі калуси досліджуваних генотипів фундука та грецького горіха були здатні до наступної регенерації рослин.

Отже, за результатами застосування селективних агентів: сечовини та випромінювання було відібрано чотири генотипи фундука та ще чотири генотипи грецького горіха, які зарекомендували високу посухостійкість в лабораторних умовах.

В таблиці 6.2 висвітлено дані проведених досліджень з визначення ефективності укорінення рослин регенерантів.

Таблиця 6.2

Укорінення рослин-регенерантів

Склад живильного середовища	Селекційний номер	Кількість експлантатів, шт.	Кількість укорінених рослин,	
			шт.	%
Фундук				
Мурасіге і Скуга	Ф2045	40	17	43
	Ф2048	40	20	50
	Ф2064	40	18	45
	Ф2078	40	19	48
Драйвера і Куніюкі	Ф2045	40	23	58
	Ф2048	40	20	50
	Ф2064	40	25	63
	Ф2078	40	30	75
Грецький горіх				
Мурасіге і Скуга	Г2356	45	22	49
	Г2347	45	24	53
	Г2366	45	19	42
	Г2383	45	23	51
Драйвера і Куніюкі	Г2356	45	33	73
	Г2347	45	30	67
	Г2366	45	29	64
	Г2383	45	35	78

В цілому, якщо аналізувати укорінення генотипів фундука по середовищу Мурасіге і Скуга, то в середньому було укорінено 19 шт. рослин, що становило 46 % від загальної кількості експлантів, а в горіха 22 шт. та 49 %. В той же час на середовищі Драйвера і Куніюкі відібрані нами селекційні номери фундука забезпечували дещо більший відсоток укорінених рослин – 25 шт., що становило 61 % від загальної кількості експлантів, а в горіха 32 шт. та 71 %.

Показники адаптації до ґрунтових умов наведено в таблиці 6.3.

Таблиця 6.3

Адаптація укорінених рослин-регенерантів до ґрунтових умов

Склад живильного середовища	Селекційний номер	Кількість рослин, шт.	Кількість рослин що прижилися,	
			шт.	%
Фундук				
Мурасіге і Скуга	Ф2045	17	14	82
	Ф2048	20	15	75
	Ф2064	18	14	78
	Ф2078	19	13	68
Драйвера і Куніюкі	Ф2045	23	17	74
	Ф2048	20	18	90
	Ф2064	25	20	80
	Ф2078	30	25	83
Грецький горіх				
Мурасіге і Скуга	Г2356	22	12	55
	Г2347	24	15	63
	Г2366	19	11	58
	Г2383	23	13	57
Драйвера і Куніюкі	Г2356	33	29	88
	Г2347	30	25	83
	Г2366	29	23	79
	Г2383	35	29	83

Так, в середньому відсоток рослин що прижилися в досліді був в межах 78,8 % в фундука, та 70,8 % в грецького горіха.

Живильне середовище, на якому відбувалось укорінення, впливає на адаптацію рослин до ґрунтових умов, оскільки за застосування варіантів середовищ для ризогенезу формування кореневої системи відбувається по-різному. Так, встановлено, що за використання живильного середовища Мурасіге і Скуга в фундука прижилося 75,8 %, а в грецького горіха 58,3 %. А от за застосування для ризогенезу середовища Драйвера і Куніюкі – 81,8 % та 83,3 % відповідно.

Швидке вкорінення рослин є передумовою високого виходу саджанців, а тому питання пошуку елементів та речовин, що стимулюють коренеутворення та приживання, має першочергове значення.

Дослідження проводили в трьох видах субстратів – кокосовому, перліті та вермикуліті (таблиця 6.4).

Таблиця 6.4

Розвиток мікроклінів фундука та грецького горіха залежно від складу субстрату

Варіант	К-ть корінців		Довжина корінців		Сира маса корінців, г	Висота рослин	
	шт.	%	см	%		см	%
Фундук							
Субстрат кокосовий (st)	3,5	100	5,9	100	0,12	5,25	100
Перліт	4,4	126	5,2	88	0,15	6,03	115
Вермикуліт	5,3	151	4,5	76	0,18	6,89	131
Грецький горіх							
Субстрат кокосовий (st)	4	100	6,2	100	0,13	5,56	100
Перліт	5,6	140	5,4	87	0,16	6,26	113
Вермикуліт	7,3	183	4,8	77	0,19	7,02	126

Отже, визначено, що краще ризогенез відбувався в рослин фундука за висаджування їх на перліт та вермикуліт. Так, у рослин цих варіантів збільшувалась кількість корінців на 26 та 51 %, та маса на 15 і 31 % порівняно з стандартом.

А от довжина корінців в розрахунку на одну рослину становила лише 88 та 76 % від довжини корінців на контролі. Зважаючи на те, що маса корінців була на 0,03 та 0,06 г більшою за контроль, то корінці кращих варіантів мали меншу довжину, але більший діаметр.

Також встановлено, що в рослин грецького горіха за висаджування їх на перліт та вермикуліт збільшувалась кількість корінців на 40 та 83 %, та маса на 13 і 26 % порівняно з стандартом. А довжина корінців в розрахунку на одну рослину становила лише 87 та 77 % від довжини корінців на контролі, при цьому їх маса була більшою за показники контрольного варіанту. Аналогічно кращі варіанти за біометричним розвитком сприяли формуванню більшої за масою, але меншої за довжиною кореневої системи.

Біометричні показники фундука та грецького горіха відображені в табл.6.5.

Таблиця.6.5.

Біометричні показники саджанців фундука та грецького горіха, 2021 р.

Варіант	Довжина пагону, мм	Діаметр пагону, мм	Площа листової поверхні рослини, см ²
Фундук			
Субстрат кокосовий (st)	70,05	4,07	1125
Перліт	81,23	5,34	1789
Вермикуліт	95,63	6,56	1923
Грецький горіх			
Субстрат кокосовий (st)	65,45	5,33	1346
Перліт	85,98	6,78	1862
Вермикуліт	99,26	7,23	2030

Досліджено, що середня довжина пагону рослин фундука за вирощування їх на перліті становила 81,23 мм, а на вермикуліті – 95,63 мм. Аналогічно застосування перліту та вермикуліту сприяло більш кращому росту стебла, тобто збільшенню діаметра пагона.

Також встановлено, що за висаджування рослин грецького горіха на перліт та вермикуліт, довжина їх пагонів збільшилась до 85,98 та 99,26 мм, а діаметр до 6,78 та 7,23 мм.

На площу листової поверхні впливали субстрати і за розміщення на вермикуліті середня площа листя фундука становила 1923, а грецького горіха – 2030 см².

Коренеутворення рослин, залежно від складу субстратів, відбувалось по різному і суттєво впливало як на загальний ріст і розвиток, так і на вихід і якість саджанців (таблиця 6.5).

Таблиця 6.6

Розвиток кореневої системи саджанців фундука та грецького горіха, 2021р.

Варіант	Кількість коренів товщиною, шт.			Довжина коренів товщиною, см		
	всього	> 2 мм	< 2 мм	сумарна	> 2 мм	< 2 мм
Фундук						
Субстрат кокосовий (st)	18,0	4,9	13,1	388,8	178,3	210,5
Перліт	22,7	6,9	15,8	496,9	217,9	279,0
Вермикуліт	25,2	8,7	16,5	535,7	230,1	305,6
Грецький горіх						
Субстрат кокосовий (st)	19,6	5,6	14,0	405,2	189,0	216,2
Перліт	25,6	8,8	16,8	508,0	219,0	289,0
Вермикуліт	27,2	9,7	17,5	545,1	230,1	315,0

Коренева система фундука гірше всього розвивалась у рослин стандарту, які вирощувались на кокосовому субстраті, де загальна кількість коренів в кінці вегетації була в середньому 18,0 шт., та їх сумарна довжина 388,8 см.

Краще коренева система розвивалась на субстратах, які складались з перліту, кількість коренів була 22,7 шт., а найбільш інтенсивний розвиток кореневої системи забезпечувало використання якості субстрату вермикуліту, де середня кількість коренів була 25,2 шт.

Досліджено, що коренева система грецького горіха також гірше всього розвивалась у рослин стандарту, де загальна кількість коренів в кінці вегетації була в середньому по 19,6 шт., та їх сумарна довжина 405,2 см. А кращі значення формування кореневої системи були на субстратах, які складались з перліту, кількість коренів була 25,6 шт., а найбільш інтенсивний розвиток кореневої системи забезпечувало використання якості субстрату вермикуліту, де середня кількість коренів була 27,2 шт.

Довжина кореневої системи фундука та грецького горіха зростала за використання перліту, та максимальні значення були за застосування вермикуліту. Причому збільшувалась не тільки певна частина коренів, а й сумарна їх кількість, що засвідчує про гарний розвиток рослин.

Висновки до розділу 6

Результатами використання селективних агентів: сечовини та випромінювання було відібрано чотири генотипи фундука та ще чотири генотипи грецького горіха, які зарекомендували високу посухостійкість в лабораторних умовах.

Краще укорінення генотипів фундука спостерігалось на середовищі Драйвера і Куніюкі – 25 шт., що становило 61 % від загальної кількості експлантів, а в горіха 32 шт. та 71 %. Укорінення генотипів фундука на середовищі Мурасіге і Скуга в середньому становило 46 % від загальної кількості експлантів, а в горіха 22 шт. та 49 %. За використання живильного

середовища Мурасіге і Скуга в фундука прижилося 75,8 %, а в грецького горіха 58,3 %. А от за застосування для ризогенезу середовища Драйвера і Куніюкі – 81,8 % та 83,3 % відповідно.

Досліджено, що ризогенез краще відбувався в рослин фундука за висаджування їх на перліт та вермикуліт. Так, у рослин цих варіантів збільшувалась кількість корінців на 26 та 51 %, та маса на 15 і 31 % порівняно з стандартом. Також в рослин грецького горіха за висаджування їх на перліт та вермикуліт збільшувалась кількість корінців на 40 та 83 %, та маса на 13 і 26 % порівняно з стандартом. А довжина корінців в розрахунку на одну рослину становила лише 87 та 77 % від довжини корінців на контролі, при цьому їх маса була більшою за показники контрольного варіанту. Аналогічно кращі варіанти за біометричним розвитком сприяли формуванню більшої за масою, але меншої за довжиною кореневої системи.

Середня довжина пагону рослин фундука за вирощування їх на перліті становила 81,23 мм, а на вермикуліті – 95,63 мм. Аналогічно застосування перліту та вермикуліту сприяло більш кращому росту стебла, тобто збільшенню діаметра пагона. Також встановлено, що за висаджування рослин грецького горіха на перліт та вермикуліт, довжина їх пагонів збільшилась до 85,98 та 99,26 мм, а діаметр до 6,78 та 7,23 мм.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та обґрунтовано новий підхід до виконання наукового завдання – мікроклонального розмноження горіхоплідних культур та одержання посухостійких матеріалів фундука та грецького горіха.

1. За використання середовища Мурасіге і Скуга сорти фундука мали ростовий індекс 6,2 та формували калюс масою 159,8 мг, а за застосування середовища за приписом Драйвера і Куніюкі відповідно ростовий індекс 9,7 та формували калюс масою 237,3 мг. Кращий ростовий індекс за середовища на базі припису Драйвера і Куніюкі ми спостерігали при отриманні калюсу в сортів фундука: Барселонський, Трапезунд, Косфорд та Болградська новинка. А от краща середня маса сформованого калюсу була у сортів фундука: Пірожок та Степовий 83. Також кращий ростовий індекс за застосування середовища на базі припису Драйвера і Куніюкі був при отриманні калюсу в сортів грецького горіха: Фернет, Буковинський 2, Кишиневський, Кордене та Ярівський. А от краща середня маса сформованого калюсу була у сортів грецького горіха: Буковинський 2, Чернівецький 1 та Фернет.

2. Порівняння динаміки суспензійних культур окремих сортів фундука з середніми значеннями показує, що показники кількості клітин в 1 мл суспензії ($Ч10^5$) для сортів: Дар Павленка, Лозівський шаровидний, Пірожок, Степовий 83, Боровський та Серебристий були нижчі середньої кількості клітин, а в сортів: Болградська новинка, Косфорд, Барселонський та Трапезунд – вищі. А от за порівняння динаміки зміни чисельності клітин в суспензійних культурах окремих сортів грецького горіха з середніми значеннями по досліді встановлено, що показники кількості клітин в 1 мл суспензії ($Ч10^5$) для сортів: Коржеуцький, Кордене, Ферджан та Клішківський були нижчі середньої кількості клітин, а в сортів: Кишиневський, Чернівецький 1, Ярівський, Буковинський 2 та Фернет – відповідно вищі.

3. На живильному середовищі за прописом Драйвера і Куніюкі спостерігався не лише високий відсоток регенерації рослин фундука, але й частота регенерації, від 44 до 63 %. Так, краща регенераційна здатність була у сорту Болградська новинка, Косфорд та Барселонський. При цьому кількість отриманих регенерантів становила 54, 56 та 55 %, а частота регенерації рослин з морфогенних калюсів – 63, 61 та 60 % відповідно. А от на живильному середовищі за прописом Мурасіге і Скуга спостерігався високий відсоток регенерації рослин грецького горіха, а також і частота регенерації, від 50 до 68 %. Краща регенераційна здатність була у сорту грецького горіха Буковинський 2, Коржеуцкий, Клішківський та Фернет. При цьому кількість отриманих регенерантів становила 65, 62, 62 та 62 %, а частота регенерації рослин з морфогенних калюсів – 68, 68, 64 та 63 % відповідно.

4. Найбільше значення ростового індексу при застосуванні сублетальних концентрацій маніту було у сортів: Трапезунд, Косфорд та Серебристий, а за застосування ПЕГ 6000 у: Трапезунд, Барселонський, Серебристий та Косфорд. Також встановлено, що найбільше значення ростового індексу при застосуванні сублетальних концентрацій маніту було у сортів грецького горіха: Ярівський, Фернет, Чернівецький 1 та Буковинський 2, а за застосування ПЕГ 6000 у: Фернет, Чернівецький 1, Буковинський 2 та Ярівський.

5. Максимум посухостійких калюсних ліній формували сорти Трапезунд, Косфорд, Барселонський та Пірожок за додавання селективного агенту маніту, та сорти Барселонський, Трапезунд та Косфорд за додавання в якості селективного агенту ПЕГ 6000. Отже, сорт фундука Барселонський та Косфорд однаково добре підходять для селекції на посухостійкість з використанням обох селективних середовищ – маніту та ПЕГ 6000. А от кращі показники відсотку числа посухостійких рослин регенерантів було отримано на селекційному середовищі з використанням маніту в сортів Кишиневський, Коржеуцкий та Ферджан. А от за використання середовища з додаванням ПЕГ 6000 більше посухостійких рослин регенерантів формувалось в сортів грецького горіха Буковинський 2, Ярівський та Фернет.

6. За застосування гама опромінювання або сечовини та культивування калюсу на селективному середовищі з додаванням маніту найбільша частота утворення морфогенного калюсу спостерігалась в сортів фундуку: Косфорд, Трапезунд, Дар Павленка, Степовий 83 та Барселонський, а за аналогічних умов опромінення та культивування на середовищі з додаванням ПЕГ – в сортів: Барселонський, Трапезунд, Косфорд, Пірожок та Степовий 83. Також за застосування сечовини та культивування калюсу на селективному середовищі з додаванням маніту найбільша частота утворення морфогенного калюсу спостерігалась в сортів грецького горіха: Буковинський 2, Чернівецький 1, Фернет, Ярівський та Кордене, а за аналогічних умов опромінення та культивування на середовищі з додаванням ПЕГ – в сортів: Буковинський 2, Фернет, Клішківський, Ярівський та Чернівецький 1.

7. Краще укорінення генотипів фундука спостерігалось на середовищі Драйвера і Куніюкі – 25 шт., що становило 61 % від загальної кількості експлантів, а в горіха 32 шт. та 71 %. Укорінення генотипів фундука на середовищі Мурасіге і Скуга в середньому становило 46 % від загальної кількості експлантів, а в горіха 22 шт. та 49 %. За використання живильного середовища Мурасіге і Скуга в фундука прижилося 75,8 %, а в грецького горіха 58,3 %. А от за застосування для ризогенезу середовища Драйвера і Куніюкі – 81,8 % та 83,3 % відповідно.

8. В рослин фундука ризогенез краще відбувався за висаджування їх на перліт та вермикуліт. Так, у рослин цих варіантів збільшувалась кількість корінців на 26 та 51 %, та маса на 15 і 31 % порівняно з стандартом. Також в рослин грецького горіха відповідно збільшувалась кількість корінців на 40 та 83 %, та маса на 13 і 26 % порівняно з стандартом. А довжина корінців в розрахунку на одну рослину становила лише 87 та 77 % від довжини корінців на контролі, при цьому їх маса була більшою за показники контрольного варіанту. Аналогічно кращі варіанти за біометричним розвитком сприяли формуванню більшої за масою, але меншої за довжиною кореневої системи.

РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для отримання калюсних тканин досліджуваних сортів фундука та грецького горіха рекомендується живильне середовище за прописом Драйвера і Куніюкі з додаванням амінооцтової кислоти (0,95 мг/л), L-цистеїну – 1,0 мг/л, регулятора росту цитокінінової природи 6-БАП (2 мг/л) та ІМК (0,52 мг/л).

2. Для отримання посухостійких форм фундука та грецького горіха використовувати в якості селективного фактору гамма опромінення в поєднанні з селективними агентами маніт 6 % та ПЕГ 6000 20 %.

3. Використовувати сорти фундука Барселонський та Косфорд як джерела отримання посухостійких вихідних матеріалів, що однаково добре підходять для відбору на посухостійкість з використанням обох селективних середовищ – маніту та ПЕГ 6000.

4. Використовувати сорти грецького горіха Кишиневський, Коржеуцький та Ферджан для відбору посухостійких рослин з використанням маніту, та сорти Буковинський 2, Ярівський та Фернет за використання середовища з додаванням ПЕГ 6000.

5. Отримані нами посухостійкі лінії фундука та грецького горіха використовувати в якості донорів генів стійкості до посухи в традиційному селекційному процесі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Алиева, З.М. Эколого-физиологические аспекты воспроизведения и устойчивости к абиотическим стрессорам ресурсных видов растений Дагестана: дисс. ... д. биол. наук (03.02.14 «биологические ресурсы»). Махачкала, 2017. 387 с.
2. Алиханова, А.А. Естественное вегетативное возобновление лещины обыкновенной и потенции к регенерации её изолированных структур: автореф. дисс. ... канд. биол. наук (03.00.12 «Физиология и биохимия растений»). Махачкала, 2009. 20 с.
3. Альбрех Г., Мустроф А. Участие инвертазы и сахарозосинтетазы в превращениях сахарозы в связи с накоплением целлюлозы и каллозы в корнях пшеницы при недостатке кислорода. Физиология растений. 2003. 50, 3. С. 907-915.
4. Аль-Холани Х.А. Получение стресс-толерантных растений кукурузы методом клеточной селекции. Автореф. канд. биол. наук. Москва. 2010. 24 с.
5. Аль-Холани Х.А., Долгих Ю.И. Определение концентрации маннита для использования в процессе клеточной селекции на устойчивость к засухе кукурузы. Вестник РУДН. Сер. Агрономия и животноводство. 2007. Вып. 1-2. С. 38 - 42.
6. Аль-Холани Х.А., Долгих Ю.И. Сравнение эффективности селективных систем с маннитом и полиэтиленгликолем для отбора засухоустойчивых растений кукурузы. Сб. IX Междунар. конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. Звенигород. 2008. С. 18-19.
7. Алякин, А.А., Ефремов А.А., Качин С.В. Фракционный состав эфирного масла душицы обыкновенной Красноярского Края. Химия растительного сырья. 2010. № 1. С. 99-104.
8. Андрієвський В.В., Врублевський А.Т. Особливості введення грецького горіха *in vitro*. Тези VI міжнародної науково-практичної конференції

"Біотехнологія: Звершення та надії". Національний університет біоресурсів і природокористування України, 2017. 1. С. 31–32.

9. Анисимова, А.Г., Демьянова Е.И. Морфолого-анатомические особенности половых форм *Origanum vulgare* (Lamiaceae). Растительные ресурсы. 2007. 1. С. 36-45.

10. Бабилова, А.В., Горобченко Т.Ю., Журавлев Ю.Н. Растение как объект биотехнологии. Комаровские чтения. 2007. Вып. IV. С. 184–211.

11. Баер, Г.Я., Рехметов Д.Б., Стадничук Н.А. Самоклональная вариабельность в культуре *in vitro* как источник получения селекционного материала пальчатого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. Селекція і насінництво. 2008. 96 С. 154-161.

12. Балабак О. А., Балабак А. В. Удосконалення технології розмноження сортів фундука в умовах Правобережного Лісостепу України. Вестник Уманського національного університету садівництва. 2015. № 2. С. 44–47.

13. Банникова М.А., Головка А.Э., Хведыныч О.А., Кучук Н.В. Регенерация растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L) в культуре *in vitro*. Гистологическое изучение процессов регенерации. Цитология и генетика. 1995. Т. 29. №6. С. 14 – 22.

14. Белова, М.М., М.Ю. Чередниченко Культивирование *in vitro* лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.). Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2016. № 60. С. 31-35.

15. Беседина, Е.Н. Усовершенствование метода клонального микроразмножения подвоев яблони *in vitro*: дисс. ... канд. с.-х. наук (06.01.08 «плодоводство и виноградарство»). Краснодар, 2015. 142 с.

16. Бирюлева Э.Г., Петришина Н.Н. Эпидермальные структуры и анатомия вегетативных органов *Melissa officinalis* в связи с эфиромасличностью. Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2014. Вып. 10. С. 88-93.

17. Бирюлёва Э.Г., Усеинова В.М. Адаптивные особенности дикорастущих видов душицы при введении в культуру. Учёные ботаники Таврического университета: вклад в науку, идеи и их развитие: материалы

Международ. науч. конф. (20 мая 2008 г., Симферополь). Симферополь: ТНУ им. В.И. Вернадского, 2008. С. 188.

18. Боева С.А., Брежнева Т.А., Мальцева А.А. Сапонины растений *Polemonium coeruleum* L. и *Beta vulgaris* L. особенности получения, сравнительная оценка гипогликемической активности. Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. 2007. № 1. 139-141.

19. Бойко Е.Ф. *Origanum vulgare* L. и *Origanum tyttanthum* Gontsch. как лекарственные, эфиромасличные, пряно-ароматические и декоративные культуры. Ученые записки Таврического Национального университета им. В.И. Вернадского. Серия биология и химия. 2009. Т. 22(61), № 2. С. 9-15.

20. Бойко Е.Ф., Мишнев А.В., Лолойко А.А. Компонентный состав эфирного масла крымских природных популяций душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.). Збірник наукових праць ЛНАУ. Біологічні науки. 2010. № 19. С. 17-22.

21. Бойко, Е.Ф. Оценка качества растительного сырья *Origanum vulgare* L. Труды Никитского ботанического сада. 2011. Т. 133. С. 28-40.

22. Боков, Д.О. Применение *Origanum vulgare* L. и *Origanum onites* L. в лечении злокачественных образований: механизмы противоопухолевой активности фенольных соединений. Студенческий научный форум: материалы V Международной студенческой электронной научной конференции. [Электронный ресурс].

23. Брежнева Т.А., Николаевский В.А., Селеменев В.Ф., Сливкин А.И., Альфалуи А.М., Тафрауити Х., Сафонова Е.Ф. Выделение сапонинов из корневищ сахарной свеклы и предварительная оценка их адаптогенного действия. Химико-фармацевтический журнал. 2001. Т. 35. №3. С. 39 - 41.

24. Бублик, О.М. Чинники самокласнальної мінливості рослин. Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. 2011. Т. 9., №1. С. 118-133.

25. Бугара А.М., Бугара И.А. Использование методов биотехнологии для размножения растений и сохранения генофонда. Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана: тематический сборник научных работ. 2003. С. 14-20.

26. Бугара И.А., Юнусова Э.А. Клеточная селекция каллусных культур *Glycine mx* на устойчивость к осмотическому стрессу. Экосистемы. 2016. Вып. 8. С. 83-87.
27. Бугара, И.А. Морфометрическое и цитохимическое исследование каллусных культур мяты. Ученые записки Таврического Национального университета им. В.И. Вернадского. Серия биология и химия. 2008. Т. 21(60), № 1. С. 44-52.
28. Булатова А.А., Шапчич М.П., Юрин В.М. Получение клеточной культуры *in vitro* и оптимизация состава питательной среды для активного роста клизии душистой. Труды БГУ. Молекулярная биология. 2009. Т. 4, Ч. 1. с.207-210.
29. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 146 с.
30. Быков В.А., Зайко Л.Н., Конон Н.Т. Атлас лекарственных растений России. М.: ФГБНУ ВИЛАР, 2006. 345 с.
31. Быков, В.А., Сидельников Н.И., Зайко Л.Н. Дикорастущие лекарственные растения России: сбор, сушка, подготовка сырья. М.: ФГБНУ ВИЛАР, 2015. 344 с.
32. В Ковчеге выращивают саженцы фундука *in-vitro*. URL: <http://orehovod.com/articles/658-v-kovchege-vyraschivayut-sazhency-funduka-in-vitro.html>
33. Веденичова Н.П., Косаківська І.В. Цитокиніни як регулятори онтогенезу рослин за різних умов зростання. Київ: Наш формат, 2017. 200 с.
34. Величко Н.А., Смольникова Я.В. Оптимизация условий культивирования каллусной ткани *Digitalis purpurea* L. Биотехнология и общество в XXI веке. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. С. 326-329.
35. Ветчинкина, Е.М., Ширнина И.В., Ширнин С.Ю. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro*. Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Серия: Естественные и медицинские науки. 2012. № 7. С. 109-118.

36. Вечерко, Н.А., Ромаданова Н.В., Жумабеков Е.Ж. Сохранение биоразнообразия яблони методом культуры тканей. Биология клеточных растений *in vitro* и биотехнология: материалы IX Международной конференции (8-12 сентября 2008 г., Звенигород). М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. С. 70.

37. Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К., Дурникин Д.А. Микроразмножение растений фиалки *Sainpaulia jonantha* (S. Kewensis C.V. Clarke). Биотехнология и общество в XXI веке. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. С. 320-333.

38. Виджешвар П., Митрофанова О.В., Лищук А.И. Клональное микроразмножение актинидии превосходной [*Actinidia deliciosa* (Chev.) Liagh. Ferguson]. Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур: сборник научных трудов. Ялта, 1997. Т. 119. С. 111-126.

39. Войнов Н.А., Волова Т.Г., Зобова Н.В. Современные проблемы и методы биотехнологии: учебное пособие. Красноярск: ИПК СФУ, 2009. 111 с.

40. Волосевич Н.Н., Кухарчик Н.В., Сидоренко Т.Н. Вегетативная продуктивность растений малины (*Rubus Idaeus* L.) после культивирования *in vitro*. Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. 2014. № 1. С. 53-56.

41. Генкель П.А. Физиология устойчивости растительных организмов. Физиология сельскохозяйственных растений. М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1967. Т. 3. С. 87 - 325.

42. Григорюк И.А., Ткачев В.И., Савинский С.В., Мусиенко Н.Н. Современные методы исследования и оценки засухо- и жароустойчивости растений: Метод. пособие. К.: Наук. світ, 2003. 139 с.

43. Губанова Н.Я., Дубровная О.В., Чугункова Т.В. Комплексная селекция *in vitro* на устойчивость клеточных линий кормовой свеклы к токсину возбудителя бактериоза и низким температурам. Биополимеры и клетка. 2000. Т. 16. № 2. С. 138-143.

44. Гуля Н.И., Маслова Е.В., Петрова И.В. Основные этапы клонального микроразмножения в условиях *in vitro* для сохранения редких и

исчезающих видов растений. Биология – наука XXI века: 20-я Международная школа-конференция молодых ученых (18-22 апреля 2016 г., Пущино). Пущино: ООО «Буки Веди», 2016. С. 221.

45. Гумерова Е.А., Плотникова А.В., Шкильменская К.Р. Получение каллусных культур *Glaucium flavum* Crantz (Paraveraceae). Биотехнология и общество в XXI веке. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. С. 26-31.

46. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений: курс лекций. Минск: БГУ, 2007. 102 с.

47. Долгих Ю.И., Ларина С.Н., Шамина З.Б. Селекция на осмоустойчивость кукурузы *in vitro* и характеристика растений-регенерантов. Физиология растений. 1994. т. 41. № 1. С. 114-117.

48. Долгих Ю.И., Степанова А.Ю., Гладов Е.А. Получение растений, толерантных к неблагоприятным условиям окружающей среды, методом клеточной селекции. Материалы III Международной научной конференции - Москва. 2004. С. 136-138.

49. Дроздов Е.Ф., Нам И.Я., Заякин В.В. Прямая регенерация побегов и каллусогенез из зародышевых эксплантов люпина. Биология клеток растений и биотехнология: тезисы докладов IX междунар. конф. (8-12 сентября 2008 г., Звенигород). М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. С. 112-113.

50. Дубровна О.В., Чугункова Т.В., Бавол А.В. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів. К.: Логос, 2012. 428 с.

51. Дубровная О.В., Лялько И.И., Губанова Н.Я. Соматональная изменчивость растений сахарной свеклы по признаку стерильности. Цитология и генетика. 2004. №5. С. 24-29.

52. Дышко В.Н. Клеточная и тканевая биотехнология в растениеводстве. Курс лекций для аспирантов по направлению подготовки 35.06.01 Сельское хозяйство. Смоленск: ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА», 2014. 69 с.

53. Егизбаева Т.К., Ли Т., Хасейн А., Халымбетова А.Е., Жардемали Ж. Клеточная селекция пшеницы и картофеля с использованием пероксидазы в

качестве белкового маркера засухоустойчивости. Биотехнология. Теория и практика. 2010. №3. С. 25-32.

54. Егорова Н.А. Биотехнологические основы создания новых форм и размножения эфиромасличных растений: дисс. ... д. биол. наук (03.00.20 «биотехнология»). Симферополь, 2012. 453 с.

55. Егорова Н.А. Влияние осмотического стресса на развитие каллусных культур лаванды *in vitro*. Бюл. Гос. Никитского бот. сада. 2012. Вып. 105. С. 139-143.

56. Егорова Н.А. Влияние ряда факторов на индукцию морфогенеза в каллусе эфиромасличной герани *in vitro*. Наука сегодня: теоретические и практические аспекты: сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции. (23 декабря 2015 г., Вологда). – Вологда: ООО «Маркер», 2015. Ч. 3. С. 16-19.

57. Егорова Н.А. индукция морфогенеза и получение растений-регенерантов в культуре каллусных тканей лаванды. Бюллетень Никитского ботанического сада. 2007. Вып. 95. С. 62-66.

58. Егорова Н.А. Методические указания по самостоятельной подготовке для выполнения лабораторно-практических занятий по дисциплине «Биотехнология в растениеводстве». Симферополь: ЮФ «КАТУ» НАУ, 2008. 40 с.

59. Егорова Н.А. Некоторые аспекты биотехнологии эфиромасличных растений: индукция каллюсо- и морфогенеза, использование соматоклональной изменчивости. Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46, № 2. С.108-120.

60. Егорова Н.А. Некоторые аспекты биотехнологии эфиромасличных растений: микроклональное размножение, синтез продуктов вторичного метаболизма *in vitro*. Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46, №3. С. 187-201.

61. Егорова Н.А. Некоторые аспекты биотехнологии эфиромасличных растений: индукция каллюсо- и морфогенеза, использование соматоклональной изменчивости. Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46, № 2. С. 108-120.

62. Егорова Н.А. Некоторые аспекты биотехнологии эфиромасличных растений: индукция каллюсо- и морфогенеза, использование соматической вариативности. Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46, №2. С. 108-120.
63. Егорова Н.А. Разработка методических основ клеточной селекции лаванды *in vitro* на устойчивость к NaCl. Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2011. Вып. 5. С. 173-179.
64. Егорова Н.А., Бугаенко Л.А., Ставцева И.В. Биотехнологические методы в селекции эфиромасличных растений. Бюллетень Никитского ботанического сада. 2002. Вып. 85. С. 41-43.
65. Егорова Н.А., Кривоухатко А.Г., Ставцева И.В. Микроразмножение эфиромасличных растений с использованием культуры изолированных тканей и органов *in vitro*. Таврійський вісник аграрної науки. 2013. № 1. С. 9-14.
66. Егорова Н.А., Митрофанова И.В., Браилко В.А. Морфогенетические и физиолого-биохимические особенности *Lavandula angustifolia* при длительном микроразмножении *in vitro*. Физиология растений. 2019. Т. 66., № 2. С. 137-145.
67. Егорова Н.А., Ставцева И. В., Инюткина А. Г. Культура каллусных тканей и соматическая изменчивость у эфиромасличных растений. Сборник научных трудов Никитского ботан. сада. 2009. Т. 131. С. 63-67.
68. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Получение и цитофизиологическая характеристика каллусной культуры аниса. Вісник Харківського Національного аграрного університету. Серія біологія. 2008. Вип. 1 (13). С. 65-70.
69. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Разработка биотехнологических приемов микроразмножения *in vitro* для *Lavandula angustifolia* Mill. Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2015. №3 (54). С.338-342.
70. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Разработка методов селекции *in vitro* для получения устойчивых к осмотическому стрессу форм эфиромасличных растений. Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: материалы X Международной конференции (14-18 октября 2013 г., Казань). Казань: Центр инновационных технологий. 2013. С. 342.

71. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Лолойко А.А. Использование соматклональной изменчивости в культуре *in vitro* для создания исходного селекционного материала у эфиромасличных растений. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2011. Т. 11. С. 252-257.

72. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Митрофонова И.В. Морфогенез и клональное микроразмножение *Salvia sclarea* L. *in vitro*. Труды Никитского ботанического сада. 2011. Т. 133. С. 41-52.

73. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Якимова О. В. Роль некоторых факторов в процессе индукции каллусогенеза *in vitro* у эфиромасличных растений. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2014. Т. 15. С. 63-67.

74. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Якимова О.В. Некоторые аспекты клонального микроразмножения и сохранения *in vitro* эфиромасличных растений. Таврический вестник аграрной науки. 2015. № 1 (3). С. 18-24.

75. Егорова Н.А., Якимова О.В., Ставцева И.В. Клональное микроразмножение эфиромасличных растений семейства Lamiaceae. Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине: сборник научных трудов международной конференции, посвященной 85-летию ВИЛАР (23-25 июня 2016 г., Москва). М.: Щербинская типография, 2016. С. 218-222.

76. Егорова Н.А., Якимова О.В., Ставцева И.В. Некоторые аспекты размножения *in vitro* сортов и селекционных образцов эфиромасличных растений семейства Lamiaceae. Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: материалы XI Международной конференции, которая знаменует полувековую историю по исследованию культивируемых *in vitro* клеток высших растений и 60-летие деятельности отдела биохимии и биотехнологии растений государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад НАН Беларуси». Минск: «Медисон», 2018. С. 62-63.

77. Егорова, Н.А. Изменчивость каллусных культур лаванды при длительном пассировании *in vitro*. Таврический вестник аграрной науки. 2017. №1 (9). С. 16-27.

78. Егорова, Н.А. Культура каллюсных тканей лаванды. Физиология и биохимия культ. растений. 2003. Т. 35, № 2. С. 166-171.

79. Жанг Х.Т., Ту Д.Х., Биляев Д. В. Изучение влияния регуляторов роста на побегообразование на семядольных эксплантах горчицы сарептской. Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: материалы IX Международной конференции (8-12 сентября 2008 г., Звенигород) М: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. С. 138.

80. Жужжалова Т.П., Подвигина О.А., Знаменская В.В. Пути воспроизведения нового организма сахарной свеклы в культуре *in vitro*. Энциклопедия рода Beta: биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск, 2010. С. 403-419.

81. Жуков Л.А., Смирнова О.В., Ведерникова О.П. Онтогенетический атлас лекарственных растений: учебное пособие. Йошкар-Ола: МарГУ, 2002. Т. III. 280 с.

82. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В., Калашникова Е.А. Биотехнология: теория и практика. М.: Изд-во Оникс, 2009. 496 с.

83. Зобова Н.В. Повышение устойчивости ячменя к стрессовым биотическим и абиотическим факторам в Сибири (генетико-биотехнологические аспекты). Автореф. док. с.-х. наук. Красноярск. 2009. 28 с.

84. Зубайдова Т.М. Нейротропное действие настоя травы душицы мелкоцветковой и обыкновенной (НТДМ) и (НТДО). Проблемы фитотерапии и фитофармакологии: материалы 1 съезда фитотерапевтов и фитофармакологов Таджикистана (ноябрь 2008, Душанбе). 2008. С. 71-78.

85. Иванова Н.Н. Клональное микроразмножение листовых декоративных растений. Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур: сборник научных трудов. Ялта, 1997. Т. 119. С. 153-168.

86. Иванова Н.Н. Особенности морфогенеза и клональное микроразмножение некоторых цветочно-декоративных культур: автореф. дисс. ... канд. биол. наук (03.00.20 «биотехнология»). Ялта, 2009. 20 с.

87. Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*: монография. Одесса: Астропринт, 2011. 224 с.

88. Ищук Л.П., Мацкевич В.В. Размножение энергетических видов *Salix L. in vitro*. Биотехнология и общество в XXI веке. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. С. 352-356.

89. Казаринова Н.В., Ткаченко К.Г. Абиотическая активность эфирного масла *Origanum vulgare L.* собранной в Новосибирской области. Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: материалы III науч.-практ. конф. (25-27 октября 2004 г., Барнаул). Барнаул, 2004. С. 40-42.

90. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия: Учебное пособие. М.: Мзд-во РГАУ-МСХА, 2012. 318 с.

91. Калашникова Е.В. Клеточная селекция на устойчивость к грибным болезням: автореф. на соискание науч. степени доктора биол. наук. М., 2003. 57 с.

92. Калинин Ф.Л., Кушнир Г. П., Сарнацька В. В. Технология микрклонального размножения растений. Киев: Наук. думка, 1992. 232 с.

93. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. К.: Наукова думка, 1992. С. 145-150.

94. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения. К.: Наукова думка, 1992. 232 с.

95. Картель Н.А., Кильчевский А.В. Биотехнология в растениеводстве. Минск: Тэхналогія, 2005. 310 с.

96. Кефели В.И. Природные ингибиторы роста. Физиология растений. 1997. Т. 44. № 3. С. 471–480.

97. Кляченко О.Л. Біотехнологія в рослинництві – поліпшення технологій у селекції рослин. Пропозиція. 2010. №2. С. 38-42.

98. Кляченко О.Л., Коломієць Ю.В. Особливості ризогенезу форм цукрових буряків стійких до збудників бактеріозу *Pseudomonas syringae* pv. *artata* та *Pseudomonas wieriingae*. Вісник Білоцерківського державного аграрного

університету. Збірник наукових праць: Агробіологічні науки землеробства. – Біла церква. 2005. Вип. 32. С. 75-81.

99. Колесникова Е.О. Соматональная изменчивость *Stevia rebaudiana* в культуре *in vitro*. Сборник статей победителей IV международной научно-практической конференции. Пенза: МЦНС «Наука и просвещение», 2016. С. 21-23.

100. Колодяжная Я.С., Куцоконь Н.К., Левенко Б.А., Сютикова О.С., Рахметов Д.Б., Кочетов А.В. Трансгенные растения, толерантные к абиотическим стрессам. Цитология и генетика. 2009. №2. С. 72-93.

101. Коломієць Ю.В., Кляченко О.Л., Ващенко Л.М. Використання N-нітро-N-метилсечовини в селекції цукрових буряків на стійкість до *P. syringae* pv. *artata* та *P. Wieringae*. Вісник Запорізького державного університету. 2006. №1. С. 22-28.

102. Колчанова О. В., Обозний О. І. Особливості введення в культуру *in vitro* представників роду *Corylus*. Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія. 2015. № 3. С. 91–97.

103. Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Тищенко Е.Н. Прямая регенерация генотипов подсолнечника. Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: материалы IX Международной конференции (8-12 сентября 2008 г., Звенигород) М: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. С. 188.

104. Корниенко А.В., Буторина А.К. Индуцированный мутагенез у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.): полученные результаты и перспективы использования для разработки tilling-проекта. Успехи современной биологии. 2012. Т. 132, № 6. С.582-593.

105. Корниенко А.В., Сухоруких В.А., Бердников Р.В. Применение микрклонального размножения в селекции сахарной свеклы. Сахарная свекла. 2012. № 7. С. 28-29.

106. Корчагина А.В. Оптимизация условий клонального микроразмножения пеларгонии королевской (*Pelargonium grandiflorum* (Andrews) Willd.): дисс.... канд. с.-х. наук (06.01.05 «селекция и семеноводство

сельскохозяйственных растений»). М., 2016. 141 с.

107. Косенко І. С. Найважливіші досягнення у науковій роботі Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України у 2010 році. Автохтонні та інтродуковані рослини. 2010.

108. Кочкин Д.В., Галишев Б.А., Глаголева Е.С. Обнаружение в суспензионной культуре клеток *Panax japonicus* Var. *Repens* редкого тритерпенового гликозида женьшеня – гинзенозида малонил-RG1. Физиология растений. 2017. Т. 64, № 5. С. 337-345.

109. Кочкин Д.В., Суханова Е.С., Носов А.М. Закономерности накопления тритерпеновых гликозидов в циклевыращивания суспензионной культуры клеток *Polyscias fruticosa*. Вестник ПГТУ. 2014. № 4. С. 67-73.

110. Кошулько А.И. Сапонин и технология его извлечения для коммерческих целей. Цукор України. 2004. Вип. 3-4, №37. С. 1-6.

111. Криницина А.А., Чурикова О.А. Влияние различных типов цитокининов на микроразмножение сирени сорта «Великая победа». Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: материалы X Международной конференции (14-18 октября 2013 г., Казань). –Казань: Центр инновационных технологий, 2013. С. 358.

112. Кузнецов В.В., Шевяков Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция. Физиология растений. 2003. №2. С. 165-173.

113. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. К.: Логос, 2005. 730 с.

114. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження рослин. К.: Наукова думка, 2005. 271 с.

115. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Київ: Наукова думка, 2005. 272 с.

116. Лебедев В.Г., Азарова А.Б., Шестибратов К.А. Проявление соматклональной изменчивости у микроразмноженных и трансгенных растений. Известия ТСХА. 2012. Вып. 1. С. 153-163.

117. Лебедев В.Г., Шестибратов К.А. Органогенез сосны обыкновенной

(*Pinus sylvestris* L.) в культуре *in vitro*. Хвойные бореальной зоны. 2012. Т. 30. № 1-2. С. 114-119.

118. Лешина Л.Г., Булко О.В. Культивирование *in vitro*, ростовые параметры и оценка способности к биосинтезу гликозидов культуры клеток *Digitalis purpurea* L. Физиология и биохимия культ. растений. 2011. Т. 43., № 2. С. 164-170.

119. Логвина А.О. Качественный анализ фенольных соединений и антиоксидантный потенциал каллусных линий и нативных растений *Trigonella feonum-graecum*. Физиология растений. 2014. Т. 9 (1). С. 67-72.

120. Лукичева Л.А. Особенности клонального микроразмножения безвирусных сортов вишни и сливы. Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур: сборник научных трудов. 1997. Т. 119. С. 34-45.

121. Мазур Н. Зеленые клоны: на Пересыпи «штампуют» здоровые микросаженцы для плантаций киви и фундука под Одессой. URL: <http://dumskaya.net/news/klonirovanie-po-odesski-v-laboratorii-na-peresyp-073803/>

122. Мацкевич В. В. Удосконалені методи оздоровлення картоплі від вірусів та використання отриманого матеріалу в первинному насінництві: автореферат на здобуття ступеня канд. с.- г. н. за спеціальністю 06.01.14 – насінництво. Київ, 2004. 153 с.

123. Мацкевич О.В., Лісовий М.М. Особливості розмноження гібриду павловнії (*Paulownia*) *in vitro*. VI Міжнародна науково-практична конференція. «Біотехнологія: звершення та надії», присвячена до 120-річчя НУБіП України. 14-16 листопада 2017. м. Київ. С. 218–219.

124. Медведева Н.И., Паливара Н.В. Особенности микрклонального размножения интродуцентов и клонов винограда. Научный журнал КубГАУ. 2008. № 40 (6). С. 1-18.

125. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки. Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений, Т. 6. М.: ВИНТИ, 1989. 166 с.

126. Миркин Б.М., Наумова Л.Г., Мулдашев А.А. Высшие растения: краткий курс систематики с основами науки о растительности: Учебник. 2-е изд., перабот. М.: Логос, 2002. 256 с.

127. Миpович В.М., Коненкина Т.А., Федосеева Г.М. Исследование качественного состава эфирного масла душицы обыкновенной, произрастающей в восточной Сибири. Химия растительного сырья. 2008. № 2. С. 61-64.

128. Миpович, В.М. Фармакологическое исследование представителе родов *Origanum* L. и *Rhododendron* L. флоры Восточной Сибири: автореф. дисс. ... д. фармацевтических наук (14.04.02 «фармацевтическая химия и фармакология»). Улан-Уде, 2010. 41 с.

129. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения садовых культур. К.: Аграрна наука, 2011. 344 с.

130. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Лесникова-Седошенко Н.П. Применение биотехнологических методов в оздоровлении растений и размножении безвирусного посадочного материала перспективных цветочно-декоративных культур. Сборник научных трудов ГНБС. 2014. Т. 138. С. 5-56.

131. Митрофанова, И.В. Микрклональное размножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы). Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур: сборник научных трудов. 1997. Т. 119. С. 63-95.

132. Митрофанова, И.В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений. Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41, № 6. С. 496-508.

133. Митрофанова О.В., Михайлов А.П., Чехов А.В. Биотехнологические аспекты освобождения от вирусности клонального микроразмножения некоторых экономически важных многолетних культур. Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур: сборник научных трудов. 1997. Т. 119. С. 7-34.

134. Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Тищенко Е.Н. Цитогенетический

анализ клеточной линии сои, устойчивой к оксианионам вольфрама. Физиология и биохимия культурных растений. 2010. Т. 42, № 2. С. 125-131.

135. Мишустина Н.А., Рамаданова Н.В., Абидкулова К.Т. Получение асептической коллекции *Berberis iliensis* M. Pop в культуре *in vitro*. Биотехнология и общество в XXI веке. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. С. 383-388.

136. Мороз П. А., Комиссаренко Н. Ф. Аллелопатическая активность некоторых фенольных соединений. Роль токсинов растительного и микробного происхождения в аллелопатии. Киев: Наук. думка. 1983. С. 118–122.

137. Мубарак М.М. Изучение мяты болотной (*Menta fulegium* L.) в культуре *in vitro*: дисс. ... канд. биол. наук (03.01.06 «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»). М., 2015. 131 с.

138. Мусиенко Н.Н., Оканенко А.А., Капля А.В. Жаростойкость и продуктивность озимой пшеницы. Киев: Вища школа, 1985. 195 с.

139. Мусієнко М.М., Панюта О.О. Біотехнологія рослин: навчальний посібник. К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. 114 с.

140. Мэтьюз Р. Вирусы растений. М.: Мир. 1973. 686 с.

141. Нгуен Тхань Хай. Получение *in vitro* клеточных и тканевых культур подсолнечника (*Helianthus Annus* L.), устойчивых к *Sclerotinia sclerotiorum* : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.23 "Биотехнология" / Нгуен Тхань Хай. М., 2008. 24 с.

142. Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* центрального сибирского ботанического сада. Вестник ВОГиС. 2008. Т. 12, № 4. С. 564-571.

143. Ованесян Н.А. Клональное микроразмножение и индукция каллусообразования олеандра (*Nerium oleander*) *in vitro*. Вестник биотехнологии. 2007. Т. 3, № 3. 10-17.

144. Ованесян Н.А., Мартумян М.К., Есяян А.Г. Цитогенетическое

описание каллусной культуры *Nerium oleander*. Биолог. журнал Армении. 2008. Т. 1-2 (60). 130-134.

145. Овчинникова В.Н., Варламова Н.В., Майсурян А.Н. Морфогенез и клональное микроразмножение в культуре *in vitro* скорцонеры (*Scorzonera hispanica* L.) / В.Н. Овчинникова [и др.]. Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: X Международная конференция (14-18 октября 2013 г., Казань). Казань: Центр инновационных технологий, 2013. С. 370.

146. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. [4-е изд.] М.: Агропромиздат, 1988. 271 с.

147. Песяк С.В., Комлева Е.В., Карначук Р.А. Оптимизация условий культивирования каллусной культуры полыни однолетней. Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: материалы IX Международной конференции (8-12 сентября 2008 г., Звенигород). М: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. С. 294.

148. Подгаєцький А. А., Мацкевич В. В., Врублевський А. Т. Використання біоциду РРМ як додаткового деконтамінанта в процесі мікроклонального розмноження рослинних об'єктів. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Агрономія і біологія. 2016. № 9. С. 156–160.

149. Расторгуев С.Л., Квочкин А.Н., Соловых Н.В. Применение методов биотехнологии в агропромышленном секторе страны. Достижения науки и техники АПК. 2010. № 12. С. 8-10.

150. Рижук Т. О. Вивчення регенераційного потенціалу представників роду *Corylus* L. в умовах *in vivo*. Селекційно-генетична наука і освіта. 2017. 211 с.

151. Сікач В.О. Вплив поживних середовищ на фізіологічні особливості культивованих рослин стевії за умов *in vitro*. Физиология и биохимия культурных растений. 1998. Т. 30, № 4. С. 294-277.

152. Саматова И.С. Динамика морфофизиологических показателей ежевики, малины и земляники при длительном хранении *in vitro*: дисс. ... канд. биол. наук (03.00.12 «Физиология и биохимия растений», 03.00.15 «Генетика»). Санкт-Петербург, 2009. 167 с.

153. Сельдимирова О.А., Катасонова А.А., Круглова Н.Н. Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллюсах различного происхождения у пшеницы. Физиология и биохимия культурных растений. 2011. Т. 43, № 4. С. 297-306.

154. Сергеева Л.Е., Мартыненко А.И. Осморегулирование у клеточных линий табака, устойчивых к солевому стрессу. Физиология и биохимия культурных растений. 1992. №4. С. 383-387.

155. Сидоров В.А. Биотехнология растений. К.: Наукова думка, 2004. 280 с.

156. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. К.: Наукова думка, 1990. 280 с.

157. Скрипченко Н. В. Динаміка вмісту фенольних речовин в пагонах актинідії та регенераційна здатність при розмноженні. Вісник харківського національного аграрного університету. Серія «Біологія». 2009. Вип. 1 (16). С. 63–67.

158. Смольникова, Я.В., Величко Н.А. Биологически активные вещества каллусной ткани наперстянки пурпурной. Химия растительного сырья. 2011. № 4. С. 239-243.

159. Соболева Г.В. Влияние осмотического стресса на процессы роста и морфогенеза в длительно пассируемых каллусных тканях гороха (*Pisum sativum* L.). Зернобобовые и крупяные культуры. 2013. Вып. 1, № 5. С. 8-14.

160. Соколовська-Сергієнко О.Г., Стасик О.О. Особливості реакції фотосинтетичного апарату контрастних за посухостійкістю сортів озимої пшениці на ґрунтову посуху. Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. 2008. Т. 6, №1. С. 137-144.

161. Ставцева И.В., Егорова Н.А. Влияние генотипических особенностей на процессы каллусогенеза и регенерацию растений *in vitro* у фенхеля. Экосистемы Крыма их оптимизация и охрана: тематический сб. науч. тр. Симферополь: Таврия, 2005. – Вып. 15. С. 50-56.

162. Ставцева И.В., Егорова Н.А. Гормональная регуляция индукции

соматического эмбриогенеза в длительно культивируемом каллусе фенхеля. Биологически активные вещества растений – изучение и использование: материалы Международной научной конференции (29-31 мая 2013 г., Минск.) Минск: ГНУ «Центральный ботанический сад Академии наук Беларуси», 2013. С. 346-347.

163. Таран Н.Ю. Каротиноїди фотосинтетичних тканин за умов посухи. Физиология и биохимия культурных растений. 1999. Т.31, № 6. С. 414-422.

164. Тарасенко Г. А. Використання імуноферментного аналізу (ІФА) в діагностиці вірусів представників роду *Corylus* L. Автохтонні та інтродуковані рослини. 2013. № 9. С. 137–141.

165. Тарасенко Г. А. Віруси та вірусні хвороби рослин роду *Corylus* L. в екологічних умовах НДП Софіївка НАНУ. Автохтонні та інтродуковані рослини. 2014. № 10. С. 168–174.

166. Тимофеева О.А. Биотехнологические подходы к созданию новых форм растений: учебное пособие. Казань, 2006. 54 с.

167. Тимофеева С.Н., Эльконин Л.А. Опыт клонального микроразмножения бобовника анагировидного. Бюллетень Ботанического сада Саратовского государственного университета. 2008. № 7. С. 230-232.

168. Титов С.Е., Кочетов А.В., Коваль В.С., Шумный В.К. Трансгенез как способ повышения устойчивости растений к абиотическим стрессам. Усп. соврем. Биологии. 2003. Вып. 123. С. 487-494.

169. Тихомирова Л.И., Шмаков А.И., Кечайкин А.А. Эффективный способ массового размножения *Potentilla alba* L. в культуре *in vitro*. Биотехнология и общество в XXI веке. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. С. 420-425.

170. Тихомирова, Л.И. Биотехнологические аспекты в декоративном садоводстве на примере *Iris sibirica* L. Биотехнология и общество в XXI веке. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. С. 411-415.

171. Тітаренко Т.Є., Медведєва Т. В., Сатіна Г. М., Сатіна Л. Ф. Розмноження буковинських сортів горіха грецького (*Juglas regia* L.). Садівництво. 2009. Вип. 62. С. 58–64.
172. Туманов И.И., Бутенко Р.Г., Оголевец И.В., Сметюк В.В. Повышение морозостойкости культуры каллусной ткани ели путём вымораживания менее устойчивых клеток. Физиология растений. №24. Вып. 5. С. 895-899.
173. Туть Е.А., Упадышев Т.М. Особенности микроразмножения актинидии и лимонника китайского. Сельскохозяйственная биология. 2008. № 3. С. 96-101.
174. Тюкавин Г.Б. Клональное размножение якона (*Plymnia sonchifolia* Roerp. & Ensl.) *in vitro* и *in vivo*. Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: материалы IX Международной конференции (8-12 сентября 2008 г., Звенигород) М: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. С. 412.
175. Улинець В.З. Вплив вірусної інфекції на спектральні характеристики фотосинтетичного апарату рослин родини Solanaceae: автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.06 «Ботаника». К., 2002. 22 с.
176. Федулова Т.П. Генетически модифицированные растения сахарной свеклы: проблемы и перспективы использования. Сахарная свекла. 2008. №10. С. 18-20.
177. Филинова М.В., Чуринов А.А., Шилова И.В. Сравнительное исследование химического состава двух линий каллусной культуры *Copium Maculatum* L. Биология – наука XXI века: материалы 20-ой Международной школы-конференции молодых ученых (18-22 апреля 2016 г. Пущино). Пущино: ООО «Буки Веди», 2016. С. 246.
178. Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Удосконалення елементів технології мікроклонального розмноження *Cornus Mas* L. VI Міжнародна науково-практична конференція. «Біотехнологія: звершення та надії», присвячена до 120-річчя НУБіП України. 14-16 листопада 2017. м. Київ. С. 90–91.
179. Хазиева Ф.М., Коротких И.Н., Осипов В.И. Селекция лекарственных растений с применением метаболомного анализа. Труды кубанского

государственного аграрного университета. 2015. №4 (55). С.267-272.

180. Хлебова Л.П., Никитина Е.Д., Пронина Р.Д. Соматоклональная изменчивость в культуре незрелых зародышей *Triticum aestivum* L. Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: материалы XV международной практической конференции (23-26 мая 2016 г., Барнаул). Барнаул: Алтайский гос. Университет, 2016. С. 442-445.

181. Цыренев В.Ж. Основы биотехнологии: культивирование изолированных клеток и тканей растений: учебно-методическое пособие. Улан-Уде: ВСГТУ, 2003. 57 с.

182. Чайковский В.А. Особенности морфогенеза в культуре вегетативных органов мяты *in vitro*. Биология – наука XXI века: материалы 20-ой Международной школы-конференции молодых ученых (18-22 апреля 2016 г., Пущино). Пущино: ООО «Буки Веди», 2016. С. 247.

183. Черкасова Н.Н., Жужжалова Т.П., Землянухина О.А. Влияние сорбита на повышение засухоустойчивости сахарной свеклы. Сахарная свекла. 2010. №9. С. 23-25.

184. Чеченева Т.Н. Изменчивость злаков в культуре *in vitro* и в процессе регенерации растений. Физиология и биохимия культ.растений. 2006. Т. 38, № 2. С. 163-175.

185. Чмелева С.И., Бугара А.М., Омельченко А.В. Получение каллусных культур олеандра обыкновенного (*Nerium olrandar* L.) и их анализ на содержание сердечных гликозидов. Ученые записки Таврического Национального университета им. В. И. Вернадского. Серия биология и химия. 2009. Т. 22 (61), № 2. С. 3-8.

186. Чугункова Т.В. Використання клітинної селекції для створення стійких форм буряків. Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41. № 6. С. 509-514.

187. Чугункова Т.В., Дубровна О.В. Особенности регенерации растений инбредных линий сахарной свеклы в культуре *in vitro*. Биополимеры и клетка. 1997. Т. 13. №4. С. 303-307.

188. Чумакова И.М., Фоменко Т.И. Ростовые характеристики каллусных тканей кадила сарматского. Биологически активные веществарастений – изучение и использование: материалы Международной научной конференции (29-31 мая 2013 г., Минск). Минск: ГНУ «Центральный ботанический сад Академии наук Беларуси», 2013. С. 354-355.

189. Шевякова Н.И. Метаболизм и физиологическая роль пролина в растениях при водном и солевом стрессе. Физиология растений. 1983. Т. 30. Вып. 4. С. 768-781.

190. Шейко Е.А., Мусатенко Л.И. Особенности репродуктивной биологии и введение в культуру *Himsntoglossum caprinum* (bieb.) С. Koch и *Ophrys oestrifea* Vieb. Вісник Харківського Національного аграрного університету. Серія біологія. 2011. Вип. 1 (22). С. 84-90.

191. Шипунова А.А., Валиков В.А. Укоренение микропобегов сирени в вермикулите. Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: X Международная конференция (14-18 октября 2013 г., Казань). Казань: Центр инновационных технологий. 2013. С. 401.

192. Широков А.И., Крюков Л.А. Основы биотехнологии растений: электронное учебно-методическое пособие. Нижний Новгород:Нижегородский госуниверситет, 2012. 49 с.

193. Энхтайван А., Кузьмина Е.А., Калашкикова Е.А. Влияние условий культивирования на размножение растений рода *Astragalus* L. и накопление вторичных метаболитов в культуре *in vitro*. Биотехнология и общество в XXI веке. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. С. 431-435.

194. Якимова О.В., Егорова Н.А. Введение в культуру *in vitro* и микроразмножение *Melissa officinalis* L. Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия в селекции растений: материалы Международной научной конференции (18-20 августа 2014 г., Минск). Минск: ГНУ «Центральный ботанический сад Академии наук Белоруссии», 2014. С. 172-175.

195. Якимова О.В., Егорова Н.А. Влияние некоторых факторов на микроразмножение *Origanum vulgare in vitro*. Биоразнообразии. Экология.

Адаптация. Эволюция: материалы VI Международной конференции молодых ученых, посвященной 150-летию со дня рождения известного ботаника В. И. Липского (13-17 мая 2013 г., Одесса). Одесса: Печатный дом, 2013. С. 302-303.

196. Якимова О.В., Егорова Н.А. Влияние состава питательной среды и генотипа на клональное микроразмножение душицы *in vitro*. Якимова. Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2016. №4(55). С. 304-309.

197. Якимова О.В., Егорова Н.А. Влияние состава питательной среды и генотипа на клональное микроразмножение душицы *in vitro*. Труды кубанского государственного аграрного университета. 2015. Вып. 4 (55). С. 304-309.

198. Якимова О.В., Егорова Н.А. Индукция каллусогенеза в культуре изолированных органов *Origanum vulgare* L. Масличные культуры. 2014. Вып. 2. С. 159-160.

199. Якимова О.В., Егорова Н.А. Исследование влияния некоторых факторов на каллусообразование у мелиссы (*Melissa officinalis* L.) в культуре *in vitro*. Вестник удмуртского университета: Биология. Науки о земле. 2014. Вып. 4. С. 39-45.

200. Якимова О.В., Егорова Н.А. Исследование влияния состава питательной среды на микроразмножение *Origanum vulgare* L. *in vitro*. Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (21-26 сентября 2015 г., Петрозаводск). Петрозаводск: Каркльский научный центр РАН, 2015. С. 611.

201. Якимова О.В., Егорова Н.А. Каллусогенез и морфогенез в культуре изолированных органов и тканей *Melissa officinalis* L. *in vitro*. Ученые записки ТНУ им. В.И. Вернадского, серия биология и химия. 2014. Т. 27 (66), № 5. Спецвыпуск. С. 191-201.

202. Якимова О.В., Егорова Н.А. Клональное микроразмножение душицы *in vitro*. Таврический вестник аграрной науки. 2015. № 2 (4). С. 39-44.

203. Якимова О.В., Егорова Н.А. Особенности морфогенеза эксплантов *Melissa officinalis* L. на первом этапе микроразмножения *in vitro*. Труды

Кубанского государственного аграрного университета. 2016. №3 (60). С. 339-344.

204. Якимова, О.В. Влияние некоторых факторов на микроразмножение *Melissa officinalis* при введении эксплантов в культуру *in vitro*. 21-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых: сборник тезисов (17-21 апреля 2017 г., Пущино). Пущино: ООО «Буки Веди», 2017. С. 270-271.

205. Abid Ali Khan M.M. Identification of phyto-saponins as novel biodynamic agents: an updated overview / M.M. Abid Ali Khan, T.S. Naqvi, M.S. Naqvi // Asian J. Exp. Biol. Sci. – 2012. – Vol. 3. - №3. – P. 459 – 467.

206. Adkins S.W., Kunanuvatchaidah R., Godwin I.D. Somaclonal variation in rice-drought tolerance and other agronomic characters. Australian Journal of Botany. 1995. № 43. P. 201-209.

207. Ali M., Mujib A., Tonk D., Zafar N. Plant regeneration through somatic embryogenesis and genome size analysis of *Coriandrum sativum* L. Protoplasma. 2017. № 254(1). P. 343-352.

208. Al-Jibbori A.M.J., Abd A.S., Majeed D.M. Influence of abiotic elicitors on accumulation of thymol in callus cultures of *Origanum vulgare* L. Journal of life sciences. 2012. Vol. 6. P. 1094-1099.

209. Arafteh R.M., Shibli R.A., Al-Mahmoud M. Callusing suspension culture and secondary metabolites production in Persian oregano (*Origanum vulgare* L.) and Arabian oregano (*O. syriacum* L.). Jordan journal of agricultural sciences. 2006. Vol. 2, № 3. P. 274-282.

210. Aramburu J., Rovira M. Incidence and natural spread of apple mosaic ilarvirus in hazel in north-east Spain. Plant Pathology. 2000. T. 49. № 4. С. 423–427.

211. Aramburu J., Rovira M. The effects of apple mosaic ilarvirus (ApMV) on hazelnut (*Corylus avellana* L.). The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 1998. T. 73. № 1. С. 97–101.

212. Arnold, S., Sabala I., Bozhkov P. Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2002. Vol.69 (3). P. 233-249.

213. Babu R.N., Divakaran M., Ray R.P., Anupama K., Peter K.V., Sarma Y.R.

Bitechnological Approaches in Improvement of Spices: A Review. In Book: Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology. Springer: New Delhi, Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 2015. P.487-516.

214. Bartels D., Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. Crit. Rev. Plant Sci. 2005. V. 21. P. 1-36.

215. Bhatnagar-Mathur P., Valdez V., Sharma K.K. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospects and prospects. Plant Cell Rep. 2008. V. 27. №3. P. 411-424.

216. Bilska A, Sowinski P. Closure of plasmodesmata in maize (*Zea mays*) at low temperature: a new mechanism for inhibition on photosynthesis. Ann Bot. 2010. 106, № 5. P. 675-686.

217. Biswas M.K., Dutt M., Ruy U.K. Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. Scientia Horticultural. 2009. No. 122. P. 409-416.

218. Bohnert H.J., Sheveleva E. Plant stress adaptations, making metabolism move. Curr. Opin. Plant Biol. 1998. V. 1. P. 267-274.

219. Bolouk S.G., Kazemitabar S. K., Sinaki J. M. *In vitro* culture of the peppermint plant (*Mentha piperita*) without the use of hormones. International Journal of Agricultural and Crop Sciences. 2013. Vol. 6 (18). P. 1279-1283.

220. Bracamonte M.A., Bima P., Bongiovanni G. Nutrition and Micropropagation of *Origanum vulgare* × *apalii*. Molecular Medicinal Chemistry. 2006. Vol. 11. P. 6-7.

221. Bray E.A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. Responses to abiotic stress. Biochemistry and molecular biology of plants. 2000. P. 1158-1249.

222. Burgess J. E., Thompson M. M. Shoot development and bud mite infestation in hazelnut (*Corylus avellana*). Annals of applied biology. 1985. T. 107. № 3. C. 397–408.

223. Caboche M., Muller J.F. Use of a medium allowing low cell density growth for *in vitro* selection experiments: isolation of valine-resistant clones from nitrosoguanidine-mutagenized cells and gamma-irradiated tobacco plants. Plant cell

cultures: Results and perspectives. Amsterdam: North Holland Biomedical Press, 1980. P. 133-138.

224. Canti R.G., Spear F.G. The effect of gamma irradiation on cell division in tissue culture *in vitro*. Proceedings of The Royal Society. Biological Sciences. 1997. Vol. 102. P. 92-103.

225. Chaves M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. J. Exp. Bot. 1991. V. 42. P. 1-16.

226. Choluj D., Karwowska R., Ciszewska A., M. Jasinska Influence of long-term drought stress on osmolyte accumulation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants. Acta Physiologiae Plantarum. 2008. V. 30(5). P. 679-687.

227. Cliff M.B., Meinerz A.R., Xavier M. *In vitro* activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. Brazilian journal of microbiology. 2010. Vol. 41. P. 116-123.

228. Darwesh Hadeer Y.A., Nour El-Deen A.H., Fayad Eman M. *In vitro* investigation for improving secondary metabolites in *Origanum vulgare* plants using tissue culture technique at taif governorate, KSA. Research journal of pharmaceutical, biological and chemical. 2015. Vol. 6 (5). P. 1117-1117.

229. Dasan B. G., Boyaci I. H., Mutlu M. Nonthermal plasma treatment of *Aspergillus* spp. spores on hazelnuts in an atmospheric pressure fluidized bed plasma system: Impact of process parameters and surveillance of the residual viability of spores. Journal of Food Engineering. 2017. T. 196. C. 139–149.

230. David Raja H., Arockiasamy D.I. *In vitro* propagation of *Mentha viridis* L. from nodal and shoot tip explants. Plant Tissue Cult. & Biotech. 2008 Vol. 18 (1). P. 1-6.

231. Delauney A.J., Verma D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. Plant J. 1993. V.4. P. 215-223.

232. Derwich E., Benziane Z. Phytochemical analysis and *in vitro* antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* from Morocco. American-Eurasian Journal of scientific research. 2010. Vol. 5 (2). P. 120-129.

233. Detrez C., Sangwan R.S., Sangwan, Norreel B.S. Phenotypic and karyotypic status of plants regenerated from direct organogenesis in petiole culture. *Theor. And Appl. Genet.* 189. Vol. 77. P. 462-468.
234. Dimitrova Z., Dimov N. Antiherpes effect of *Melissa officinalis* L. extracts. *Acta-Microbiol-Bulg.* 1993. p. 65-72.
235. Dovzhenko A., Hans-Ulrich Koop Sugar beet: shoot regeneration from callus and callus protoplasts. *Planta.* 2003. V. 217. P. 374-381.
236. Dragisga R., Djilianov D., Dencher P., Atanassov A. *In vitro* selection for somatic tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bulgarian Journal of Plant Physiology.* 1996. № 22(3-4). P. 30-39.
237. Ebad F. A.-S., Marwa EL-Sebai Abd EL-sadek, EL-Kazzaz A.A. Micropropagation of four potato cultivars *in vitro*. *Academia Journal of Agricultural Research.* 2015. Vol. 3 (9). p. 184-188.
238. Eimer M. Transgenic drought- and salt-tolerant plant. *Genet. Engineer. Newslett.* 2004. Spec. Issue 15. P. 1-14.
239. El-Gengaihi S., Taha H. S., Kamel A. M. *In vivo* and *in vitro* comparative studies of *Origanum* species. *Journal of food, Agriculture & environment.* 2006. Vol. 4 (3&4). P. 127-134.
240. Endang G.L. Review: *In vitro* selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance. *Biodiversitas.* V. 7. №3. P. 297-301.
241. Erdag B.B., Yel. C. Emek, S. K. Aydogan Clonal propagation of *Dorystoechas hastate* via axillary shoot proliferation. *Turk J Bot.* 2010. Vol. 34. p. 233-240.
242. Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S.M.A. Plant drought stress: effect, mechanism and management. *Agron. Sustain.* 2009. Vol. 299. P. 185-212.
243. Floou-Paneri P., Palatos G., Govaris A. Oregano herb versus oregano essential oil as feed supplement to increase the oxidative stability of turkey meat. *International journal of poultry science.* 2005. Vol. 4 (11). P. 866-871.
244. Frąszczak B., Gąsecka M., Golcz A. The chemical composition of lemon

balm and basil plants grown under different light conditions. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus. 2015 Vol. 14 (4). P. 93-104.

245. Galeş R., Preotu A., Toma C. Aspects of floral structure and morphogenesis in *Melissa officinalis*. Biology vegetable. 2010. № 2. P. 15-17.

246. Garcha-Beltrjn J.M., Esteban M.A. Properties and applications of plants of Origanum. Sp. Genus. SM J Biol. 2016. Vol. 2 (1). P. 1006-1016.

247. Ghiorghita G.I., Maftai D.E.St., Nicuta D.N. Investigations on the *in vitro* morphogenetic reaction of *Melissa officinalis* L. species. Anal. stiintifice ale Universitatii "Alexandru Ioan Cuza", Geneticasi Biologie Moleculara. 2005. Vol. 5. P. 119-126.

248. Ghosh N., Caraway E., Bandhu Das A., Dani G. Ravi. *In vitro* regeneration of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) via leaf explants and callusing. Annals of Plant Sciences. 2013. V. 2(10). P. 405-411.

249. Goleniowski M.E., Flamarique C., Bima P. Micropropagation of *Oregano* (*Origanum vulgare x applii*) from meristem tips. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2003. Vol. 39. P. 125-128.

250. Gonçalves S., Romano A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. Biotechnology Advances. 2013. Vol. 31. P. 166-174.

251. Grover A., Sahi C., Sanan A. Timing abiotic stresses in plants through genetic engineering: current strategies and perspective. Plant Sci. 1999. V. 143. P. 101-111.

252. Gurel E. Callus and root development from leaf explants: variability at variety, plant and organ level. Turk. J. of Bot. 1997. V. 21. P. 131-136.

253. Gurel E., Gurel S., Lamaux P.G. Biotechnology applications for sugar beet. Crit Rev. Plant Sci. 2008. V. 27. P. 108-140.

254. Gurel S., Gurel E., Kaya Z. Callus development and indirect shoot regeneration from seedling explants cultured *in vitro*. Turkish Journal of Botany. 2001. Vol. 25. № 1. P. 25-33.

255. Habibi D., Taleghani F.D., Oroojnia S. Physiological evaluation of sugar beet genotype under drought stress. 2nd International Conference on Chemical Engineering and Applications. 2011. Vol. 23. P. 96-101.
256. Hare P.D., Cress W.A., Van Staden J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell and Environm.* 1998. V. 21. P. 535-553.
257. Harms C.T., Baktir I., Oertli J.I. Clonal propagation *in vitro* of red beet (*Beta vulgaris* L.) by multiple adventitious shoot formation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1983. V. 2. P. 93-102.
258. Hisano H., Kimoto Y., Hayakawa H. High frequency Agrobacterium-mediated transformation and plant regeneration via direct shoot formation from leaf explants in *Beta vulgaris* and *Beta maritima*. *Plant Cell. Rep.* 2004. Vol. 22. №12. P. 910-918.
259. Hoffman C.M., Huijbregts T., Swaaji N.V., Janson R. Impact of different environments in Europe on yield and quality of sugar beet genotypes. *European J. Agron.* 2009. Vol. 30. P. 17-26.
260. Hussein Y., Amin G., Hashem E.S. *In vitro* cultivation of marjoram (*Origanum majorana* L.) under influence of 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid) as Herbicide. *Live science journal.* 2014. Vol. 11 (2). P. 249-257.
261. Ingram J., Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1996. V. 47. P. 377-403.
262. Iola-Boldura O.M., Radu F., Popescu S. Regeneration, micropropagation, callus cultures and somatic embryogenesis of common sage (*Salvia officinalis* L.). *Bull. UASVM Hort.* 2010. Vol. 67, No. 1. P. 308-313.
263. Jain D.C., Abid Ali Khan M.M., Zaim M. Antiviral evaluations of some steroids and their glycosides: a new report. *Nat. Acad. Sci. Letters.* 1990. Vol. 13. P. 41-42.
264. Jayakumar S., Ramalinagam R. Influence of additives on enhanced *in vitro* shoot multiplication of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. *Not Sci Biol.* 2013. Vol. 5 (3). P. 338-345.

265. Kawamitsu Y., Driscoll T., Boyer JS. Photosynthesis during desiccation in an Intertidal Alga and a Land Plant. *Plant Cell Physiol.* 2000. V. 41(3). P. 344-353.
266. Khan A., Bashir S., Khan S.R. Antiurolithic activity of *Origanum vulgare* is mediated through multiple pathways. *BMC Complementary and alternative medicine.* 2011. No. 11 (96). P 1-16.
267. Khosh-Khui M. Biotechnology of scented Roses: a review. *International Journal of Horticultural Science and Technology.* 2014. Vol. 1 (1). P. 1-20.
268. Kryzhko A., Yakimova O., Kuznetsova L., Gorelova V. Stimulating effect of *Bacillus thuringiensis* on establishment of *Origanum vulgare* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology.* Tampa. 2019. Vol. 55. P. 73-74.
269. Kukreja A.K., Cimap P.O. *In vitro* propagation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) through nodal bud culture of adult plant. *Journal of Spices and Aromatic Crops.* 1999. Vol. 8 (2). P. 171-177.
270. Kumari N., Saradhi P.P. Regeneration of plants from callus culture of *Origanum vulgare* L. *Plant Cell Rep.* 1992. Vol. 11, No. 9. P. 476-479.
271. Leelavathi D., Kuppan N. Callus induction and regeneration of multiple shoot from *in vitro* apical bud explant of *Origanum vulgare* an important medicinal plant. *International journal of research in pharmacy and chemistry.* 2013. Vol. 3 (4). P. 898-903.
272. Lestari E.G. Review: *In vitro* selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance. *Biodiversitas.* 2006. V. 7. №3. P. 297-301.
273. Lucky PLANTS, OOO. URL: <https://lucky-plants.all.biz/>
274. Mafakheri A., Siosemardeh A., Bahramnejad B., Struik P.C., Sohrabi Y. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal of Crop Science.* 2010. V. 4(8). P. 580-585.
275. Maggio A., Miyazaki S., Veronese P., Fujita T., Ibeas J.I., Damsz B., Narasimhan M.L., Hasegawa P.M., Joly R.J., Bressan R.A. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction. *Plant J.* 2002. V. 31. P. 699-712.

276. Manivannan P., Abdul Jaleel C., Sankar B., Kishorekumar A., Somasundaram R., Lakshmanan G.M.A., Panneerselvam R. Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. *Colloids and Surfaces B*. 2007. V. 59. P. 141-149.
277. McCue K.F., Hanson A.D. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotechnol.* 1990. V. 8. P. 358-362.
278. Meftahizade H., Lotfi M., Moradkhani H. Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. *African J. of Biotechnology*. 2010. Vol. 9, No. 28. P. 4314-4321.
279. Meftahizade H., Moradkhani H., Naseri B. Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes. *J. of Medicinal Plants Research*. 2010. Vol. 4, No. 3. P. 240-246.
280. Mofizur Md.I., Hasegawa-Rijeka H. Waterstress. InTech, 2011. 310 p.
281. Mohd M., Khan Taqi A., Firoz M. Effect of abiotic stress on synthesis of secondary plant products: a critical review. *Agricultural Reviews*. 2011. Vol. 32 (3). P. 172-182.
282. Mohebalipour N., Aharizad S., Mohammadi S.A. Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 2012. Vol. 10 (1). P. 280-286.
283. Mokhtarzadeh S., Demirici B., Goger G. Characterization of volatile components in *Melissa officinalis* L. under *in vitro* condition. *Journal of essential oil research*. 2017. Vol. 29, No. 4. P. 299-303.
284. Molinari H.B., Marur C.J., Daros E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiol. Plant*. 2007. V. 14. P. 2837-2847.
285. Moradkhani H., Sargsyan E., Bibak H. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: a review. *J. of Medicinal Plants Research*. 2010. Vol. 4, No. 25. P. 2753-2759.

286. Moreira M.F., Appezzato-Gloria B., Zaidanll L.B.P. Anatomical aspects of IBA-treated microcuttings of *Gamphrenamacrocephala* St.-Hil.il Braz. Arch. Biol. and Technol. 2000. Vol. 43, No. 2. P. 221-227.
287. Myagkih E., Yakimova O. Optimization of conditions for rooting and *in vivo* establishment of microclones of *Origanum vulgare* L. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Tampa. 2019. Vol. 55. P. 74.
288. Myagkih E., Yakimova O., Mishnev A.V. Some features if vegetative propagation of *Origanum vulgare* L. In Vitro Cellular & Developmental Biology Missouri. 2018. Vol. 54, No. 4. P. 492.
289. Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K. Regulons involved in osmotic stress responsive and cold stress responsive gene expression in plants. *Physiol. Plant.* 2006. V. 126. P. 62-71.
290. Nanova Zh., Slavova Y. Mass vegetative propagation of winter marjoram (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum* (Link) jetswaart). Bulgarian journal of agricultural science, National centre for agrarian sciences. 2006. Vol. 12. P. 531-536.
291. Nas M.N. P.E. Read. 2004. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. *Scientia Horticulturae.* 101. P. 189–200.
292. Neumann D., Nover L., Parthier B. Heat shock and other stress response system of plants. *Biol. Zentralb.* 1989. V. 108. №1. P. 1-146.
293. Neumann K.H., Kumar A., Sopory S.K. Recent Advances In Plant Biotechnology And Its Applications. New Delhi, Intern. Publ. House Pvt. Ltd., 2008. 694 p.
294. Oana C.T., Falticeanu M., Prisecaru M. Considerations regarding the effects of growth regulators over the *invitro* morphogenetic reaction at *Origanum vulgare* L. *J. Plant Develop.* 2008. Vol. 15. P. 133-138.
295. Oana C.T., Falticeanu M., Prisecaru M. Studies regarding the micropropagation of *Origanum vulgare* l.(oregano, wild marjoran) through *in vitro*” tissue culture. *Jordan Journal of Agricultural Science.* 2006. Vol. 2, No. 3. P. 1115-1120.

296. Oliveira I. et al. Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. Food chemistry. 2007. T. 105. № 3. P. 1018–1025.

297. Oluk E.A., Cakır A. Micropropagation of *Origanum sipyleum* L., an endemic medicinal herb of Turkey. African Journal of Biotechnology. 2009. Vol. 8 (21). P. 5769-5772.

298. Ommen O.E., Donnelly A., Vanhoutvin S., Oijen M., Manderscheid R. Chlorophyll content of spring wheat flag leaves grown under elevated CO₂ concentrations and other environmental stresses within the ESPACE-wheat project. Eur. J. Agron. 1999. V.10. P. 197-203.

299. Özbek T., Güllüce M., Sahin F. Investigation of the antimutagenic potential of the methanol extract of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. Turk J. Biol. 2008. Vol. 32. P. 271-276.

300. Özcan M., Chalchat J.C. Composition of the essential oil of *Origanum majorana* and *O. vulgare* subsp. *hirtum* growing wild in Turkey. Journal of spices and Aromatic Crops. 2002. Vol. 11 (1). P. 45-49.

301. Özkum D. *In vitro* shoot Regeneration of oregano (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz & Davis). Hacettepe journal of biology and chemistry. 2007. Vol. 35 (2). P. 97-100.

302. Pedrieri S. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2001. № 64. P. 185-210.

303. Petkova D., Nedjalkov D., Djilianov D. Early screening for drought tolerance in cultivated alfalfa. Bulgarian Journal of Agricultural Science. 1995. № 1(4). P. 429-432.

304. Plant Preservative Mixture. URL: <https://www.plantcelltechnology.com/plant-preservative-mixture-ppm/>

305. Popova A.F., Ivanenko G.F., Ustinova A.Yu, Zaslavsky V.A. Localization of callose in microspores and pollen grains in *Sium latifolium* L. plants in different water regimes. Cytology and Genetics. 2008. № 6. P. 363-368.

306. Postman J. D., Mehlenbacher S. A. Apple mosaic virus in hazelnut germplasm. III International Congress on Hazel- nut 351. 1992. C. 601-610.

307. Prakash M.G., Gurusurthi K. Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Tiss OrganCult*. 2010. Vol. 100 (1). P. 13-20.

308. Preuss H.G., Echard B., Enig M. Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Mol. Cell. Bioch.* 2005. No. 272 (1-2). P. 29-34.

309. Reed B. M. et al. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*. Springer, Dordrecht, 1997. C. 169–174.

310. Reed B. M. et al. Internal bacterial contamination of micropropogated hazelnut: identification and antibiotic treatment. *Plant cell, Tissue and organ culture*. 1998. T. 52. № 1–2. C. 67–70.

311. Rihan H. Z. et al. The effect of using PPM (plant preservative mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. *Scientia horticulturae*. 2012. T. 141. C. 47–52.

312. Ryding P.O. Pericarp structure and phylogeny of tribe Menthae (Lamiaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 2010. Vol. 285, No. 3-4. P. 165-175.

313. Saad E., Raja A. *In vitro* micropropagation of spinach beet (*Beta vulgaris* L.) under effect of saltstress. *Amer. Soc. Plant. Biol. (ASPB)*. 2003. Vol. 34. №4. P. 503.

314. Sairam R.K., Veerabhadra R.K., Srivastava G.C. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci*. 2002. V. 163. P. 1037-1046.

315. Savini I., Arnone R., Catani M. V. Oregano induces programmed cell death in human colon cancer cells. *Nutr Cancer*. 2009. Vol. 61 (3). P. 381-389.

316. Schmitzer V. et al. Roasting affects phenolic composition and antioxidative activity of hazelnuts (*Corylus avellana* L.). *Journal of food science*. 2011. 76.(1) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21535710/>.
317. Serraj R., Krishnamurthy L., Kashiwagi J., Kumar J., Chandra S., Crouch JH. Variation in root traits of chickpea (*Cicer arietinum* L.) grown under terminal drought. *Field Crops Res*. 2004. V. 88. P. 115-127.
318. Sevik H., Guney K. Effects of IAA, IBA, NAA, and GA3 on rooting and morphological features of *Melissa officinalis* L. stem cuttings. *The Scientific World Journal*. 2013. Vol. 2013. P. 1-5.
319. Shakeri S.M., Kazemitabar S.K., Sinaki J.M. *In vitro* culture of *Melissa officinalis* without the use of hormones. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 2013. Vol. 6 (20). P. 1382-1387.
320. Shi Dongxue. Effects of culture media and plant growth regulators on micropropagation of willow (*Salix matsudana* ‘Golden Spiral’) and hazelnut (*Corylus columna* ‘Te Terra Red)'' (2014). Theses, Dissertations, and Student Research in Agronomy and Horticulture. 79. URL: <http://digitalcommons.unl.edu/agronhortdiss/79>.
321. Shimoyamada M., Suzuki M., Sonta M. Antifungal activity of saponins fraction obtained from *Asparagus officinalis* L. and its active principle. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1990. Vol. 54. P. 2553-2557.
322. Sidorov V., Menczel L., Maliga P. Isoleucine-requiring *Nicotiana* plant deficient in threoninedeaminase. *Nature*. 1981. Vol. 294. P. 87-88.
323. Silva S., Sato A., Salgueiro C. L. Lage Essential Oil Composition of *Melissa officinalis* L. Produced under the Influence of growth regulators. *J.Braz. Chem*. 2005. No. 16. P. 1387-1390.
324. Smirnoff N. Plant resistance to environmental stress. *Curr. Opin. Biotechnol*. 1998. V. 9. P. 214-219.
325. Sparg S.G., Light M.E., van Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethopharmacol*. 2004. Vol. 94. P. 219-243.
326. Stanojevic D., Comic Lj., Stefanovic O. *In vitro* synergistic antibacterial

activity of *Melissa officinalis* L. and some preservatives. Spanish Journal of Agricultural Research. 2010. Vol. 8 (1). P. 109-115.

327. Stoops J. et al. Decontamination of powdery and granular foods using Continuous Wave UV radiation in a dynamic process. Journal of Food Engineering. 2013. T. 119. №. 2. C. 254–259.

328. Stuhlfauth T., Steuer B., Fock H. Chlorophylls and carotenoids under water stress and their relation to primary metabolism. Photosynthetica. 1990. V.24(3). P. 412-418.

329. Tămas M., Benedec D., Vlase L. The identification and quantitative determination of rosmarinic acid by TLC and HPLC-MS from medicinal *Lamiaceae* species. 4-th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of South-East European Countries (28th-31st of May, 2006, Iasi, Romania). 2006. P. 66.

330. Tavares A.C., Pimenta M.C., Gonsalves M.T. Micropropagation of *Melissa officinalis* L. through proliferation of axillary shoots. Plant Cell Repts. 1986. Vol. 15, No. 6. P. 441-444.

331. Tetu T., Sangwan R.S., Sangwan-Norreel B.S. Hormonal control of organogenesis and somatic embryogenesis in callus. J. Exp. Bot. 1987. V. 38. P. 506 - 517.

332. Thui S.T., Kukreja A.K. An efficient protocol for high-frequency direct multiple shoot regeneration from internodes of peppermint (*Mentha × piperita*). Natural Product Communications. 2010. Vol. 5, No. 12. P.1945-1946.

333. Van der Bulk R.W. Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding - a review. Euphytica. 1991. № 56. P. 269-285.

334. Vaughn K.C., Talbot M.J., Offler C.E., McCurdy D.W. Wall ingrowths in epidermal transfer cells of *Vicia faba* cotyledons are modified primary walls marked by localized accumulations of arabinogalactan proteins. Plant Cell Physiol. 2007. 48 (1). P. 159-168.

335. Verbruggen N., Hermans C. Proline accumulation in plants: a review. Amino Acids. V. 35. P. 753-759.

336. Verma D.P.S., Hong Z. Plant callose synthase complexes. *Plant Mol. Biol.* 2001. 47, № 6. P. 693-701.
337. Vierling E., Kimpel J.A. Plant responses to environmental stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1992. V. 3. №2. P. 164-170.
338. Vinken J.P., Heng L., de Groot A. Saponins, classification and occurrence in plant kingdom. *Phytochemistry.* 2007. Vol. 68. P. 275-297.
339. Walker J.B., Sytsma K.J. Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Annals of Botany.* 2007. Vol. 100, No. 2. P. 375-391.
340. Wang W., Vinocur B., Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta.* 2003. V. 218. P. 1-14.
341. Yakimova O., Egorova N. Induction of morphogenesis *in vitro* for *Melissa officinalis* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Tampa.* 2019. Vol. 55. P. 75.
342. Yakimova O.V., Egorova N.A., Zagorskaya M.S., Stavtseva I.V. Clonal micropropagation *in vitro* of *Melissa officinalis* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology.* Missouri. 2018. Vol. 54, No. 4. P. 487.
343. Yamada M., Morishita H., Urano K. Effects of free proline accumulation on petunias under drought stress. *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. P. 1975-1981.
344. Yang A.F., Duan X.G., Gu X.F. Efficient transformation and production of plants with improved salt-tolerance. *Plant Cell, Tissue Organ Culture.* 2005. V. 83. P. 259-270.
345. Yidirim M.U. Micropropagation of *Origanum acutidens* (HAND.-MAZZ.) ietswaart using stem node explants. Hindawi publishing corporation the scientific world journal. 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/276464>.
346. Yildiz M., Alizadeh B., Beyaz R. *In vitro* growth and shoot regeneration from petiole of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) lines at different ploidy levels. *Journal of Sugar Beet Research.* 2013. V. 50. №1-2. P. 22-36.

347. Yildiz M., Onde S., Ozgen M. Sucrose effects on phenolic concentration from sugarbeet leaf and petiole explants. *Journal of Sugar Beet Research*. 2007. V. 44. №1-2. P. 1-15.
348. Yildiz M., Telci C., Onol B., Ozcan S. Oxidative stress *in vitro* culture. *Biyoloji Bilimleri Arastirma Dergisi*. 2011. V. 4 (2). P. 113-117.
349. Yu X., Reed B. M. A micropropagation system for hazelnuts (*Corylus* species). *HortScience*. 1995. T. 30. № 1. C. 120–123.
350. Zhu J.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A. Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Crit. Rev. Plant Sci*. 1997. V. 16. P. 253-277.

ДОДАТОК

А К Т

впровадження науково-технічного досягнення (НТД) - як результат закінченої науково-дослідницької чи дослідно- конструкторської роботи (НДР чи ДКР)

1. Назва НДТ, що впроваджується: посухостійкі лінії фундука та грецького горіха в якості донорів генів стійкості до посухи в традиційному селекційному процесі.

2. Якою науково-дослідною установою (вищим навчальним закладом) одержано НТД, що впроваджуються і його автори: **Білоцерківський національний аграрний університет МОН України, Врублевський А.Т.**

3. Коли і ким прийнято рішення про впровадження НТД: **Рішенням засідання кафедри лісівництва, ботаніки і фізіології рослин.**

4. Де проводилося впровадження (назва і адреса господарства, дослідного, науково-дослідного господарства): **Уманський національний університет садівництва МОН України.**

6. Результати впровадження: посухостійкі лінії фундука та грецького горіха в якості донорів генів стійкості до посухи в традиційному селекційному процесі.

7. Відповідальні за впровадження (П.І.П, посада)

а) від наукової установи: **Врублевський А.Т.**

в) від УНУС: **професор Балабак А.Ф.**

Акт складено 22 жовтня 2021 року

Представник УНУС

Балабак А.Ф.

М.П.



Представник установи

Врублевський А.Т.

М.П.