

Національна академія наук України

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Пушкарьової Надії Олександрівни

УДК 577.13:57.088.6:582.683.2

ДИСЕРТАЦІЯ

РОЗРОБКА СПОСОБІВ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ТА
ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO* НА БІОХІМІЧНІ
ВЛАСТИВОСТІ ТА ГЕНЕТИЧНУ МІНЛИВІСТЬ РОСЛИН РІДКІСНИХ ВИДІВ
РОДУ *CRAMBE*

03.00.20 – Біотехнологія

Подається на здобуття ступеня кандидата біологічних наук

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

Науковий керівник
Кучук Микола Вікторович,
доктор біологічних наук, професор
чл.-кор. НАН України

Київ – 2017

АНОТАЦІЯ

Пушкарьова Н.О. Розробка способів мікроклонального розмноження та вивчення впливу культивування *in vitro* на біохімічні властивості та генетичну мінливість рослин рідкісних видів роду *Crambe* – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 "Біотехнологія". – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національна академія наук України, Київ, 2017.

В результаті проведеної роботи було отримано колекцію асептичних рослин п'яти рідкісних видів роду *Crambe* – *Crambe koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та *C. maritima*.

Найкращі показники прямої регенерації з бічної бруньки отримали на середовищі, доповненому 0,6 мг/л 6-бензиламінопурин (БАП) для видів *C. aspera* та *C. steveniana*, 1 мг/л БАП для *C. maritima*, 0,5 мг/л кінетину для *C. koktebelica* та 1,5 мг/л кінетину для *C. tataria*. За непрямой регенерації було відмічено значно вищий регенераційний потенціал з бічної бруньки *C. tataria* ($12,25 \pm 3,68$ пагонів на середовищі з 0,3 мг/л БАП) у порівнянні з іншими видами роду *Crambe* – 4-6 пагонів з одного експланта.

Визначення морфогенного потенціалу корневих експлантів показало низьку частоту регенерації для чотирьох з досліджуваних видів: *C. koktebelica* – 20% (БАП 1 мг/л та 1-нафтилоцтова кислота (НОК) 0,1 мг/л), *C. aspera* 10% (БАП 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л), *C. tataria* 30% (Кінетин 1 мг/л та НОК 0,5 мг/л) та *C. steveniana* 40% (Кін 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л). Найбільш активно пагони утворювались за культивування з низьким вмістом цитокінінів і ауксинів. Виявили відмінність у відповіді експлантів на внесення до середовища різних типів цитокінінів – пагони з корневих експлантів *C. tataria* та *C. steveniana* частіше утворювались за культивування з кінетином. Для коренів *C. koktebelica* та *C. aspera* регенерація відмічена лише за культивування з БАП. Для виду *C. maritima* було відмічено високий регенераційний потенціал кореня за

використання двох типів цитокинінів, а за культивування на живильному середовищі з 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК на усіх експлантах утворювались пагони (в середньому $3,90 \pm 1,58$ пагони на одному експланті).

Регенерація з листових експлантів відбувалась з дещо вищою частотою ніж з корневих. Показано залежність частоти регенерації від вмісту ауксину у середовищі – низька концентрація НОК (0,1-0,5 мг/л) сприяла підвищенню частоти утворення пагонів. Так, для *C. koktebelica* відмічено 28% регенерації з листових експлантів (БАП 5 мг/л та НОК 0,5 мг/л), *C. tataria* – 38% (БАП 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л), *C. aspera* – 50% (БАП 5 мг/л та НОК 0,5 мг/л), *C. steveniana* – 80% (БАП 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л). Для *C. maritima* було досягнуто 100% регенерації на середовищі з 2,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК. При цьому з одного експланта утворювалось $4,10 \pm 1,39$ пагонів.

Регенерація з черешкових експлантів, як і з листових, залежала від концентрації НОК у живильному середовищі – за культивування експлантів з 0,1-0,5 мг/л НОК отримували найвищу частоту регенерації для усіх досліджуваних видів. Регенерацію з усіх черешкових експлантів спостерігали для *C. tataria* (БАП 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л), *C. aspera* (БАП 5 мг/л та НОК 1 мг/л) *C. steveniana* (БАП 2,5 мг/л та НОК 0,1 мг/л) та *C. maritima* (БАП 2,5 мг/л та НОК 0,1 мг/л). Для виду *C. koktebelica* найвищі показники регенерації отримано за культивування з 2,5-5 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК (частота регенерації – 60%). Нами не було знайдено даних по дослідженню морфогенезу з тканини черешка для обраних нами видів роду *Crambe*, тому показаний найвищий морфогенний потенціал цього типу експланту є важливим для оптимізації протоколів мікроклонального розмноження не лише досліджуваних видів, а, можливо, і для інших представників роду.

Приферація калюсу по всій площі експланта спостерігалась лише за наявності БАП у середовищі. Калюсогенез з тканин кореня відмічався більшою активністю ніж для інших типів експлантів для усіх досліджуваних видів, окрім *C. aspera*, де ініціація калюсної тканини по всій площі експланта (товщиною більше 10 мм) відбувалась частіше на черешкових експлантах. З кореня *C. steveniana* відмічали активний калюсогенез на середовищі з кінетином.

З частин черешка та листка також спостерігали утворення коренів по всій площі експланту. Зокрема, відмічено більшу здатність до ризогенезу листкових експлантів усіх видів, культивованих на середовищі з кінетином та НОК. Таким чином, для досліджуваних видів роду *Crambe* була виявлена детермінованість органів до певного типу морфогенезу: з кореневих експлантів утворюється калюс, з листкових – корені, а з черешкових – пагони. Найвищий морфогенний потенціал виявлено для виду *C. maritima*. Успішне розмноження *in vitro* можливе за використання усіх трьох типів експлантів. Найнижчу здатність до регенерації пагонів відмічено для виду *C. koktebelica*, хоча можна рекомендувати проводити мікроклонування рослин даного виду за допомогою черешкових експлантів.

Укорінення мікропагонів досліджуваних видів проводили на безгормональному живильному середовищі MS зі зниженим вдвічі вмістом сахарози, макро- і мікросолей. Найвищу частоту укорінення пагонів відмічено для *C. steveniana*, а найнижчу для *C. maritima*. Мікропагони з добре розвинутою кореневою системою успішно адаптували до нестерильних умов середовища на суміші торфу та перліту (2:1) в приміщенні при освітленні люмінесцентними лампами за температури $+23 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Для оцінки можливого впливу процедури поверхневої стерилізації, асептичних умов культивування та мікроклонального розмноження на біохімічні характеристики визначали вміст загального розчинного білка, поліфруктанів, жирних кислот та антиоксидантну активність вегетативних органів рослин. Для двох досліджуваних видів (*C. steveniana*, *C. maritima*) не було встановлено суттєвих відмінностей за вмістом поліфруктанів у вегетативних органах рослин залежно від умов культивування. В той же час, для рослин *C. koktebelica* та *C. aspera* відмічали значне підвищення вмісту поліфруктанів у рослинах, що культивували *in vivo*, а для *C. tataria*, навпаки – вміст поліфруктанів був вищим у асептичних рослин. Антиоксидантна активність екстрактів з вегетативних органів досліджуваних рослин виявилась дуже високою та для більшості досліджуваних видів суттєво не відрізнялась для асептичних та неасептичних зразків. Лише для рослин виду *C. steveniana* культивування *in vitro* викликало зниження

антиоксидантної активності. Порівняння вмісту жирних кислот у рослинах, що культивували у асептичних та ґрунтових умовах виявило значні відмінності. У вегетативних органах рослин *C. tataria*, *C. steveniana* та *C. maritima*, що культивували *in vitro*, відмічено значне підвищення загального вмісту жирних кислот, для інших видів суттєвої різниці виявлено не було. Крім того, було показано підвищення вмісту насичених жирних кислот у асептичних рослинах та, відповідно, підвищення ненасичених жирних кислот у неасептичних рослинах усіх досліджуваних видів. Кількісні відмінності у вмісті деяких жирних кислот можуть бути пов'язані з переходом частки однієї з них у більш ненасичений стан під впливом умов навколишнього середовища, оскільки саме ліпіди клітинних мембран відіграють вирішальну роль у формуванні стійкості рослин до несприятливих умов існування, зокрема, стійкості до понижених температур.

In vitro зразки чотирьох досліджуваних видів проявили значну генетичну подібність у асептичній культурі. Проте один з чотирьох *in vitro* генотипів *C. steveniana* був генетично поліморфним по відношенню до решти *in vitro* зразків. Якщо припустити, що всі досліджувані зразки мали походження з біологічного матеріалу єдиної особини, то можна стверджувати, що жорсткі умови введення в культуру *in vitro* призвели до генетичних змін.

Наукова новизна роботи. Автором вперше було введено у асептичну культуру рослини видів *C. koktebelica*, *C. steveniana* та *C. aspera*. Вперше в якості експланта для мікророзмноження було використано бічну бруньку (*C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та *C. maritima*) та показано умови отримання регенерантів шляхом прямого органогенезу; частину черешка (для *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera* та *C. steveniana*) та показано його високий морфогенний потенціал для всіх досліджуваних видів; частину листка (*C. koktebelica*, *C. aspera* та *C. steveniana*) та показано високу здатність до ризогенезу для всіх досліджуваних видів; частину кореня (*C. koktebelica*, *C. aspera* та *C. steveniana*) та показано найнижчий потенціал до регенерації пагонів *de novo* і високу інтенсивність калюсогенезу для всіх досліджуваних видів. Також було вперше визначено вміст загального розчинного білка, поліфруктанів та жирних кислот у

зеленій масі асептичних рослин *C. koktebelica*, *C. aspera* та *C. steveniana* та показано вплив культивування *in vitro* на біохімічні властивості та виникнення генетичних змін у рослин роду *Crambe* (*C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та *C. maritima*). Було протестовано 7 ISSR та 4 SSR маркерних системи для вивчення генотипу рідкісних видів рослин роду *Crambe* та його змін в процесі культивування *in vitro* і показано їх ефективність для кожного досліджуваного виду.

Практичне значення отриманих результатів. Було створено колекцію асептичних рослин п'яти рідкісних видів роду *Crambe* (*C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та *C. maritima*) та розроблено протоколи їх мікроклонального розмноження з дослідженням різних типів морфогенезу за використання різних типів експлантів (частина листка, черешка, кореня та бічної бруньки). Сформульовані схеми швидкого мікроклонального розмноження досліджуваних видів *in vitro* можна застосовувати для подальшого повернення рослин у природні місця зростання, та відновлення їх чисельності. Отримані дані можуть бути використані для масового розмноження досліджуваних рослин як джерел біологічно активних сполук. Підібрано ряд маркерних систем для оцінки генотипів видів роду *Crambe*.

Ключові слова. Збереження біорізноманіття, *Crambe koktebelica*, *Crambe tataria*, *Crambe aspera*, *Crambe steveniana*, *Crambe maritima*, культура *in vitro*, мікроклональне розмноження, вплив культивування *in vitro* на біохімічні характеристики рослин, ISSR- та SSR-маркерні системи.

Список публікацій:

1. **Pushkarova N.O.** *Crambe tataria* Sebeok seeds and plants grown *in vitro* and *in vivo* fatty acid composition comparison / **N.O. Pushkarova**, M.S. Kalista, M.A. Kharhota, D.B. Rakhmetov, M.N. Kuchuk // *Potravinarstvo*. – 2016. – V. 10, N 1. – P. 494-498.
2. **Pushkarova N.O.** Biotechnology approaches for conservation of the endangered species *Crambe koktebelica* (Junge) N. Busch and effect of aseptic *in vitro* cultivation on its biochemical properties / **N.O. Pushkarova**, M.S. Kalista, M.A. Kharhota, D.B. Rakhmetov, M.N. Kuchuk // *Biotechnol. Acta*. – 2016. – V. 9, N 4. – P. 19-27.

3. **Пушкарьова Н.О.** Отримання культури рослин зникаючого виду *Crambe steveniana* та вивчення впливу асептичних умов культивування на їх біохімічний склад / **Н.О. Пушкарьова**, М.С. Каліста, В.Б. Белокурова, М.В. Кучук // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. – 2016. – Т. 27. – С. 155-162.
4. **Pushkarova N.** Phylogenetic study of *Crambe* species with ISSR markers / O. Lakhneko, **N. Pushkarova**, A. Stepanenko, M. Kuchuk, B. Morgun // Vestnik of the South-Kazakhstan state pharmaceutical academy Republican scientific journal. – 2016. – V. 4, N 77. – P. 7-10.
5. **Пушкарьова Н.О.** Ефективність поверхневої стерилізації насіння як важлива умова створення *in vitro* колекції рослин, що охороняються / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова, М.В. Кучук // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. – Т. 17. – С. 241-244.
6. **Пушкарьова Н.О.** Вивчення деяких біохімічних характеристик видів рослин, що охороняються, в культурі *in vitro* / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова, М.В. Кучук // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т. 19. – С. 182-184.
7. **Пушкарьова Н.О.** Застосування регуляторів росту для мікроклонального розмноження *in vitro* рослин, що охороняються / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова, М.В. Кучук // Рідкісні рослини і гриби України та прилеглих територій: реалізація природоохоронних стратегій. Матеріали IV міжнародної конференції (м. Київ, 16-20 травня 2016 р.). – 2016. – С. 218-222.
8. **Пушкарьова Н.О.** Вивчення особливостей введення в асептичну культуру та пагоноутворення *in vitro* деяких видів рослин, занесених до Червоної книги України / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова // Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень: матеріали Другої міжнародної науково-практичної конференції (сmt Путила, 24 квітня 2015 р.). – 2015. – С. 228-232.
9. **Пушкарьова Н.О.** Особливості введення в культуру *in vitro* рідкісного виду *Crambe tataria* Sebeok / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова // “Біотехнологія XXI

століття”: тези доповідей IX Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченій 170 річниці від народження Іллі Мечникова (Київ, 24 квітня 2015 р.). – 2015. – С. 162-163.

10. **Пушкарьова Н.О.** Особливості мікроклонального розмноження *in vitro* *Crambe tataria* Sebeok / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова // “Біотехнологія: звершення та надії”: IV Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених (Київ, 21-22 травня 2015 р.). – 2015.

11. **Pushkarova N.O.** Seed surface sterilization as the first step in establishing *Crambe aspera* M. Bieb aseptic culture / **N.O. Pushkarova**, V.B. Belokurova, M.V. Kuchuk // Ukrainian society of cell biology international conference “Advances in cell biology biotechnology” (Lviv, 11-13 October 2015). – 2015.

12. **Пушкарьова Н.О.** Вміст біологічно активних сполук в рослинах роду *Crambe* // **Н.О. Пушкарьова**, М.В. Кучук // Молодь і поступ біології: збірник тез XII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (Львів, 19-21 квітня 2016 р.). – 2016. – С. 133-134.

13. **Пушкарьова Н.О.** Молекулярно-генетичний аналіз рослин *Crambe koktebelica* // О.А. Бондар, О.Р. Лахнеко, **Н.О. Пушкарьова** // Біотехнологія XXI століття: матеріали XI Всеукраїнської науково-практичної конференції (Київ, 21 квітня 2017 р.). – 2017. – С. 16.

14. **Пушкарьова Н.О.** Особливості введення в культуру *in vitro* деяких рідкісних та зникаючих видів флори України / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова // Наукові пріоритети розвитку аграрної сфери в умовах глобальних змін: матеріали міжнародної науково-практичної Інтернет конференції (Тернопіль, 4-5 грудня 2014 р.). – 2014. – С. 71-73.

SUMMARY

Pushkarova N.O. Establishment of microclonal propagation methods and study of *in vitro* cultivation effect on biochemical properties and genetic variability of endangered *Crambe* species. – Manuscript of the qualificational scientific project.

Doctoral thesis for the PhD title application in 03.00.20 “Biotechnology” specialty. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017.

Seed surface sterilization protocols were optimized for five endangered *Crambe* species and aseptic plants collection of *Crambe koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та *C. maritima* were established.

Since propagation through direct organogenesis is advisable for biodiversity conservation it was important to establish the conditions for plant regeneration without initializing callogenesis. The highest rates of direct organogenesis were gained in result of lateral bud cultivation on the medium containing 0.6 mg/L of BA for *C. aspera* and *C. steveniana*, 1 mg/L of kinetin for *C. koktebelica* and 1.5 mg/L of kinetin for *C. tataria*. 4-5.3 new-formed plantlets were formed from one explant under such conditions. No significant difference in number of new-formed plantlets between the studied species was found. The rate of indirect organogenesis was much higher for *C. tataria* (12.25 ± 3.68 new-formed plantlets from one explant).

Morphogenic potential of root explants research showed rather low regeneration frequency for four studied species: *C. koktebelica* – 20% (BA 1 mg/L and NAA 0.1 mg/L), *C. aspera* – 10% (BA 1 mg/L and NAA 0.1 mg/L), *C. tataria* – 30% (Kinetin 1 mg/L and NAA 0.5 mg/L) and *C. steveniana* – 40% (Kinetin 1 mg/L and NAA 0.1 mg/L). The highest propagation rates were reached as the result of cultivation with low cytokinin and auxin content in the medium. Moreover the difference in the explants response on certain cytokinin introduction to the medium was found – from *C. tataria* and *C. steveniana* root explants plantlets were forming with higher frequency on the medium with kinetin wherein regeneration also occurred on the medium with BA. Regeneration from *C. koktebelica* and *C. aspera* roots was observed only on the medium with BA. *C. maritima* root explants had the highest propagation rates on the

medium with either BA or kinetin and all of its explants formed plantlets on the MS medium with 1 mg/L of BA and 0.1 mg/L of NAA (3.90 ± 1.58 plantlets on each explant in average).

Regeneration frequency from leaf explants was higher than from that of roots. New plantlets were formed on the medium with either BA or kinetin (with NAA) for all the studied species, although the highest propagation rates were noted on the medium with BA. Wherein the relation between the regeneration frequency and auxin content in the medium was found – lower NAA concentration (0.1-0.5 mg/L) contributed to higher propagation rates. Thereby, the highest regeneration frequency from leaf explants was as follows: 28% for *C. koktebelica* (BA 5 mg/L and NAA 0.5 mg/L), 38% for *C. tataria* (BA 1 mg/L and NAA 0.1 mg/L), 50% for *C. aspera* (BA 5 mg/L and NAA 0.5 mg/L), 80% for *C. steveniana* (BA 1 mg/L and NAA 0.1 mg/L) and 100% for *C. maritima* (BA 2.5 mg/L and NAA 0.5 mg/L). From one *C. maritima* leaf explant 4.10 ± 1.39 plantlets were formed.

Regeneration from petiole explants as well as from leaf explants was dependable of NAA concentration in the medium – cultivation of explants with 0.1-0.5 mg/L of NAA resulted in the higher propagation rates for all the studied species. Plantlets from petioles were formed on the medium with either BA or kinetin (with NAA). 100% regeneration frequency occurred for *C. tataria* (BA 1 mg/L and 0.1 mg/L), *C. aspera* (BA 5 mg/L and 1 mg/L), *C. steveniana* (BA 2.5 mg/L and NAA 0.1 mg/L) and for *C. maritima* (BA 2.5 mg/L and NAA 0.1 mg/L). The highest propagation rates for *C. koktebelica* petiole explants (60%) were noted on the medium with 2.5-5 mg/L of BA and 0.1 mg/L of NAA. There are no data found on the morphogenic potential study of petiole explants of the studied *Crambe* species, therefore high propagation rates from this type of explant that was shown in our work is fairly important for microclonal propagation protocols optimization not only for the studied species but for *Crambe* species generally.

Callogenesis was noted on all types of explants on the medium with BA or kinetin (with the addition of NAA) but callus tissue initialization across the entire explant took place only in the presence of BA. Callus proliferation from roots was

higher than from other types of explants except for *C. aspera* – callus tissue formation across the entire explant (more than 10 mm wide) occurred more frequently on the petioles. Callogenesis on *C. steveniana* root explants was more essential on the medium with kinetin.

Petiole and leaf explants had the ability to form roots all over the explant. Also leaves of all the studied species were more frequent to form roots on the medium with kinetin and NAA.

Thus, for the studied *Crambe* species a determinacy of different explants for a certain type of morphogenesis was found: roots initialized callus tissue (more than 100 mm wide), leaves formed roots across the entire explant and petioles plantlets. The highest propagation rates were noted for *C. maritima* (for all types of explants studied) and the lowest propagation rates for *C. koktebelica*, though petiole explants are advisable for its clonal multiplication.

The rooting of plantlets was studied on hormone-free MS medium or with twice reduced sucrose, macro- and microelements content (MS/2). *C. steveniana* plantlets had the highest rooting frequency and *C. maritima* had the lowest. Slight decrease of rooting frequency was observed as a result of cultivation on MS/2 medium. The *in vivo* adaptation of plantlets with nicely developed roots was conducted with different substratum: peat and sand blend (3:1), peat and perlite blend (2:1) indoor with fluorescent lamps and at $+23 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

For evaluation of the possible influence of surface sterilization, aseptic cultivation and microclonal propagation on biochemical characteristics of plants total soluble protein, polyfructans and fatty acids content along with the antioxidant activity of aseptic and not aseptic plants green mass was determined. No significant difference in polyfructans content in *C. steveniana* and *C. maritima* plants grown *in vitro* and *in vivo* was found. There was an increase though in polyfructans content in *C. koktebelica* and *C. aspera in vivo* plants and decrease in *C. tataria in vivo* plants. Antioxidant activity of extracts from green mass was quite high comparing to ascorbic acid solution (1 mg/mL ascorbic acid – 98,22 %) that was used as a control for antioxidant activity of the studied plants estimation. Antioxidant activity of the studied *Crambe* plants grown *in*

vivo and *in vitro* had no significant difference except for *C. steveniana* plants (plants grown *in vivo* had higher antioxidant activity than those of *in vitro*).

Vegetative parts of *C. tataria*, *C. steveniana* and *C. maritima* cultivated *in vitro* had increased total fatty acid content while there wasn't any significant difference in total fatty acid content between aseptic and not aseptic plants of other species. Further analysis revealed a shift in the correlation between saturated and unsaturated fatty acids due to *in vitro* cultivation. There was an increase in saturated fatty acids production and a decrease in unsaturated fatty acids synthesis in aseptic plants compared with not aseptic ones of all the studied species. Quantitative changes in fatty acid content of *in vivo* grown plants may be due to unsaturation of certain acids as a mechanism of resistance to lower temperatures.

In vitro cultured plants showed high level of genetic similarity. However, one sample out of four of *C. steveniana in vitro* cultivated plants showed genetic polymorphism to other samples from aseptic plants. Since all analyzed samples came from the same biological material we can assume that *C. steveniana* genome underwent considerable changes after introduction to *in vitro* culture.

Scientific novelty. The aseptic *in vitro* culture of *C. koktebelica*, *C. steveniana* and *C. aspera* was first established by the author. Microclonal propagation via petiole explants was studied for the first time for *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* and its high morphogenic activity was shown for all studied species. *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* and *C. maritima* lateral bud morphogenic activity was studied and its ability for direct organogenesis was shown. Leaf parts were used as explants for microclonal propagation for the first time for *C. koktebelica*, *C. aspera*, *C. steveniana* and its ability for rhizogenesis was shown for all studied species. *C. koktebelica*, *C. aspera*, and *C. steveniana* roots were used as explants for the first time and its lowest propagation frequency with the highest callogenesis ability was shown for all studied species. Comparison of total soluble protein, polyfructans and fatty acids contents with antioxidant activity of *in vitro* and *in vivo* *Crambe* plants was performed for the first time. The effect of *in vitro* cultivation and propagation on *Crambe* (*C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* and

C. maritima) plants biochemical properties and genetic variability was shown. The efficiency of 7 ISSR and 4 SSR markers applied for endangered *Crambe* plants genotype study and its considerable changes during *in vitro* cultivation were tested.

The practical value of the results. An aseptic plants collection of the five rare *Crambe* genus species (*C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* and *C. maritima*) was created, and protocols of their microclonal propagation were developed with different types of morphogenesis study using different types of explants (part of leaf, petiole, root and lateral bud). Formulated rapid microclonal propagation schemes of the studied species *in vitro* can be used for the subsequent return of plants to natural growth sites, and the restoration of their number. The obtained data can be used for mass reproduction of studied plants as sources of biologically active compounds.

Keywords. Biodiversity conservation, *Crambe koktebelica*, *Crambe tataria*, *Crambe aspera*, *Crambe steveniana*, *Crambe maritima*, *in vitro* culture, microclonal propagation, *in vitro* cultivation effects on biochemical characteristics of plants, ISSR and SSR marker systems.

List of publications:

1. **Pushkarova N.O.** *Crambe tataria* Sebeok seeds and plants grown *in vitro* and *in vivo* fatty acid composition comparison / **N.O. Pushkarova**, M.S. Kalista, M.A. Kharhota, D.B. Rakhmetov, M.N. Kuchuk // Potravinarstvo. – 2016. – V. 10, N 1. – P. 494-498.
2. **Pushkarova N.O.** Biotechnology approaches for conservation of the endangered species *Crambe koktebelica* (Junge) N. Busch and effect of aseptic *in vitro* cultivation on its biochemical properties / **N.O. Pushkarova**, M.S. Kalista, M.A. Kharhota, D.B. Rakhmetov, M.N. Kuchuk // Biotechnol. Acta. – 2016. – V. 9, N 4. – P. 19-27.
3. **Pushkarova N.O.** Endangered species *Crambe steveniana* *in vitro* plant culture obtaining and the study of aseptic cultivation influence on its biochemistry / **N.O. Pushkarova**, M.S. Kalista, V.B. Belokurova, M.V. Kuchuk // The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University – 2016. – V. 27. – P. 155–162.
4. **Pushkarova N.** Phylogenetic study of *Crambe* species with ISSR markers / O. Lakhneko, **N. Pushkarova**, A. Stepanenko, M. Kuchuk, B. Morgun // Vestnik of the

South-Kazakhstan state pharmaceutical academy Republican scientific journal. – 2016. – V. 4, N 77. – P. 7-10.

5. **Pushkarova N.O.** Seed surface sterilization efficiency as an important prerequisite in formation of endangered plant species *in vitro* collections / **N.O. Pushkarova**, V.B. Belokurova, M.V. Kuchuk // Factors in Experimental Evolution of Organisms. – 2015. – V. 17. – P. 241–244.

6. **Pushkarova N.O.** Biochemical characteristics of endangered plant species cultured *in vitro* study / **N.O. Pushkarova**, V.B. Belokurova, M.V. Kuchuk // Factors in Experimental Evolution of Organisms. – 2016. – V. 19. – P. 182–184.

7. **Pushkarova N.O.** Growth regulators applying for *in vitro* microclonal propagation of endangered plants / **N.O. Pushkarova**, V.B. Belokurova, M.V. Kuchuk // Rare plants and fungi of Ukraine and adjacent areas: implementing conservation strategies. Proceedings of the 4th international conference (Kyiv, May 16-20, 2016). – 2016. – P. 218–222.

8. **Pushkarova N.O.** Peculiarities of *in vitro* culture introduction and propagation of several plants species included in The Red Data Book of Ukraine / **N.O. Pushkarova**, V.B. Belokurova // Regional aspects of floristic and faunistic research: proceedings of the Second International Scientific and Practical Conference (Putila town, April 24, 2015). – 2015. – P. 228-232.

9. **Pushkarova N.O.** Peculiarities of rare *Crambe tataria* Sebeok species introduction into *in vitro* culture / **N.O. Pushkarova**, V.B. Belokurova // “Biotechnology of the XXI century”: abstracts of the IX All-Ukrainian Scientific and Practical Conference devoted to the 170th anniversary of Ilya Mechnikov birth (Kyiv, April 24, 2015). – 2015. – P. 162-163.

10. **Pushkarova N.O.** Peculiarities of *Crambe tataria* Sebeok microclonal propagation *in vitro* / **N.O. Pushkarova**, V.B. Belokurova // "Biotechnology: achievements and hope": IV All-Ukrainian Scientific and Practical Conference for students, postgraduates and young scientists (Kyiv, May 21-22, 2015). – 2015.

11. **Pushkarova N.O.** Seed surface sterilization as the first step in establishing *Crambe aspera* M. Bieb aseptic culture / **N.O. Pushkarova**, V.B. Belokurova, M.V. Kuchuk //

Ukrainian society of cell biology international conference “Advances in cell biology biotechnology” (Lviv, October 11-13, 2015).

12.**Pushkarova N.O.** Bioactive compounds content of *Crambe* species // **N.O.Pushkarova**, M.V. Kuchuk // Youth and Progress of Biology: Book of Abstracts of XII International Scientific Conference for Students and PhD Students (Lviv, 19 – 21 April 2016). – 2016. – P. 133-134.

13.**Pushkarova N.O.** Molecular-genetic analysis of *Crambe koktebelica* plants // O.A. Bondar, O.R. Lakhnenko, **N.O. Pushkarova** // Biotechnology of the XXI century: materials of the XI All-Ukrainian Scientific and Practical Conference (Kyiv, April 21, 2017). – 2017. – P. 16.

14.**Pushkarova N.O.** *In vitro* culture introduction peculiarities of several rare and endangered palnt species of Ukrainian flora / **N.O. Pushkarova**, V.B. Belokurova // Scientific priorities of the agrarian sphere development in the conditions of global changes: proceedings of the international scientific and practical Internet conference (Ternopil, December 4-5, 2014). – 2014. – P. 71-73.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	21
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	30
1.1.Поняття про біорізноманіття та проблеми його збереження.....	30
1.2.Шляхи збереження видового різноманіття.....	31
1.3.Шляхи збереження рослин <i>in vitro</i>	33
1.4.Морфогенез в культурі <i>in vitro</i>	34
1.5.Фактори, що впливають на <i>in vitro</i> морфогенез та регенерацію рослин роду <i>Crambe</i> L.....	37
1.6.Заходи щодо збереження видового різноманіття флори України.....	42
1.6.1. Рідкісні види роду <i>Crambe</i> родини <i>Brassicaceae</i>	42
1.6.2. Практичне застосування видів роду <i>Crambe</i>	43
1.6.3. Рідкісні та зникаючі види родини <i>Brassicaceae</i> , що зберігаються <i>in vitro</i>	43
1.7.Вплив асептичних умов культивування на біохімічні властивості та генетичну стабільність рослин, що зберігаються.....	45
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	51
2.1. Ботанічна характеристика рослин роду <i>Crambe</i>	51
2.1.1. <i>Crambe koktebelica</i> (Junge) N. Busch – Катран коктебельський...52	
2.1.2. <i>Crambe tataria</i> Sebeok – Катран татарський.....53	
2.1.3. <i>Crambe aspera</i> M. Bieb. – Катран шершавий.....54	
2.1.4. <i>Crambe steveniana</i> Rupr. – Катран Стевена.....55	
2.1.5. <i>Crambe maritima</i> L. – Катран морський.....56	
2.2. Отримання асептичної культури рослин досліджуваних видів роду <i>Crambe</i>	57
2.3. Умови культивування асептичних рослин та гормональний склад живильного середовища.....	59
2.4. Укорінення мікропагонів та їх адаптація до умов <i>in vivo</i>	60
2.5. Визначення впливу культивування <i>in vitro</i> рослин	

досліджуваних видів на деякі біохімічні властивості.....	61
2.5.1. Дослідження антиоксидантної активності.....	61
2.5.2. Визначення вмісту поліфруктанів	62
2.5.3. Визначення вмісту загального розчинного білка.....	62
2.5.4. Визначення вмісту жирних кислот.....	63
2.5.5. Визначення впливу культивування <i>in vitro</i> рослин досліджуваних видів на їх генетичну стабільність	64
2.6. Статистична обробка даних.....	67
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	68
3.1. Результати поверхневої стерилізації насіння досліджуваних видів....	68
3.2. Дослідження морфогенного потенціалу пазушних бруньок рослин роду <i>Crambe</i>	71
3.2.1. Морфогенна відповідь експлантів (бічна брунька) <i>C. koktebelica</i> на різний гормональний склад середовища.....	72
3.2.2. Морфогенна відповідь експлантів (бічна брунька) <i>C. tataria</i> на різний гормональний склад середовища.....	73
3.2.3. Морфогенна відповідь мікропагонів <i>C. aspera</i> на різний гормональний склад середовища.....	75
3.2.4. Морфогенна відповідь експлантів (бічна брунька) <i>C. steveniana</i> на різний гормональний склад середовища.....	76
3.2.5. Морфогенна відповідь мікропагонів <i>C. maritima</i> на різний гормональний склад середовища.....	78
3.3. Дослідження морфогенного потенціалу черешкових, листкових та кореневих експлантів представників роду <i>Crambe</i>	80
3.3.1. Дослідження морфогенного потенціалу різних типів експлантів <i>C. koktebelica in vitro</i>	80
3.3.2. Дослідження морфогенного потенціалу різних типів експлантів <i>C. tataria in vitro</i>	85
3.3.3. Дослідження морфогенного потенціалу різних типів експлантів <i>C. aspera in vitro</i>	90

3.3.4. Дослідження морфогенного потенціалу різних типів експлантів <i>C. steveniana in vitro</i>	95
3.3.5. Дослідження морфогенного потенціалу різних типів експлантів <i>C. maritima in vitro</i>	100
3.4. Укорінення мікропагонів та адаптація до умов <i>in vivo</i>	104
3.5. Дослідження впливу культивування <i>in vitro</i> на біохімічні властивості та генетичну стабільність рослин рідкісних видів роду <i>Crambe</i>	107
3.5.1. Визначення складу жирних кислот у вегетативних органах рослин культивованих <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i> досліджуваних видів роду <i>Crambe</i>	107
3.5.2. Визначення антиоксидантної активності, вмісту загального розчинного білка та поліфруктанів у вегетативних органах рослин культивованих <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i> досліджуваних видів роду <i>Crambe</i>	114
3.5.3. Молекулярно-генетичний аналіз генотипів досліджуваних видів роду <i>Crambe</i>	117
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	124
ВИСНОВКИ.....	132
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	133
ДОДАТКИ.....	152

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ІОК – індоліл-3-оцтова кислота;
ІМК – 3-індолілмасляна кислота;
НОК – 1-нафтилоцтова кислота;
2,4-Д – 2,4- дихлорфеноксиоцтова кислота;
БАП – 6-бензиламінопурин;
НПП – національний природний парк;
ПЗ – природний заповідник;
РЛП – регіональний ландшафтний парк;
БЗ – біосферний заповідник;
IUCN – Міжнародний союз охорони природи;
ЮНЕСКО - Організація Об'єднаних Націй з питань освіти, науки і культури;
УФ-опромінення – ультрафіолетове опромінення;
АОА – антиоксидантна активність;
ЖК – жирні кислоти;
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;
ISSR-маркери – інвертовані повтори;
AFLP – поліморфізм у сайтах рестрикції;
RAPD-методу – випадково ампліфікована поліморфна ДНК;
SSR-маркери – мікросателітні локуси (тандемні повтори з довжиною елементарної одиниці в 2-6 нуклеотидів);
ЧП – Частота пагоноутворення;
ЧР – Частота ризогенезу;
СП – Середня кількість пагонів, що утворились на одному експланті;
DPPH – 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил радикал;
ІПЗ – індекс подвійних зв'язків;
К – коефіцієнт ненасиченості;
ЦТАБ – цетилтриметиламонійбромід;
IUCN (МСОП) – International Union for Conservation of Nature (Міжнародний союз охорони природи);

Lep – живильне середовище Leroivte;
WPM – живильне середовище для деревних рослин;
MS – живильне середовище Мурасіге-Скуга
MS/2 – живильне середовище Мурасіге-Скуга з вдвічі зменшеним вдвічі вмістом сахарози, макро- та мікросолей;
DPFH – 2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозил радикал;
AOA – антиоксидантна активність;
ЖК – жирні кислоти;
ІІЗ – індекс подвійних зв'язків;
К – коефіцієнт ненасиченості;
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;
 Σ FA – загальний вміст жирних кислот;
 Σ SFA – сума насичених жирних кислот;
 Σ USFA – Сума ненасичених жирних кислот;
ПФ – поліфруктани.

ВСТУП

Актуальність теми. Збереження біорізноманіття є глобальною проблемою, вирішення якої потребує залучення новітніх технологій. Відповідно, протягом останніх десятиліть активно розвивається біотехнологія збереження рослин – напрям, який є одним з найновітніших інструментів міжгалузевого підходу по запобіганню зниження чисельності видів. Біотехнологія збереження рослин доповнює традиційні методи захисту різноманіття *ex situ*, дає змогу зберігати види, що погано піддаються традиційному розмноженню, та забезпечує збереження генетичних ресурсів [1].

Рід *Crambe* L. (Катран) належить до родини Хрестоцвітих (*Brassicaceae*) і налічує 44 види [2-5]. Деякі види роду *Crambe* мають досить широкий спектр застосування – зелена маса та коріння використовується в харчових цілях, так само як олія з насіння [2, 6]. Крім того, насіння може бути використане в хімічній та лакофарбовій промисловості, для очищення стічних вод від важких металів та є джерелом біопалива, завдяки високому вмісту довголанцюгової ерукової кислоти [6, 7]. До Червоної книги України занесено 7 видів роду *Crambe* L. з різними природоохоронним статусом: *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. mitridatis*, *C. steveniana*, *C. maritima*, *C. grandifolia*. Крім того, деякі з перелічених видів включено до світових та європейських Червоних списків (Red List Europe, Red List EU 27, IUCN Red List, World Red List) [8, 9].

Рід *Crambe* L. також занесено до списку дикорослих рослин, що можуть бути генетичним матеріалом для покращення цінних сільськогосподарських культур [9]. У зв'язку з деякими факторами (виключно насіннєве поновлення, низька конкурентна спроможність, руйнування екотопів, низький відсоток виживання паростків, збирання рослин та підземної частини людиною та випасання худоби) представники роду *Crambe* L. знаходяться під загрозою зникнення, тому, для їх збереження, необхідна розробка ефективних методів біотехнології для масового розмноження рослин та збереження генетичного матеріалу без нанесення шкоди природним популяціям. Крім того, доцільним є

вивчення впливу умов *in vitro* на біохімічні властивості та генетичну стабільність рослин, що зберігаються, для поглиблення розуміння механізмів дії методів біотехнології на них та обґрунтування доцільності біотехнології як інструменту для збереження генетичного матеріалу.

Згідно з джерелами літератури, лише для виду *C. abyssinica* було розроблено та оптимізовано ефективні протоколи мікроклонального розмноження [10, 11]. Крім того, є роботи по вивченню морфогенного потенціалу частини листка та кореня *C. maritima* [12] та *C. tataria* [13]. Для інших рідкісних видів роду *Crambe* L. інформації щодо регенерації *in vitro* та впливу застосування методів біотехнології на біохімічні властивості та молекулярно-генетичні зміни рослин не достатньо або вона відсутня взагалі. Тому, підбір та оптимізація методів введення в асептичну культуру з подальшим мікроклональним розмноженням видів роду *Crambe* L., що занесені до Червоної книги України, є актуальним та ґрунтовним завданням при виконанні робіт по збереженню біорізноманіття рослин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась з 2013 по 2016 роки у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України під керівництвом член-кор. НАН України, д.б.н., проф. Кучука М.В. за темами III-1-15 «Вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних генів в рослинних системах» (№ держ. реєстрації 0115U000025, від 2014 р.), III-5-16 «Розробка біотехнологій отримання природних гетерологічних сполук в рослинних системах» (№ держ. реєстрації 0116U000635, від 2015 року), а також в рамках підтримки об'єкту національного наукового надбання України «Колекція зародкової плазми рослин флори України та світової флори».

Мета та завдання дослідження. Підбір та оптимізація методів введення в асептичну культуру *in vitro* з подальшим мікроклональним розмноженням видів рідкісних та зникаючих видів флори України роду *Crambe* L. для створення

високоєфективних протоколів мікроклонального розмноження та збереження у культурі *in vitro*.

Для досягнення даної мети було поставлено наступні завдання:

- встановити оптимальну схему поверхневої стерилізації насіння, за якої буде забезпечена стерильність вихідних експлантів та збережена схожість насіння в культурі *in vitro* для всіх досліджуваних видів;
- визначити вплив гормонального складу живильних середовищ на морфогенну відповідь різних типів експлантів (частина листка, кореня, черешка та бічна брунька) досліджуваних видів в культурі *in vitro* для встановлення оптимальної схеми швидкого розмноження рослин у асептичній культурі;
- оцінити вплив застосування біотехнологічних методів збереження біорізноманіття на біохімічні властивості рослин досліджуваних видів порівнявши антиоксидантну активність, вміст загального розчинного білку, поліфруктанів та жирних кислот у зеленій масі досліджуваних рослин, що культивувались *in vitro* та *in vivo*;
- вивчити поліморфізм досліджуваних видів для оцінки виникнення генетичних змін у процесі культивування та розмноження рослинного матеріалу у культурі *in vitro*;
- оптимізувати етап адаптації асептичних рослин до умов *in vivo*;
- розробити ефективні протоколи розмноження та збереження *in vitro* рідкісних та зникаючих видів флори України роду *Crambe* L.

Об'єкт дослідження – збереження рідкісних та зникаючих видів флори України, що можуть мати прикладне значення, методами біотехнології.

Предмет дослідження – оптимізація біотехнологічних методів збереження рослинного різноманіття з метою успішного розмноження рідкісних видів роду *Crambe* L. та вивчення впливу асептичних умов культури *in vitro* на біохімічні властивості та генетичну стабільність рослин.

Методи дослідження. Для досягнення мети дослідження було використано наступні методи:

- методи культури *in vitro* (введення рослин дослідних видів в асептичну культуру *in vitro* та дослідження умов їх мікроклонального розмноження);
- біохімічні методи (для визначення можливого впливу умов *in vitro* біохімічні властивості досліджуваних рослин);
- молекулярно-генетичні методи (для визначення генетичних змін внаслідок культивування та розмноження рослин дослідних видів в асептичній культурі);
- статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. Автором було проведено оптимізацію методів введення у культуру *in vitro* та мікроклонування рослин рідкісних видів роду *Crambe* L.

Вперше було:

- ✓ введено у асептичну культуру рослин видів *C. koktebelica*, *C. steveniana* та *C. aspera*;
- ✓ створено колекцію асептичних культур рослин роду *Crambe* L., що потребують заходів по збереженню їх чисельності – *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та *C. maritima*;
- ✓ використано частину черешка в якості експланта для мікроклонального розмноження рослин *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та показано його високий морфогенний потенціал для всіх досліджених видів;
- ✓ досліджено морфогенний потенціал бічної бруньки рослин видів *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та *C. maritima* у культурі *in vitro* та показано шляхи отримання регенерантів шляхом прямого органогенезу;
- ✓ використано частину листка, як експлант для мікроклонального розмноження рослин видів *C. koktebelica*, *C. aspera*, *C. steveniana* та показано високу здатність даного типу експланта до ризогенезу для усіх досліджених видів;

✓ використано частину кореня, як експлант для мікроклонального розмноження рослин видів *C. koktebelica*, *C. aspera*, *C. steveniana* та показано найнижчий потенціал даного типу експланта до регенерації пагонів *de novo* та високу інтенсивність калюсогенезу для усіх досліджених видів;

✓ визначено вміст загального розчинного білка, поліфруктанів та жирних кислот у зеленій масі рослин *C. koktebelica*, *C. aspera*, *C. steveniana*, що культивували *in vitro*;

✓ встановлено високу антиоксидантну активність екстрактів з листків рослин *C. koktebelica*, *C. aspera*, *C. steveniana*, культивованих *in vitro*;

✓ показано вплив асептичних умов культивування та мікроклонального розмноження на біохімічні властивості та виникнення генетичних змін у рослин роду *Crambe* L (*C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та *C. maritima*).

Практичне значення отриманих результатів. Було створено колекцію асептичних рослин у культурі *in vitro* п'яти рідкісних видів роду *Crambe* L – *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та *C. maritima*. Було розроблено протоколи мікроклонального розмноження 5 рідкісних видів роду *Crambe* L. та досліджено різні типи морфогенезу за використання різних типів експлантів (частина листка, черешка, кореня та бічної бруньки) шляхом підбору концентрації та комбінації регуляторів росту. Сформульовано оптимальні схеми швидкого мікроклонального розмноження досліджуваних видів *in vitro*, які можна застосовувати для подальшого повернення рослин у природні місця зростання, та відновлення їх чисельності. Отримані дані можуть бути використані для масового розмноження досліджуваних рослин, як джерел біологічно активних сполук.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно проведено інформаційний пошук, збір та аналіз джерел літератури за темою дисертації, визначено актуальність проблеми, сформульовано мету і завдання дослідження, власноруч виконано експерименти, здійснено статистичний аналіз одержаних даних, написано усі розділи дисертації. Висновки та основні наукові положення було сформульовано разом з науковим керівником дисертаційної роботи. Основні результати отримано здобувачем особисто. Дані по вмісту жирних кислот у

вегетативних органах рослин досліджуваних видів, що культивувались *in vitro* та *in vivo*, було отримано у співпраці з співробітником Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України Хархотою М.А., що відображено у спільних публікаціях. Рослини досліджуваних видів, що культивувались в умовах *in vivo*, було надано співробітниками Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України проф. Рахметовим Д.Б. та Національного науково-природничого музею НАН України к.б.н. Калістою М.С.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень було презентовано на міжнародній науково-практичній Інтернет-конференції «Наукові пріоритети розвитку аграрної сфери в умовах глобальних змін» (Тернопіль, 2014 р.); Другій міжнародній науково-практичній конференції «Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень» (сmt. Путила, 2015 р.); IX Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченій 170 річниці від народження Іллі Мечникова «Біотехнологія ХХІ століття» (Київ, 2015 р.); IV Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 2015 р.); XII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2016 р.); IV міжнародній конференції «Рідкісні рослини і гриби України та прилеглих територій: реалізація природоохоронних стратегій» (Київ, 2016 р.); X Міжнародній науково-практичній конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Чернівці, 2015 р.); XI Міжнародній науково-практичній конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Умань, 2016 р.); Міжнародній конференції Українського товариства клітинної біології «Досягнення клітинної біології та біотехнології» (Львів, 2015 р.); IV Міжнародній науковій конференції молодих вчених і студентів «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (г. Шимкент, Республіка Казахстан, 2016 р.) та на семінарах відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (2014 – 2016 рр).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 14 робіт: 7 статей у фахових наукових журналах, 1 – в зарубіжному електронному виданні; 7 тез доповідей у матеріалах з'їздів і конференцій.

Статті у фахових та іноземних журналах:

1. **Pushkarova N.O.** *Crambe tataria* Sebeok seeds and plants grown *in vitro* and *in vivo* fatty acid composition comparison / **N.O. Pushkarova**, M.S. Kalista, M.A. Kharhota, D.B. Rakhmetov, M.N. Kuchuk // *Potravinarstvo*. – 2016. – V. 10 (1), P. 494 – 498.

2. **Pushkarova N.O.** Biotechnology approaches for conservation of the endangered species *Crambe koktebelica* (Junge) N. Busch and effect of aseptic *in vitro* cultivation on its biochemical properties / **N.O. Pushkarova**, M.S. Kalista, M.A. Kharhota, D.B. Rakhmetov, M.N. Kuchuk // *Biotechnol. acta*. – 2016. – V. 9, № 4, P. 19 – 27.

3. **Пушкарьова Н.О.** Отримання культури рослин зникаючого виду *Crambe steveniana* та вивчення впливу асептичних умов культивування на їх біохімічний склад / **Н.О. Пушкарьова**, М.С. Каліста, В.Б. Белокурова, М.В. Кучук // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. – 2016. Т. 27, С. 155-162.

4. **Pushkarova N.** Phylogenetic study of *Crambe* species with ISSR markers / Lakhneko O., **Pushkarova N.**, Stepanenko A., Kuchuk M., Morgun B. // *Vestnik of the South-Kazakhstan state pharmaceutical academy Republican scientific journal*. – 2016. V. 4 (77), P. 7-10.

5. **Пушкарьова Н.О.** Ефективність поверхневої стерилізації насіння як важлива умова створення *in vitro* колекції рослин, що охороняються / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова, М.В. Кучук // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – 2015. – Т. 17, С. 241–244.

6. **Пушкарьова Н.О.** Застосування регуляторів росту для мікроклонального розмноження *in vitro* рослин, що охороняються / **Н.О. Пушкарьова**, В. Б. Белокурова, М. В. Кучук // *Рідкісні рослини і гриби України та прилеглих територій: реалізація природоохоронних стратегій*.

Матеріали IV міжнародної конференції (м. Київ, 16-20 травня 2016 р.) – 2016. – С.218-222.

7. **Пушкарьова Н.О.** Вивчення деяких біохімічних характеристик видів рослин, що охороняються, в культурі *in vitro* / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова, М.В. Кучук // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т. 19, С. 182–184.

Тези доповідей у матеріалах з'їздів і конференцій:

1. **Пушкарьова Н.О.** Вивчення особливостей введення в асептичну культуру та пагоноутворення *in vitro* деяких видів рослин, занесених до Червоної книги України / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова // Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень: матеріали Другої міжнародної науково-практичної конференції (смт Путила, 24 квітня 2015 р.) – 2015. – С. 228 – 232.

2. **Пушкарьова Н.О.** Особливості введення в культуру *in vitro* рідкісного виду *Crambe tataria* Sebeok / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова // “Біотехнологія XXI століття”: тези доповідей IX Всеукраїнської науково-практичної конференції присвяченій 170 річниці від народження Іллі Мечникова (Київ, 24 квітня 2015 р.) – 2015. – С. 162 – 163.

3. **Пушкарьова Н.О.** Особливості мікроклонального розмноження *in vitro* *Crambe tataria* Sebeok / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова // “Біотехнологія: звершення та надії” : IV Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених (Київ, 21 – 22 травня 2015 р.) – 2015.

4. **Pushkarova N.O.** Seed surface sterilization as the first step in establishing *Crambe aspera* M. Bieb aseptic culture / **N.O. Pushkarova**, V.B. Belokurova, M.V. Kuchuk // Ukrainian Society of Cell Biology International conference Advances in Cell Biologt Biotechnology (Lviv, 11 – 13 Ooctober 2015) – 2015.

5. **Пушкарьова Н.О.** Вміст біологічно активних сполук в рослинах роду *Crambe* // **Н.О. Пушкарьова**, М.В. Кучук // Молодь і поступ біології: збірник тез

ХІІ Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (Львів, 19 – 21 квітня 2016 р.) – 2016. – С. 133 – 134.

6. **Пушкарьова Н.О.** Молекулярно-генетичний аналіз рослин *Crambe koktebelica* // О.А. Бондар, О.Р. Лахнеко, **Н.О. Пушкарьова** // Біотехнологія ХХІ століття: матеріали ХІ Всеукраїнської науково-практичної конференції (Київ, 21 квітня 2017 р.) – 2017. – С. 16.

7. **Пушкарьова Н. О.** Особливості введення в культуру *in vitro* деяких рідкісних та зникаючих видів флори України / **Н.О. Пушкарьова**, В. Б. Белокурова // Наукові пріоритети розвитку аграрної сфери в умовах глобальних змін: матеріали міжнародної науково-практичної Інтернет конференції (Тернопіль, 4–5 грудня 2014 р.) – 2014. – С. 71–73.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертація складається зі списку умовних скорочень, анотації українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення, висновків та списку використаних джерел, що містить 188 посилань та додатків. Дисертація викладена на 154 сторінках комп'ютерного друку і містить 21 таблицю та 44 рисунків.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.

1.1. Поняття про біорізноманіття та проблеми його збереження.

Протягом останніх десятиліть спостерігається стрімке зниження видового різноманіття внаслідок вимирання деяких дикорослих видів рослин. При цьому наші знання про стан видового різноманіття рослинного світу є далеко не повними. По критеріям зміни чисельності рослин у світі оцінюється менше 5% відомих людству видів (10,916 видів), тому такі неповні дані можуть дати лише приблизну картину динаміки зміни чисельності рослин у світі, особливо якщо розглядати показники тих місцевостей, в яких дані про видовий і кількісний склад флори є неповним [17]. Слід пам'ятати, що при зникненні хоча б одного таксона втрачається не лише компонент світової флори, а й потенційне джерело сполук з біологічною активністю або потенційно цінний генетичний ресурс, що міг би дозволити покращити існуючі сільськогосподарські культури [15, 16].

Міжнародно-правове урегулювання проблеми скорочення біорізноманіття. Для запобігання подальшій втраті біорізноманіття Національною спілкою збереження природи IUCN були створені так звані червоні списки, які регулярно оновлюються. Ці списки дають реальну картину кількості видів, яким загрожує вимирання. Також, були розроблені міжнародні правові документи – конвенції (Конвенція про біорізноманіття, Конвенція про збереження дикої флори і фауни та природних середовищ існування в Європі, Конвенція про збереження мігруючих видів диких тварин) та угоди, і започатковано їх впровадження. Україна, як член міжнародної спільноти, підписала та ратифікувала низку міжнародних природоохоронних конвенцій, взявши на себе задачу збереження біорізноманіття [18-21]. Крім того, на Генеральній асамблеї Міжнародного союзу біологічних наук за підтримки ЮНЕСКО була прийнята Міжнародна програма "DIVERSITAS" та Конвенція про біорізноманіття, ратифікована Україною у 1994 році, на основі якої була підготовлена Загальнодержавна програма збереження біорізноманіття України на 2007-2025 роки. Беручи до уваги те, що Україна займає менше 6% площі Європи, і, при цьому на нашу країну припадає ~35% від

усього біорізноманіття Європи [22, 23], стає зрозумілим, що робота по збереження різноманіття рослинного світу є особливо актуальною для нашої держави.

1.2. Шляхи збереження видового різноманіття.

На даний час розрізняють два основні підходи до збереження різноманіття рослинного світу: *in situ* – в природних екосистемах зі створенням природних територій, що охороняються: заповідників, заказників, національних парків, пам'яток природи тощо; *ex situ* – поза природними середовищами існування: колекції ботанічних садів, генетичні банки. Кожен з підходів є досить результативним та має свої переваги. Оскільки методи збереження рослин *in situ* передбачають збереження видів в межах їх природних екосистем, їх основною перевагою є можливість еволюційних змін видів і популяцій. На жаль, ці методи мають і ряд недоліків – необхідність у великих «диких» територіях та можливість ураження рослин шкідниками та патогенами. Крім того, наявність певного виду на природоохоронній території не обов'язково забезпечує його збереження [24, 25]. Тому, хоча охорона видів в їх природних умовах зростання є ефективним підходом до охорони біорізноманіття, методи збереження видів *ex situ* є суттєвим компонентом єдиної глобальної системи по збереженню видового різноманіття планети.

Методи збереження видового різноманіття *ex situ*. Стратегії збереження генофонду *ex situ* передбачають збір генетичного різноманіття видів і їх зберігання поза природним ареалом – в колекціях рідкісних та зникаючих видів рослин зі створенням банків насіння, польових генних банків та банків культур *in vitro*. Перевагами цих методів є охорона зразків протягом тривалого часу та можливість більш досконалого їх вивчення. При залученні невеликої кількості вихідних особин ці методи дають змогу отримати досить високий коефіцієнт розмноження навіть для видів, що погано піддаються розмноженню *in situ* та *ex situ* та не залежать від погодних та кліматичних умов [1].

Створення банків насіння спрямоване на збереження рослин з насінням, яке добре переносить висушування та має високу схожість [26]. Зниження вологості та температури при зберіганні зразків сповільнює метаболічні процеси,

відповідно сповільнюючи старіння насіння [27]. Польові генетичні банки (живі колекції) та колекції *in vitro* призначені для зберігання видів, що погано піддаються насіннєвому розмноженню та рослин, що розмножуються вегетативно [28, 29]. Збереження генофонду рослин, відновлення чисельності яких в природі є ускладненим, залежить від стабільності відтворення *ex situ*. Відповідно, необхідним є пошук та розробка нових методів збереження генетичного різноманіття. Перераховані вище проблеми може вирішити використання біотехнології, зокрема створення *in vitro* колекції рослин, культивування ізольованих клітин, тканин та органів рослин на штучних живильних середовищах. Разом з тим, використання методів біотехнології має ряд переваг:

- скорочення територій, що використовуються для культивування рослин, та затрат по їх догляду у порівнянні, наприклад, з ботанічними садами та теплицями [30];
- виключення втрат матеріалу через ураження хворобами;
- можливість відновити чисельність видів шляхом створення штучних популяцій на території природного ареалу [31];
- можливість отримання асептичних культур видів, що потребують заходів по відновленню чисельності, без їх вилучення з природного місця зростання [15].

1.3. Шляхи збереження рослин *in vitro*.

В основі технології збереження *in vitro* лежить здатність рослин тривалий час зберігати життєздатність в асептичних умовах. На базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України створена та постійно поповнюється унікальна колекція рослин *in vitro*, в тому числі рослин, що занесені до Червоної книги України.

Збереження рослин в асептичній культурі *in vitro* може здійснюватись трьома шляхами:

- В умовах активного росту;
- В умовах уповільненого росту за низьких температур (+2-15°C);
- Кріоконсервація у рідкому азоті (-196°C).

Кожен з перерахованих шляхів збереження генетичного матеріалу має свої переваги та забезпечує вирішення поставлених цілей.

Збереження рослин в умовах активного росту. Забезпечується шляхом періодичних перенесень культур на свіже живильне середовище, що підтримує регенераційний потенціал рослин на високому рівні, тим самим забезпечуючи їх постійний активний ріст. Такий шлях збереження культури рослин дозволяє зберігати, розмножувати та інтродукувати велику кількість видів, збереження яких в банках насіння є неможливим у зв'язку з низькою схожістю насіння. Даний метод дозволяє отримати велику кількість рослин-регенерантів, які в подальшому можна використати як посадковий матеріал для відновлення природних популяцій з невеликої кількості рослин-донорів (без вилучення з природного ареалу) [1].

Хоча підбір оптимальних умов і сприяє культивуванню протягом тривалого часу без помітних ознак онтогенетичного старіння, зберігання рослин в умовах активного росту часто супроводжується зниженням морфогенного потенціалу та виникненням соматоклональної мінливості [34]. Це явище призводить до втрати чистоти генотипу, що при збереженні генетичного різноманіття є небажаним.

Збереження рослин в умовах уповільненого росту. Цей метод характеризується сповільненням метаболічної активності та вегетативної активності виду, що зберігається та має ряд переваг: можливість тривалого зберігання культур, зменшення витрат на зберігання рослин та збільшення інтервалів між субкультивуваннями [35]. Зберігання в умовах сповільненого росту зазвичай проводиться при температурі $+1...+4^{\circ}\text{C}$, зниженій освітленості (або у темряві), на живильних середовищах без регуляторів росту, при зниженні концентрації сахарози та зниженні вмісту мінеральних солей в середовищі, іноді з додаванням в середовище інгібіторів росту (маніт, абсцизова кислота, сорбіт) [28, 36, 37]. При цьому підбір оптимальних умов культивування дозволяє збільшити період між субкультивуваннями, разом з тим збільшуючи період життєздатності культивованих рослин.

Кріоконсервація рослинного матеріалу. Полягає у повній зупинці мітотичної та метаболічної активності і, відповідно, повній зупинці росту рослин, що зберігаються у рідкого азоту. Кріоконсервація дозволяє повністю відмовитись від субкультивувань. В рідкому азоті можуть зберігатися суспензійні та калюсні культури, апікальні меристеми, сплячі бруньки, ізольовані зародки насіння, соматональні ембріоди та пилок. Розрізняють 3 способи кріоконсервації меристем рослин, що зберігаються:

- повільна заморозка – повільне охолодження зразків (частіше до -40°C) з використанням кріопротекторів та подальшим зануренням у рідкий азот для зберігання [38];
- вітрифікація – швидке охолодження зразків з попередньою дегідратацією (за допомогою розчину з високою концентрацією кріопротекторів, або за допомогою повітряної сушки), яка перешкоджає утворенню внутрішньоклітинної криги [39];
- інкапсуляція-дегідратація (штучне насіння) – інкапсуляція експлантів в альгінатні кульки з наступним зануренням у рідкий азот (після попереднього часткового висушення) [28].

Таким чином, культура *in vitro* використовується як інструмент отримання незараженого рослинного матеріалу, який далі використовується для розмноження та висадження у природні місця зростання. Крім того, такий матеріал є джерелом експлантів для кріоконсервації та спрощує обмін між колекціями [38]. Головною вимогою успішного збереження рослин *in vitro* є підбір та оптимізація умов культивування. Підбір первинного експланта, умов поверхневої стерилізації, складу живильного середовища, фізичних та хімічних факторів культивування є необхідними умовами, що забезпечують тривале зберігання рослинного матеріалу та створення генетичних банків та колекцій *in vitro* культур.

1.4. Морфогенез в культурі *in vitro*.

Морфогенез – це процес розвитку структур з недиференційованого стану у диференційований. Регуляція морфогенезу здійснюється на клітинному,

тканинному рівні та рівні організму в цілому. Особливістю морфогенезу вищих рослин є здатність кожної клітини організму переходити до дедиференційованого стану і можливість давати початок цілій рослині внаслідок переходу до диференціації. Також, рослинній клітині властива тотипотентність – здатність клітини зберігати потенціал до утворення всіх типів клітин дорослого організму. В культурі *in vitro* процес морфогенезу може приводити до диференціації органів *de novo*, тобто до органогенезу.

Дослідження морфогенезу в культурі *in vitro* має певні закономірності, пов'язані з відсутністю регуляції на рівні організму та з використанням регуляторів росту, що дає можливість отримати широкий спектр морфогенних реакцій, які моделюють процеси морфогенезу *in vivo* [40].

Тканини і органи, які зберігають здатність до морфо- чи органогенезу називають відповідно морфогенними чи органогенними.

В культурі *in vitro* до регенерації цілого організму *de novo* призводять лише два шляхи морфогенезу – соматичний ембріогенез і органогенез пагонів знаступним ризогенезом [41]. Обидва шляхи морфогенезу можуть бути реалізовані як шляхом прямого (утворення адвентивних бруньок на експлантах, взятих зрізноманітних органів, без утворення калусної тканини), так і непрямого органогенезу (утворення морфогенних меристем, які дають початок органам, утвореним *de novo*).

Вперше концепція компетенції, детермінації та диференціації тканин в процесі органогенезу була запропонована у серії робіт M.L. Christianson та D.A. Warnik на основі вивчення процесів регенерації органів злисткових експлантів в'юнка польового (*Convolvulus arvensis* L.) [42-44]. Автори виділили 3 стадії органогенезу:

1. Набуття клітинами експланта органогенної компетентності (здатність відповідати на гормональні сигнали);
2. Детермінація компетентних клітин під дією екзогенних регуляторів росту;
3. Власне морфогенез (протікає незалежно від регуляторів росту).

Початковим етапом органогенезу в культурі *in vitro* є дедиференціація – перехід тканин експлантів від більш організованого стану до менш організованого. За ступенем дедиференціації розрізняють мультипотентні (здатні дати початок кільком типам клітин в межах лише однієї клітинної лінії) [45], плюрипотентні (здатні сформувати практично бідь-який тип клітин, але не є достатніми для формування цілого організму) [46] та тотипотентні клітини (можуть дати початок усім типам клітин, з яких складається рослинний організм) [47]. Набуття клітинами компетентності на другому етапі органогенезу починається з реакції на специфічні фітогормональні сигнали, які в подальшому призводять до перебудови властивій клітині програми розвитку та перших поділів з утворенням меристематичного центру [48]. При утворенні нової меристеми компетентні клітини вибирають різні програми, що визначають шлях їх подальшого розвитку (стадія детермінації) [49].

В культурі *in vitro* з тканин експланта або калюса можна індукувати розвиток бруньок або коренів. Часто спочатку в морфогенному калюсі на поверхні меристеми закладаються бруньки, а потім у товщині калюса ендогенно формується корінь [50].

Соматичний ембріогенез – це процес, при якому в результаті ряду морфологічних і біохімічних змін соматичні клітини диференціюються і утворюють ембріоїди (зачатки цілої рослини). Соматичні ембріоїди є біполярними (мають 2 меристематичні полюси), мають органи, що притаманні зародку та не мають судинного зв'язку з материнською тканиною [51, 52]. Соматичні зародки формуються з соматичних клітин рослини і повністю повторюють генотип материнського організму [53, 41].

Соматичний ембріогенез вперше спостерігали в 1958 році Ф. Стюард і співавтори у суспензійній культурі *Daucus carota* L. [54] і на сьогодні його вже було показано для багатьох видів. Ефективність індукції соматичного ембріогенезу залежить від ряду факторів, серед яких генотип, тип експланта, мінеральний склад живильного середовища, регулятори росту і фізичні умови культивування (температура, освітленість, рН) [55, 56]. Соматичні ембріоїди

можуть формуватись як зкалюсної тканини (непрямий соматичний ембріогенез), так і безпосередньо з тканин експланта (прямий соматичний ембріогенез). Іноді спостерігається явище вторинного соматичного ембріогенезу, коли новоутворений ембріод припиняє розвиватись і дає початок ембріодам наступного порядку [37]. Для соматичних ембріодів характерні ті самі стадії розвитку що і для зиготичних зародків [57].

Таким чином, розуміння процесів морфогенезу і регенерації рослин *in vitro* має важливе значення для розробки протоколів мікророзмноження та для збереження генетичного різноманіття. Культура *in vitro* може слугувати модельною системою для вивчення шляхів та особливостей морфогенезу для кожного виду рослин індивідуально, оскільки шляхи морфогенезу *in vitro* та *in vivo* є універсальними [40].

1.5. Фактори, що впливають на *in vitro* морфогенез та регенерацію рослин роду *Crambe* L.

Для досягнення успішної регенерації в культурі *in vitro* слід розуміти, які фактори впливають на даний процес та яким чином. Найбільший вплив на морфогенез в культурі *in vitro* мають: тип експланта, генотип материнської особини, мінеральні компоненти середовища, регулятори росту та фізичні умови культивування (температура, фотоперіод, тощо) [59, 40].

Значення вибору експланта при мікроклональному розмноженні рослин в культурі *in vitro*. Експлант – фрагмент тканини чи органа, який самостійно інкубується на середовищі чи використовується для отримання первинного калюсу. Основними факторами, що визначають морфогенний потенціал експланта, є генотип рослини, стадії клітинного циклу клітин експланта, метаболізм клітин та ендогенні регулятори росту. На морфогенний потенціал впливає також і те, від якого органу було отримано експлант для подальшого розмноження, вік рослини-донора, передпідготовка та спосіб розміщення на середовищі [60].

Згідно з даними літератури [10-13, 61-64] для мікроклонального розмноження рослин роду *Crambe* використовують:

- сім'ядольні листки (для *C. giberosa* та *C. abyssinica*);
- сім'ядольні вузли (*C. abyssinica*);
- апікальні меристеми (*C. abyssinica*);
- частини листка (*C. giberosa*, *C. tataria*, *C. abyssinica*);
- частини кореня (*C. maritima*, *C. tataria*, *C. abyssinica*, *C. giberosa*);
- частини стебла (*C. abyssinica*);
- гіпокотиль (*C. abyssinica*);
- бічну бруньку (*C. giberosa*, *C. abyssinica*).

Великі експланти краще реагують на введення в асептичну культуру, швидше ростуть і мають більшу кількість пазушних бруньок, хоча гірше піддаються поверхневій стерилізації.

Доцільність та ефективність роботи запікальними та пазушними бруньками пояснюється тим, що в них вже є необхідні для розвитку рослини-регенеранта структури, які потрібно лише активувати. За використання кореня, листка та інших експлантів, які не характеризуються меристематичною активністю, спочатку потрібно індукувати формування меристематичних клітин і лише потім починається процес регенерації.

Для введення в асептичну культуру часто використовують насіння. Але при роботі зі зникаючими видами рослин часто використання насіння є неможливим у зв'язку зцінністю кожної насінини. Крім того, часто насіння знаходиться у стані спокою, тому робота з ним потребує додаткових стимулів для його переривання. Так, насіння виду *C. giberosa* для успішного введення у асептичну культуру спочатку скарифікували. Застосовували два типи скарифікації – усунення лише перикарпу та усунення перикапру разом з насінневою шкіркою [61]. Проростання насінин без насінневої шкірки у культурі *in vitro* відбувалось вже на 6-7 добу після проведення процедури поверхневої стерилізації, а на 30 добу зусіх насінин, що культивувались, утворювались добре розвинені життєздатні проростки. Насіння з насінневою шкіркою у асептичних умовах не проростало навіть через 90 діб після поверхневої стерилізації [61].

Досить часто в якості первинних експлантів використовують частину листка, стебла або черешка, в яких відбувається утворення меристем адвентивних бруньок *de novo*. Морфогенний потенціал таких експлантів забезпечується високим вмістом ендогенних регуляторів росту, а також активністю інтеркалярної меристеми в черешку і в основі листка [65]. Використання флоральних органів забезпечує збереження рослини-донора, що особливо важливо при роботі з видами рослин, що охороняються. Крім того, надземні органи мають нижчий рівень контамінації ніж підземні органи [66].

Морфогенний потенціал листових експлантів було оцінено для *C. giberosa*, *C. tataria* та *C. abyssinica*. Було показано здатність цього типу експланту лише до калюсогенезу [13, 61, 62]. Для асептичних рослин *C. abyssinica* відмічено невисоку частоту пагоноутворення на черешкових експлантах (до 2,5%) і значно вищу на стеблових – до 30%. При цьому регенерація пагонів відбувалась з утвореної раніше калюсної тканини [62].

Досить ефективним виявилось використання корневих експлантів для розмноження рослин видів *C. giberosa*, *C. maritima* та *C. tataria* у асептичній культурі [12, 13, 61]. Зокрема, для *C. maritima* та *C. tataria* розроблено протоколи мікроклонального розмноження лише з корневих експлантів кореня.

Значення регуляторів росту при мікроклональному розмноженні та культивуванні рослин *in vitro*. Ріст рослин і процеси розвитку (проростання насіння, подовження стебла, ріст і розвиток листків, цвітіння, утворення і дозрівання плодів) контролюються регуляторами росту [67]. Речовини, що синтезуються у рослині та регулюють її ріст і розвиток – ендогенні фітогормони, а їх синтетичні аналоги – екзогенні регулятори росту рослин [78]. В культурі *in vitro* використовують екзогенні гормони, оскільки первинні експланти мають невеликі розміри, тому не здатні самостійно регулювати власний ріст та розвиток в асептичній культурі.

Варіації складу та концентрації екзогенних фітогормонів дають змогу стимулювати морфогенний потенціал експлантів і процеси регенерації в асептичній культурі. Так, для *C. giberosa* було показано, що культивування

кореневих експлантів на середовищі з вмістом 0,5 мг/л БАП викликає пагоноутворення [61]. На кореневих експлантах *C. maritima* відбувався ембріогенез при культивуванні на середовищі з додаванням 10% кокосового молока, 2,0 мг/л ІОК та 0,8 мг/л кінетину [12]. На кореневих експлантах *C. tataria* відмічали пагоноутворення лише за наявності у живильному середовищі НОК з БАП [13].

Для катрану татарського, також було показано високу активність калюсогенезу листкових експлантів. Відмічено, що калюсна тканина утворювалась лише за наявності у середовищі як цитокінінів так і ауксинів (за вмісту 1 мг/л 2,4-Д на листкових експлантах спостерігали калюсогенез), при цьому НОК був менш ефективним ніж 2,4-Д, а БАП, в свою чергу, ніж кінетин. Так, найвища інтенсивність наростання калюсної тканини на листкових експлантах відмічена на середовищі з 2 мг/л кінетину та 1 мг/л 2,4-Д [13]. Для даного виду також показано низьку здатність до калюсогенезу кореня, у порівнянні з листками [13]. Для кореневих експлантів, найбільша активність калюсогенезу спостерігалась за культивування на середовищі з 2 мг/л 2,4-Д [13].

Інші фактори, що впливають на морфогенез в культурі *in vitro*. Крім перерахованих факторів на морфогенез в культурі *in vitro* також впливають: місткість культурального посуду; температура (для більшості рослин температурний оптимум становить 24-25°C – температурні умови, що необхідні для вирощування рослини-донора будуть оптимальними і для рослин-регенерантів); умови освітлення та фотоперіод (вибір інтенсивності освітлення при культивуванні рослин-регенеративів відбувається з урахуванням оптимальної інтенсивності освітлення рослини-донора) [62].

Також відмічено вплив на регенераційну здатність різних типів експлантів *C. abyssinica* (сім'ядольні листки, сім'ядольні вузли та гіпокотиль) застосування різних гелюутворюючих сполук, зокрема агар-агар мікробіологічний, фітобленд та гелерайт [62]. Так, на сім'ядольних листках, культивованих на середовищах з додаванням агару, відмічали калюсогенез на усіх експлантах разом з відсутністю регенерації (лише перенесення на живильне середовище 34,4 μ М БАП та 5 μ М

НОК викликало непряму регенерацію з частотою 8%). Культивування тих самих експлантів на середовищі з додаванням фітобленду за однакових концентрацій регуляторів росту викликало непряму регенерацію пагонів (13%-58%) [62]. На частинах епикотилія, що проростали на середовищі з агаром відмічали пряму регенерацію пагонів з частотою від 23% до 98%. На середовищі з фітоблендом, частота непрямої регенерації була вищою – від 50% до 100% (100% регенерації пагонів спостерігали на середовищі з 22 μM БАП та 0,5 μM НОК). Крім того, показано позитивний вплив використання агару у середовищі (у порівнянні з фітоблендом) на активність калюсогенезу на гіпокотиліях [62]. Застосування гелрайту у середовищі знижує частоту регенерації пагонів у порівнянні з фітоблендом [10].

На регенерацію різних органів рослин у культурі *in vitro* також може впливати вибір джерел азоту та вуглецю. Азот є необхідним для росту та розвитку рослини. До експлантів, що культивуються *in vitro*, азот надходить в основному у формі іонів NO_3^- та NH_4^+ , тому його наявність у достатній кількості у обох формах має важливе значення для росту та диференціації клітин [70]. Дослідження показують, що застосування NH_4^+ як єдиного джерела азоту негативно впливає на регенерацію та ріст нових пагонів, може знижувати темпи поділу клітин, елонгації та формування пагонів у культурі тканин [70-72]. Саме баланс між NO_3^- та NH_4^+ є важливим для сприяння ембріогенезу. Для визначення оптимального мінерального складу середовища для регенерації з гіпокотилія *C. abyssinica* було досліджено чотири типи основ для живильних середовищ – MS [73], Lep (Lepoivre) [74], N6 [75] та WPM (Woody plant medium) [76]. Найвищі показники регенерації було отримано на живильному середовищі Lep, дещо нижчі на MS та N6 і найнижчі на середовищі WPM [10].

Джерело вуглецю також може викликати зміни частоти регенерації. Так, для регенерації з гіпокотилія *C. abyssinica* вміст у середовищі 16 г/л глюкози, або 30 г/л сахарози викликав підвищення частоти регенерації у порівнянні з культивуванням частин гіпокотилія на середовищі з фруктозою (10-16 г/л) [10].

Існують дані, що свідчать про позитивний вплив на регенераційну здатність експлантів наявності у живильному середовищі AgNO_3 . Так, для *C. abyssinica* вміст 5 мг/л AgNO_3 у середовищі Лер або MS підвищує частоту регенерації [10, 62].

1.6. Заходи щодо збереження видового різноманіття флори України.

Відтоді як було відкрито перші системи регенерації рослин, що дозволяли отримувати велику кількість рослинного матеріалу з соматичних тканин рослин, культура ізолюваних тканин та органів стала альтернативним методом швидкого розмноження рослин [77].

Згідно з останнім видання Червоної книги України [78], список рослин та грибів, що потребують заходів по збереженню їх чисельності на території нашої держави, нараховує 826 видів. Кількість видів представлених у даному списку для мохоподібних становить 46 видів; для лишайників – 52; для грибів – 57 видів; для водоростей – 60 видів. І найбільша частка видів, що потребують охорони, належить судинним рослинам – 611 видів.

Заходів по збереженню потребують представники однієї з найчисленніших родин відділу Покритонасінні (*Magnoliophyta*), класу Дводольні (*Magnoliopsida*) – Родина Капустяні (*Brassicaceae*), зокрема 17 родів (30 видів): рід *Alyssum* – 3 види; рід *Biscutella* – 1 вид; рід *Brassica* – 1 вид; рід *Cardamine* – 2 види; рід *Cochlearia* – 1 вид; рід *Crambe* – 8 видів; рід *Diplotaxis* – 1 вид; рід *Draba* – 1 вид; рід *Erysimum* – 2 види; рід *Isatis* – 1 вид; рід *Lepidium* – 2 види; рід *Lunaria* – 1 вид; рід *Matthiola* – 1 вид; рід *Raphanus* – 1 вид; рід *Schivereckia* – 1 вид; рід *Sobolewsia* – 1 вид; рід *Subularia* – 1 вид; рід *Syrenia* – 1 вид.

1.6.1 Підкісні види роду *Crambe* родини *Brassicaceae*. Рід *Crambe* належить до родини *Brassicaceae* і є при цьому одним з найчисельніших за видовим різноманіттям (44 види) [2, 5, 78-80]. Представники роду можуть проростати як на рівні моря так і на висоті в 3800 м у Гімалаях, як в помірно морських, так і в напівсухих та сухих кліматичних умовах. Спираючись на зону географічного поширення представники роду *Crambe* можна розділити на три частини [3, 4]:

- *Dendrocrambe* DC. – ендемічні види Макаронезійського архіпелагу (Канарські острови та Мадейра), північної частини центральної Європи;

- *Leptocrambe* DC. – види поширені в Середземномор'ї та Африці;

- *Sarcocrambe* DC. – види поширені у Євразії аж до Західних Гімалаїв.

1.6.2. Практичне застосування видів роду *Crambe*. Рослини роду *Crambe* мають досить широкий спектр застосування. Можна виділити три основні напрямки їх використання:

- В харчових цілях. В їжу використовуються зелена маса та коріння. Олія з насіння може бути застосована у кондитерській промисловості, а також в якості салатного масла. Має світлий колір, легко рафінується, не гірчить та за смаком схожа на олію з гірчиці білої [6]. З літературних джерел відоме використання в їжу *C. maritima* (листя), *C. orientalis* (коріння), *C. cordifolia* (коріння та листя), *C. tataria* (коріння), та *C. kotschyana* (коріння) [2].

- В екологічних цілях. В літературі вказується здатність рослин *C. abyssinica* витримувати та акумулювати високі дози миш'яку [80]. Було також виявлено ефективність того ж виду в очищенні стічних вод, що містять токсичні метали (кадмій, свинець і хром) [81].

- В технічних цілях. Масло з насіння представників роду *Crambe* використовують як технічне в хімічній та лакофарбовій промисловості (для підвищення клейкості каучуку та приготування пластичних плівок, для отримання пластмас, синтетичних волокон і масел для змащування) [6];

- Як джерело біопалива. Завдяки високому вмісту довголанцюгової ерукової кислоти (до 60 % від загального вмісту жирних кислот у олії з насіння *C. abyssinica*), що має високу питому теплоту згорання, олія з насіння *Crambe* може бути джерелом біопалива [6].

1.6.3. Рідкісні та зникаючі види родини *Brassicaceae*, що зберігаються *in vitro*. Види, що вивчаються у даній роботі, відносяться до роду *Crambe*, ростуть на території України та занесені до Червоної книги України з різним природоохоронним статусом (табл. 1): *C. koktebelica* (рідкісний) [82], *C. tataria* (вразливий) [83], *C. aspera* (вразливий) [84], *C. steveniana* (вразливий) [85],

C. maritima (вразливий) [87]. Крім того, досліджувані види роду *Crambe* занесено до Red List Europe (*C. aspera*), до Red List EU 27 (*C. aspera*), до IUCN Red List (*C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana*, *C. maritima*) та до World Red List (*C. koktebelica*) (табл. 1.) [2, 9].

Слід зауважити, що зазначені види є ендемічними для Європи і можуть зустрічатись також на Канарських островах [9]. Вказані вище види також занесено до списку дикорослих родичів сільськогосподарських культур, які можуть бути використані для покращення цінних культур [9] та вважаються потенційно олійними культурами [2, 6].

Табл. 1. Природоохоронний статус у досліджуваних видів роду *Crambe*.

Вид	Червона книга України	Червоні списки (світові)	Червоні списки (Європа)	Червоні списки (EU 27)	Червоні списки IUCN
<i>C.koktebelica</i>	Рідкісний	Недостатньо даних	-	-	Недостатньо даних
<i>C. tataria</i>	Вразливий				Найменший ризик
<i>C. aspera</i>	Вразливий		Вразливий	Під загрозою вимирання	Вразливий
<i>C. steveniana</i>	Вразливий				Недостатньо даних
<i>C. maritima</i>	Вразливий				Найменший ризик

Біотехнологічні методи збереження рослинного різноманіття, зокрема методи культури *in vitro*, не широко використовуються з метою збільшення чисельності рослин. Тому, для більшості видів рослин, що потребують охорони, не розроблено ефективних протоколів введення у асептичну культуру та мікроклонального розмноження.

З 30 рідкісних видів родини *Brassicaceae* в культурі *in vitro*, згідно з даними літератури, досліджено лише 6 видів – *Alyssum borzaeanum* Nyár. (зазначено

існування культури рослин, калюсні лінії та ембріогенні культури) [86], *Biscutella laevigata* L. (в асептичній культурі представлений культурою рослин та калюсними лініями) [87, 88], *Crambe maritima* L. (зазначено існування культури рослин, калюсні лінії та ембріогенні культури) [12, 89], *Crambe tataria* Sebeok [13] (в асептичній культурі представлений культурою рослин та калюсними лініями), *Lunaria rediviva* L. та *Matthiola fragrans* Bunge (в асептичній культурі представлено культурою рослин) [90, 91] (Додаток 1).

Дослідження рідкісних та зникаючих видів роду *Crambe* у культурі *in vitro*.

Серед представників родини *Brassicaceae*, що потребують охорони до складу світових колекцій культур *in vitro* входять лише 6 видів (Додаток 1). Рід *Crambe* в Червоній книзі України представлений найбільшою кількістю видів (8 видів), але у колекції *in vitro* представлений лише 2 видами (*C. maritima*, *C. tataria*). Для інших видів роду *Crambe* робіт по культивуванню *in vitro* знайдено не було (Додаток 1).

1.7. Вплив асептичних умов культивування на біохімічні властивості та генетичну стабільність рослин, що зберігаються

Використання методів біотехнології для збереження біологічного різноманіття дає змогу зберігати види, які важко піддаються традиційним методам розмноження. Але застосування методів біотехнології, зокрема методів культури *in vitro*, можливе лише за умови всебічного вивчення впливу асептичних умов на рослинний організм та його функціонування.

Антиоксидантна активність рослинного матеріалу. Існування живого організму у аеробному середовищі супроводжується надлишковим утворенням активних форм кисню, що викликає окислювальний стрес у клітинах. Рослини постійно підтримують баланс між утворенням та руйнуванням активних форм кисню, але стресові умови (засоленість ґрунтів, УФ-опромінення, несприятливий температурний режим, тощо) викликають підвищення рівня активних радикалів та накопичення перекисних сполук змінюючи цей баланс. Накопичення активних радикалів викликає порушення структури ліпідного бішару та інактивацію ряду мембранних білків. Окислення амінокислотних залишків (тирозин, триптофан,

фенілаланін, метіонін, цистеїн), вуглеводів та нуклеїнових кислот викликає пошкодження ДНК і порушення структурної цілісності клітини [92-95]. Утворення активних радикалів можна зупинити за допомогою антиоксидантів - біополімерів та низькомолекулярних сполук, що можуть приєднувати вільний радикал без утворення нового. Такі системи сформувались в ході еволюції у рослинному організмі для забезпечення виживання рослини за несприятливих умов чи за дії стресових факторів. Активність цих систем може відрізнятись залежно від виду рослин.

Споживання людиною рослин з високою антиоксидантною активністю (АОА), як показали дослідження, знижує ризик виникнення ряду захворювань (серцево-судинні захворювання, артрит, хвороба Альцгеймера та ін.) та уповільнює процес старіння [95].

Згідно з даними літератури для представників роду *Crambe* відмічено досить високий вміст деяких компонентів антиоксидантної системи (флавоноїдів, кварцетину та ін.) [96, 97], тому дослідження АОА рідкісних рослин даного роду може показати не лише їх здатність протистояти стресовим чинникам, а й відкрити потенційні джерела антиоксидантів.

Рослини, що культивували *in vitro* та *ex vitro* того самого виду часто відрізняються за показниками АОА. При цьому, спостерігається як підвищення АОА у асептичних рослинах, так і її зниження [98, 99].

Вміст загального розчинного білка у рослинному матеріалі. Білки відіграють ключову роль у всіх обмінних процесах організму, виконують структурну, каталітичну та запасуючу функції. Високий вміст білка у вегетативних органах рослини може свідчити про доцільність її використання в якості кормової культури. Так, відомі дослідження кормових якостей представників роду *Crambe* (*Crambe abyssinica*), що показали високу харчову цінність даного виду, зокрема завдяки високому вмісту білка [100-102].

Умови культури *in vitro* та екзогенні регулятори росту, що застосовують при мікроклональному розмноженні рослин можуть викликати зміну експресії генів які регулюють синтез розчинних та стресових білків [103, 104].

Вміст поліфруктанів у рослинному матеріалі. Фруктани – це запасуючі полісахариди рослин, полімери D-фруктози. У рослинному організмі фруктани у розчинному стані містяться в клітинному соці вакуоль та виконують роль енергетичного резерву організму. Крім запасуючої функції, дані сполуки беруть участь у забезпеченні стійкості рослин до понижених температур та нестачі вологи [105, 106]. Фруктани проявляють імуномодельючу, протипухлинну та протизапальну активність [107], тому рослини, що мають високий вміст поліфруктанів також потенційно можуть бути використані в фармакології.

Зниження активності фотосинтезу, постачання підземним органам вуглецю та інші специфічні для асептичної культури особливості можуть значно підвищувати синтез поліфруктанів у коренях та листках рослин, культивованих *in vitro* [108].

Вміст жирних кислот у рослинному матеріалі. Жирні кислоти (ЖК) мають велике значення у обміні речовин рослинного організму. Вони забезпечують збереження та транспортування енергії; є незамінними компонентами усіх клітинних мембран та регулюють роботу генів. Крім того, деякі поліненасичені ЖК є прекурсорами локальних метаболітів (ейкозаноїдів). Комплексні ліпіди ЖК важливі для термальної, електричної ізоляції та механічного захисту. Вільні ЖК та їх солі можуть виконувати роль детергентів завдяки своїм амфіпатичним властивостям та здатності утворювати міцели [109].

ЖК є вуглецевими ланцюгами з карбоксильною групою ($-\text{COOH}$) на одному кінці молекули. Ковалентні зв'язки між атомами вуглецю можуть бути одинарними (атоми вуглецю мають один атом водню) або подвійними (атоми вуглецю мають два атоми водню). Ланцюжки з одинарним зв'язком називають насиченими ЖК. Більшість насичених ЖК є прямими воднево-вуглецевими ланцюгами з рівним числом вуглецевих атомів. Найбільш поширені ЖК містять 12-22 атомів вуглецю.

Вуглецеві ланцюги з подвійним зв'язком (ненасичені ЖК) можуть мати один (мононенасичені ЖК), два і більше подвійних зв'язків (поліненасичені ЖК), які розташовані в молекулі через одну групу CH_2 . Найбільш поширені

мононенасичені ЖК довжиною 16-22 атоми мають подвійний зв'язок у конфігурації *cis* (атоми водню на іншому кінці подвійного зв'язку орієнтовані в тому ж напрямі). Поліненасичені ЖК, що утворюються лише в рослинах та фітопланктоні, є незамінними для усіх вищих організмів. ω -3 та ω -6 ЖК є важливими у харчовому раціоні тварин та людини [109, 110].

Умови культивування *in vitro* відмінні від природних умов уснування рослин, тому можливою є зміна вмісту ЖК у рослинах. Відсутність різких перепадів температур в першу чергу може викликати зміну вмісту мембранних ЖК, оскільки вони відіграють роль у стійкості рослин до температурних коливань [109, 110]. Крім того, процедура поверхневої стерилізації, мікроклональне розмноження та подальше тривале культивування рослин-регенерантів *in vitro* може виступати досить сильним стресовим фактором та викликати активацію мобільних елементів з подальшими мутаціями або зміною експресії генів, що відповідають за ліпідний синтез [102, 104].

Генетична мінливість у кільтурі *in vitro*. Для встановлення ступеня спорідненості між таксонами, популяціями та організмами, або для визначення генетичної структури популяцій чи угруповань часто застосовують метод полімеразної-ланцюгової реакції (ПЛР), що опирається на застосування різних молекулярно-генетичних маркерів [111-113]. Техніка оцінки генетичної однорідності рослинного матеріалу на основі ISSR-маркерів (інвертовані повтори) поєднує більшість переваг AFLP (поліморфізм у сайтах рестрикції) та мікросателітного аналізу з універсальністю RAPD-методу (випадково ампліфікована поліморфна ДНК) [114]. ISSR-маркери мають високу репродуктивність завдяки використанню довгих праймерів (у порівнянні з RAPD-праймерами), що дозволяє застосовувати вищу температуру ренатурації та зумовлює більшу точність.

Культивування *in vitro* може призводити до появи соматоклональної мінливості як у калюсних культурах, так і в рослинах-регенерантах [115-117]. Для оцінки соматоклональної мінливості різних видів рослин використовують молекулярні маркери, зокрема ISSR- та SSR-маркери (мікросателітні локуси), що

дозволяють ідентифікувати зміни нуклеотидних послідовностей різних ділянок геному. Збереження генетичної стабільності рослин-регенератів по відношенню до вихідної материнської особини є важливим для виключення фенотипових, цитологічних, біохімічних та молекулярних змін у рослин-регенератів, що зберігаються *in vitro*. Такі зміни унеможливають отримання уніфікованого рослинного матеріалу з прогнозованою якістю та характеристиками шляхом мікророзмноження. Згідно з даними літератури, на частоту соматичної мінливості у культурі *in vitro* можуть впливати такі фактори як тип морфогенезу (непряма регенерація), генотип [118], джерело експлантів [119], регулятори росту [120, 121] склад живильного середовища, тривалість, умови культивування та ін..

Рідкісні види потребують розробки методів оцінки генетичної однорідності рослинного матеріалу, що зберігається та розмножується методами біотехнології, зокрема у культурі *in vitro*. Хоча дана технологія широко використовується для дослідження видів родини *Brassicaceae* [121-124], в тому числі існують публікації по вивченню популяцій видів роду *Crambe* [125-132], оцінка стану популяцій досліджуваних видів на території України досі не проводилась.

У зв'язку з можливим прикладним застосуванням рослин роду *Crambe* та показаною вище їх цінністю в якості генетичного матеріалу для покращення сільськогосподарсько важливих видів, розробка шляхів збільшення чисельності та умов регенерації рослин досліджуваних видів є важливим завданням. Оптимізація умов, що необхідні для прямої та непрямої регенерації, а також розділення утворених *in vitro* пагонів на адвентивні та не адвентивні дасть змогу використовувати отримані схеми мікроклонування з метою збереження генетичного матеріалу (без генетичних змін рослин-регенератів по відношенню до материнських форм) та для селекційного виведення нових форм. Крім того, у зв'язку з відсутністю робіт по культивуванню більшості досліджуваних рідкісних видів роду *Crambe in vitro*, досі не було вивчено генетичну стабільність рослин-регенератів по відношенню до рослин-донорів за допомогою молекулярно-генетичних методів. Дослідження змін біохімічних параметрів рослин (АОА, вміст загального розчинного білка, поліфруктанів, ЖК) допоможе краще

зрозуміти механізм підтримання стійкості до стресових факторів (пониження температури оточуючого середовища, посухи, тощо) видів даного роду.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктами дослідження служили рідкісні ендемічні види роду *Crambe* [78]. Вихідним матеріалом для започаткування культури рослин *in vitro* використовували насіння досліджуваних видів. В якості первинних експлантів для мікророзмноження використовували частину листка, частину черешка, частину кореня та бічну бруньку асептичних рослин видів *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та *C. maritima*. Для дослідження біохімічних властивостей та генетичної мінливості рослин досліджуваних видів використовували зелене верхівкове листя рослин, культивованих *in vitro* (протягом 30 днів на безгормональному живильному середовищі MS), а в якості контролю – зелене верхівкове листя рослин, що культивували *in vivo*, від яких був взятий вихідний матеріал для введення у асептичну культуру.

2.1. Ботанічна характеристика рослин роду *Crambe*.

Представники дослідного роду є однорічними, багаторічними травами або напівчагарниками. Стебло голе або розсіяно опушене простими волосками, прямостояче. Прикореневе листя велике, виймчасто-зубчасте, перисто-розсічене або глибоко розсічене, зазвичай голе або слабо опушене, досить м'ясисте, пухирцево-зморшкувате та хвилясте по краям на міцних довгих черешках. Стеблове листя нечисленне, значно менше за прикореневе, більш м'яке, зазвичай зубчасте, черешкове. Верхнє листя дрібне ниткоподібне або взагалі відсутнє. Кисті верхівкові, крупні та галузисті. Квітки дуже численні, дрібні, ароматні, білого або жовтувато-зеленого кольору, чотирьохчленні. Плід – двочленний нерозкривний стручок. Верхній членник крупний, одноплідний, шаровидний або яйцевидний, зморшкуватий, спочатку м'ясистий, а потім сухий та міцний. Нижній членник короткий, циліндричний, безплідний. Насіння 1-3 мм в діаметрі, коричневого або чорного кольору. Цвітіння настає у червні [2, 4, 79].

У представників роду *Crambe* унікальний основний набір хромосом $x=15$ при цьому, вони завжди поліплоїдні [133, 134]. Диплоїдний набір хромосом ($2n$)

різниться від 30 до 150 на кшталт поліплоїдного ряду в 30, 45, 60, 90, 120 та 150 хромосом.

2.1.1. *Crambe koktebelica* (Junge) N. Busch – Катран коктебельський. Локальний ендемічний вид, що на території України росте в східному Криму. Відомі дві локальні популяції: на Карадазькому гірському масиві та на узбережжі Коктебельської бухти. Рослини ростуть або поодинокі, або невеликими групами.

Рослини виду зростають на сухих еродованих глинистих схилах зі змитими ґрунтами по морських обривах, на вапняково-щебенистих схилах та на сланцевих осипищах (рис. 1). Вид є геліофітом та субксерофітом.

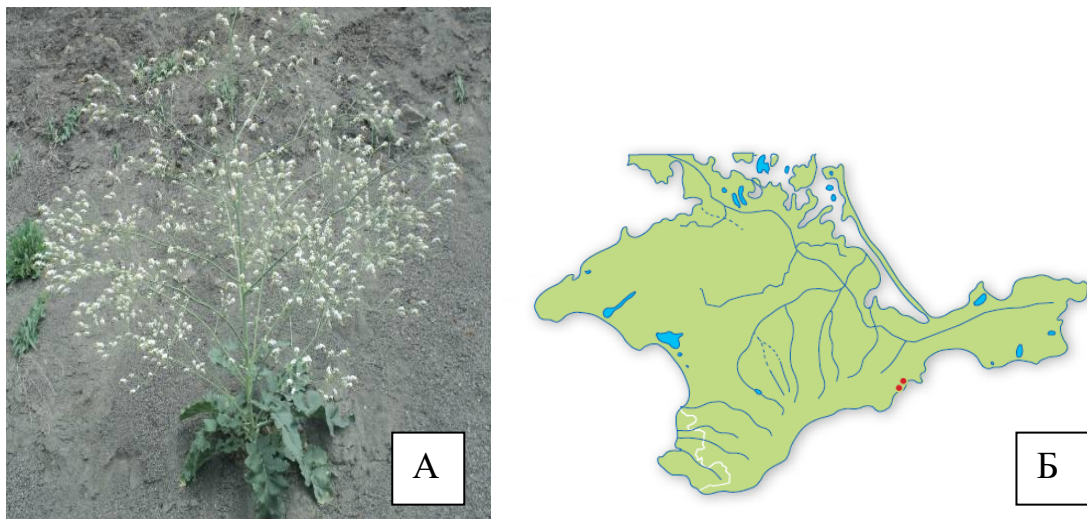


Рис. 1. Зовнішній вигляд (А) та поширення (Б) рослин виду *Crambe koktebelica*.

Катран коктебельський відноситься до гемікриптофітів. Це напіврозеткова рослина, малорічний монокарпик, висотою до 1,5 – 2,5 м. Стебло прямостояче, сильно розгалужене, починає галузитись майже від самої основи, опушене густими, спрямованими вниз простими волосками. Листки дуже великі (до 30 см завдовжки), розеткові, опушені довгими, загнутими назад простими волосками, черешкові, від ліроподібних, ліроподібно-пірчастих до іноді майже цілісних, по краю нерівномірно різновеликозубчасті, з широко трикутними зубчиками. Коренева система стрижнева. Квіти білі, прості, зібрані в складну розлогу китицю. Плід – гладенький нерозкривний двочленний стручечок з майже

кулястим верхнім члеником, діаметром 4 – 4,5 мм. Цвіте в квітні-травні, а плодоносить в червні-вересні. Розмножується насінням.

Вид занесено до переліку видів, що потребують охорони у рамках І Бернської конвенції (1979) і зберігається на території Карадазького природного заповідника [81, 135].

2.1.2. *Crambe tataria* Sebeok – Катран татарський. Рослини виду в Україні зрідка трапляються у лісостепу, степу та в Криму (рис. 2). Крім того, вид поширений на Кавказі, в південно-західному Сибіру, у Європі (Угорщина, Румунія), та в Болгарії.

Зростають рослини переважно на чорноземах у складі угруповань союзу Astragalo-Stipion. У північній частині ареалу приурочений до крейдяних відслонень з угрупованнями союзу Centaureo carbonati–Koelerion talievii. На Поділлі трапляється у складі екстразональних лучно-степових угруповань союзу Cirsio-Brachypodium pinnati. Вид є ксерофітом.

Катран татарський відноситься до гемікриптофітів. Стебло прямостояче, майже від основи дуже галузиться. На початкових етапах розвитку опушений довгими жорсткими волосками, пізніше – голий, напіврозетковий трав'яний багаторічний монокарпик, висотою 60–120 см. Листки великі за розміром (до 30 см завдовжки), розеткові, черешкові, глибоко двічі пірчастороздільні, з довгастими або лінійно-довгастими, зубчастими або надрізнаними частками. Листки спочатку жорстковолосисті, потім голі, на верхівці — дрібні, ланцетні, майже суцільні. Коренева система стрижнева. Корінь веретеноподібний, довгий та м'ясистий. Квітки білі, зібрані в складну волотисто-галузисту китицю (плейоботрій). Прості китиці спочатку короткі, при плодах видовжені. Плід — голий нерозкритий двочленний стручечок з майже кулястим поперечно зморшкуватим 4-реберним верхнім члеником. Цвіте в травні–червні, а плодоносить у червні–липні. Розмножується насінням.

Охороняється на території Галицького Національного природного парку (НПП) (ділянки «Касова гора», «Великі Голди»), Луганського й Українського

степового природного заповідника (ПЗ), регіонального ландшафтного парка (РЛП) «Печенізьке поле» (Харківська обл.) [82, 136].

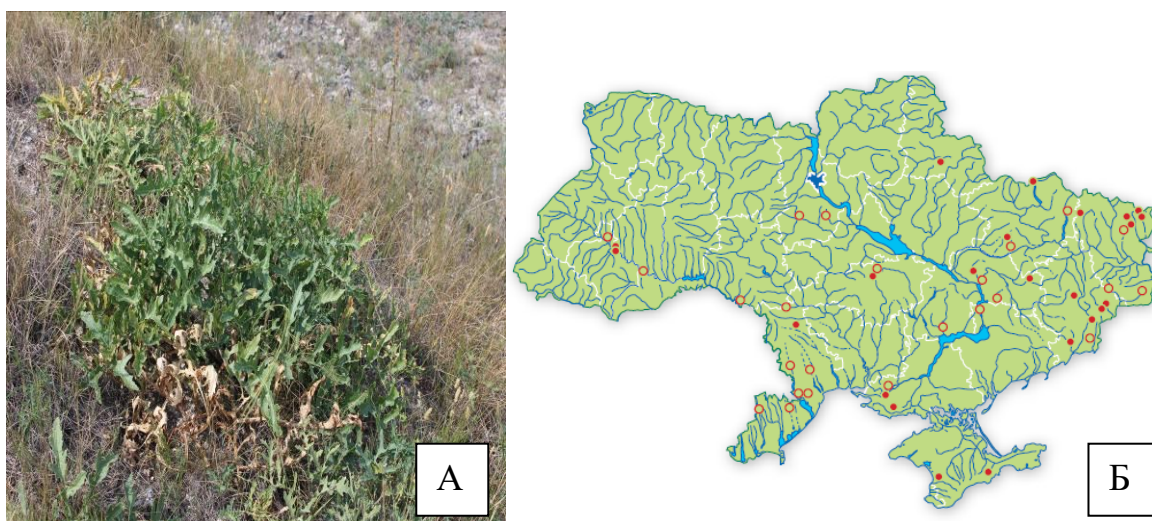


Рис. 2. Зовнішній вигляд (А) та поширення (Б) рослин виду *Crambe tataria*.

2.1.3. *Crambe aspera* M. Bieb. – Катран шершавий. Рослини виду в Україні трапляються в лісостеповій та степовій зонах (рис. 3). Крім того вид поширений у Східній Європі (південна частина). Структура популяцій невідома. Рослини зростають поодинокі або невеликими групами.

Росте катран шершавий в степу, частіше на суглинистих, кам'янистих, супіщаних та солонцюватих чорноземах та відшаруваннях карбонатних порід. Вид є геліофіт, ксерофіт та субксерофіт.

Як і попередньо описані види, катран шершавий відноситься до гемікриптофітів. Це напіврозетковий полікарпик 0,3–0,5 (1) м заввишки. Стебло прямостояче, дуже галузисте, густо опушене шорсткими, довгими, простими волосками, сизе. Листки великі за розміром, розеткові двічі або тричі пірчастороздільні, з довгастими зубчастими долями. Від густого опушення листки набувають сіруватого забарвлення. Коренева система стрижнева. Квітки білі, зібрані в складну розлогу китицю (плейоботрій). Плід — нерозкривний двочленний стручечок, верхній членник якого гоструватий, горбисто-зморшкуватий, 7–9 мм завдовжки. Цвіте у квітні–травні (червні), а плодоносить у червні–вересні. Розмножується насінням.

Охороняється у відділенні «Хомутовський степ» Українського степового ПЗ [82, 137].

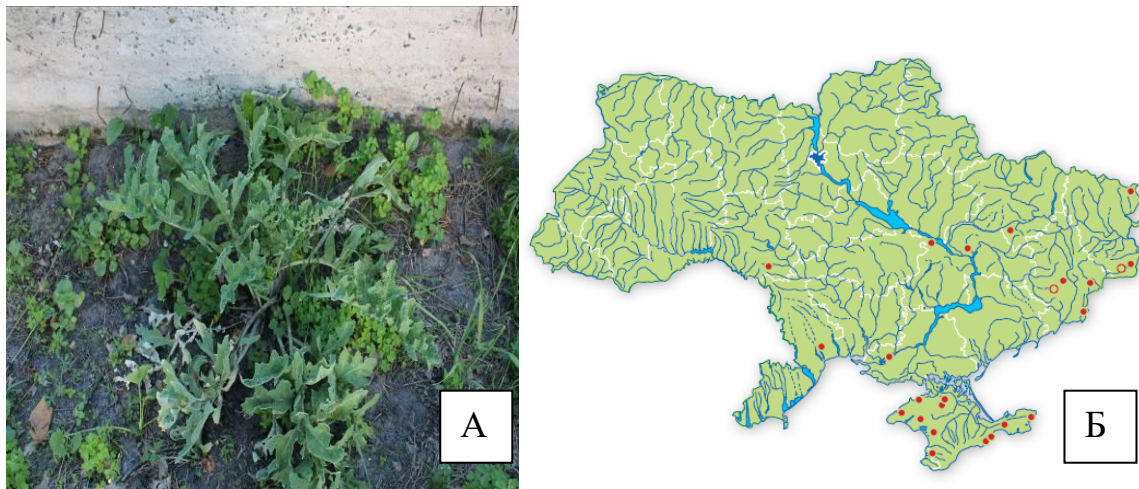


Рис. 3. Зовнішній вигляд (А) та поширення (Б) рослин виду *Crambe aspera*

2.1.4. *Crambe steveniana* Rupr. – Катран Стевена. Рідкісний ендемічний вид, що на території нашої держави зустрічається лише в Криму (в Передгір'ї) (рис. 4). Крім того, рослини виду зростають на Передкавказзі. Трапляються як поодинокі особини так і зібрані у невеликі групи. Чисельність виду незначна й різко зменшується.

Представники виду зростають на степових схилах переважно з виходами крейди та мергелю (угруповання порядку AlysoSedetalia). Відноситься до геліофітів, та є субксерофітом.

Катран Стевена є гемікриптофітом. Рослина зовсім гола, сизуватого кольору, напіврозеткова. Це трав'яний монокарпик (інколи полікарпик), 60–100 см заввишки. Стебло прямостояче, починає галузитись майже від самої основи. Листки товсті, м'ясисті, розеткові, черешкові, пірчасторозсічені або двічі пірчасторозсічені, з віддаленозубчастим або надрізаним краєм та притупленою верхівкою, 18–30 см завдовжки. Коренева система стрижнева. Квітки білі, зібрані в розлогу, рихлу, дуже галузисту складну китицю. Плід — голий, нерозкривний, двочленний стручечок; його верхній членик округлий, чотирьохгранний,

сітчастий, коричневий (зрілий), 6–8 мм завдовжки і 6–7 мм завширшки. Цвіте у травні–липні, а плодоносить у липні. Розмножується насінням.

Охороняється у заказнику загальнодержавного значення «Ак-Кая» [84, 138].

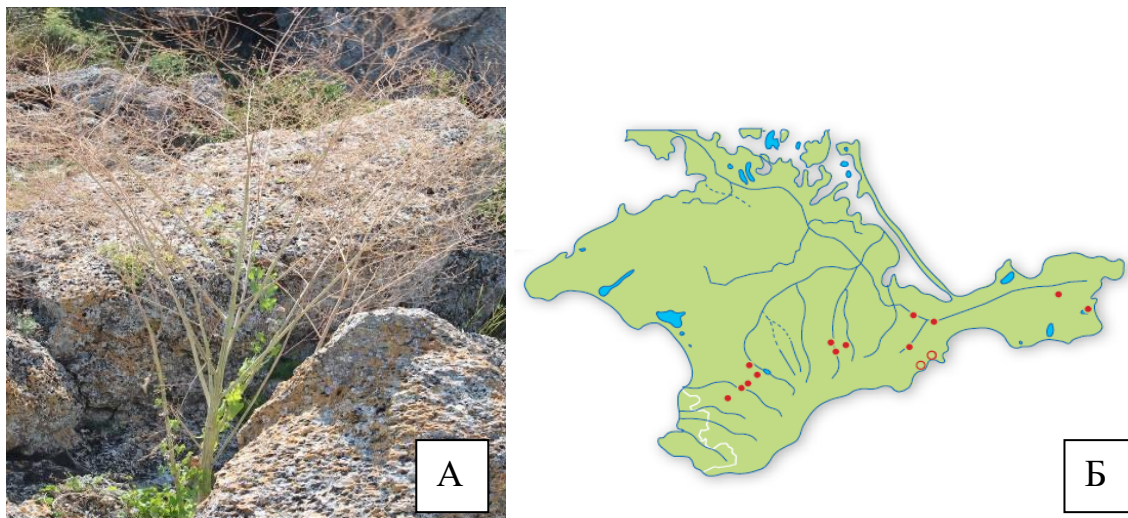


Рис.4. Зовнішній вигляд (А) та поширення (Б) рослин виду *Crambe steveniana*.

2.1.5. *Crambe maritima* L. – Катран морський. Європейсько-Середземноморський літоральний вид, що на території України трапляється у Причорномор’ї та Приазов’ї (рис. 5). Крім того, зростає на території Північно-Західної, Атлантичної, Центральної, Східної Європи, Південно-Західній Азії (Росія, Грузія) та в Північній Африці. Рослини зустрічаються поодинці, але частіше трапляються невеликими групами. Чисельність та структура популяцій вивчені недостатньо.

Зростає рослина на літоральних пісках та черепашниках з різкою зміною зволоження. Угруповання кл. *Sakiletea maritimae* та *Ammophiletea*. Вид є геліофітом та ксерофітом.

Катран морський є гемікриптофітом. Це напіврозеткова багаторічна трав’яна рослина (0,3) 0,5–0,6 (0,8) м заввишки. Стебло товсте, прямостояче, дуже галузисте, голе з сизою поволокою. Листки великі, голі, м’ясисті; розеткові — довгочерешкові, в обрисі від яйцеподібних до довгастих, 4–5-лопатові, з нерівномірнозубчастим хвилястим краєм, стеблові (верхні) — ланцетні,

сукулентні. Коренева система стрижнева. Квітки зібрані в складну розлогу китицю. Пелюстки білі, 7–9 мм завдовжки. Плід нерозкривний двочленний стручечок; верхній членик круглястий, горбисто-зморшкуватий або майже гладенький, м'ясистий, 7–9 мм завдовжки. Цвіте у квітні–травні (червні), плодоносить у червні–вересні. Розмножується насінням.

Охороняється в Чорноморському біосферному заповіднику (БЗ), Ялтинському гірсько-лісовому, Карадазькому ПЗ та в Азово-Сиваському НПП [85, 139].

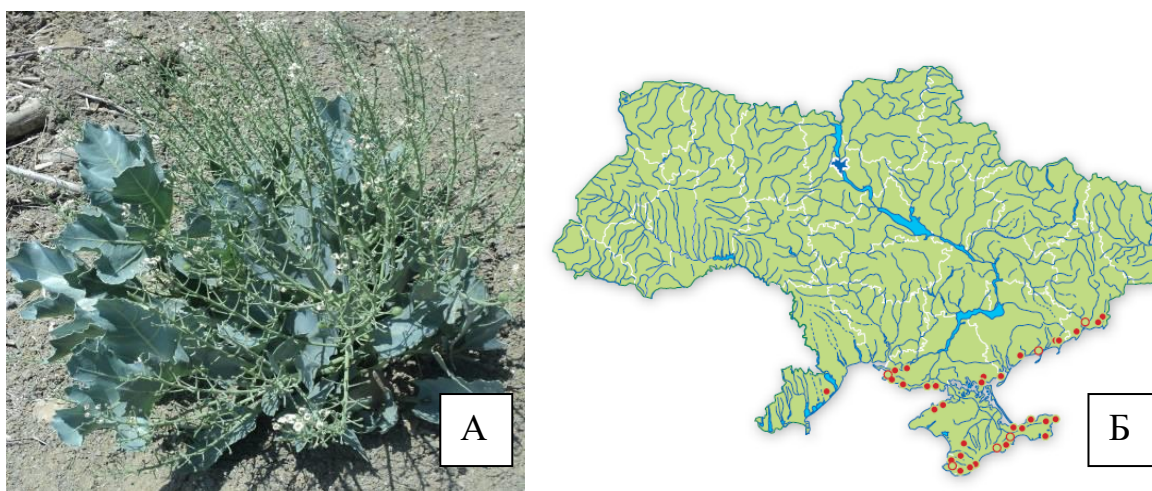


Рис. 5. Зовнішній вигляд (А) та поширення (Б) рослин виду *Crambe maritima*.

2.2. Отримання асептичної культури рослин досліджуваних видів роду *Crambe*.

Експериментальні роботи по культивуванню ізольованих тканин та органів рослин проводили по класичним методикам [140, 141]. Усі роботи з ізольованими тканинами та органами виконували у ламінарному боксі Esco Laminar Flow Cabinet (Esco Technologies, США). Перед початком роботи ламінарний бокс опромінювали бактерицидними ультрафіолетовими лампами протягом 20 хв. Для стерилізації внутрішньої поверхні ламінарного боксу і супутнього обладнання використовували 70 % етанол. Живильні середовища та дистильовану воду стерилізували у автоклаві за тиску 1 атм. та температурі 120 °С протягом 20 хв.

Лабораторний та культуральний посуд стерилізували у сушильній шафі за температури 220 °C протягом 2 годин.

Матеріал для введення в культуру *in vitro*. Насіння, надане науковим співробітником Національного науково-природничого музею НАН України Калістою М.С. було використано як вихідний матеріал для проведення поверхневої стерилізації. Насіння досліджуваних видів було зібране у 2012-2013 рр. Вихідний матеріал також було отримано з банку насіння Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України [142] де зберігалось в умовах пониженої вологості при температурі +4°C.

Проведення поверхневої стерилізації вихідних експлантів. Підготовку експлантів та введення їх у культуру *in vitro* проводили в асептичних умовах згідно з загальноприйнятими рекомендаціями [143] та намагались оптимізувати для кожного з обраних видів. Спочатку з насінин механічним способом знімали шкаралупу (перикарп) та насіннєву шкурку. Далі, насіння попередньо занурювали у 70% етанол на 60 сек, а потім обробляли одним з чотирьох типів стерилізуючих сполук:

1. Промисловий розчин «Білизна» (час експозиції 4 – 18 хв);
2. Діюрид (час експозиції 1 – 6 хв);
3. 3% H₂O₂ (час експозиції 4-20 хв);
4. 50% H₂O₂ (час експозиції 4-12 хв).

Після обробки стерилізуючими розчинами насіння промивали стерильною дистильованою водою тричі по 5 хв. Далі експланти культивували в чашках Петрі на агаризованому живильному середовищі MS [73] при 16-годинному фотоперіоді і температурі +24°C. Аналогічні дослідження були проведені для всіх вказаних вище видів.

Для рослин кожного виду визначали відсоток асептичного насіння по відношенню до загального числа насінин, та відсоток насіння, яке після обробки стерилізуючими сполуками утворювало прростки.

2.3. Умови культивування асептичних рослин та гормональний склад живильного середовища

Умови культивування асептичних рослин. Для дослідження умов розмноження використовували агаризоване середовище MS, доповнене екзогенними регуляторами росту. Для приготування середовища використовували розчини вітамінів, хлориду кальцію (II), хелату заліза (II), що відповідають пропису MS [73]. Всі стокові розчини макро- та мікроелементів, органічних речовин та регуляторів росту зберігали у холодильнику при температурі +4°C. В якості джерела вуглеводів використовували сахарозу в концентрації 30,0 г/л. Для отримання твердого середовища використовували агар марки «Bactoagar» (Panreac, Іспанія) в концентрації 8 г/л. Перед автоклавуванням рН середовища доводили до 5,7 – 5,8.

Гормональний склад живильного середовища. На етапі розмноження мікропагонів дослідних рослин вивчали вплив екзогенних регуляторів росту на процес утворення пагонів. Використовували регулятори росту цитокінінової природи – БАП (0,3 мг/л - 5 мг/л) і кінетин (0,1 мг/л - 5 мг/л), та ауксини: НОК в концентрації 0,1 мг/л до 1,5 мг/л (табл. 2). Культивування мікропагонів проводили в умовах культуральної кімнати за інтенсивності освітлення 4 клк та при 16-годинному фотоперіоді і температурі +24°C. Період між пасажками становив 35-40 днів.

Для кожної групи експлантів (10 шт., що культивували на одному з середовищ №1-24) на етапі дослідження морфогенного потенціалу визначали: частоту пагоноутворення (ЧП), середню кількість експлантів утворених з одного експланта (СП), частоту ризогенезу (ЧР) за наступними формулами:

$ЧП = ЕкП \times 100$, де ЕкП – кількість експлантів, на яких відбувалось пагоноутворення.

$СП = ЗКП / ЕкП$, де ЗКП – це загальна кількість пагонів, що утворились для однієї групи експлантів (10 експлантів, що культивували на одному з середовищ №1-24),

$ЧР = E_{кР} \times 100$, де $E_{кР}$ – кількість експлантів, на яких спостерігався ризогенез.

Табл. 2. Вміст регуляторів росту у живильних середовищах (MS), які використовували для визначення морфогенного потенціалу різних типів експлантів дослідних видів.

Регулятори росту, мг/л		НОК, мг/л			
		0,1	0,5	1	1,5
БАП	1	№1	№2	№3	№4
	2,5	№5	№6	№7	№8
	5	№9	№10	№11	№12
Кінетин	1	№13	№14	№15	№16
	2,5	№17	№18	№19	№20
	5	№21	№22	№23	№24

Інтенсивність наростання калюсної тканини оцінювали відповідно за товщиною калюсної тканини, що утворилась з тканини експланта. Так, відсутність видимого калюсу позначали «-»; незначну проліферацію калюсної тканини лише на місцях надрізів – «+»; 2,5 мм калюсу (лише на місцях надрізів) – «++»; товщину калюса 3,5-10 мм (по всьому експланту) – «+++»; товщину калюса більше 10 мм (по всьому експланту) – «++++». Кожен експеримент було проведено двічі у трьох повторах.

2.4. Укорінення мікропагонів та їх адаптація до умов *in vivo*.

Для укорінення мікропагонів використовували живильне середовище зі зменшеним вдвічі вмістом макро- та мікросолей та сахарози. На етапі індукції ризогенезу вивчали частоту укорінення (процентне співвідношення мікропагонів, що укорінювались, до загальної кількості мікропагонів, висаджених на середовище для ризогенезу).

Мікропагони з добре розвинутою кореневою системою адаптували до нестерильних умов середовища. На етапі адаптації до умов *in vivo*

використовували різні типи субстратів: суміш торфу та піску (3:1), суміш торфу та перліту (2:1). Асептичні рослини висаджували у попередньо проавтоклавований субстрат. Протягом перших 10-15 діб підтримували високу вологість для уникнення висихання листків.

Адаптацію до умов *ex vitro* проводили в приміщенні при освітленні люмінесцентними лампами за температури $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$. Ефективність адаптації оцінювали як процентне співвідношення рослин, що виживали у субстраті та починали утворювати асимілюючі листки до загального числа висаджених у ґрунт рослин.

2.5. Визначення впливу культивування *in vitro* рослин досліджуваних видів на деякі біохімічні властивості

Для оцінки впливу культивування рослин п'яти рідкісних видів роду *Crambe in vitro* досліджували та порівнювали генетичну стабільність рослин, що зростали у асептичних та ґрунтових умовах та наступні біохімічні характеристики – АОА, вміст загального розчинного білка, вміст поліфруктанів та вміст ЖК. Визначення АОА, вмісту загального розчинного білка та поліфруктанів проводили у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Визначення вмісту ЖК проводили на обладнанні Центру спільного користування на базі Інституту мікробіології та вірусології Д. К. Заболотного НАН України. Дослідження генетичної стабільності рослин-регенерантів та рослин-донорів було виконано у відділі молекулярної біології Інституту клітинної біології та генетичної біології НАН України.

2.5.1 Дослідження антиоксидантної активності. АОА визначали за допомогою радикалу 2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозил (DPPH) [144]. Для виготовлення екстрактів рослинний матеріал (вегетативні органи) зважували, гомогенізували з дистильованою водою визначеного об'єму та центрифугували при 1000 g протягом 10 хв. Далі відбирали супернатант. Для проведення реакції використовували розчин DPPH у 96% етиловому спирті (концентрація – 10^{-4} М). Реакцію проводили у 96-лункових мікропланшетах. В кожну лунку додавали розчин DPPH та дослідні екстракти у відповідних розведеннях. Об'єм екстрактів,

що додавались, становив 10, 5, 2,5 та 1,25 мкл, а кінцевий об'єм реакційної суміші у кожній лунці становив 100 мкл. Реакційна суміш витримувалась протягом 30 хв у темряві, при кімнатній температурі, після чого вимірювали оптичну густину суміші при довжині хвилі 550 нм. Також, проводили вимірювання оптичної густини розчинів екстрактів відповідної концентрації у спирті (без додавання DPPH). У якості позитивного контролю використовували водний розчин аскорбінової кислоти концентрацією 1 мг/мл. Поглинання вільного радикала (АОА) виражали у відсотках і обчислювали за формулою:

$$\text{АОА} = A(\kappa) - A(e) / A(\kappa) \times 100, \text{ де:}$$

$A(\kappa)$ – оптична щільність контрольного розчину,

$A(e)$ – оптична щільність дослідного екстракту на спектрофотографі.

2.5.2. Визначення вмісту поліфруктанів. Вміст поліфруктанів визначали за здатністю кетоцукрів забарвлюватись у кислому середовищі за наявності резорцину. Для приготування екстрактів зважували 200 мг рослинного матеріалу, гомогенізували у 0,6 мл дистильованої води, центрифугували при 1000 g протягом 10 хв. Далі відбирали 100 мкл супернатанту, до якого додавали 100 мкл 0,1% спиртового розчину резорцину та 100 мкл концентрованої соляної кислоти. Екстрагування проводили на водяній бані при температурі +80°C протягом 20 хв. Поліфруктани визначали за методом Селіванова з модифікаціями [145] на спектрофотометрі Ерпендорф (Германія) (550 нм). Паралельно проводили реакцію з резорцином розчинів фруктози концентрацією 0,62, 1,25 2,5 та 5 мг/мл. Концентрацію поліфруктанів визначали за калібрувальним графіком (калібрування проводили за розчинами фруктози). Виміри здійснювали у трьох повторностях.

2.5.3. Визначення вмісту загального розчинного білка. Для приготування екстрактів свіжі листки (100 мг) гомогенізували на льодяній бані у охолодженій фарфоровій ступці з додаванням 300 мкл фосфатного буферу, рН 7,4. Далі екстракти кількісно переносили у пробірки Ерпендорф (1,5 мл) та центрифугували протягом 10 хв при 1000 g та +4 °C. Надосад відбирали та переносили у чисті пробірки, після чого центрифугували протягом 25 хв при 16000 g та +4 °C.

Частину супернатанту використовували для визначення концентрації білка за методом Бредфорда з певними модифікаціями [146]. 100 мкл розбавленого у 50 разів супернатанту переносили у пробірку Eppendorf (1,5 мл), додавали 1 мл розчину кумасі діамантового блакитного, перемішували та витримували при кімнатній температурі протягом 3 хв. Вимірювали оптичну густину розчину на спектрофотометрі Eppendorf (Греманія) при довжині хвилі 595 нм. Для побудови калібрувального графіку використовували бичачий сироватковий альбумін у концентраціях 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 мкг/мл. Концентрацію загального розчинного білка у дослідних екстрактах обчислювали використовуючи побудований калібрувальний графік.

2.5.4. Визначення вмісту жирних кислот. Виділення ЖК та їх метилювання проводили одноетапно відповідно до запропонованої R. Garces та M. Mancha методики [147]. Для приготування екстрактів брали 200 мг верхівкових листків рослин. Пробу подрібнювали в ступці. Переносили рослинний матеріал у скляні пробірки з кришками та тефлоновими прокладками і додавали спочатку 3,3 мл реакційної суміші, що містила: метанол:толуол:сірчана кислота в об'ємному співвідношенні 44:20:2, потім 1,7 мл гексану (метанол, толуол, гексан — HPLC-grade, Sigma-Aldrich, США; сірчана кислота — хч, Альфарус, Україна). Пробірки витримували на водяній бані при 80 °C протягом 2 год. Після охолодження до кімнатної температури їх обережно струшували, що призводило до розділення рідини на дві фази. Відбирали верхню фазу, в якій концентрувались утворені метилові ефіри ЖК. Кислотність розчину доводили до нейтрального рН насиченням 1 М розчином фосфату натрію.

Визначення складу ЖК проводили з застосуванням газової хромато-мас-спектрометричної системи Agilent 6890N/5973inert (Agilent Technologies, США) з капілярною колонкою DB-FFAP (довжина 30 м; внутрішній діаметр 0,25 мм; товщина нерухомої фази 0,25 мкм). Хроматографічне розділення відбувалось у градієнтному режимі від 150° до 220° з градієнтом температури 2°/хв. Як газ-носій використовували гелій зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Ідентифікацію проводили, застосовуючи бібліотеку мас-спектрів NIST 02 і стандартну суміш

метилових ефірів ЖК бактерій (Supelco, США). В якості внутрішнього стандарту була використана гептадеканова кислота (C17:0) (хч, ABCR, Німеччина).

Для оцінки ступеня ненасиченості ЖК в тканинах листків використовували індекс ненасиченості (індекс подвійних зв'язків – ІПЗ):

$$\text{ІПЗ} = \sum P_j n / 100,$$

де P_j – це вага ЖК (моль%), n – кількість подвійних зв'язків в кожній ненасиченій кислоті. Також використовували коефіцієнт ненасиченості (K) – відношення суми ненасичених ЖК до суми насичених [148].

Статистична обробка результатів. Статистичну обробку результатів проводили, оцінюючи різницю середніх значень (t -критерій Стьюдента) [149].

2.6. Визначення впливу культивування *in vitro* рослин досліджуваних видів на їх генетичну стабільність.

Праймери, які застосовувались у дослідженні. Список праймерів наведено у таблиці 3. Праймери синтезовані фірмою Metabion (Німеччина). Робочі розчини праймерів концентрацією 10 мМ у стерильному ТЕ буфері (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЕДТА) рН 8,0 зберігали при температурі -20°C .

Виділення загальної ДНК ЦТАБ-експрес методом. Відбирали 0,03-0,04 г зразку і переносили у мікроцентрифужну пробірку Eppendorf на 1,5 мл. Додавали 600 мкл підігрітого до 70°C буферу ЦТАБ (цетилтриметиламонію бромід) (2% ЦТАБ; 1,42 М NaCl; 20 мМ ЕДТА; 100 мМ Tris-HCl рН 8,0; 2% PVP; 5 мМ аскорбінова кислота; 4,0 мМ DIECA (Diethyldithiocarbamic acid)). Перемішували на шейкері Eppendorf (Германія) 1 хв. До отриманої суміші додавали 500 мкл суміші хлороформ:ізоаміловий спирт (24:1). Змішували 5 хв при 500 об/хв на орбітальному шейкері Microshaker ML-1. Центрифугували на центрифугі Eppendorf 5418 на 12000 об/хв 5 хв. Відбирали 200 мкл верхньої водної фази, що містить ДНК, та переносили її у чисту пробірку. Додавали 140 мкл ізопропанолу, перемішували і залишали на 5 хв за кімнатної температури. Осаджували у мікроцентрифугі при 12000 об/хв 20 хв. Зливали супернатант і додавали 800 мкл 70 % етанолу. Ресуспендували. Відцентрифугували 5 хв при 12000 об/хв. Та зливали супернатант. Осаджували 2 хв і відбирали дозатором

залишки етанолу. Висушували осад при температурі 55°C і розчиняли ДНК у 100 мкл TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) [150-152].

Табл. 3. Перелік праймерів, що використовувались у дослідженні

№	Найменування	Послідовність
ISSR		
1	A17898	5'-(CA) ₆ AC-3' [153]
2	B17899	5'-(CT) ₈ TG-3' [153]
3	HB10	5'-(GA) ₆ CC-3' [153]
4	IS-O5	5'- ATTA (CA) ₇ -3' [153]
5	UBC827	5'- ACACACACACACACACG-3' [154]
6	UBC864	5'- ATGATGATGATGATGATG-3' [154]
7	UBC890	5'- VHVGTGTGTGTGTGTGT-3' [154]
SSR		
8	gH032602	5'- AGATGGCTTCTCGAACAACAAC-3' [154] 5'- TTACCCACTCGTGTCTACTAC-3' [154]
9	gHGL110933	5'- ATCCTTACTTGAACTTGTCACC-3' [154] 5'- GAGGGAGATATCAACTGTTACC-3' [154]
10	gHGL218091	5'- GTTGTTGCTCGTCGTCATTAG-3' [154] 5'- ACTCTACTTCTCTCTCGCTTTC-3' [154]

Спектрофотометричне вимірювання загальної рослинної ДНК. Для приготування зразку в пробірку вносили 95 мкл деіонізованої води (Millipore) та 5 мкл препарату загальної ДНК. Потім добре перемішували. Для приготування контролю в пробірку вносили 95 мкл води і додавали 5 мкл ТЕ буферу (pH 8,0).

Вимірювання концентрації здійснювали на фотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35 згідно інструкції виробника. Відповідно до отриманих результатів проводили нормалізацію зразків загальної ДНК до 30 нг/мкл.

Проведення полімеразної ланцюгової реакції. До складу реакційної стандартної суміші входило: 0,5 мкМ специфічних праймерів, 2 мкл буфера для

ПЛР 10× Reaction buffer B (Solis BioDyne), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеотид-3-фосфата (Thermo Scientific), 0,5 од. полімерази FIREPol® DNA Polymerase (Solis BioDyne), 50-100 нг сумарної ДНК, деіонізовану воду Milli-Q до кінцевого об'єму 20 мкл.

Програми ампліфікацій були наступними:

1. ПЛР на ISSR-маркер A17898: денатурація 94 °C – 3 хв, 34 цикли: денатурація 94 °C – 30 с, ренатурація 35 °C – 45 с, елонгація 72 °C – 90 с; завершальна елонгація 72 °C – 5 хв.

2. ПЛР на ISSR-маркер B17899: денатурація 94 °C – 3 хв, 34 цикли: денатурація 94 °C – 30 с, ренатурація 50 °C – 45 с, елонгація 72 °C – 90 с; завершальна елонгація 72 °C – 5 хв.

3. ПЛР на ISSR-маркер HB10: денатурація 94 °C – 3 хв, 34 цикли: денатурація 94 °C – 30 с, ренатурація 40 °C – 45 с, елонгація 72 °C – 90 с; завершальна елонгація 72 °C – 5 хв.

4. ПЛР на ISSR-маркер IS-O5: денатурація 94 °C – 3 хв, 34 цикли: денатурація 94 °C – 30 с, ренатурація 45 °C – 45 с, елонгація 72 °C – 90 с; завершальна елонгація 72 °C – 5 хв.

5. ПЛР на ISSR-маркер UBC827: денатурація 94 °C – 3 хв, 34 цикли: денатурація 94 °C – 30 с, ренатурація 48 °C – 60 с, елонгація 72 °C – 120 с; завершальна елонгація 72 °C – 5 хв.

6. ПЛР на ISSR-маркер UBC864: денатурація 94 °C – 3 хв, 34 цикли: денатурація 94 °C – 30 с, ренатурація 40 °C – 45 с, елонгація 72 °C – 90 с; завершальна елонгація 72 °C – 5 хв.

7. ПЛР на ISSR-маркер UBC890: денатурація 94 °C – 3 хв, 34 цикли: денатурація 94 °C – 30 с, ренатурація 48 °C – 60 с, елонгація 72 °C – 120 с; завершальна елонгація 72 °C – 5 хв.

8. ПЛР на SSR-маркер gH032602: денатурація 94 °C – 3 хв, 34 цикли: денатурація 94 °C – 30 с, ренатурація 52 °C – 30 с, елонгація 72 °C – 30 с; завершальна елонгація 72 °C – 5 хв.

9. ПЛР на SSR-маркер gHGL110933: денатурація 94 °C – 3 хв, 34 цикли: денатурація 94 °C – 30 с, ренатурація 53 °C – 30 с, елонгація 72 °C – 30 с; завершальна елонгація 72 °C – 5 хв.

10. ПЛР на SSR-маркер gHGL218091: денатурація 94 °C – 3 хв, 34 цикли: денатурація 94 °C – 30 с, ренатурація 53 °C – 30 с, елонгація 72 °C – 30 с; завершальна елонгація 72 °C – 5 хв.

Електрофорез ДНК і продуктів ПЛР. Готували агарозний гель концентрацією 1,5 % або 2% в 1×LB (lithium borate buffer) [155]. В якості барвника використовували етидій бромід в концентрації 0,5 мкг/мл. В кожну лунку вносили 8 мкл зразку (для продуктів ПЛР) або 5 мкл (для загальної ДНК) та 1 мкл 6×буферу для нанесення.

Для визначення розміру продуктів використовували маркери GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific) (розмір ампліконів, п.н.: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100). Встановлювали напругу на електродах від 3 до 7 В/см в залежності від розмірів очікуваних ампліконів. Час проведення електрофорезу – від 2 до 4 годин. Для документування результатів горизонтального електрофорезу в агарозному гелі використовували джерело УФ-світла та фотоапарат Canon. Отримане зображення обробляли за допомогою графічного редактора GIMP [156].

Біоінформатичний аналіз. Біоінформатичний аналіз отриманих ампліфікованих фрагментів здійснювався за допомогою програмного забезпечення Gel Analyzer 2010a [157].

Встановлення філогенетичних зв'язків проводили у програмному забезпеченні DARwin 6.0 за допомогою UPGMA методу [168].

2.7. Статистична обробка даних.

Статистичну обробку і аналіз отриманих даних проводили за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Excel 7.0 і Statistica 8.0. Дані подано у вигляді середніх значень та стандартних похибок ($M \pm m$). Для порівняння середніх значень незалежних вибірок застосовували багаторанговий тест Дункана (однофакторний дисперсний аналіз).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Результати поверхневої стерилізації насіння досліджуваних видів.

Види роду *Crambe* мають знижену насіннєву схожість [77]. Раніше було встановлено, що показники насіннєвої продуктивності рослин значно знижуються у природних місцях зростання, порівняно з рослинами, що культивують в умовах інтродукції. На зниження коефіцієнту насіннєвого розмноження впливає не лише антропогенний фактор, а ряд інших умов. Так, коефіцієнт насіннєвої продуктивності у ботанічному саду Південного федерального університета (Росія) склав 45,5%, а у природних місцях зростання (Чумбурська коса) – 18,1% [159]. Методи біотехнології, зокрема культури *in vitro*, можуть бути корисним доповненням класичних способів збереження біорізноманіття, особливо при роботі з багаторічними рослинами, забезпечуючи здоровим посадковим матеріалом у короткий термін. Для цього, необхідно дослідити та оптимізувати усі етапи роботи з культурою *in vitro* для кожного з досліджуваних видів.

На першому етапі роботи по культивуванню *in vitro* рослин рідкісних видів роду *Crambe* нами було протестовано різні схеми поверхневої стерилізації насіння (з застосуванням різних стерилізуючих сполук та різною тривалістю обробки насіння цими сполуками). За використання таких стерилізуючих речовин як промисловий розчин «Білизна», 50% H_2O_2 та 3% H_2O_2 , відсоток отриманого асептичного насіння був значно нижчим, ніж при використанні діюциду, що призводило до втрати насіння і зниження загальної кількості отриманих асептичних паростків. При збільшенні часу експозиції насіння у зазначених стерилізуючих сполуках підвищувались показники асептичності, але кількість насінин, що проростали, зменшувалась. В деяких випадках асептичне насіння не проростало. Тому було визначено оптимальний час експозиції насіння у стерилізуючих сполуках, що забезпечував високу асептичність паростків. За використання промислового розчину «Білизна» цей час складав 13 хв., для 50% H_2O_2 – 8 хв., а 3% H_2O_2 – 16 хв.

Згідно з отриманими результатами було визначено оптимальну схему поверхневої стерилізації насіння досліджуваних видів. Спочатку з насінини механічно знімали тверду зовнішню оболонку (плід) та насіннєву шкірку (епікард), потім експланти занурювали у 70% етанол на 60 сек, далі поміщали у діюцид на 3 хв. Така тривалість експозиції у діюциді забезпечувала високий відсоток асептичного насіння і давала змогу отримати велику кількість асептичних насінин, що проростали. Для кожної групи рослин (по 10 насінин одного виду для кожної стерилізуючої сполуки та тривалості стерилізації) визначали відсоток асептичного насіння по відношенню до загального числа насінин, та відсоток насіння, що після обробки стерилізуючими сполуками утворювало проростки. На рис. 6 зазначено результати поверхневої стерилізації насіння за описаною вище схемою.

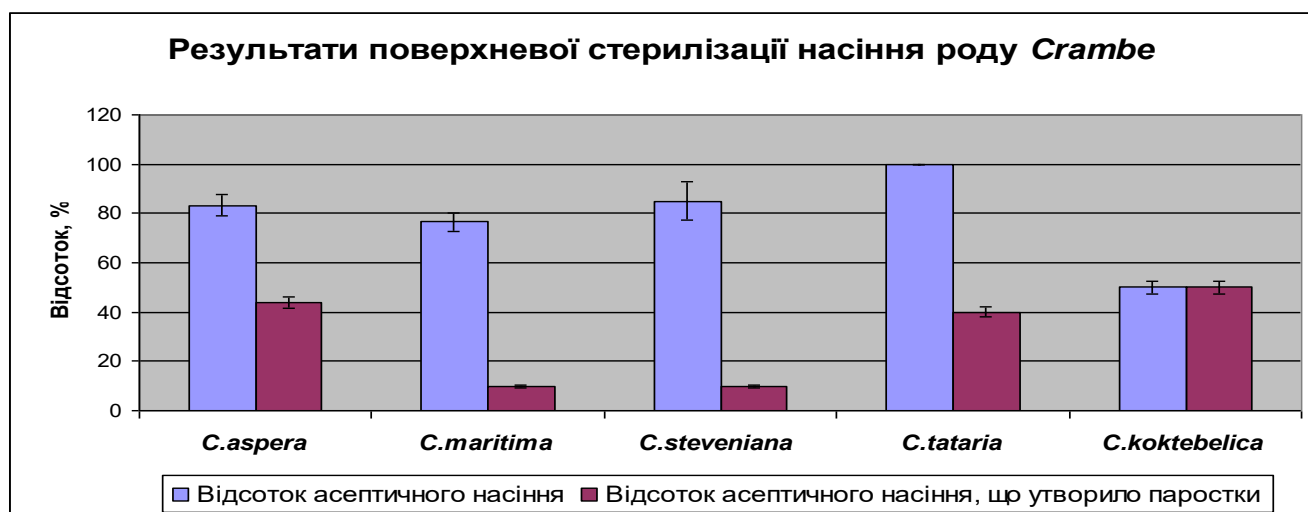


Рис.6. Результати поверхневої стерилізації насіння досліджуваних видів за використання діюциду (3 хв): дані наведено у вигляді $M \pm m$.

Найбільший відсоток асептичності вихідних експлантів показав вид *C. tataria*. Для цього виду практично все насіння, яке було обрано для процедури поверхневої стерилізації, вдалось простерилізувати. При цьому близько 40% насінин далі давали життєздатні проростки (рис. 6) [160]. Первинні експланти видів *C. steveniana* та *C. aspera* також показали досить високу асептичність насіння, але показники проростання насіння видів відрізнялись. З насіння

C. steveniana утворювалась найменша кількість паростків. Після знезараження експлантів *C. aspera* було отримано найвищий серед досліджуваних видів відсоток проростання. Для виду *C. koktebelica* було отримано найменшу кількість асептичного насіння, але половина цих насінин проростала та давала початок культури *in vitro* (рис. 6). Збільшення часу експозиції експлантів у діючій підвищувало відсоток асептичності насіння, але кількість насінин, що проростали після такої процедури, суттєво зменшувалась. Тому, наведена нами методика стерилізації насіння дослідних видів є оптимальною для швидкої ініціації асептичної культури *in vitro* (рис. 7).

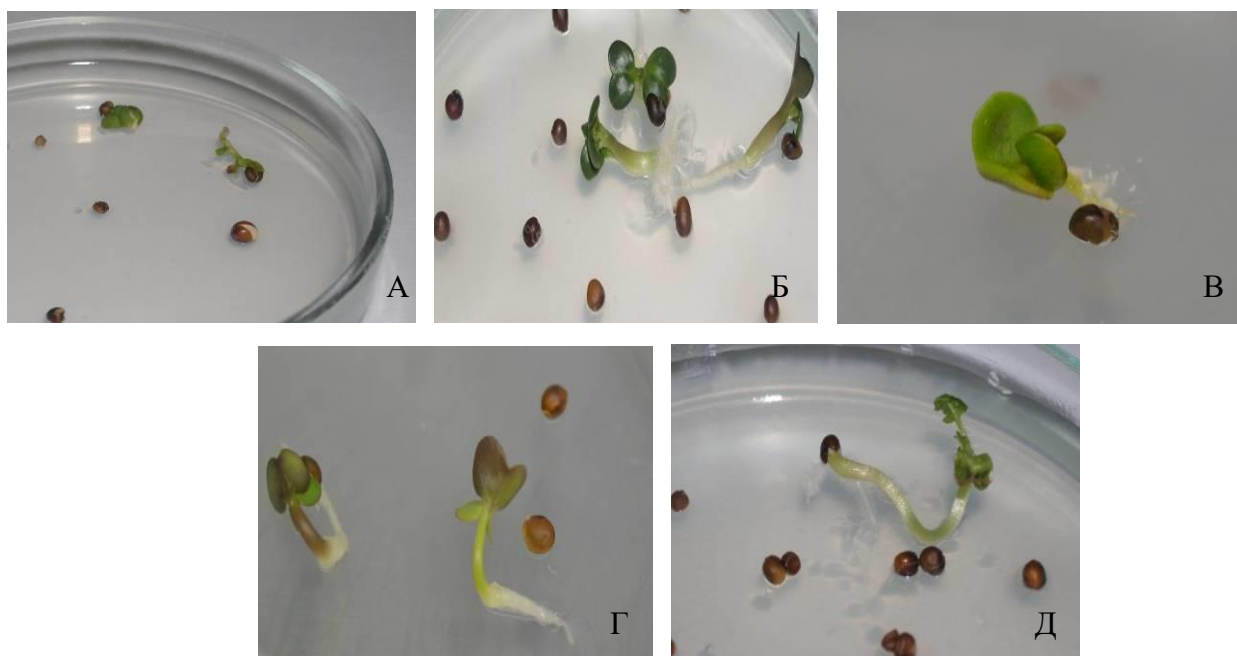


Рис. 7. Проростання насіння дослідних видів *in vitro*:

А – *C. aspera*; Б – *C. maritima*; В – *C. steveniana*; Г – *C. tataria*, Д – *C. koktebelica*.

Час проростання для кожного досліджуваного виду відрізнявся. Найдовше утворювались проростки виду *C. koktebelica*, *C. tataria* та *C. maritima* – через 40-45 днів після процедури поверхневої стерилізації. Набагато швидше проростало насіння виду *C. steveniana* та *C. aspera* (в середньому через 10 днів). Поява у молодих асептичних проростків першого справжнього листка відбувалась в середньому через 12-16 днів після проростання насінини для всіх досліджуваних видів (рис. 7) [161]. Додавання гіберелової кислоти у концентрації 1 мг/л до

складу живильного середовища не супроводжувалось збільшенням числа насінин, що проростали.

Згідно з даними літератури, насінню роду *Crambe* притаманний глибокий спокій [162, 163]. Наші дослідження показали, що насіння позбавлене твердої оболонки (плоду) та шкірки, *in vitro* проростає без внесення до середовища цитокінінів чи гіберелової кислоти. Тому, можна робити висновок про наявність інгібіторів глибокого спокою саме у покривах насінин для усіх досліджуваних видів, що корелює з іншими публікаціями [61, 162].

Для визначення впливу тривалого зберігання насіння в умовах пониженої температури та вологості на схожість порівнювали насіння зібране у 2012-2013 роках та таке, що зберігалось у банку насіння Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Виявили значне зниження схожості насіння, що збігається з даними літератури [159, 160, 162]. У зв'язку з втратою схожості при зберіганні у банку насіння, розробка методів мікроклонального розмноження з подальшою інтродукцією рослин є актуальною проблемою для збереження та відтворення чисельності видів.

Етап поверхневої стерилізації дав змогу оцінити схожість насіння після процедури поверхневої стерилізації, наявність глибокого спокою у насіння п'яти видів роду *Crambe*, що потребують охорони, та шляхи його подолання. Час необхідний для проростання насінини відрізнявся залежно від виду, хоча за темпами росту та розвитку на перших етапах культивування досліджуваних рослин значних відмінностей виявлено не було. Було визначено оптимальні умови для швидкої ініціації культури рослин *in vitro*.

3.2. Дослідження морфогенного потенціалу пазушних бруньок рослин роду *Crambe*.

Згідно з даними літературними стосовно регенерації рослин роду *Crambe*, більшість робіт зосереджена на дослідженні регенерації з частин листової пластинки, гіпокотила та кореня [10, 12, 13]. При цьому, зазначено досить високий коефіцієнт проліферації калюсної тканини [10, 12]. Умови виникнення регенерації шляхом прямого органогенезу для досліджуваних видів досі не було

встановлено. Тому, з метою пошуку шляхів отримання пагонів в культурі *in vitro* без утворення калюсної тканини було протестовано регенераційну здатність пазушних бруньок рослин видів роду *Crambe*, оскільки саме цей тип експланта може забезпечити найбільшу генетичну стабільність вихідних рослин-регенерантів [163], що особливо важливо при збереженні біорізноманіття рослин методами біотехнології.

3.2.1. Морфогенна відповідь експлантів (бічна брунька) *C. koktebelica* на різний гормональний склад середовища. За наявності БАП у середовищі (від 0,3 – 1 мг/л) спостерігалось пригнічення ризогенезу та розвиток калюсної тканини. За культивування експлантів з 0,3 мг/л БАП утворювалось в середньому $4,00 \pm 1,31$ пагони з однієї бічної бруньки (табл. 4), які після перенесення на безгормональне середовище розвивались нормально (швидко укорінювались, утворювались нові листки). Підвищення вмісту даного регулятора росту (до 1 мг/л БАП) у середовищі викликало збільшення кількості утворених пагонів (в середньому $5,25 \pm 0,81$ пагонів з однієї бруньки) (табл. 4), але при подальшому культивуванні на безгормональному середовищі всі пагони погано укорінювались. Таким чином, внесення БАП до складу середовища пригнічувало ризогенез та викликало ініціацію калюсогенезу, що було відмічено і роботах інших авторів по дослідженню морфогенезу *C. giberosa* [61].

За використання кінетину з бічних бруньок вдалося отримати регенерацію без утворення калюсу. Калюс розвився лише за концентрації фітогормону 1 мг/л і більше (табл. 4). Найвищі показники регенерації отримали на середовищі з 0,5 мг/л кінетину (в середньому $4,60 \pm 1,30$ пагонів з однієї бічної бруньки, без утворення калюсу) та 1,5 мг/л (в середньому $5,00 \pm 0,83$ пагонів, але з утворенням калюсної тканини) (табл. 4). За культивування експлантів з кінетином (0,1 – 1,5 мг/л) пригнічувався ризогенез (табл. 4), але при перенесенні на безгормональне середовище пагони швидко укорінювались.

При внесенні до живильного середовища НОК (0,5 – 2 мг/л) спостерігали утворення яскраво-зеленого рихлого калюсу та відсутність кореневої системи. За

культивування експлантів на середовищі з НОК більшим, ніж 0,5 мг/л, відмічали лише калюсогенез без регенерації пагонів (табл. 4).

Табл. 4. Вплив екзогенних регуляторів росту на процеси пагоноутворення, ризогенезу та калюсоутворення з пазушних бруньок рослин *Crambe koktebelica*.

Регулятори росту, мг/л		Утворені пагони, шт	Укорінення	Калюсогенез
БАП	0,3	4,00 ± 1,31	-	+
	0,6	3,20 ± 0,43	-	+
	1	5,25 ± 0,81	-	+
Кінетин	0,1	2,00 ± 0,70	-	-
	0,5	4,60 ± 1,30	-	-
	1	4,00 ± 0,70	-	+
	1,5	5,00 ± 0,83	-	+
НОК	0,5	1,00	-	+
	1	-	-	+
	1,5	-	-	+
	2	-	-	+
МС		1,00	+	-

Примітка: дані подано у вигляді $M \pm m$.

Отже, з бічної бруньки *C. koktebelica* відмічали регенерацію пагонів без утворення калюсу, але отримані пагони укорінювались лише на безгормональному середовищі. Оптимальний вміст регуляторів росту для мікроклонування з бічної бруньки шляхом прямої регенерації – кінетин 0,5 мг/л, шляхом непрямой регенерації – БАП 1 мг/л.

3.2.2. Морфогенна відповідь експлантів (бічна брунька) *C.tataria* на різний гормональний склад середовища. За наявності у живильному середовищі БАП відбувалось пригнічення ризогенезу. Більшість пагонів утворювались після того, як з експланта починала активно розвиватись калюсна тканина. Для *C. tataria* оптимальним можна вважати вміст 0,3 мг/л БАП у середовищі викликає ($12,25 \pm$

3,86 пагонів з однієї бічної бруньки). Зі збільшенням концентрації регулятора росту зменшувалась кількість утворених пагонів (табл. 5).

Табл. 5. Вплив екзогенних регуляторів росту на процеси пагоноутворення (кількість новоутворених пагонів, шт.), ризогенезу та калюсоутворення з пазушних бруньок рослин *Crambe tataria*.

Регулятори росту, мг/л		Утворені пагони, шт	Укорінення	Калюсогенез
БАП	0,3	12,20 ± 3,86	-	+
	0,6	6,00 ± 2,48	-	+
	1	7,20 ± 2,21	-	+
Кінетин	0,1	1,00	-	+
	0,5	3,00 ± 1,14	-	+
	1	4,00 ± 0,89	-	-
	1,5	4,00 ± 0,70	-	-
НОК	0,5	1,30 ± 0,44	-	+
	1	1,30 ± 0,44	-	+
	1,5	1,00	-	+
	2	1,75 ± 0,54	-	+
МС		1,00	+	-

Примітка: дані подано у вигляді $M \pm m$.

За використання кінетину з бічної бруньки *C. tataria* також відмічали регенерацію пагонів та пригнічення ризогенезу. Калюсна тканина утворювалась за низьких концентрацій кінетину (0,1 – 0,5 мг/л). Найвищі показники регенерації відмічено за культивування на середовищі з 1 мг/л і більше кінетину (в середньому 4,00 ± 0,89 пагони) (табл. 5).

Культивування з НОК викликало утворення калюсної тканини та пригнічення ризогенезу як за його низької, так і за високої концентрації. На відміну від попередньо описаного виду, на експлантах *C. tataria* за культивування з НОК відмічено непряму регенерацію пагонів. Найбільше їх утворювалось (в

середньому $1,75 \pm 0,54$ пагони з однієї бічної бруньки) на середовищі з 2 мг/л НОК. При цьому, рослини мали вітрифіковані листки і погано укорінювались на безгормональному середовищі (табл. 5).

Лише за культивування експлантів на середовищі з кінетином отримали пряму регенерацію пагонів з бічної бруньки *C. tataria*, але укорінення утворених пагонів відбувалось лише на безгормональному середовищі. Оптимальний вміст регуляторів росту для мікроклонування з бічної бруньки шляхом прямої регенерації – кінетин 1-1,5 мг/л, шляхом непрямої регенерації – БАП 0,3 мг/л.

3.2.3. Морфогенна відповідь мікропагонів *C. aspera* на різний гормональний склад середовища. Оскільки рослини виду *C. aspera in vitro* мали розеткове стебло, досліджували вплив фітогормонів на 1-1,5 місячні рослини, що висаджували на живильне середовище, доповнене БАП, кінетином та НОК у різних концентраціях. Згідно отриманих даних, укорінення рослин за культивування з БАП (0,3 – 1 мг/л) не відбувалось. Кількість утворених пагонів була за культивування з даним регулятором росту була практично однаковою як за низьких концентрацій, так і за високих (табл. 6).

За низького вмісту кінетину у середовищі з одного мікропагона розвивалось в середньому $2,00 \pm 0,70$ рослини (без утворення калюсу), а зі збільшенням концентрації регулятора росту до 0,5-1,5 мг/л спостерігали утворення калюсної тканини та формування в середньому шести пагонів (табл. 6).

З внесенням до середовища НОК з тканин експланта активно розвивалась калюсна тканина, пригнічувався ризогенез та не відбувалось утворення пагонів. Крім того, за подальшого культивування пагони гинули (за концентрації НОК 1-2 мг/л) (табл. 6).

З мікропагонів *C. aspera* за використання як кінетину, так і БАП, отримували пагони шляхом прямої регенерації. Оптимальний вміст регуляторів росту для мікроклонування з бічної бруньки шляхом прямої регенерації – 0,6 мг/л БАП, шляхом непрямої регенерації – 0,5-1,5 мг/л кінетину.

Табл. 6. Вплив екзогенних регуляторів росту на процеси пагоноутворення (кількість новоутворених пагонів, шт.), ризогенезу та калюсоутворення з пазушних бруньок рослин *Crambe aspera*.

Регулятори росту, мг/л		Утворені пагони, шт	Укорінення	Калюсогенез
БАП	0,3	4,00 ± 1,52	-	-
	0,6	4,50 ± 1,29	-	-
	1	4,30 ± 0,570	-	+
Кінетин	0,1	2,00 ± 0,70	-	-
	0,5	6,00 ± 0,89	-	+
	1	6,00 ± 1,58	-	+
	1,5	5,00 ± 1,44	-	+
НОК	0,5	1,00	-	+
	1	-	-	+
	1,5	-	-	+
	2	-	-	+
МС		1,00	+	-

Примітка: дані подано у вигляді $M \pm m$.

3.2.4. Морфогенна відповідь експлантів (бічна брунька) *C. steveniana* на різний гормональний склад середовища. За низьких концентрацій БАП у середовищі відмічено регенерацію без калюсогенезу. Найбільше пагонів *C. steveniana in vitro* утворювалось за наявності культивування з 0,6 мг/л БАП ($5,30 \pm 1,00$ пагонів з однієї бічної бруньки (без утворення калюсу)). Зі збільшенням концентрації фітогормону до 1 мг/л кількість утворених пагонів зменшувалась та починала наростати калюсна тканина (табл. 7). При цьому, утворені пагони мали дуже витрифіковані листки та погано укорінювались за подальшого перенесення їх на безгормональне середовище.

Внесення кінетину до складу живильного середовища у невисоких концентраціях (0,1-0,5 мг/л) сприяло утворенню калюса з тканин експланта та пригніченню ризогенеза. З однієї бічної бруньки утворювалось в середньому 3

пагони. Зі збільшенням вмісту кінетину до 1 мг/л зменшувалась кількість новоутворених рослин але, при цьому, відмічено ризогенез. Подальше підвищення вмісту кінетину викликало збільшення регенованих пагонів (в середньому $3,00 \pm 0,63$ пагони). Відмічено, що за високого вмісту регулятора росту у середовищі (1-1,5 мг/л) з калюсної тканини утворювались короткі корінці (табл. 7).

Табл. 7. Вплив екзогенних регуляторів росту на процеси пагоноутворення (кількість новоутворених пагонів, шт.), ризогенезу та калюсоутворення з пазушних бруньок рослин *Crambe steveniana*.

Регулятори росту, мг/л		Утворені пагони, шт	Укорінення	Калюсогенез
БАП	0,3	$2,00 \pm 0,59$	-	-
	0,6	$5,30 \pm 1,00$	-	-
	1	$2,70 \pm 1,50$	-	+
Кінетин	0,1	$3,00 \pm 1,58$	-	+
	0,5	$3,00 \pm 0,70$	-	+
	1	1,00	+	+
	1,5	$3,00 \pm 0,63$	+	+
НОК	0,5	$1,80 \pm 0,40$	+	+
	1	$2,00 \pm 0,70$	+	-
	1,5	1,00	+	+
	2	$4,00 \pm 2,00$	+	+
МС		1,00	+	-

Примітка: дані подано у вигляді $M \pm m$.

Культивування з НОК бічної бруньки призводило до регенерації пагонів з тканин експланта та супроводжувалось активним ризогенезом та розвитком калюсу. Найбільшу кількість утворених пагонів за наявності у середовищі даного регулятора росту отримали за концентрації 1 мг/л та 2 мг/л (табл. 4). Лише на

середовищі з 1 мг/л НОК не було відмічено калюсогенезу, а утворені корені були короткі та значно потовщені (табл. 4).

Отже, найбільшу кількість новоутворених пагонів з однієї бічної бруньки шляхом прямої регенерації було отримано за використання БАП. Крім того, на середовищі, доповненому НОК або кінетином отримували регенерацію пагонів без утворення калюсної тканини та пригнічення ризогенезу тому, всі пагони, що утворились, виживали при перенесенні на безгормональне середовище. Рекомендований вміст регуляторів росту для мікроклонування з бічної бруньки шляхом прямої регенерації – 0,6 мг/л БАП, шляхом непрямої регенерації – 0,5 мг/л або 1,5 мг/л кінетину.

3.2.5. Морфогенна відповідь мікропагонів *C. maritima* на різний гормональний склад середовища. Внесення до складу середовища БАП викликала пригнічення ризогенезу. За культивування експлантів на середовищі з низьким вмістом регулятора росту відмічали регенерацію пагонів без калюсогенезу ($2,00 \pm 0,41$ пагони) (табл. 8). У відповідь на підвищення концентрації фітогормону з тканини експланта активно розвивалась калюсна тканина. За культивування з 1 мг/л БАП з мікропагона утворювалась найбільша кількість пагонів (в середньому $4,00 \pm 0,57$ пагони) (табл. 8).

За культивування з кінетином відмічали відсутність калюсогенезу та ризогенезу. При цьому, найбільша кількість пагонів утворювалась на середовищі з 0,5 мг/л кінетину (в середньому $4,00 \pm 1,67$ пагонів) (табл. 8).

За наявності НОК у середовищі, також отримали досить високі показники регенерації пагонів ($3,00 \pm 0,63$ шт. при наявності 1 мг/л НОК у середовищі). При цьому, новоутворені пагони були візуально набагато дрібнішими за контрольні рослини (рослини, що культивували на безгормональному середовищі) і, при перенесенні на безгормональне середовище, росли повільніше. Внесення НОК до складу живильного середовища викликало активний калюсогенез як за низьких, так і за високих його концентрацій. З утвореного рихлого жовто-зеленого калюса відмічали активний ризогенез (табл. 8).

Табл. 8. Вплив екзогенних регуляторів росту на процеси пагоноутворення (кількість новоутворених пагонів, шт.), ризогенезу та калюсоутворення з пазушних бруньок рослин *Crambe maritima*.

Регулятори росту, мг/л		Утворені пагони, шт	Укорінення	Калюсогенез
БАП	0,3	2,00 ± 0,41	-	-
	0,6	2,45 ± 1,25	-	+
	1	4,00 ± 0,57	-	+
Кінетин	0,1	3,00 ± 1,09	-	-
	0,5	4,00 ± 1,67	-	-
	1	3,00 ± 0,63	-	-
	1,5	3,00 ± 1,54	-	-
НОК	0,5	1,00	+	+
	1	3,00 ± 0,63	+	+
	1,5	1,00	+	+
	2	1,00	+	+
МС		1,00	+	-

Примітка: дані подано у вигляді $M \pm m$.

Отже, для *C. maritima* було показано шляхи отримання прямої регенерації з мікропагонів за використання БАП і кінетину. Слід також відмітити, що рослини регенеранти даного виду на безгормональному середовищі росли та розвивались нормально, але погано укорінювались, що унеможливлювало перехід до етапу адаптації мікропагонів. Після зменшення вмісту сахарози, макро- та мікросолей у живильному середовищі вдвічі отримували рослини з розвиненою кореневою системою. Оптимальний вміст регуляторів росту для мікроклонування з мікропагона шляхом прямої регенерації – 0,5-1 мг/л кінетину, шляхом непрямой регенерації – 1 мг/л БАП.

Дослідження морфогенного потенціалу пазушних бруньок пяти досліджуваних видів роду *Crambe*, показало значні відмінності незважаючи на близьку спорідненість видів [78]. Так, найбільший морфогенний потенціал

проявив вид *C. tataria*, а найменший – *C. maritima*. В результаті проведених досліджень отримали регенерацію пагонів з пазушних бруньок без утворення калюсної тканини для усіх досліджуваних видів, що є одним з факторів підтримки генетичної однорідності матеріалу культивованого *in vitro*.

Пряму регенерацію з бічних бруньок спостерігали за низьких концентрацій цитокінінів (БАП 0,3 мг/л – для *C. aspera*, *C. steveniana*, та *C. maritima* та кінетин 0,1 мг/л – для *C. aspera*). Дані літератури також свідчать про позитивний вплив невисоких концентрацій БАП у середовищі (0,5 мг/г) для отримання регенерації з вузлових експлантів виду *C. giberosa in vitro* [61]. Крім того, для даного виду було відмічено загибель всіх вузлових експлантів на середовищі з додаванням високих концентрацій БАП (5 мг/л). Можна стверджувати що бічні бруньки деяких представників роду *Crambe* мають високу чутливість до даного фітогормону і, як більшість розеткових рослин [163-166], добре регенерують при внесенні до живильного середовища саме БАП.

3.3. Дослідження морфогенного потенціалу черешкових, листкових та корневих експлантів представників роду *Crambe*

Відповідно до численних публікацій [10, 12, 13, 61-64] різні типи експлантів мають різний морфогенний потенціал. Для визначення оптимальних умов регенерації рослин досліджуваних видів *in vitro* використовували три типи експлантів: частина листової пластинки, частина черешка та частина кореня.

3.3.1. Дослідження морфогенного потенціалу різних типів експлантів *C. koktebelica in vitro*. Дослідження морфогенного потенціалу трьох типів експлантів дало змогу встановити вплив гормонального складу живильного середовища на частоту та ефективність (середню кількість утворених пагонів на одному експланті) пагоноутворення. Внесення БАП до середовища, у поєднанні з НОК, призводило до пагоноутворення з більшою частотою ніж доповнення його кінетином та НОК. Зокрема, на середовищі № 1 та № 2 на корневих експлантах відмічали регенерацію пагонів (рис. 8), але регенеранти, що утворювались мали дуже витрифіковані органи і при подальшому культивуванні на безгормональному середовищі не укорінювались та швидко гинули (рис. 9).

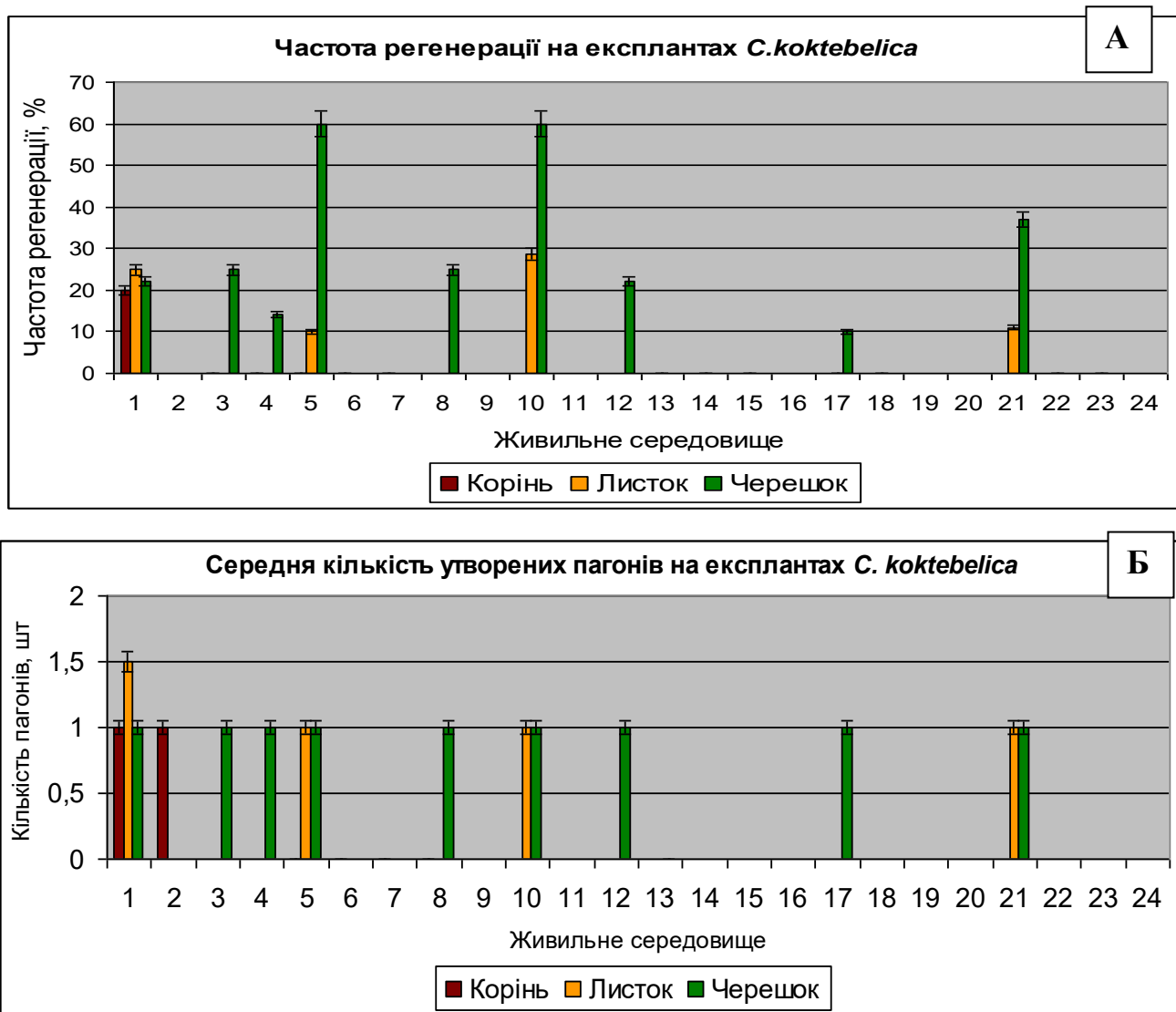


Рис. 8. Регенерація на різних типах експлантів *C. koktebelica*: А – Частота регенерації; Б – Середня кількість утворених пагонів.

Дані подано у вигляді $M \pm m$.

Досить високу частоту та ефективність регенерації відмічено на черешкових експлантах, що культивували на середовищах № 5 та № 10. На усіх експлантах, що регенерували, утворювалось в середньому по одному пагону (рис. 8). За культивування листкових експлантів на середовищі № 1 відмічали невисоку частоту регенерації та утворення дещо більшої кількості пагонів ($1,50 \pm 0,75$ паг.) ніж за використання інших типів експлантів (рис. 8).



Рис. 9. Регенерація пагонів на різних типах експлантів *C. koktebelica* на середовищі з додаванням регуляторів росту: А – корінь (середовище № 1); Б – листок (середовище № 9); В – черешок (середовище № 1).

Наявність кінетину у середовищі викликало утворення пагонів *de novo* лише з частини черешка (середовище № 17, № 21) та листка (середовище № 21). При цьому, відмічали низьку частоту регенерації.

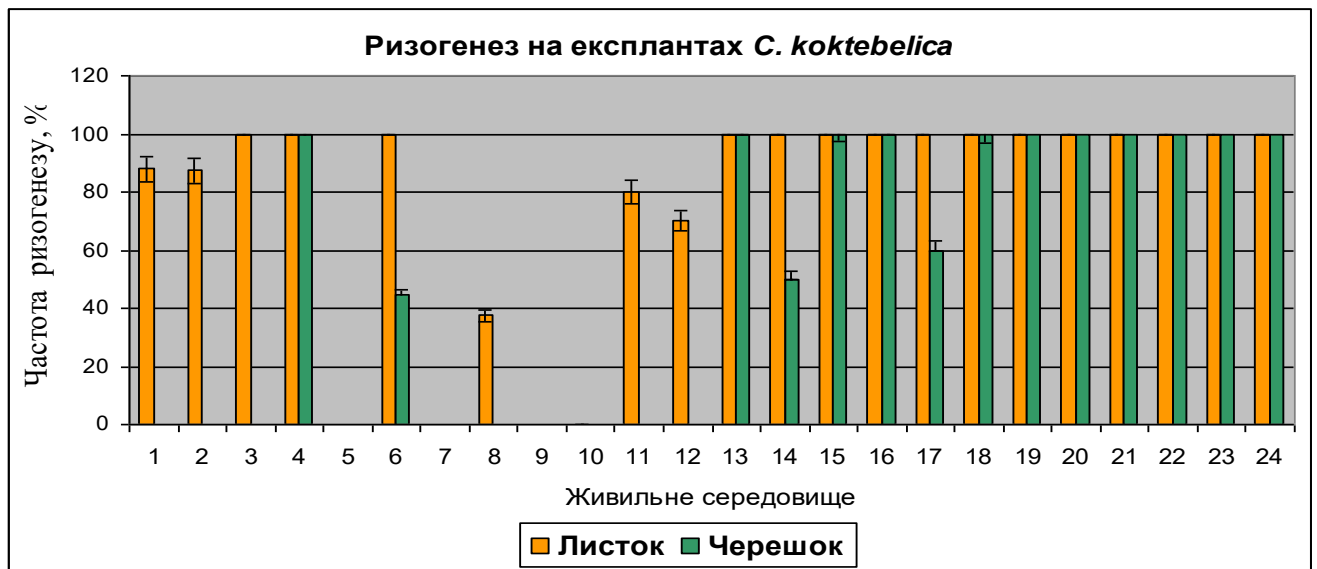


Рис. 10. Частота ризогенезу з листових та черешкових експлантів *C. koktebelica*: дані подано у вигляді $M \pm m$.

Додавання кінетину та НОК до середовища ініціювало активний ризогенез. На всіх листових експлантах за культивування на середовищах № 13-24 спостерігали ризогенез, на середовищах з БАП та НОК (№ 1-12) частота ризогенезу була значно нижчою, або даний тип морфогенезу був відсутнім взагалі

(рис. 10). На черешкових експлантах також було відмічено високу активність ризогенезу за культивування з кінетином та його відсутність на середовищах з БАП (Рис. 11).

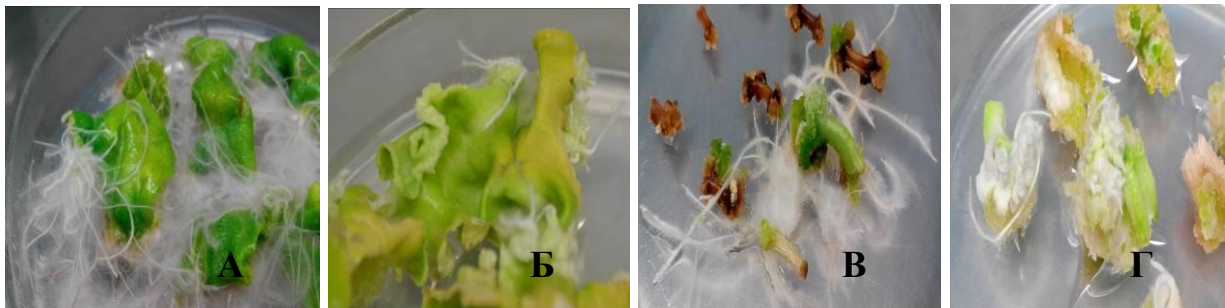


Рис. 11. Ризогенез на різних типах експлантів *C. koktebelica* на живильних середовищах, доповнених регуляторами росту: А – листок (середовище № 14); Б – листок (середовище № 12); В – черешок (середовище № 14); Г – черешок (середовище № 6).

За використання середовищ № 1-24 усі кореневі експланти давали початок калюсній тканині. Високу інтенсивність наростання калюсу відмічали на середовищі доповненому БАП 2,5 мг/л та НОК 1,5 мг/л (рис. 12). Культивування коренів з БАП та НОК сприяло розвитку яскраво-зеленого калюсу, а з кінетином та НОК – світло-зеленого калюсу який швидко гинув. Лише за наявності у середовищі кінетину (5 мг/л) та НОК (0,1-1,5 мг/л) утворений калюс можна було культивувати протягом тривалого часу.

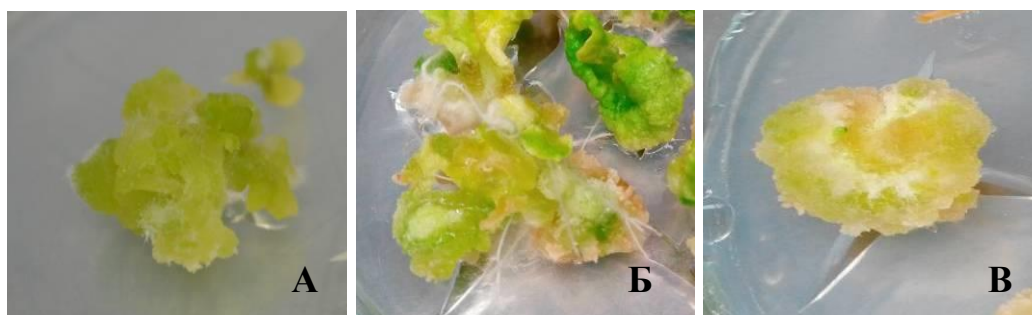


Рис. 12. Калюсогенез на різних типах експлантів *C. koktebelica*: А – корінь (середовище № 8); Б – листок (середовище № 6); В – черешок (середовище № 8).

Дещо вищу інтенсивність калюсогенезу відмічали на черешкових експлантах – калюс світло-зеленого кольору утворювався на місцях надрізів, а на середовищі доповненому 2,5 мг/л БАП та 1-1,5 мг/л НОК по всій площі експланта (рис. 12). Листки *C. koktebelica* мали найменший потенціал до калюсогенезу (калюс утворювався лише на місцях надрізів) (табл. 9).

Табл. 9. Інтенсивність наростання калюсної тканини на різних типах експлантів (частина кореня, листка та черешка) виду *C. koktebelica in vitro*.

Регулятори росту, мг/л		БАП			Кінетин		
		1	2,5	5	1	2,5	5
Частина кореня							
НОК	0,1	+++	+++	++	+	++	+++
	0,5	++	+++	++	+++	++	++
	1	++	+++	+++	++	++	++
	1,5	+++	++++	+++	++	+++	++
Частина листка							
НОК	0,1	+	+++	+++	+	+	+
	0,5	++	++	++	+	+	+
	1	+	+	++	+	+	+
	1,5	+	+	+	++	++	+
Частина черешка							
НОК	0,1	+	++	+	+	+	+
	0,5	+	+++	+++	+	++	+
	1	++	++++	+++	+	++	++
	1,5	++	++++	+++	++	++	++

Примітка: Оцінка інтенсивності наростання калюсної тканини: «-» - немає видимої калюсної тканини; «+» - невелика проліферація калюсної тканини лише на кінцях надрізів; «++» - 2,5 мм калюсної тканини на місцях надрізів; «+++» - 3,5 – 10 мм калюсної тканини по всій площі експланта; «++++» - більше 10 мм калюсної тканини по всій площі експланта.

Було показано різницю у регенераційній здатності трьох типів експлантів одного виду. Інтенсивність калюсогнєнеза з кореня була високою, але для проліферації більше 10 мм калюсної тканини по всій площі експланта потрібно досягти певного рівня регуляторів росту у живильному середовищі (БАП 2,5 мг/л та НОК 1,5 мг/л). При цьому, частота регенерація пагонів з кореня виявилась найнижчою порівняно з листками і черешками.

Показано схожу морфогенну відповідь листка та черешка на культивування за певних концентрацій регуляторів росту. Наявність кінетину викликала ризогенез на усіх варіантах середовищ як на листкових, так і на черешкових експлантах. Регенерація пагонів на черешках відбувалась зі значно вищою частотою ніж на листкових експлантах на тих самих концентраціях та співвідношеннях регуляторів росту (варіантах середовищ), що свідчить про різну чутливість до екзогенних фітогормонів та різний морфогенний потенціал двох типів експлантів одного виду.

3.3.2. Дослідження морфогенного потенціалу різних типів експлантів *C. tataria in vitro*. Найнижчий відсоток регенерації серед досліджених трьох типів експлантів спостерігався за використання частини кореня. За культивування з БАП частота утворення пагонів була нижча ніж за культивування кореня з кінетином. Середня кількість утворених пагонів також була досить висока ($2,66 \pm 0,57$ паг) на середовищі доповненому кінетином (1 мг/л кінетину та 0,5 мг/л НОК), тому саме його можна вважати відносно ефективним для мікроклонування за допомогою частини кореня (рис. 13). Регенерація пагонів з кореневих експлантів відбувалась лише на середовищі з низьким вмістом кінетину (1 мг/л) та дещо вищим вмістом НОК (0,5-1 мг/л) (рис. 13). Пагони утворені з частини кореня відрізнялись від рослин-регенерантів, утворених на інших досліджуваних типах експлантів меншими розмірами, але через 9-12 днів укорінювались на безгормональному середовищі (рис. 14).

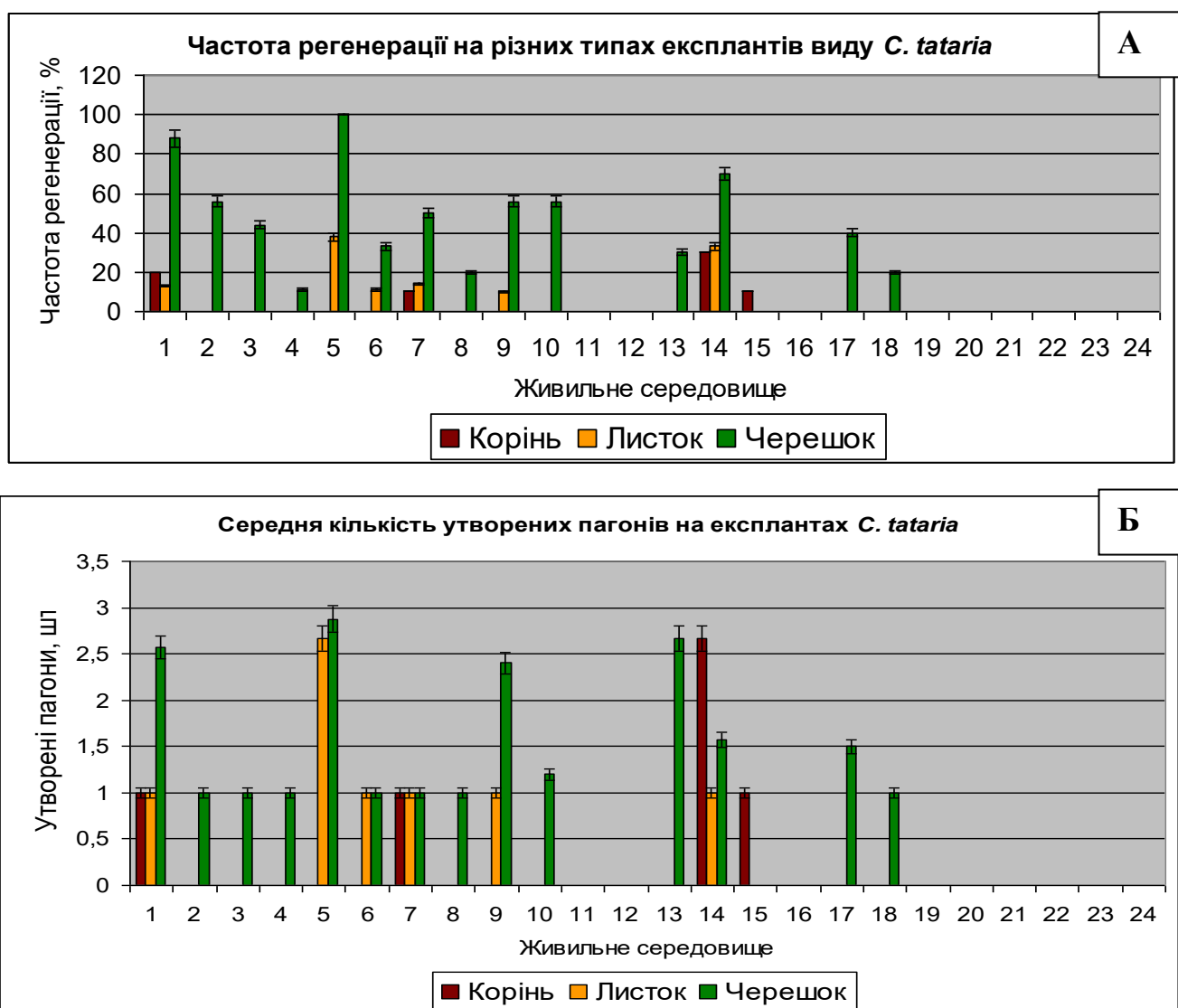


Рис. 13. Регенерація на різних типах експлантів *C. tataria*: А – Частота регенерації; Б – Середня кількість утворених пагонів. Дані подано у вигляді $M \pm m$.

Листкові експланти показали дещо вищу частоту регенерації, ніж кореневі. Внесення до складу середовища БАП виявилось більш продуктивним ніж культивування з кінетином. Пагони утворювались за низької концентрації НОК (0,1 мг/л) у поєднанні з БАП. Зі зниженням вмісту ауксину знижувалась частота регенерації, або була відсутня взагалі. Культивування частин листка на середовищі №5 (БАП 2,5 мг/л та НОК 0,1 мг/л) дало змогу отримати найвищі показники регенерації – 38% експлантів утворювали пагони (рис. 13). При цьому, на одному експланті утворювалась також найбільша кількість пагонів – $2,67 \pm$

0,26 паг, отже саме цей варіант середовища рекомендовано для мікроклонального розмноження з використанням листкових експлантів.



Рис. 14. Регенерація пагонів на різних типах експлантів *C. tataria* на середовищі з додаванням регуляторів росту: А – корінь (середовище № 18); Б – листок (середовище № 6); В – черешок (середовище № 13).

Культивування черешкових експлантів з БАП виявилось більш ефективним ніж культивування з кінетином. Для даного типу експланта відмічено залежність частоти регенерації від концентрації НОК у середовищі – низький вміст ауксину забезпечував високу частоту регенерації. Лише за використання частини черешка для мікророзмноження отримали регенерацію на всіх експлантах (БАП 2,5 мг/л та НОК 0,1 мг/л) (рис. 14). Враховуючи високу частоту регенерації та найбільшу кількість утворених на одному експланті пагонів можна стверджувати про найбільший морфогенний потенціал черешка серед досліджених типів експлантів виду *C. tataria*.

Крім регенерації пагонів на листкових та черешкових експлантах *C. tataria* також спостерігали утворення коренів (рис. 15). На середовищі доповненому кінетином спостерігали активний ризогенез як на листках, так і на черешках (рис. 16). Так, утворення коренів відмічено на усіх варіантах середовищ з кінетинном (№ 13-24). Листкові експланти проявили більшу здатність до ризогенезу – корені утворювались на середовищі з кінетином та, хоч і з нижчою частотою, на середовищі з БАП. Ризогенез на черешках відмічали на середовищах з кінетином, а за культивування з БАП спостерігали лише для трьох варіантів (середовище №2, №3, №10) (рис. 15).

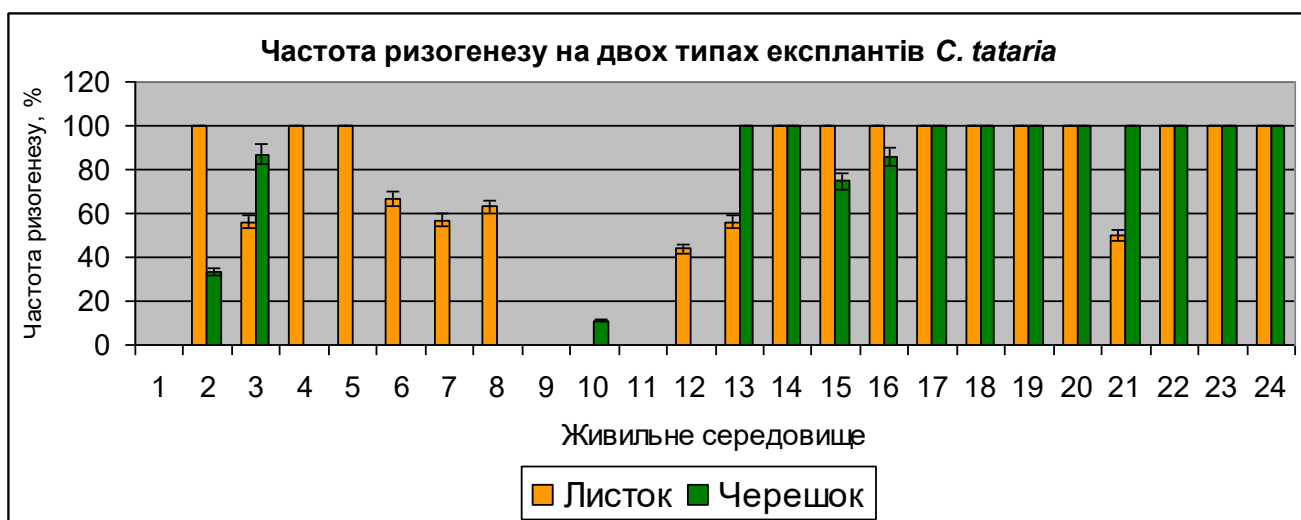


Рис. 15. Частота ризогенезу з листових та черешкових експлантів *C. tataria*: дані подано у вигляді $M \pm m$.

Досить часто два типи морфогенезу спостерігались одночасно на одному і тому ж експланті. При цьому, не відмічали укорінення новоутворених пагонів, а утворення коренів з тканин експланта (середовище № 2, № 10, № 13, № 14 – для черешкових експлантів і № 5, № 6, № 7 – для листових експлантів) (рис. 16).

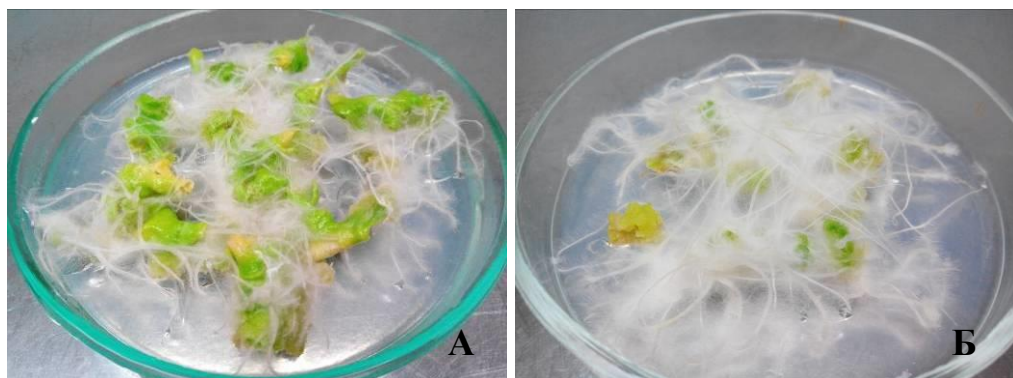


Рис. 16. Ризогенез з різних типів експлантів *C. tataria* на живильних середовищах, доповнених регуляторами росту: А – листок (середовище № 20); Б – черешок (середовище № 19).

Було виявлено залежність інтенсивності наростання калюсної тканини від рівня НОК у середовищі. Максимальної активності калюсогенез досягав за концентрації НОК 0,5 мг/л (табл. 10). Так, для черешкових експлантів більше

10 мм калюсу спостерігали за культивування з 0,5 мг/л НОК та 1-5 мг/л БАП, а для кореневих експлантів з 0,5 мг/л НОК та 1-2,5 мг/л БАП (табл. 10). З трьох досліджених типів експлантів листок мав найнижчу активність наростання калюсної тканини (рис. 17). За наявності кінетину у середовищі, для трьох типів експлантів, калюсна тканина утворювалась лише на місцях надрізів. Утворений калюс мав світло-зелене або жовто-зелене забарвлення.

Табл. 10. Інтенсивність наростання калюсної тканини на різних типах експлантів (частина кореня, листка та черешка) виду *C. tataria in vitro*.

Регулятори росту, мг/л		БАП			Кінетин		
		1	2,5	5	1	2,5	5
Частина кореня							
НОК	0,1	+++	+++	++++	+	+	+
	0,5	++++	++++	+++	+	++	+
	1	++	++++	+++	+	++	+
	1,5	+++	++	++	+	++	++
Частина листка							
НОК	0,1	++	++	++	+	+	+
	0,5	++	+++	++	++	+	+
	1	+	+++	++	++	+	+
	1,5	+	++	++	++	++	+
Частина черешка							
НОК	0,1	++	++	++	+	+	+
	0,5	++++	++++	++++	++	++	+
	1	+++	+++	+++	++	++	+
	1,5	++++	++	+++	++	+++	+

Примітка: Оцінка інтенсивності наростання калюсної тканини: «-» - немає видимої калюсної тканини; «+» - невелика проліферація калюсної тканини лише на кінцях надрізів; «++» - 2,5 мм калюсної тканини на місцях надрізів; «+++» - 3,5 – 10 мм калюсної тканини по всій площі експланта; «++++» - більше 10 мм калюсної тканини по всій площі експланта.

Для трьох типів експлантів *C. tataria* відмічено схожість у відповіді на культивування з певним складом регуляторів росту – регенерація пагонів спостерігалась на середовищі з низьким вмістом цитокинінів (як БАП, так і кінетину) та НОК на коренях, листках та черешках. При цьому, відмічено різницю у частоті регенерації та середній кількості утворених пагонів на тих самих варіантах живильних середовищ для різних типів експлантів. Так, найнижчу регенераційну здатність проявив корінь, далі листок і найвищу – черешок.



Рис. 17. Калюсогенез на різних типах експлантів *C. tataria*: А – корінь (середовище № 6); Б – листок (середовище № 7); В – черешок (середовище № 20).

3.3.3. Дослідження морфогенного потенціалу різних типів експлантів *C. aspera in vitro*. Найнижчий потенціал до утворення пагонів *de novo* (рис. 18) показали кореневі експланти – лише з 10% експлантів на живильному середовищі № 1 (БАП 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л). На інших варіантах середовищ (№ 2-24) утворення пагонів відмічено не було (рис. 19).



Рис. 18. Регенерація з різних типів експлантів *C. aspera*: А – корінь (середовище № 17); Б – листок (середовище № 11); В – черешок (середовище № 21).

Для успішної регенерації пагонів на листових експлантах вміст цитокінінів повинен досягти певного рівня. Так, утворення пагонів відмічали на середовищі №10 (БАП 2,5 мг/л та НОК 0,1 мг/л). Збільшення концентрації БАП знижувало частоту регенерації. Крім того, було відмічено залежність частоти регенерації від вмісту НОК – 0,1 мг/л є оптимальною для мікророзмноження контентрацією регулятора росту у середовищі. Утворення пагонів на листових експлантах (рис. 18) спостерігали також за наявності у середовищі кінетину та 0,1-0,5 мг/л НОК. Подальше підвищення вмісту ауксину вело до зниження частоти регенерації (рис. 19).

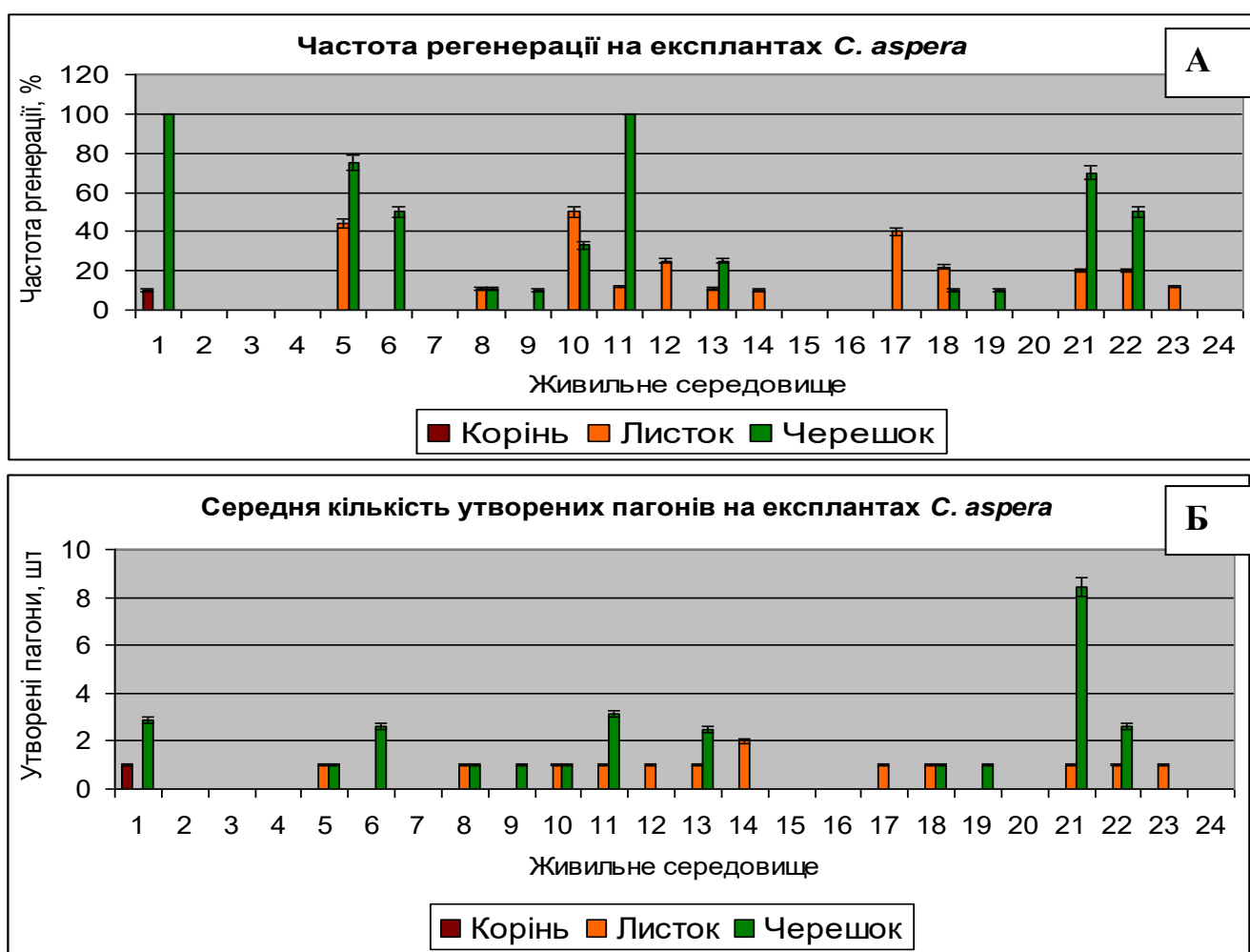


Рис. 19. Регенерація на різних типах експлантів *C. aspera*: А – Частота регенерації; Б – Середня кількість утворених пагонів. Дані подано у вигляді $M \pm m$.

Для успішної регенерації пагонів на листових експлантах вміст цитокінінів повинен досягти певного рівня. Так, утворення пагонів відмічали на середовищі

№10 (БАП 2,5 мг/л та НОК 0,1 мг/л). Збільшення концентрації БАП знижувало частоту регенерації. Крім того, відмічено залежність частоти регенерації від вмісту НОК – 0,1 мг/л є оптимальною концентрацією ауксину для мікророзмноження. Утворення пагонів на листових експлантах (рис. 18) спостерігали також за наявності у середовищі кінетину та 0,1-0,5 мг/л НОК. Подальше підвищення вмісту ауксину знижувало частоту регенерації (рис. 19).

Найвищий морфогенний потенціал проявили черешкові експланти – до 100% за культивування на середовищі з БАП (№ 1, № 11). При цьому, спостерігали більшу, ніж на листових експлантах, середню кількість утворених пагонів – $2,87 \pm 1,07$ паг. та $3,14 \pm 1,46$ паг. на середовищах № 1 та № 11 відповідно. Регенерація пагонів відбувалась як за низьких концентрацій БАП, так і за високих, але лише за невисокої концентрації НОК (0,1-1 мг/л). Внесення кінетину до складу середовища виявилось доволі ефективним – при збільшенні концентрації регулятора росту до 5 мг/л (за умови наявності НОК 0,1-1 мг/л) спостерігали регенерацію з досить високою частотою та утворення найбільшої для даного виду кількості пагонів на експланті ($8,43 \pm 1,52$ паг. на середовищі № 21) (рис. 19).

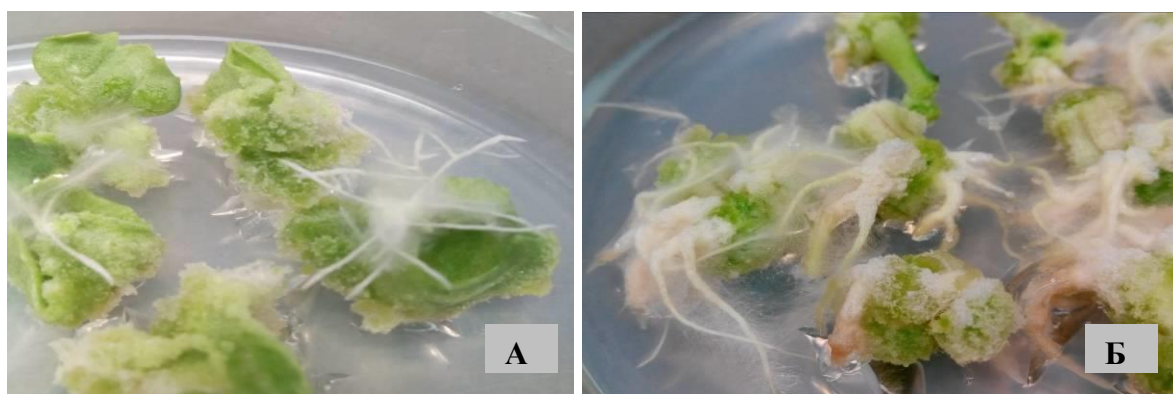


Рис. 20. Ризогенез на різних типах експлантів: А – листок (середовище № 7);
Б – черешок (середовище № 15).

Черешкові експланти культивовані на середовищі з БАП не показали здатності до утворення коренів, в той час як листові експланти, все ж відзначились невисокою активністю ризогенезу (рис. 20). Найбільшу частоту

ризогенезу було відмічено на середовищі № 16 та № 17 для листкових експлантів і № 15 та № 19 для черешкових експлантів (рис. 21). Крім того, корені утворювались на листкових експлантах практично на усіх варіантах живильних середовищ з кінетином (№ 13-24).

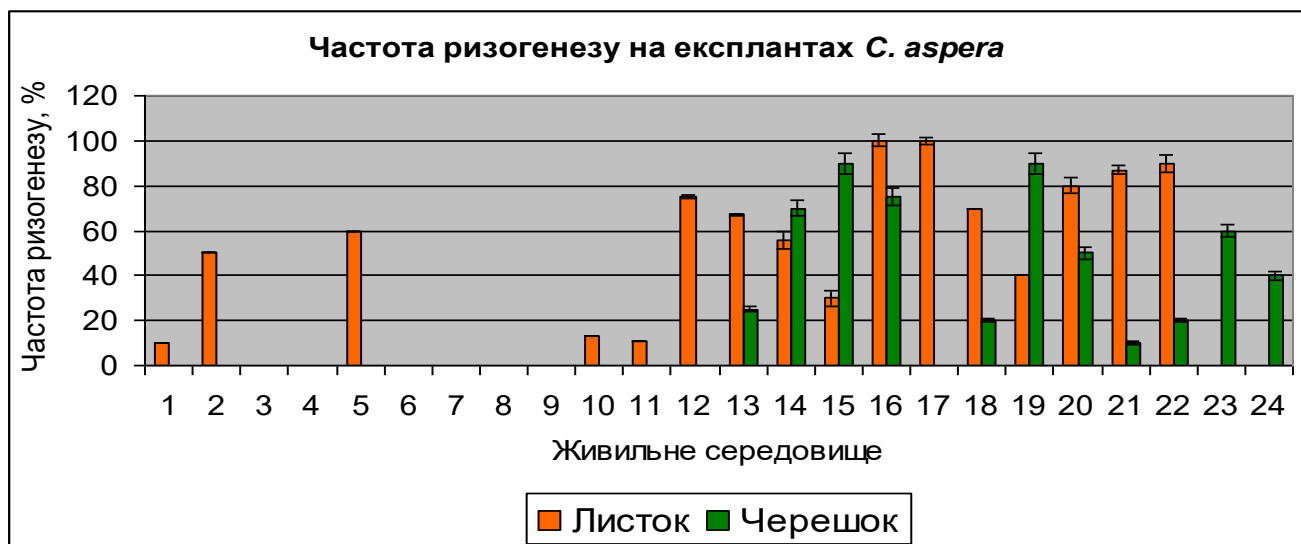


Рис. 21. Частота ризогенезу з листкових та черешкових експлантів *C. aspera*: дані подано у вигляді $M \pm m$.

За наявності в живильному середовищі БАП та НОК на всіх експлантах активно розвивалась калюсна тканина. Проліферація калюсу з корневих експлантів (рис. 22) найактивніше відбувалась на середовищі №10 (БАП 5 мг/л та НОК 0,5 мг/л), в інших випадках калюс формувався лише на місцях надрізів. За культивування корневих експлантів з кінетином спостерігали лише низьку проліферацію калюсної тканини і лише на місцях надрізів (табл. 11).

На листкових експлантах ініціація калюсної тканини товщиною більше 10 мм відбувалась (рис. 22) лише за культивування з низьким вмістом БАП (до 2 мг/л) та високими концентраціями НОК (1-1,5 мг/л), а зі збільшенням вмісту цитокініну у середовищі зменшувалась активність проліферації калюсу (табл. 11). Внесення кінетину до середовища пригнічувало калюсогенез. Проліферацію калюсної тканини відмічали лише з підвищенням вмісту НОК у середовищі до 1-1,5 мг/л у невеликій кількості і лише на місцях надрізів (табл. 11).

Табл. 11. Інтенсивність наростання калюсної тканини на різних типах експлантів (частина кореня, листка та черешка) виду *C. aspera in vitro*.

Регулятори росту, мг/л		БАП			Кінетин		
		1	2,5	5	1	2,5	5
Частина кореня							
НОК	0,1	+	++	+	+	+	+
	0,5	+	++	++++	+	+	+
	1	++	++	+++	+	+	+
	1,5	++	++	++	+	+	+
Частина листка							
НОК	0,1	+++	+++	+	-	—	-
	0,5	+++	+++	+	-	+	-
	1	++++	+++	++	+	+	+
	1,5	++++	+++	++	+	+	+
Частина черешка							
НОК	0,1	++	+	+	+	++	+++
	0,5	+	++++	++++	++	++	+++
	1	+++	++++	++	++	++	++
	1,5	+++	++++	++	++	++	+

Примітка: Оцінка інтенсивності наростання калюсної тканини: «-» - немає видимої калюсної тканини; «+» - невелика проліферація калюсної тканини лише на кінцях надрізів; «++» - 2,5 мм калюсної тканини на місцях надрізів; «+++» - 3,5 – 10 мм калюсної тканини по всій площі експланта; «++++» - більше 10 мм калюсної тканини по всій площі експланта.

З черешкових експлантів відмічено активний калюсогенез за концентрації НОК 0,5 мг/л та високого вмісту БАП (2,5-5 мг/л). Культивування черешкових експлантів на середовищі з кінетином викликало утворення калюсу зі значно нижчою ефективністю ніж БАП. Таким чином, як і для листових експлантів, відмічено залежність активності проліферації калюсної тканини від вмісту

ауксину у середовищі, а також відмічено позитивний вплив саме БАП (на відміну від кінетину) на товщину утвореного калюсу.



Рис. 22. Калюсогенез на різних типах експлантів *C. aspera*: А – корінь (середовище № 10); Б – листок (середовище № 3); В – черешок (середовище № 10).

Отже, найвищий регенераційний потенціал було встановлено для черешкових експлантів виду *C. aspera* за наявності у середовищі БАП у поєднанні з НОК. Експланти даного виду також показали найнижчу активність калюсогенезу серед досліджених видів.

3.3.4. Дослідження морфогенного потенціалу різних типів експлантів *C. steveniana in vitro*. У відповідь на культивування корневих експлантів на середовищах № 1-24 було відмічено досить високу частоту регенерації, але низьку середню кількість утворених пагонів на експланті. Регенерація з частин кореня відбувалась на середовищі з низьким вмістом НОК (0,1-0,5 мг/л) та концентрацією цитокінінів до 2,5 мг/л (як БАП, так і кінетин) (рис 23). Найвища частота регенерації пагонів відмічена на середовищі №13 (кінетин 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л). Морфогенний потенціал корневих експлантів *C. steveniana* виявся вищим за *C. koktebelica*, *C. tataria* та *C. aspera*.

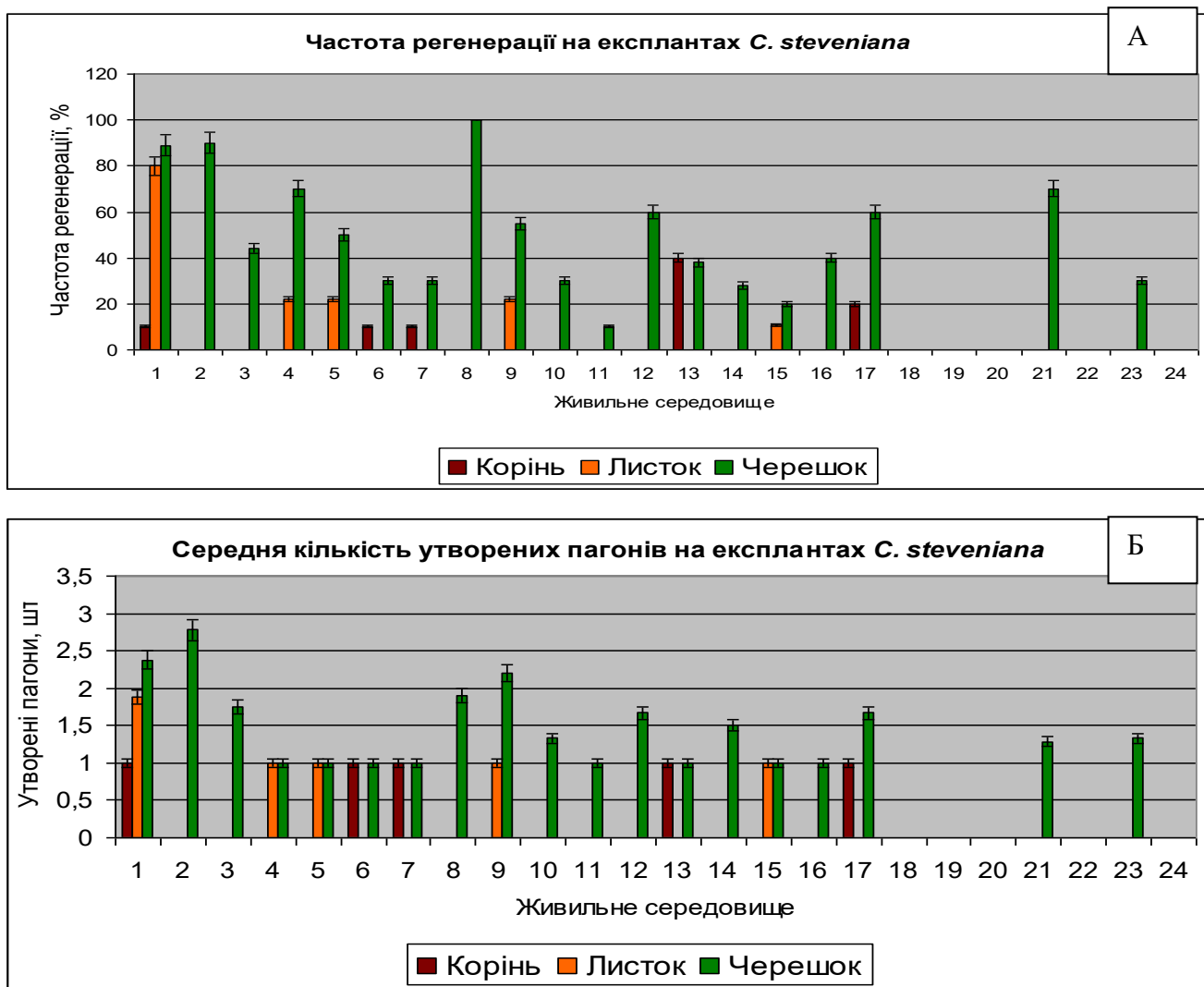


Рис. 23. Регенерація на різних типах експлантів *C. steveniana*: А – Частота регенерації; Б – Середня кількість утворених пагонів.

Дані подано у вигляді $M \pm m$.

Листковим експлантам *C. steveniana* притаманний найнижчий серед досліджених типів експлантів морфогенний потенціал. Внесення БАП до складу середовища викликало регенерацію пагонів (рис. 24) більш успішно ніж додавання кінетину. Культивування листків на середовищі з низьким вмістом регуляторів росту (середовище № 1 – БАП 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л) виявилось найсприятливішим для регенерації пагонів за використання даного типу експланта – частота регенерації 80% (рис. 23).



Рис. 24. Регенерація пагонів на різних типах експлантів *C. steveniana*: А – корінь (середовище № 17); Б – листок (середовище № 1); В – черешок (середовище № 8).

Черешкові експланти *C. steveniana*, як і для інших досліджуваних видів, виявили найбільшу здатність до утворення пагонів. За культивування експлантів на живильних середовищах доповнених БАП у поєднанні з НОК (середовища № 1, № 2, № 8) пагоноутворення відбувалось з дещо більшою частотою, ніж при культивуванні з кінетином та НОК (живильні середовища № 12, № 17, № 21). Схожа картина спостерігалась і за середньою кількістю утворених пагонів (рис. 13). Культивування черешків рослин *C. steveniana* на середовищі з низьким вмістом БАП та НОК (середовище № 1 та № 2), окрім високої частоти регенерації, викликало утворення найбільшої кількості пагонів на одному експланті – середовище № 1 - $2,37 \pm 0,91$ паг. та середовище № 2 – $2,77 \pm 1,09$ паг. (рис. 24).

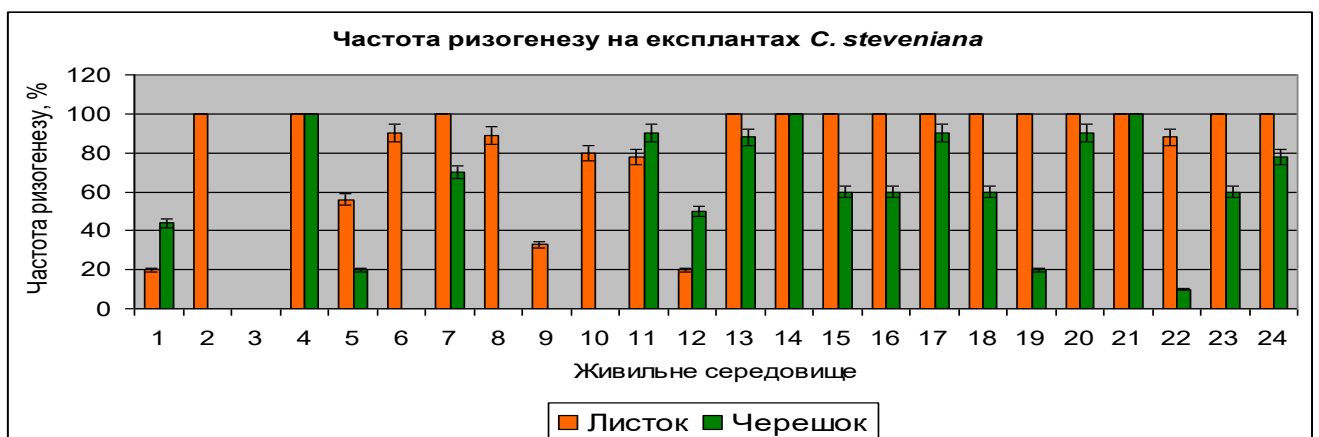


Рис. 25. Частота ризогенезу на середовищі, доповненому регуляторами росту з частини листка та черешка *C. steveniana in vitro*: дані подано у вигляді $M \pm m$.

В досліджених умовах (середовища №1-24) відмічали досить активний ризогенез. Зокрема, на листових експлантах дещо частіше спостерігалась регенерація коренів (рис. 25). За культивування черешкових експлантів на середовищах з БАП відмічено утворення коренів (рис. 26) відмічено рідше ніж за культивування з кінетином. Крім того, частота ризогенезу виявилась вищою у листових експлантів практично на усіх дослідених варіантах середовищ (рис. 25).

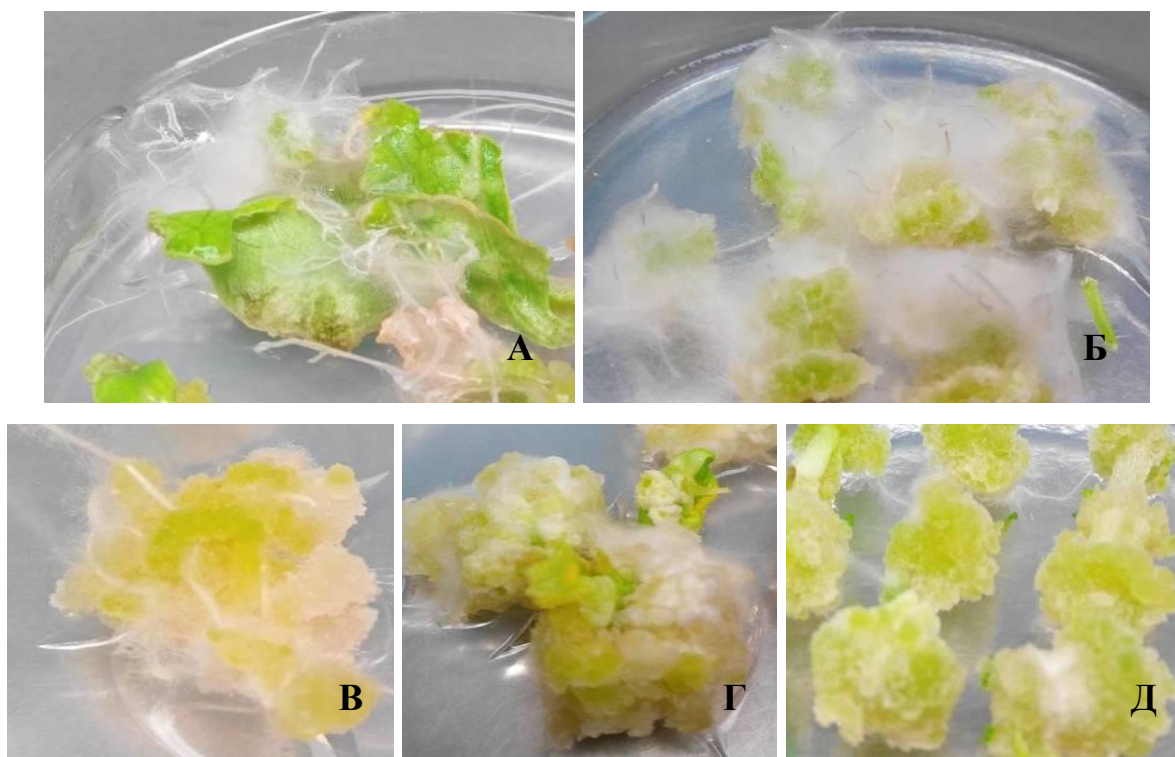


Рис. 26. Ризогенез та калюсогенез на різних типах експлантів *C. steveniana*: А – листок (середовище №17); Б – черешок (середовище №20); В – корінь (середовище №1); Г – листок (середовище № 11); Д – черешок (середовище № 12).

Для виду *C. steveniana* на всіх типах експлантів спостерігалась досить висока інтенсивність наростання калюсної тканини, крім того, вдалось отримати регенерацію калюсної тканини не лише на місцях надрізу, а й по всій площі експланта за використання як БАП, так і кінетину у поєднанні з НОК (табл. 12). Калюсна тканина, що утворювалась на кореневих та черешкових експлантах мала світло-зелений або яскраво-зелений колір, була рихлою та неоднорідною

(рис. 26). На листових експлантах утворювався щільний калюс світло-зеленого та білого кольору.

Табл. 12. Інтенсивність наростання калюсної тканини на різних типах експлантів (частина кореня, листка та черешка) виду *C. steveniana in vitro*.

Регулятори росту, мг/л		БАП			Кінетин		
		1	2,5	5	1	2,5	5
Частина кореня							
НОК	0,1	+++	+++	+++	+++	++++	++++
	0,5	++++	+++	++++	+++	++++	++++
	1	+++	+++	++++	++	++++	++++
	1,5	+++	+++	+++	++	+++	++++
Частина листка							
НОК	0,1	++	++	++	+	++	++
	0,5	++	+++	+++	+	++	++
	1	+++	+++	++++	++	++	+
	1,5	+++	++++	+++	++	++	++
Частина черешка							
НОК	0,1	++++	+++	++	+++	++++	++++
	0,5	++++	+++	++	+++	+++	+++
	1	+++	++++	+++	+++	+++	+++
	1,5	+++	++++	++++	++++	+++	+++

Примітка: Оцінка інтенсивності наростання калюсної тканини: «-» - немає видимої калюсної тканини; «+» - невелика проліферація калюсної тканини лише на кінцях надрізів; «++» - 2,5 мм калюсної тканини на місцях надрізів; «+++» - 3,5 – 10 мм калюсної тканини по всій площі експланта; «++++» - більше 10 мм калюсної тканини по всій площі експланта.

Для корневих експлантів внесення до складу середовища кінетину, на відміну від інших досліджуваних видів, викликало значно більшу проліферацію калюсної тканини ніж наявність у середовищі БАП. Так, більше 10 мм калюсу по

всій площі експланта утворювалось після підвищення вмісту кінетину до 2,5 мг/л (табл. 12). Культивування з кінетином частини листка та черешка виявилось менш ефективним – більше калюсу утворювалось на цих експлантах за культивування з БАП.

3.3.5. Дослідження морфогенного потенціалу різних типів експлантів *C. maritima in vitro*. З усіх досліджуваних нами видів роду *Crambe*, експланти трьох типів *C. maritima* мали найбільший морфогенний потенціал. На корневих експлантах, що культивували на середовищі з БАП та НОК, спостерігали регенерацію пагонів з досить високою частотою на усіх варіантах концентрацій фітогормонів. Найвищі показники відмічено на середовищі № 1 (БАП 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л) – на всіх експлантах відбувалась регенерація пагонів *de novo*. Середня кількість утворених пагонів в випадку теж була найвищою для типу експланта – $4,00 \pm 1,82$ паг. (рис. 27). Утворені пагони мали світло-зелене стебло та зелені або фіолетові злегка вітрифіковані листки (рис. 28). При перенесенні на безгормональне середовище розвивались нормально. Наявність кінетину у середовищі виявилась менш ефективною ніж БАП – відмічена значно нижча частота регенерації (рис. 28).

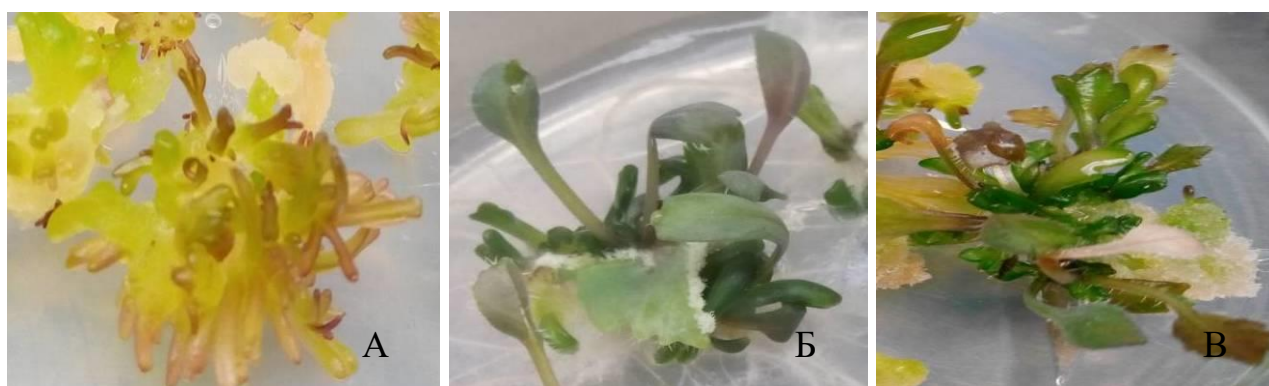


Рис. 27. Регенерація пагонів на різних типах експлантів *C. maritima*:

А – корінь (середовище № 1); Б – листок (середовище № 15); В – черешок (середовище № 17).

На листкових експлантах, культивованих на середовищі № 6 (БАП 2,5 мг/л та НОК 0,5 мг/л), відмічали найвищі показники регенерації – на всіх експлантах

відбувалась регенерація пагонів *de novo* (середня кількість утворених пагонів становила $5,20 \pm 0,44$ паг.). Утворені пагони мали зелене або темно-фіолетове забарвлення не були вітрифіковані (рис. 28). При перенесенні на безгормональне середовище MS/2 пагони укорінювались і розвивались нормально.

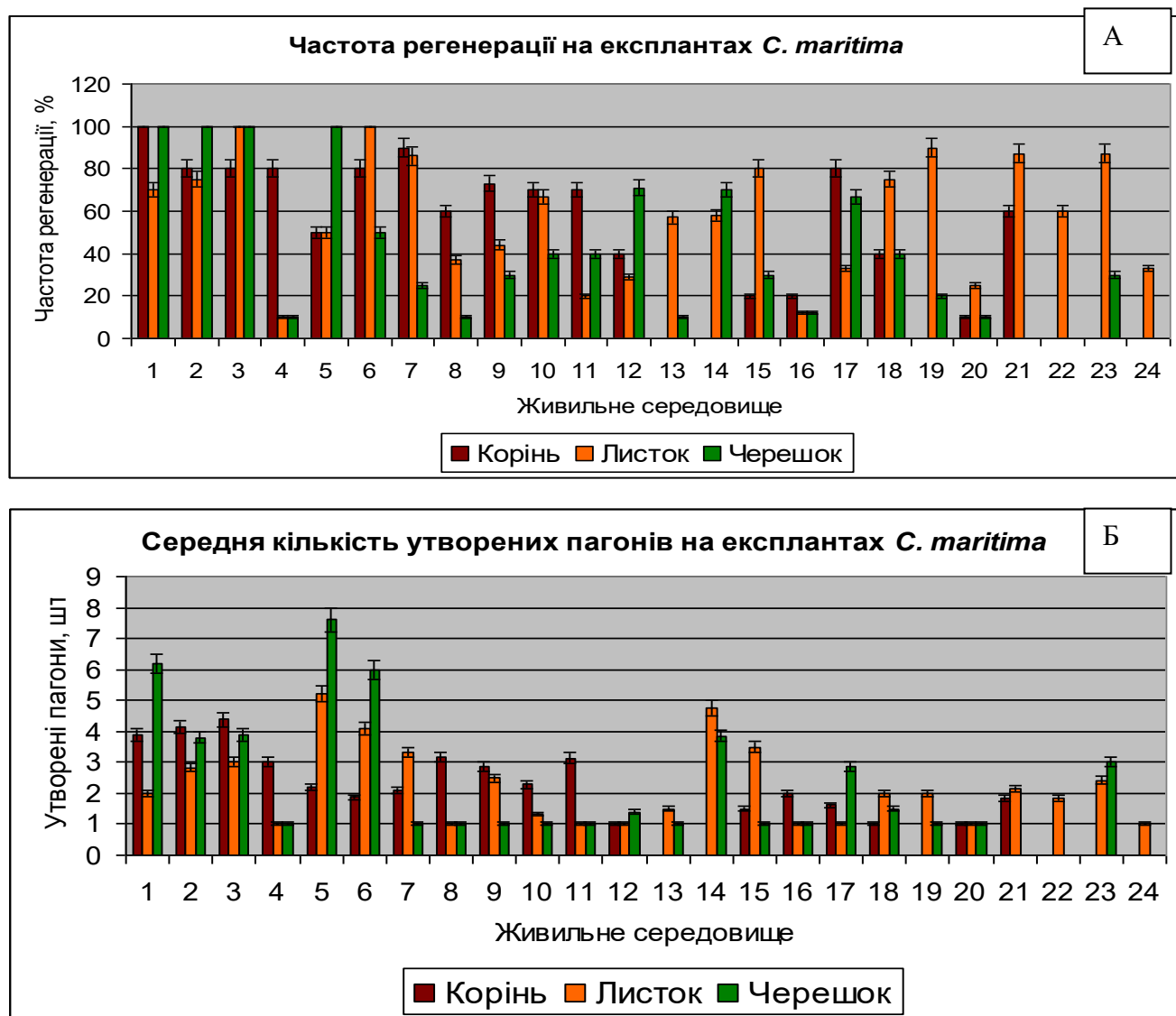


Рис. 28. Регенерація на трьох типах експлантів *C. maritima*: А – відсоток регенерації; Б – середня кількість утворених пагонів.

Дані подано у вигляді $M \pm m$.

Найвищий відсоток регенерації з тканин черешка було відмічено за культивування на середовищах з БАП (№ 1, № 2, № 3, № 5) – на всіх експлантах утворювались пагони. В наведених випадках також спостерігали високу середню

кількість утворених пагонів, хоча найбільше пагонів з одного експланта утворювалось на середовищі № 5 (БАП 2,5 мг/л та НОК 0,1 мг/л) – $7,60 \pm 2,25$ паг. Дане середовище є найсприятливішим для швидкого мікророзмноження рослин виду *C. maritima*. Внесення до складу середовища кінетину виявилось менш ефективним за наявності у середовищі БАП, хоча для інших типів експлантів різкої різниці у морфогенній відповіді залежно від типу цитокініну не виявлено.

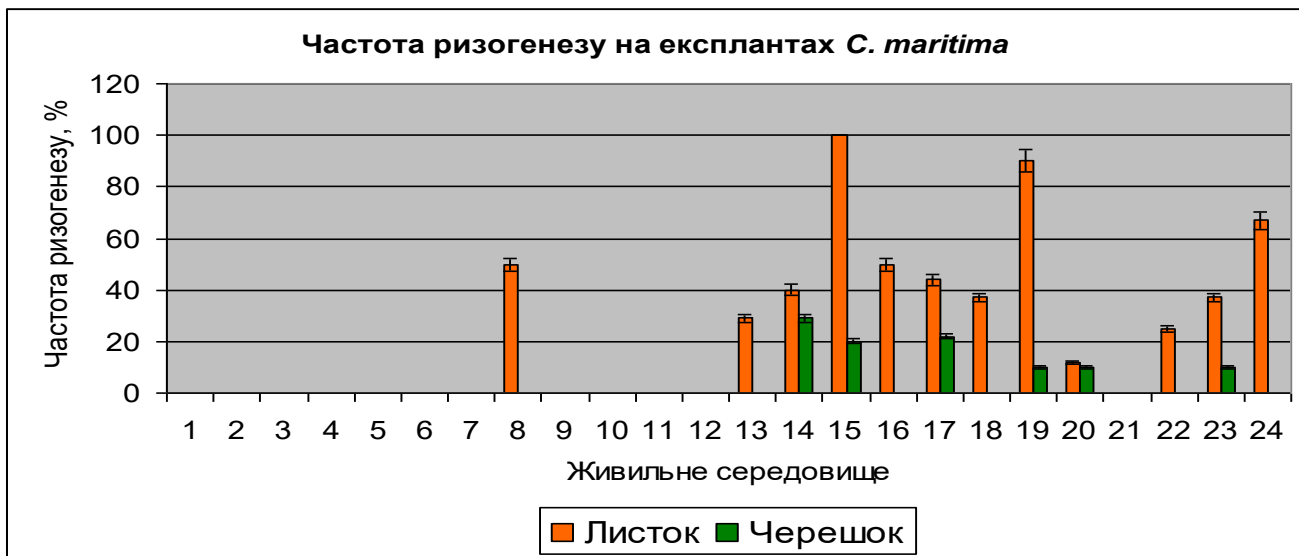


Рис. 29. Частота ризогенезу на середовищі, доповненому регуляторами росту з частини листка та черешка *C. maritima in vitro*: дані подано у вигляді $M \pm m$.

Крім регенерації пагонів на листових та черешкових експлантах також спостерігали ризогенез (рис. 29). При цьому, на середовищах з БАП відмічали більш активну регенерацію пагонів, а на середовищах з кінетином більш активно утворювали корені. З отриманих даних можна зробити висновок про те, що тканини черешка мають більший потенціал до регенерації саме пагонів, ніж листові експланти.

Найактивнішу проліферацію калюсної тканини відмічено на корневих експлантах (табл. 13). На середовищах з БАП або кінетином на всіх експлантах спостерігали утворення калюсу по всій площі експланта (рис. 30). Лише на середовищі з високим вмістом кінетину (№21-24) товщина калюсної тканини

зменшувалась. Дещо нижчу інтенсивність наростання калюсної тканини було відмічено на листових експлантах.

Табл. 13. Інтенсивність наростання калюсної тканини на різних типах експлантів (частина кореня, листка та черешка) виду *C. maritima in vitro*.

Регулятори росту, мг/л		БАП			Кінетин		
		1	2,5	5	1	2,5	5
Частина кореня							
НОК	0,1	++++	++++	++++	++++	++++	+++
	0,5	++++	++++	++++	++++	++++	+++
	1	++++	++++	++++	++++	++++	+++
	1,5	++++	++++	++++	++++	++++	+++
Частина листка							
НОК	0,1	+++	++	++	++	++	++
	0,5	++	++	++	++	+++	+++
	1	++	+++	++	+	++	+++
	1,5	++	++	+++	+	+++	+++
Частина черешка							
НОК	0,1	++	++	+++	++	+++	++
	0,5	++	+++	++	++++	+++	++
	1	++	+++	++++	++++	++	+++
	1,5	+++	+++	++++	++++	++	++

Примітка: Оцінка інтенсивності наростання калюсної тканини: «-» - немає видимої калюсної тканини; «+» - невелика проліферація калюсної тканини лише на кінцях надрізів; «++» - 2,5 мм калюсної тканини на місцях надрізів; «+++» - 3,5 – 10 мм калюсної тканини по всій площі експланта; «++++» - більше 10 мм калюсної тканини по всій площі експланта.

Черешкові експланти, в свою чергу, мали найнижчу для даного виду активність калюсогенезу. Утворена з трьох типів експлантів калюсна тканина дещо відрізнялась морфологічно. З корневих експлантів утворювався оводнений

світло-коричневий калюс, з листкових – світло-зелений, місцями білий рихлий калюс, а з черешкових – світло-зелений, місцями білий або жовто-зелений рихлий калюс (рис. 30).



Рис. 30. Калюсогенез на різних типах експлантів *C. maritima*:

А – корінь (середовище №7); Б – листок (середовище № 20); В – черешок (середовище № 14).

Таким чином, було підтверджено висунуті іншими авторами рекомендації по використанню кореневих експлантів для мікророзмноження виду *C. maritima in vitro* [12], але також показано, що регенерація пагонів *de novo* на черешкових експлантах відбувається зі значно більшою частотою.

Було встановлено відмінність у морфогенній відповіді експлантів на різний гормональний склад живильного середовища для п'яти рідкісних видів одного роду. Для усіх досліджуваних видів черешкові експланти показали найбільший морфогенний потенціал, у порівнянні з листковими та кореневими експлантами. Такі результати можна пояснити високим вмістом ендегенних регуляторів росту саме у цій частині асептичної рослини. Для роз'яснення причин високої здатності черешкових експлантів до регенерації пагонів необхідні провести додаткові дослідження рівня ендегенних фітогормонів у частинах рослин видів роду *Crambe*.

3.4. Укорінення мікропагонів та адаптація до умов *in vivo*.

Згідно з рекомендаціями [10, 12, 13, 67] укорінення мікропагонів досліджуваних видів проводили на безгормональному живильному середовищі

MS. Найкраще укорінювались пагони виду *C. steveniana*, а найгірше – *C. maritima* (рис. 32). Також перевіряли вплив зниження вмісту сахарози, макро- і мікросолей у живильному середовищі на процес ризогенезу мікропагонів. Для більшості видів така зміна складу середовища викликала підвищення частоти укорінення. Для двох видів, що мали розеткове стебло (*C. aspera* та *C. maritima*), спостерігали значне підвищення частоти укорінення у відповідь на культивування на середовищі MS/2 (рис. 31).

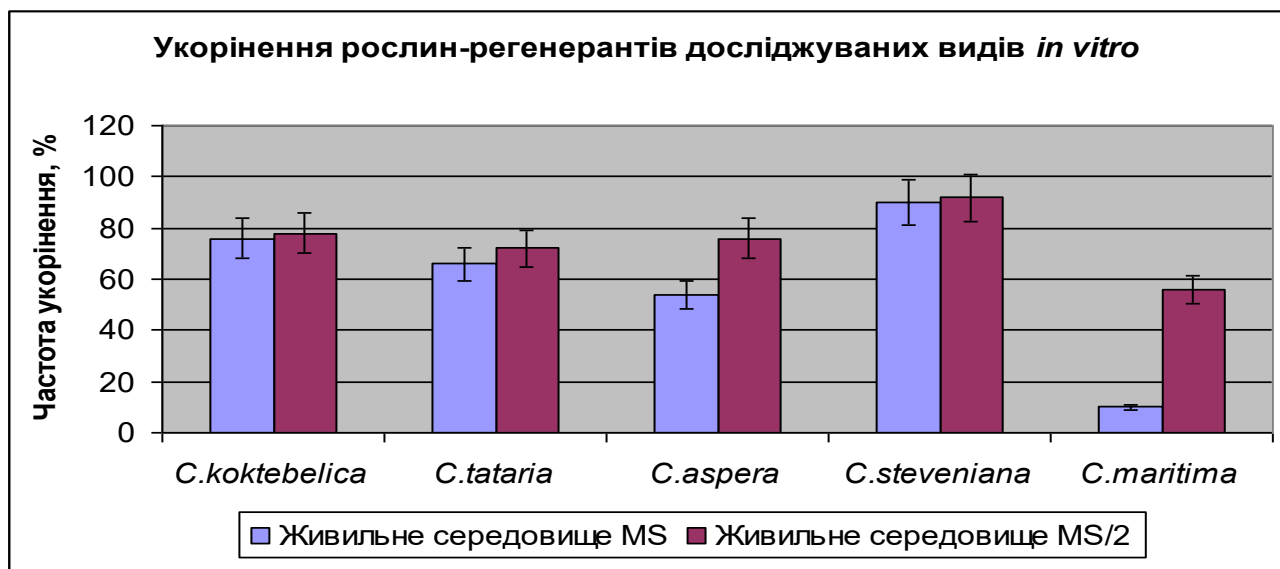


Рис. 31. Частота укорінення мікропагонів дослідних видів *in vitro* на живильних середовищах MS та MS/2: дані подано у вигляді $M \pm m$.

Перенесення рослин у нестерильні умови є важливим етапом виконання робіт по збереженню чисельності видів методами біотехнології, на якому отримують посадковий матеріал, що може бути повернутий у природні місця зростання, природничі парки та ботанічні сади. Особливо важливим на цьому етапі є підбір умов, які б забезпечували найбільшим відсотком рослин, здатних до вегетації та подальшого розвитку після культивування у специфічних умовах культури *in vitro*. Відомо, що за культивування в асептичних умовах, рослина пристосовується до навколишнього середовища – підвищена вологість, відсутність контамінації, відсутність вітру, штучний субстрат тощо. Відповідно до умов існування, в рослинному організмі відбуваються певні зміни – зменшення

активності продихів, потоншення шару кутикули, зниження резистентності до захворювань та ін [163-166]. Для уникнення шокowego стану і подальшої загибелі рослин при перенесенні до *in vivo* необхідно підібрати умови, що забезпечували б їх успішне пристосування.

На етапі адаптації використовували два типи субстрату (суміш торфу та піску (3:1), суміш торфу та перліту (2:1)). Використання суміші торфу та піску виявилось менш ефективною ніж суміш торфу та перліту та характеризувалось довшим періодом спокою (рис. 32). Відповідно, можна стверджувати, що перліт, утримуючи вологу у ґрунті, забезпечує пристосування рослин-регенерантів до ґрунтових умов. Для більшості рослин, що вирощували на суміші торфу та перліту, крупні листки починали засихати та відмирати на 10-14 день після перенесення в ґрунтові умови. На 18 – 25 день культивування спостерігали утворення нових асимілюючих листків. Для *C. aspera* та *C. maritima* перенесення рослин до умов ґрунту викликало уповільнення росту. Для подолання стану спокою застосовували чергування високих та низьких температур. Так, після витримування рослини при $+5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ протягом двох-трьох діб і перенесення до попередніх умов культивування ($+23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) вдалося подолати стан спокою і досягти подальшого утворення асимілюючих листків.

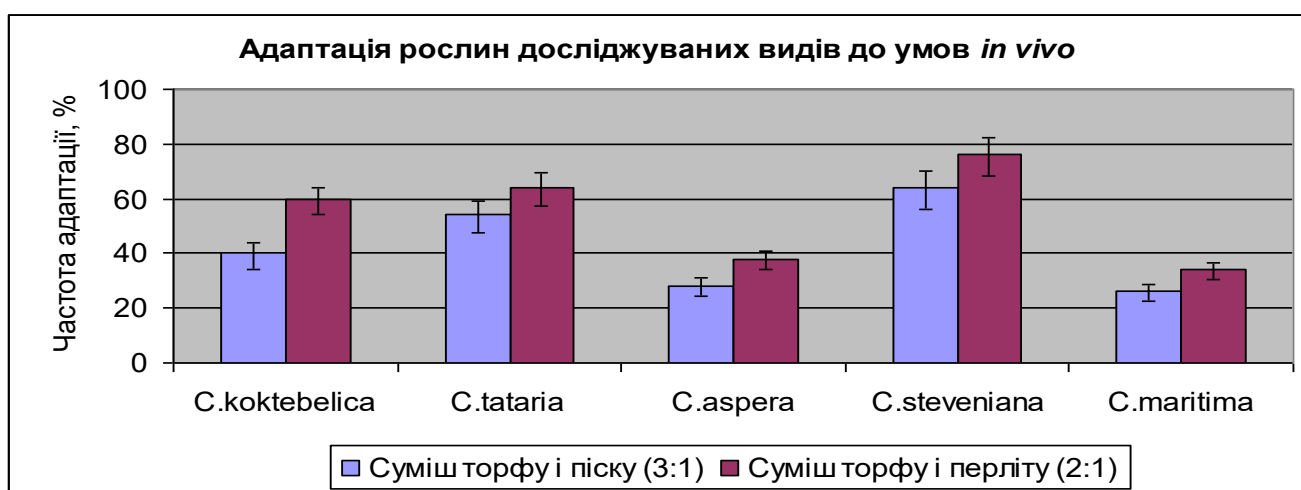


Рис. 32. Ефективність адаптації рослин-регенерантів до нестерильних умов: дані подано у вигляді $M \pm m$.

Таким чином, було проведено роботу по підборі оптимальних умов введення у культуру *in vitro*, мікроклонального розмноження, укорінення та адаптації до ґрунтових умов рослин п'яти рідкісних видів роду *Crambe*. Розроблено методику збереження та розмноження досліджуваних видів методами біотехнології з можливістю подальшого повернення адаптованих до умов *in vivo* рослин до природних місць зростання.

3.5. Дослідження впливу культивування *in vitro* на біохімічні властивості та генетичну стабільність рослин рідкісних видів роду *Crambe*.

Біотехнологічні методи збереження рідкісних та зникаючих видів в культурі *in vitro* забезпечуть великою кількістю біологічної маси, що дає змогу більш ґрунтовно вивчати види, що зберігаються. Існує ряд публікацій, в яких зазначається відмінність в біохімічному складі між рослинами що культивували в асептичних та ґрунтових умовах. Крім того, процедура поверхневої стерилізації та подальше мікроклональне розмноження може викликати генетичні варіації у рослинах-регенератах у порівнянні з рослинами-донорами [103, 104, 167]. Тому, доцільним є проведення біохімічних та молекулярних-генетичних досліджень з метою визначення впливу культивування *in vitro* на можливі зміни біохімічних властивостей та виникнення генетичних варіацій у рослин-регенерантів.

3.5.1. Визначення складу жирних кислот у вегетативних органах рослин культивованих *in vitro* та *in vivo* досліджуваних видів роду *Crambe*. Жирні кислоти (ЖК) діляться на три групи згідно зі ступенем насиченості (наявності подвійних зв'язків у вуглецевих ланцюгах): насичені, мононенасичені та поліненасичені ЖК. При порівнянні кількісного вмісту ЖК у екстрактах з вегетативних органів рослин, що культивували в асептичних та неасептичних умовах, виявили значні відмінності. Для всіх досліджуваних видів (крім *C. koktebelica*) загальний вміст ЖК, вміст ненасичених та насичених ЖК був вищим у культивованих *in vitro* рослинах. Найбільше ЖК містилось в екстрактах вегетативних органів рослин виду *C. maritima*, що вирощувались в умовах *in vitro* ($6,56 \pm 2,22$ мг/г маси). У рослинах, що проростали *in vivo*, вміст ЖК був значно меншим ($2,74 \pm 0,17$ мг/г маси). Найменше їх містилось у вегетативних органах

рослин *C. steveniana*, що культивували *in vivo* ($1,92 \pm 0,23$ мг/г маси). У асептичних рослинах *C. koktebelica* вміст ЖК був майже таким, як в неасептичних рослинах. Для усіх видів індекс подвійних зв'язків та коефіцієнт ненасиченості у неасептичних рослин був вищим, що говорить про якісну відмінність у синтезі насичених та ненасичених ЖК у рослин з різних умов зростання (табл. 14).

Табл.14. Загальний вміст жирних кислот (Σ FA), сума насичених (Σ SFA) та ненасичених (Σ USFA) жирних кислот, індекс подвійних зв'язків (ІПЗ) та коефіцієнт ненасиченості (К) жирних кислот вегетативних органів досліджуваних видів роду *Crambe*.

Види		Σ FA, мг/г	Σ SFA, мг/г	Σ USFA, мг/г	ІПЗ	К
<i>C. koktebelica</i>	<i>In vitro</i>	$3,64 \pm 0,70$	$1,58 \pm 0,01^*$	$1,25 \pm 0,69$	$1,24 \pm 0,42$	$1,46 \pm 0,22$
	<i>In vivo</i>	$3,74 \pm 0,54^*$	$0,70 \pm 0,20$	$3,04 \pm 0,68$	$2,07 \pm 0,17$	$4,68 \pm 1,97$
<i>C. tatarica</i>	<i>In vitro</i>	$6,09 \pm 0,51$	$1,94 \pm 0,10^*$	$4,14 \pm 0,41$	$2,13 \pm 0,10^*$	$1,81 \pm 0,01^*$
	<i>In vivo</i>	$2,65 \pm 0,09^*$	$0,67 \pm 0,04^*$	$1,95 \pm 0,11^*$	$2,02 \pm 0,08^*$	$2,95 \pm 0,35$
<i>C. aspera</i>	<i>In vitro</i>	$4,78 \pm 1,93$	$1,61 \pm 0,37$	$3,16 \pm 1,56$	$1,8 \pm 0,53$	$1,72 \pm 0,12$
	<i>In vivo</i>	$3,56 \pm 0,06^*$	$0,95 \pm 0,03^*$	$2,68 \pm 0,10^*$	$2,00 \pm 0,04^*$	$2,82 \pm 0,19$
<i>C. steveniana</i>	<i>In vitro</i>	$5,81 \pm 0,39$	$1,23 \pm 0,88$	$4,58 \pm 1,28$	$1,26 \pm 0,02^*$	$3,71 \pm 1,23$
	<i>In vivo</i>	$1,92 \pm 0,23$	$0,47 \pm 0,05^*$	$1,45 \pm 0,19$	$2,09 \pm 0,03^*$	$3,07 \pm 0,17$
<i>C. maritima</i>	<i>In vitro</i>	$6,56 \pm 2,22$	$1,83 \pm 0,55$	$4,72 \pm 1,67$	$1,77 \pm 0,11$	$2,57 \pm 0,33$
	<i>In vivo</i>	$2,74 \pm 0,17$	$0,64 \pm 0,06^*$	$2,07 \pm 0,19$	$1,99 \pm 0,07^*$	$3,24 \pm 0,41$

Примітка: дані подано у вигляді $M \pm m$; * - $p \leq 0,05$.

Серед насичених ЖК в у рослинах досліджуваних видів роду *Crambe* були присутні лауринова (C12:0), пальмітинова (C16:0), стеаринова (C18:0) та

лігноцеринова (C24:0) кислоти (для видів *C. tataria*, *C. aspera*, *C. stevenaina*, *C. maritima*). Також, до складу вегетативних органів рослин входили ненасичені ЖК: мононенасичені (олеїнова кислота (C18:1 $\Delta 9$, ω 9), нервонова кислота (C24:1 $\Delta 15$, ω 9) та поліненасичені (лінолева кислота (C18:2 $\Delta 9$, 12, ω 6), α -ліноленова кислота (C18:3 $\Delta 9$, 12, 15, ω 3)).

Подальше вивчення газ-спектрів зразків ефірів ЖК з асептичних та неасептичних рослин дослідних видів, дало змогу визначити за рахунок синтезу яких саме ЖК відбувалось підвищення загального вмісту ЖК у рослинах в умовах *in vitro*. В усіх зразках найбільший вміст, серед насичених ЖК, належав пальмітиновій кислоті C16:0, більша кількість її містилась у рослинах культивованих *in vitro*. У асептичних рослинах *C. koktebelica* відмічено вдвічі більший вміст C16:0 порівняно з неасептичними рослинами того ж виду (рис. 33).

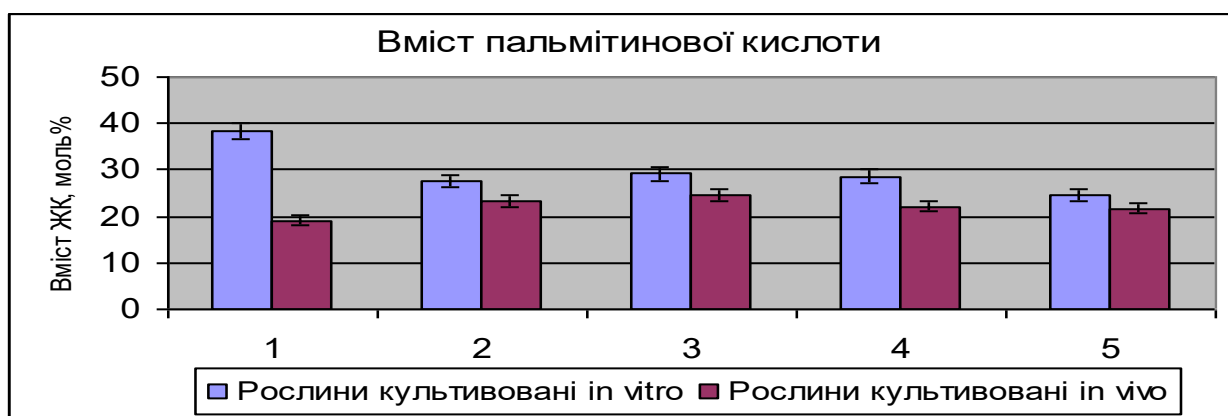


Рис. 33. Вміст пальмітинової кислоти у вегетативних органах рослин досліджених видів: 1. – *C. koktebelica*, 2. – *C. tataria*, 3. – *C. aspera*, 4. – *C. stevenaina*, 5. – *C. maritima*. Дані подано у вигляді $M \pm m$.

Найбільша кількість лауринової та стеаринової кислот містилась в екстрактах отриманих з вегетативних органів асептичних рослин *C. koktebelica* (C12:0 - $4,9 \pm 0,82$ моль%, та C18:0 – $3,7 \pm 0,97$ моль%). Спостерігали значну різницю у вмісті лауриної кислоти у рослинах, залежно від умов культивування – в асептичних зразках містилось значно більше стеаринової кислоти ніж в неасептичних для усіх досліджуваних видів. Культивовані *in vitro* рослини усіх

видів також містили більшу кількість стеаринової кислоти ніж ті, що культивувались *in vivo* (рис. 34).

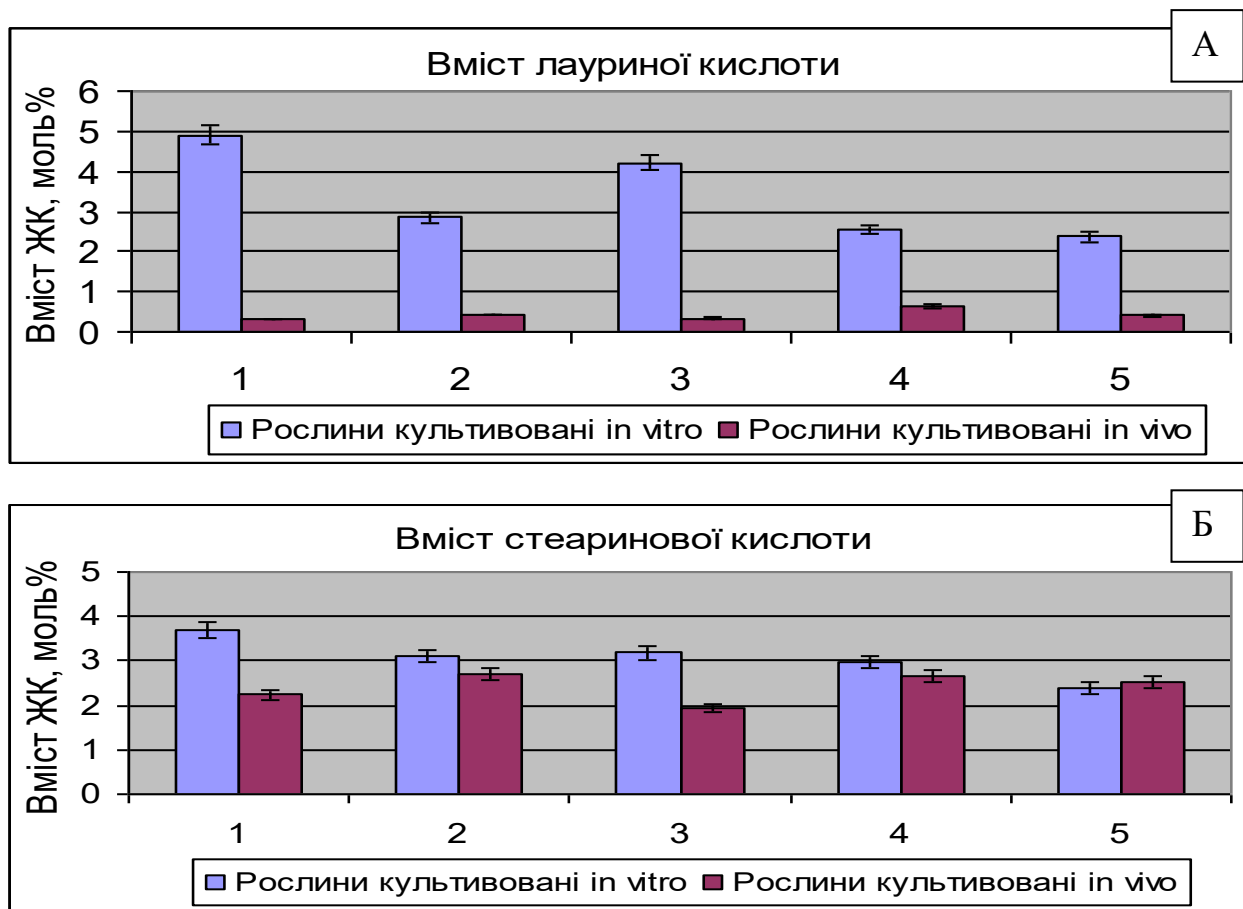


Рис. 34. Вміст лауринової (А) та стеаринової (Б) кислот у вегетативних органах рослин досліджуваних видів:

1. – *C. koktebelica*, 2. – *C. tataria*, 3. – *C. aspera*, 4. – *C. stevenaina*, 5. – *C. maritima*.

Дані подано у вигляді $M \pm m$.

Для усіх рослин, що культивували умовах відкритого ґрунту відмічено збільшення вмісту олеїнової кислоти у порівнянні з рослинами з асептичних умов (рис. 35). Лише один з досліджуваних виявився відмінним від інших – у вегетативних органах рослин, що культивували *in vitro*, виду *C. maritima* містилось значно більша кількість олеїнової кислоти ніж у тих, що культивували *in vivo*. Це також був найвищий показник вмісту даної ЖК серед усіх досліджених зразків представлених видів незалежно від умов культивування (рис. 35).

Серед п'яти досліджуваних видів лише у екстрактах (з асептичних та неасептичних рослин) *C. steveniana* не було знайдено лінолеву кислоту. У неасептичних рослинах *C. maritima* також не було встановлено наявності лінолевої кислоти, хоча у екстрактах з асептичних рослин, було встановлено наявність даної ЖК у найбільшій серед дослідних зразків кількості. У зразках з асептичних рослин *C. tataria* та *C. aspera* вміст лінолевої кислоти був у кілька разів більшим у неасептичних рослинах. Для *C. koktebelica* навпаки, лінолевої кислоти містилось більше у неасептичних рослинах (рис. 35).

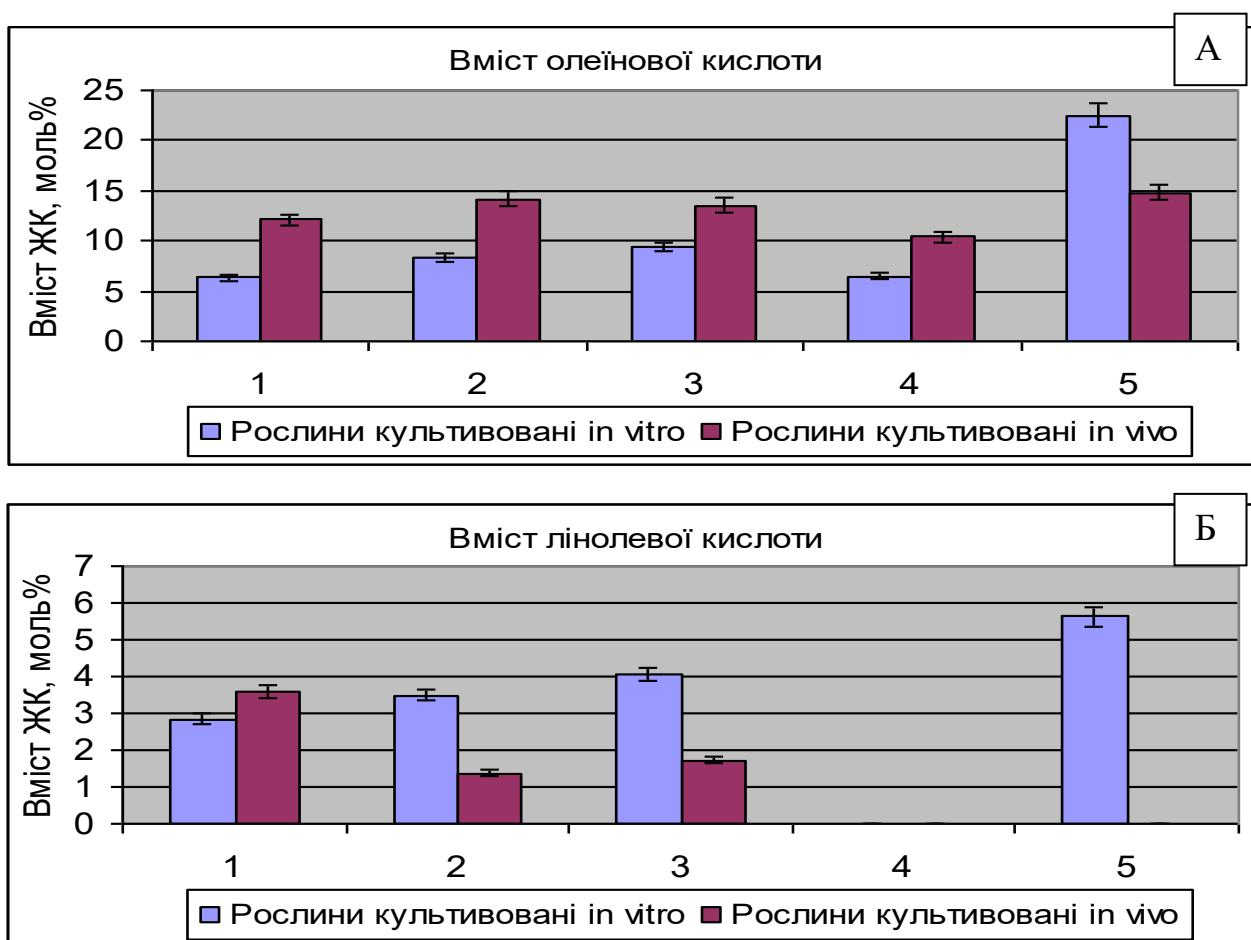


Рис. 35. Вміст олеїнової (А) та лінолевої (Б) кислот у вегетативних органах рослин досліджуваних видів: 1. – *C. koktebelica*, 2. – *C. tataria*, 3. – *C. aspera*, 4. – *C. steveniana*, 5. – *C. maritima*. Дані подано у вигляді $M \pm m$.

Домінуючою серед усіх ЖК (для всіх зразків) була α -ліноленова кислота (C18:3 $\Delta^9, 12, 15$, ω 3) (рис. 36). На відміну інших ненасичених ЖК, вміст α -

ліноленової кислоти був вищим для зразків з рослин, що культивували *in vivo*. Так, найбільше C18:3 містилось у неасептичних екстрактах *C. koktebelica* ($62,72 \pm 9,19$ моль%) та *C. stevenaina* ($62,69 \pm 2,38$ моль%). Найсуттєвіша різниця у вмісті C18:3 між зразками отриманими від рослин, що культивували *in vitro* та *in vivo*, належала видам *C. koktebelica* та *C. maritima*. Згідно з даними літератури, вміст α -ліноленової кислоти (однієї з найцінніших в харчовому раціоні людини) в найбільш вживаних видів з родини *Brassicaceae* є нижчим ніж вміст даної ЖК в досліджуваних представниках роду *Crambe* ($33,08 \pm 1,41\%$ для рапсу та $33,79 \pm 1,53\%$ для ріпи та $46,60 \pm 2,80\%$ для капусти) [168]. Тому, доцільно розглядати рід *Crambe* в якості джерела незамінних ЖК.

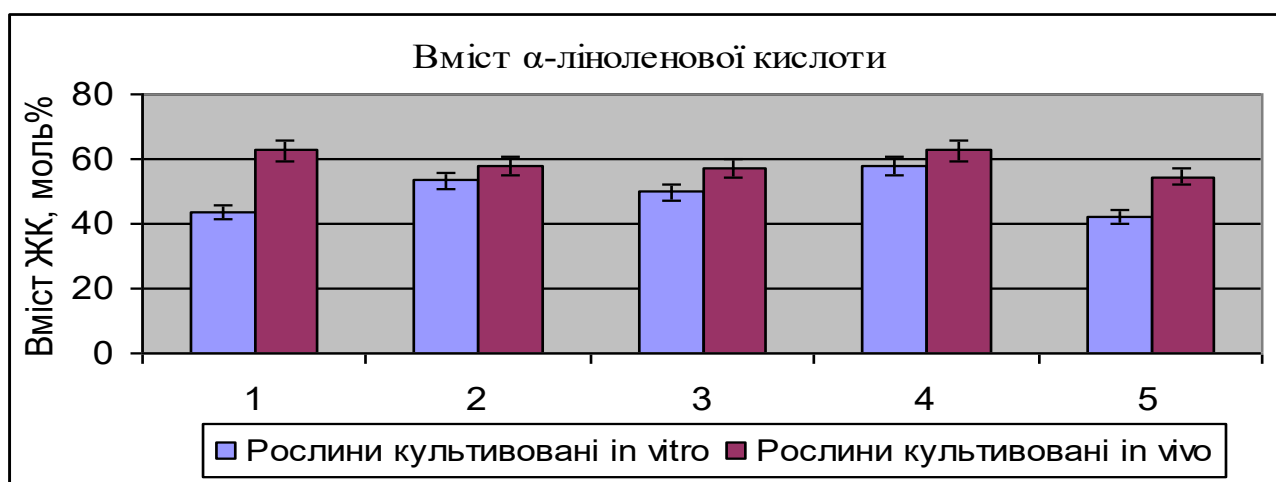


Рис. 36. Вміст α -ліноленової кислоти у вегетативних органах рослин досліджуваних видів: 1. – *C. koktebelica*, 2. – *C. tataria*, 3. – *C. aspera*, 4. – *C. stevenaina*, 5. – *C. maritima*. Дані подано у вигляді $M \pm m$.

В зразках, отриманих з вегетативних органів рослин *C. stevenaina*, що проростали в стерильних умовах, було знайдено невелику кількість лігноцеринової кислоти (C24:0 – $1,64 \pm 0,082$ моль%), а у рослинах, що проростали *in vivo* лише її мононенасичений аналог нервонову кислоту (C24:1 – $3,08 \pm 0,15$ моль%) (рис. 37). Для зразків з неасептичних рослин виду *C. tataria* встановлено наявність лігноцеринової кислоти (C24:0 – $0,44 \pm 0,02$ моль%), а у асептичних рослинах цього ж виду було показано наявність лише нервонової

кислоти (C24:1 – $2,66 \pm 0,13$ моль%). Нервонова кислота має широкий спектр застосування при симптоматичному лікуванні розсіяного склерозу, хвороби Паркінсона, шизофренії, хвороб пов'язаних з неврологічними розладами (хвороба Альцгеймера), використовується також для поліпшення пам'яті, лікування артрити, захворювань печінки та ожиріння. Крім того, нервонова кислота має широке застосування в якості харчової добавки в дитячому раціоні та сумішах (зокрема в раціоні недоношених немовлят), в раціоні вагітних жінок та в збагачених енергетичних добавках що мають нейрозахисну дію для атлетів під час тренувань [169, 170]. Беручи до уваги широке та різнопланове використання нервонової кислоти, її наявність, навіть у невеликій кількості, у вегетативних органах рослин виду *C. steveniana*, вирощених в умовах відкритого ґрунту, дає можливість говорити про подальше дослідження умов використання даного виду в якості джерела C24:1, або для біотехнологічного підвищення вмісту нервонової кислоти у зеленій масі рослин.

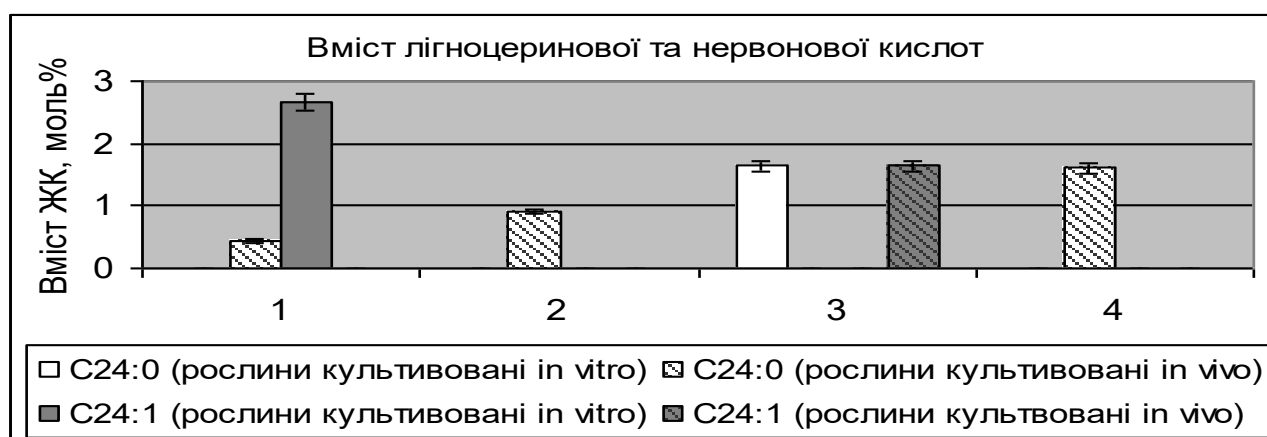


Рис. 37. Вміст лігноцеринової та нервонової кислот у вегетативних органах рослин досліджуваних видів: 1. – *C. tataria*, 2. – *C. aspera*, 3. – *C. steveniana*, 4. – *C. maritima*. Дані подано у вигляді $M \pm m$.

Вміст лігноцеринової кислоти, також було встановлено у рослинах, що культивували *in vivo* видів *C. aspera* ($0,90 \pm 0,04$ моль%) та *C. maritima* ($1,60 \pm 0,08$ моль%), але у рослинах даних видів, що росли *in vitro* не було встановлено даної, або нервонової кислот (рис. 37). Крім того, лише у рослинах *C. steveniana*

культивованих *in vivo*, встановлено вміст пальмітолеїнової кислоти в невеликій кількості ($1,50 \pm 0,16$ моль%).

Після дослідження та порівняння вмісту ЖК у вегетативних органах рослин, вдалося показати деякі суттєві відмінності у синтезі ЖК залежно від умов культивування. Кількісні відмінності у вмісті деяких ЖК можуть бути пов'язані з переходом частки певної ЖК у більш ненасичений стан під впливом умов навколишнього середовища. Відомо, що саме ліпіди клітинних мембран відіграють вирішальну роль у формуванні стійкості рослин до несприятливих умов існування, зокрема стійкості до понижених температур. При зниженні температури оточуючого середовища, прискорюється синтез поліненасичених ЖК у мембранних ліпідах [166, 171, 172]. У культурі *in vitro* температурні умови строго контролюються, в той час, як у відкритому ґрунті можливі досить значні їх коливання. Тому, саме вплив понижених температур за культивування *in vivo* міг викликати перехід насичених ЖК у більш ненасичений стан, що проявлялось у зниженні вмісту насичених ЖК та підвищенні вмісту ненасичених ЖК у порівнянні з рослинами, що культивували *in vitro*.

3.5.2. Визначення антиоксидантної активності, вмісту загального розчинного білка та поліфруктанів у вегетативних органах рослин культивованих *in vitro* та *in vivo* досліджуваних видів роду *Crambe*. Визначення та порівняння вмісту поліфруктанів, загального розчинного білка та АОА у рослин-регенерантів, що культивували *in vitro*, та рослин-донорів, культивованих *in vivo*, дає змогу оцінити не лише потенціал досліджуваних видів в якості можливих джерел сполук з біологічною активністю, а й дати змогу оцінити рівень стресу, який чинить культивування у асептичній культурі на рослинний організм [173].

Аналіз вмісту вторинних метаболітів у екстрактах з вегетативних органів досліджуваних видів показав найбільші відмінності між рослинами культованими *in vitro* та *in vivo* за показниками вмісту загального розчинного білка. Так, лише для виду *C. aspera* вміст білка виявився однаковим як у асептичних, так і в неасептичних рослинах (табл. 15). Для видів *C. koktebelica*, *C. steveniana*, *C. maritima* було відмічено збільшення вмісту загального

розчинного білка у рослин, що проростали *in vitro*, а для рослин *C. tataria* навпаки, зниження. Найбільший вміст загального розчинного білка відмітили у рослинах *C. maritima*, що культивували *in vitro* ($10,88 \pm 1,08$ мг/г), при цьому, для культивованих *in vivo* рослин того ж виду відмічено значне зниження даного показника ($2,18 \pm 0,14$ мг/г) (табл. 15).

Табл. 15. Антиоксидантна активність, вміст поліфруктанів та загального розчинного білка вегетативних органів рослин культивованих *in vitro* та *in vivo*.

Дослідні види	Білок, мг/г		ПФ, мг/г		АОА, %	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
<i>C.koktebelica</i>	$8,10 \pm 1,76$	$2,38 \pm 0,29$	$4,57 \pm 1,86$	$9,15 \pm 0,12$	$82 \pm 12,05$	$97 \pm 4,06$
<i>C. tataria</i>	$4,50 \pm 0,10$	$6,41 \pm 1,05$	$8,71 \pm 3,98$	$1,47 \pm 0,48$	$97 \pm 8,68$	$100 \pm 1,44$
<i>C. aspera</i>	$7,13 \pm 3,98$	$7,26 \pm 3,18$	$1,82 \pm 1,04$	$15,38 \pm 1,92$	$69 \pm 9,11$	$91 \pm 6,75$
<i>C. steveniana</i>	$5,52 \pm 0,43$	$3,94 \pm 0,49$	$6,29 \pm 0,35$	$5,34 \pm 1,38$	$75 \pm 0,82$	$91 \pm 8,33$
<i>C. maritima</i>	$10,88 \pm 1,08$	$2,18 \pm 0,14$	$6,23 \pm 1,70$	$7,17 \pm 1,79$	$92 \pm 8,28$	$109 \pm 6,04$

Примітки: ПФ – вміст поліфруктанів, АОА – антиоксидантна активність. Дані подано у вигляді $M \pm m$.

Для двох досліджуваних видів (*C. steveniana*, *C. maritima*) не було встановлено суттєвих відмінностей за вмістом поліфруктанів у вегетативних органах рослин залежно від умов культивування. З іншого боку, для рослин *C. koktebelica* та *C. aspera* відмічали значне підвищення вмісту поліфруктанів у рослинах, що культивували *in vivo*, а для *C. tataria* навпаки (вміст поліфруктанів був вищим у асептичних рослин) (табл. 15).

АОА екстрактів з вегетативних органів досліджуваних рослин виявилась дуже високою (розчин аскорбінової кислоти було взято як еталон для оцінки АОА досліджуваних зразків – 1 мг/мл аскорбінової кислоти – 98,22%). Крім того, АОА асептичних та неасептичних рослин для більшості видів суттєво не відрізнялась, лише рослини виду *C. steveniana*, культивовані *in vivo*, відзначились дещо вищою АОА ніж ті, що культивували *in vivo* (табл. 15).

Ряд публікацій свідчить про те, що культивування *in vitro* може бути стресовим чинником і викликати активацію мобільних елементів, що в результаті призводить до мутацій або зміни експресії генів чи цілого каскаду. Часто гени, що регулюють синтез білка та елементів захисних систем рослини, відповідають на стресовий фактор першими [103, 104]. Крім того, екзогенні регулятори використовують для мікроклонального розмноження *in vitro*, мають властивість активувати експресію генів, що регулюють синтез розчинних та стресових білків [174-175]. Ця властивість регуляторів росту може бути причиною виникнення різниці вмісту загального розчинного білка між рослинами, що культивували *in vitro* та *in vivo*. За культивування *in vitro* також відмічено підвищення синтезу вторинних метаболітів у рослин [176-179]. Ця зміна викликана вмістом живильного середовища та впливом екзогенних та ендогенних регуляторів росту на рівень експресії генів вторинного метаболізму. Отже, зміна вмісту поліфруктанів, компонентів системи АОА, білків та ЖК в асептичних рослинах порівняно з рослинами, що культивували в умовах відкритого ґрунту, може бути викликана специфічними умовами асептичної культури і мати пристосувальний характер, або спричинена генетичними змінами у рослинах-регенерантах. Крім того, синтез поліфруктанів у *in vivo* рослинах корелює з концентрацією ендогенних регуляторів росту та змінами фізичних умов оточуючого середовища і, внаслідок взаємних дій синтезу карбогідратів та фітогормонів, дає змогу рослинам витримувати та пристосовуватись до несприятливих умов оточуючого середовища [180]. Одним з механізмів акліматизації до пониження температури є підвищення вмісту білків, що беруть участь у відповіді на стрес та в метаболічних процесах і складу мембранних ЖК [181]. Вміст фруктанів у надземних та підземних органах рослини змінюється протягом року, що також зумовлено дією механізму захисту від несприятливих температурних режимів та посухи завдяки стабілізації клітинних мембран, зменшенню втрат води, перешкоджанню збільшення розмірів клітин внаслідок зростання осмотичного тиску та зниженню точки замерзання [182-185]. Тому слід розуміти, що у рослинах, які було використано в якості контролю (*in vivo*), досить часто змінюється рівень

вторинних метаболітів, що відповідають за адаптацію до температурних умов, посухи та за перехід до наступного вікового стану. Щоб визначити чи були описані вище зміни біохімічних характеристик в культурі *in vitro* результатом дії систем пристосування до змін умов оточуючого середовища чи викликані можливими мутаціями та зміною генотипу слід провести дослідження поліморфізму рослин-регенерантів досліджуваних видів по відношенню до вихідних форм.

3.5.3. Молекулярно-генетичний аналіз генотипів досліджуваних видів роду *Crambe*. Проведено молекулярно-генетичний аналіз 5 видів роду *Crambe* (*C. maritima*, *C. aspera*, *C. tataria*, *C. steveniana*, *C. koktebelica*) за використання 10 ДНК-маркерів: 7 ISSR-маркерів (A17898, B17899, HB10, IS-O5, UBC827, UBC864 та UBC890) та 3 SSR-маркери (gH032602, gHGL110933 та gHGL218091) [153, 154].

В результаті ПЛР-аналізу було отримано електрофореграми продуктів ампліфікації (Додаток 2), на основі яких побудовано філогенетичні дерева за допомогою програмного забезпечення DARwin 6.0 за використанням UPGMA-методу (рис. 39-43).

Молекулярно-генетичний аналіз генотипів *Crambe koktebelica*. Усі використані у даному дослідженні маркерні системи дали змогу отримати чіткі та відтворювані фрагменти. ISSR- та SSR-праймери забезпечували ампліфікацію фрагментів у межах 270-2300 пар нуклеотидів (пн) та 80-120 пн відповідно. При цьому, ISSR-праймери генерували 88 ампліфікованих фрагментів, з яких 43 були поліморфними. SSR-праймери продукували 7 поліморфних ампліфікованих фрагментів (табл. 16). Найбільш інформативними серед ISSR-маркерів виявилися B17899, UBC890 та UBC827.

Дендрограма, що зображена на рисунку 39 складається з двох головних кластерів. До першого кластеру увійшли 1 *in vivo* та 3 *in vitro* зразки *Crambe koktebelica*. Досліджувані *in vitro* зразки мають подібні генотипи, тобто генетичні зміни після введення в культуру не вдалось детектувати.

Табл. 16. Характеристика ISSR та SSR маркерних систем, використаних для дослідження генотипів *Crambe koktebelica*.

	A17898	B17899	HB10	IS-O5	UBC827	UBC864	UBC890
АФ, шт	13	9	11	12	10	17	16
ПФ, шт	5	6	6	5	6	5	10
П, %	38,46%	66,67%	54,55%	41,67%	60,00%	29,41%	62,50%
Оцінка системи	SSR - маркери						
	gHGL218091		gHGL110933		gH032602		
АФ, шт	3		2		2		
ПФ, шт	3		2		2		
П, %	100%		100%		100%		

Примітка: «АФ» – кількість ампліфікованих фрагментів; «ПФ» – кількість поліморфних фрагментів; «П» – відсоткове співвідношення ПФ до АФ.

Другий кластер складається з двох подібних *in vivo* генотипів. Можна припустити, що ці зразки мають походження від однієї особини.

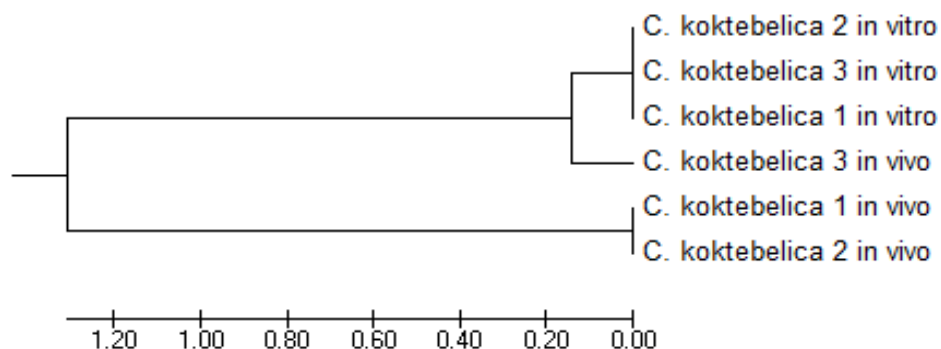


Рис. 39. Філогенетичне дерево *in vivo* та *in vitro* зразків *Crambe koktebelica*

Молекулярно-генетичний аналіз генотипів *Crambe tatarica*. Маркерні системи, що були використані у дослідженні [153, 154], давали чіткі фрагменти. ISSR-праймери забезпечували ампліфікацію фрагментів у межах 270-2300 пн, а SSR-праймери – 80-120 пн. При цьому, ISSR-праймери генерували 102 фрагменти з яких 71 був поліморфний. SSR-праймери продукували 9 поліморфних

ампліфікованих фрагментів (табл. 17). ISSR-меркери UBC890, B17899 та HB10 виявились найбільш інформативними.

Табл. 17. Характеристика ISSR та SSR маркерних систем, використаних для дослідження генотипів *Crambe tataria*.

Оцінка системи	ISSR - маркери						
	A17898	B17899	HB10	IS-O5	UBC827	UBC864	UBC890
АФ, шт	13	8	11	15	13	13	29
ПФ, шт	9	7	9	12	9	8	17
Поліморфізм	69,23%	87,5%	81,82%	80,00%	69,23%	61,54%	89,47%
Оцінка системи	SSR - маркери						
	gHGL218091		gHGL110933		gH032602		
АФ, шт	3		3		3		
ПФ, шт	3		3		3		
П, %	100%		100%		100%		

Примітка: «АФ» – кількість ампліфікованих фрагментів; «ПФ» – кількість поліморфних фрагментів; «П» – відсоткове співвідношення ПФ до АФ.

Дендрограма, що зображена на рисунку 40 складається з двох головних кластерів. До першого увійшли всі досліджувані *in vitro* зразки *Crambe tataria*, відповідно, до другого – всі досліджувані *in vivo* зразки цього виду.

Виявили, що генотипи *in vitro* зразків мають високу ступінь подібності на противагу до досліджуваних *in vivo* генотипів. Для останніх виявлено генетичний поліморфізм, що характерно для *in vivo* популяцій.

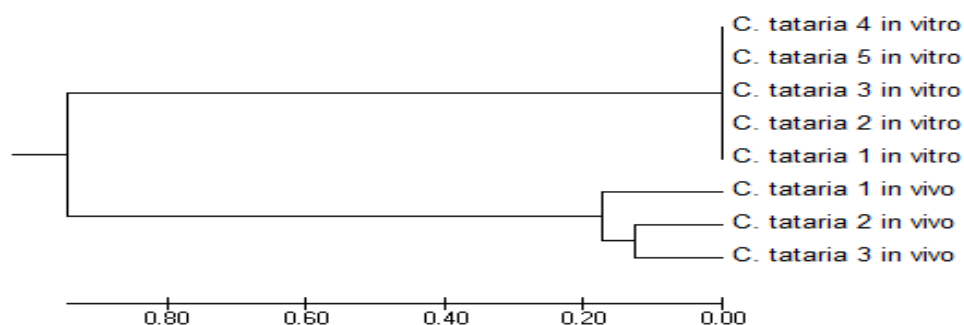


Рис. 40. Філогенетичне дерево *in vivo* та *in vitro* зразків *Crambe tataria*

Молекулярно-генетичний аналіз генотипів *Crambe aspera*. Більшість використаних у дослідженні маркерних систем формували чіткі фрагменти. ISSR- та SSR- праймери ампліфікували фрагменти ДНК в межах 270-2300 пн та 80-190 пн відповідно. При цьому, ISSR-праймери давали змогу отримати 73 ампліфіковані фрагменти, з яких поліморфними виявились 41 фрагмент. SSR-праймери ампліфікували 7 фрагментів, усі з яких були поліморфними (табл. 18). Маркерні системи A17898, IS-O5, B17899 та UBC890 виявились найбільш інформативними (з ISSR маркерів) для вивчення генотипів виду *C. aspera*. Праймер HB10 не забезпечував ампліфікації чітких фрагментів.

Табл. 18. Характеристика ISSR та SSR маркерних систем, використаних для дослідження генотипів *Crambe aspera*.

	A17898	B17899	HB10	IS-O5	UBC827	UBC864	UBC890
АФ, шт	10	8	-	13	11	11	20
ПФ, шт	6	8	-	10	1	3	13
П, %	60,00%	100%	-	79,92%	9,09%	27,27%	65,00%
Оцінка системи	SSR - маркери						
	gHGL218091		gHGL110933		gH032602		
АФ, шт	2		3		2		
ПФ, шт	2		3		2		
П, %	100%		100%		100%		

Примітка: «АФ» – кількість ампліфікованих фрагментів; «ПФ» – кількість поліморфних фрагментів; «П» – відсоткове співвідношення ПФ до АФ.

Дендрограма, що зображена на рисунку 41 складається з двох головних кластерів. До першого кластеру увійшли 1 *in vivo* та 7 *in vitro* зразків *Crambe aspera*. Всі 7 генотипів з культури *in vitro* виявились подібними.

До другого кластеру увійшли 2 *in vivo* зразки. Три досліджувані *in vivo* генотипи *Crambe aspera* проявили генетичний поліморфізм, що характерно для особин з природних популяцій.

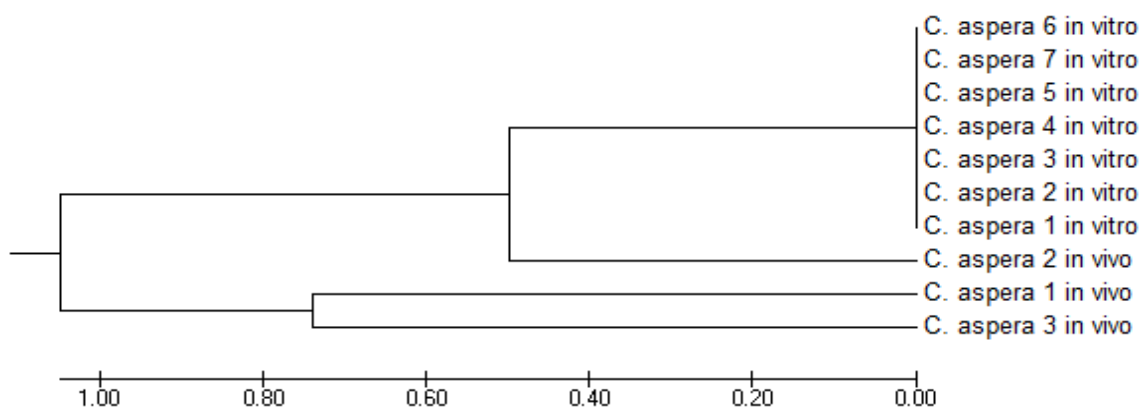


Рис. 41. Філогенетичне дерево *in vivo* та *in vitro* зразків *Crambe aspera*

Молекулярно-генетичний аналіз генотипів *Crambe steveniana*. Усі маркерні системи [154, 154] давали чіткі фрагменти. ISSR-праймери забезпечували ампліфікацію фрагментів у межах 280-2300 пн, а SSR-праймери – 80-120 пн. Застосовані до генотипів *C. steveniana* ISSR-праймери генерували 85 фрагментів, з яких 67 були поліморфними. SSR-праймери продукували 9 поліморфних ампліфікованих фрагментів (табл. 19). ISSR-меркери UBC890, B17899, IS-O5, UBC864 та HB10 виявились найбільш інформативними.

Табл. 19. Характеристика ISSR та SSR маркерних систем використаних для дослідження генотипів *Crambe steveniana*

	A17898	B17899	HB10	IS-O5	UBC827	UBC864	UBC890
АФ, шт	10	5	11	13	12	12	22
ПФ, шт	7	5	10	11	6	10	18
П, %	70,00%	100%	90,90%	84,62%	50,00%	83,33%	81,82%
Оцінка системи	SSR - маркери						
	gHGL218091		gHGL110933		gH032602		
АФ, шт	4		2		3		
ПФ, шт	4		2		3		
П, %	100%		100%		100%		

Примітка: «АФ» – кількість ампліфікованих фрагментів; «ПФ» – кількість поліморфних фрагментів; «П» – відсоткове співвідношення ПФ до АФ.

Дендрограма, що зображена на рисунку 42 складається з двох головних кластерів. Досліджувані *in vitro* зразки *Crambe steveniana* склали другу субкластерну групу. Було виявлено у трьох з чотирьох *in vitro* генотипів значну генетичну подібність. Один *in vitro* зразок був генетично поліморфним по відношенню до решти *in vitro* зразків. Якщо припустити, що всі досліджувані зразки мали походження з біологічного матеріалу єдиної особини, то можна стверджувати, що жорсткі умови введення в культуру *in vitro* призвели до генетичних змін. Єдиний *in vivo* зразок *Crambe steveniana* склав другий кластер і був генетично відмінним від досліджуваних *in vitro* зразів (рис. 42).

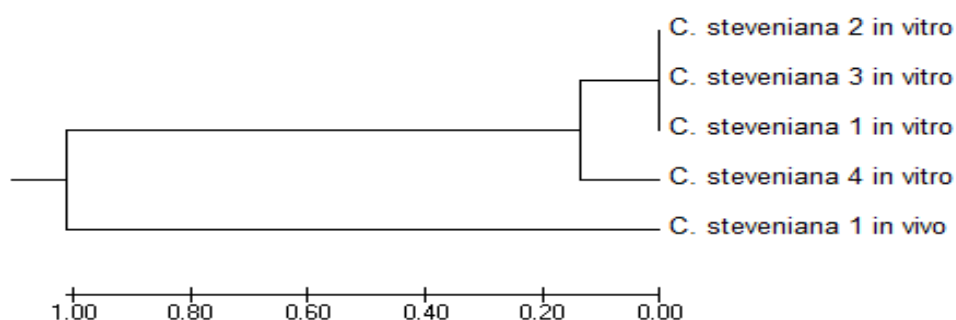


Рис. 42. Філогенетичне дерево *in vivo* та *in vitro* зразків *Crambe steveniana*

Молекулярно-генетичний аналіз генотипів *Crambe maritima*. Усі маркерні системи, що були використані для дослідження генотипів *C. maritima* давали чіткі фрагменти. Зокрема, ISSR- та SSR- праймери ампліфікували фрагменти ДНК в межах 400-1700 пн та 80-120 пн відповідно. ISSR-праймери давали змогу візуалізувати 78 ампліфіковані фрагменти, з яких поліморфними виявлялись 47 фрагментів. SSR-праймери ампліфікували 8 фрагментів, усі з яких були поліморфними (табл. 20). Прамер В17899 ампліфікував лише один чіткий фрагмент та не відмічався поліморфізмом. Маркерні системи IS-O5 UBC827 та UBC890 виявились найбільш інформативними (з ISSR маркерів) для вивчення генотипів виду *C. maritima*.

Табл. 20. Характеристика ISSR та SSR маркерних систем використаних для дослідження генотипів *Crambe maritima*

	A17898	B17899	HB10	IS-O5	UBC827	UBC864	UBC890
АФ, шт	10	1	9	16	11	11	20
ПФ, шт	5	0	5	15	6	4	12
П, %	50,00%	0	55,56%	93,75%	54,55%	36,36%	20,00%
Оцінка системи	SSR - маркери						
	gHGL218091		gHGL110933		gH032602		
АФ, шт	2		4		2		
ПФ, шт	2		4		2		
П, %	100%		100%		100%		

Примітка: «АФ» – кількість ампліфікованих фрагментів; «ПФ» – кількість поліморфних фрагментів; «П» – відсоткове співвідношення ПФ до АФ.

Дендрограма, що зображена на рисунку 43 складається з двох головних кластерів. В першому кластері одна субкластерна група представлена лише зразками *in vitro*, а інша – зразками *in vivo*. Досліджувані *in vitro* зразки *Crambe maritima* проявили значну генетичну подібність. Зразки *in vivo* *C. maritima* проявили високий ступінь генетичного різноманіття, що характерно для природних популяцій.

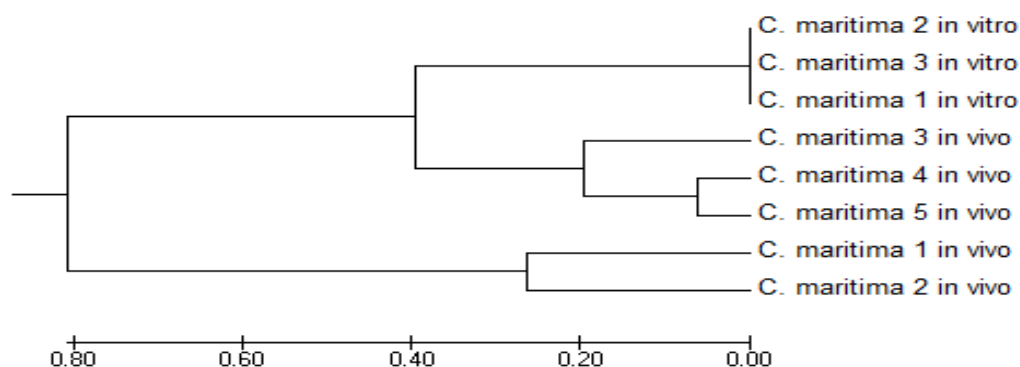


Рис. 43. Філогенетичне дерево *in vivo* та *in vitro* зразків *Crambe maritima*

УЗАГАЛЬНЕННЯ

В роботі було розроблено оптимальні протоколи поверхневої стерилізації насіння п'яти рідкісних видів роду *Crambe* – *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та *C. maritima* для ініціації асептичної культури рослин з використанням діюциду з часом експозиції 3 хв. Зняття насінневої шкірки перед обробкою стерилізуючими сполуками сприяло скороченню терміну від проведення стерилізації до проростання насінини. Тому можна стверджувати, що насінню досліджуваних видів, як і іншим представникам роду *Crambe*, притаманний глибокий спокій, інгібітори якого знаходяться у насіннєвій шкірці. Отримані дані дають змогу прискорити темпи роботи зі зникаючими видами роду *Crambe* та зменшити втрату насінневого матеріалу під час ініціації асептичної культури рослин.

Розділення регенеруваних пагонів на адвентивні та неадвентивні дає змогу використовувати отримані під час дослідження результати для збереження біорізноманіття та можливо цінного генетичного матеріалу для покращення сільськогосподарських культур або для селекційного виведення нових форм. Нами було встановлено умови прямої та непрямої регенерації з бічної бруньки досліджуваних видів та показано морфогенний потенціал даного типу експлантів. Також визначено відмінності у регенераційній здатності п'яти видів одного роду. Так, утворення пагонів шляхом прямої регенерації спостерігали для видів *C. koktebelica* та *C. tataria* на живильних середовищах з кінетином, а для видів *C. maritima*, *C. aspera* та *C. steveniana* на середовищі з БАП. При цьому максимальна кількість пагонів, утворених у даних випадках, сильно не відрізнялась для усіх досліджуваних видів. Регенераційна здатність за непрямого морфогенезу для видів *C. tataria*, *C. koktebelica*, *C. aspera* та *C. maritima* виявилась більш продуктивною ніж пряма регенерація. Для виду *C. maritima* кількість утворених пагонів з калюсної тканини була практично такою ж, як і без утворення калюсу. Найвищий регенераційний потенціал проявив вид *C. tataria* за культивування з БАП.

Наступним етапом роботи було дослідження морфогенного потенціалу частини кореня, листка та черешка. Оскільки для більшості видів таких досліджень проведено не було, отримані дані є корисними для встановлення оптимальних схем мікроклонування рідкісних рослин даного роду. В результаті роботи підтверджено зазначену у джерелах літератури високу регенераційну здатність тканин кореня для виду *C. maritima* – частота регенерації та кількість утворених пагонів була найвищою серед досліджуваних видів. Для інших досліджуваних видів визначено досить низьку частоту регенерації з кореня. Також підтверджено ключову роль БАП в ініціації регенерації розеткових рослин з кореневих експлантів для видів *C. koktebelica* та *C. aspera* (у поєднанні з НОК), але для видів *C. tataria*, *C. steveniana* та *C. maritima* більша частота регенерації пагонів спостерігалась за культивування на середовищі з кінетином та НОК. Таким чином, з п'яти досліджуваних видів роду *Crambe* ефективність використання корневих експлантів для мікроклонування було підтверджено лише для виду *C. maritima*. Можна стверджувати про успішну регенерацію пагонів з частини кореня за культивування з низьким вмістом цитокінінів (1 мг/л БАП або кінетину) та НОК (0,1-0,5 мг/л) у середовищі.

На листових експлантах регенерація пагонів відбувалась як за культивування з БАП, так і з кінетином у поєднанні з НОК, але застосування БАП виявилось більш ефективним для усіх досліджуваних видів. Відмічено залежність частоти регенерації від вмісту НОК у середовищі – за низьких його концентрацій (0,1-0,5 мг/л) спостерігали найвищу частоту утворення пагонів. Збільшення вмісту НОК у середовищі веде до зниження частоти регенерації. Найбільшу регенераційну здатність листових експлантів відмічено для *C. maritima*, а найнижчу для *C. koktebelica*. Використання даного типу експланта для розмноження рослин в асептичній культурі є доцільним лише для видів *C. steveniana* та *C. maritima*.

Регенерацію на черешкових експлантах відмічено на середовищах з двома типами цитокінінів, але культивування частини черешка з БАП та НОК дало змогу отримати оптимальні протоколи розмноження рослин. Висока концентрація

БАП у середовищі (2,5-5 мг/л) була умовою високої частоти регенерації пагонів *de novo* для усіх досліджуваних видів, окрім *C. tataria* – для чого спостерігали утворення пагонів з усіх експлантів за відносно низького вмісту БАП (1 мг/л). Також відмічено схожу з листовими експлантами роль НОК в індукції пагоноутворення – оптимальним є низький вміст ауксину (0,1-0,5 мг/л) у середовищі. Нами не було знайдено даних літератури по дослідженню морфогенезу з тканин черешка для рідкісних видів роду *Crambe*, тому показаний найвищий морфогенний потенціал цього типу експланту є важливим для оптимізації протоколів мікроклонального розмноження представників даного роду.

В результаті дослідження морфогенного потенціалу трьох типів експлантів рідкісних видів роду *Crambe*, можна стверджувати, що найвищий морфогенний потенціал має *C. maritima*. Успішне розмноження *in vitro* можливе за використання усіх трьох типів експлантів. Найнижчу здатність до регенерації пагонів відмічено для виду *C. koktebelica*, хоча можна рекомендувати проводити мікроклонування даного виду за допомогою черешкових експлантів. Частина листка та черешка *C. koktebelica* та *C. aspera* відзначились нижчою чутливістю до екзогенних регуляторів росту – максимальні показники регенерації отримували з використанням вищих доз БАП ніж для інших видів. Оскільки успішна регенерація залежить від рівня ендогенних та екзогенних фітогормонів, можна стверджувати про низький рівень цитокінінів у надземних органах рослин двох зазначених видів.

Кореневі експланти проявили більшу активність калюсогенезу в порівнянні з іншими органами рослин для усіх досліджуваних видів, окрім *C. aspera* – для якого проліферація калюсної тканини по всій площі експланта (товщиною більше 10 мм) відбувалась частіше на черешкових експлантах. Утворення калюсу відбувалось за культивування як з БАП, так і з кінетином, але регенерація його по всій площі експланта спостерігалась лише за наявності БАП у середовищі, що також показано для інших видів роду (Piovan et al., 2011; Магомедалиева, 2013). Для листових та черешкових експлантів *C. maritima* відмічали найвищу

активність калюсогенезу також на середовищі з кінетином, що може бути пояснено високим морфогенним потенціалом та вмістом ендogenous регуляторів росту у експлантах даного виду. Крім того, з кореня *C. steveniana* відмічали більш активну регенерацію калюса за культивування з кінетином. Утворений калюс відрізнявся за структурою та кольором залежно від типу експланта та гормонального складу середовища. Так, з кореневих експлантів утворювався оводнений світло-коричневий калюс, з листових – світло-зелений, місцями білий рихлий калюс, а з черешкових – світло-зелений, місцями білий або жовто-зелений рихлий калюс (на середовищах з БАП). На черешкових та листових експлантах також відмічено утворення коренів по всій площі експланту особливо за культивування на середовищі з кінетином та НОК.

В результаті роботи показано, що вибір експланта є важливим фактором у визначенні оптимальних схем регенерації рідкісних видів роду *Crambe*, оскільки рівень ендogenous фітогормонів або різна чутливість до екзогенних регуляторів росту може відрізнятись у органів рослини та мати видоспецифічний характер. Крім того, для досліджуваних видів виявлена детермінованість органів до певного типу морфогенезу: з кореневих експлантів утворюється калюс, з листових – корені, а з черешкових – пагони.

Внаслідок високої чутливості до екзогенних регуляторів росту ауксинової природи, виявленої під час досліджень та згідно з даними джерел літератури, укорінення рослин-регенерантів проводили на безгормональному живильному середовищі зі зменшеним вдвічі вмістом сахарози, макро- та мікросолей. Рослини з добре розвиненою кореневою системою адаптували до умов відкритого ґрунту. Виявили зниження здатності до укорінення та виживання в умовах ґрунту рослин, що у культурі *in vitro* мали розеткове стебло. В якості субстрату для адаптації рослин до умов *in vivo* доцільно використовувати суміш торфу та перліту, оскільки завдяки високій здатності затримувати воду останнього досягаються вищі показники адаптації рослин до неасептичних умов.

Для кожного з досліджених видів було розроблено схему збереження різноманіття методами біотехнології, від ініціації асептичної культури рослин до

адаптації їх до умов відкритого ґрунту. Розроблені схеми дають змогу відтворювати чисельність рідкісних та зникаючих видів у природних місцях зростання, природничих парках, заповідниках тощо. Крім того, оскільки представники виду потенційно можуть мати прикладне значення або бути використанні як генетичний матеріал для поліпшення економічно важливих видів, схеми розмноження *in vitro* можуть бути використані для подальшої селекційної роботи або біотехнологічного покращення сільськогосподарсько важливих видів.

Згідно отриманих даних, для більшості рослин (*C. koktebelica*, *C. steveniana*, *C. maritima*), що культивували *in vitro*, відмічено збільшення вмісту загального розчинного білка у порівнянні з рослинами з ґрунтових умов. Ми вважаємо, що екзогенні регулятори росту, які використовувались для мікроклонального розмноження *in vitro* та мають властивість активувати експресію генів, що регулюють синтез розчинних та стресових білків, можуть бути причиною виникнення різниці вмісту загального розчинного білка між рослинами, що культивували *in vitro* та *in vivo*.

Для двох досліджуваних видів (*C. steveniana*, *C. maritima*) не було встановлено суттєвих відмінностей за вмістом поліфруктанів у вегетативних органах рослин залежно від умов культивування. З іншого боку, для рослин *C. koktebelica* та *C. aspera* відмічали значне підвищення вмісту поліфруктанів у рослинах, що культивували *in vivo*, а для *C. tataria*, навпаки, вміст поліфруктанів був вищим у асептичних рослин. Такі неоднозначні результати можуть бути пояснені специфічними для асептичної культури особливостями (зниженням активності фотосинтезу, постачанням підземним органам вуглецю та ін.), які можуть значно підвищувати синтез поліфруктанів у листках рослин, культивованих *in vitro*. З іншого боку, фруктани відіграють важливу роль у механізмі пристосування до зниження температури оточуючого середовища та засухи (беруть участь у стабілізації клітинних мембран, запобігають підвищенню осмотичного тиску та знижують точку замерзання), а їх вміст у вегетативних органах та коренях рослин, що культивували *in vivo* може змінюватись протягом року, тому слід розуміти, що така відмінність відповіді на культивування *in vitro*

може бути пов'язана з нестабільними умовами культивування контрольних рослин та різним віковим станом.

АОА екстрактів з вегетативних органів досліджуваних рослин виявилась дуже високою та для більшості видів не відрізнялась залежно від умов культивування (лише рослини *C. steveniana*, що культивували *in vivo*, мали дещо вищу АОА ніж ті, що культивували *in vitro*). Результати дослідження корелюють з даними літератури, в яких описано як підвищення АОА в асептичних рослинах, так і її зниження та високий вміст деяких компонентів антиоксидантної системи (флавоноїдів, кварцетину та ін.).

У вегетативних органах рослин *C. tataria*, *C. steveniana* та *C. maritima*, що культивували *in vitro*, відмічено значне підвищення загального вмісту ЖК, для інших видів суттєвої різниці виявлено не було. Після проведення детального аналізу виявили зміну співвідношення між насиченими та ненасиченими ЖК у рослинах з різних умов зростання. Вміст насичених ЖК в асептичних рослинах був вищим, а в неасептичних містилось більше ненасичених ЖК. Ми вважаємо, що така різниця може бути пов'язана з переходом частки певної ЖК у більш ненасичений стан під впливом умов навколишнього середовища. Саме ліпіди клітинних мембран відіграють вирішальну роль у формуванні стійкості рослин до несприятливих умов існування, зокрема, стійкості до низьких температур. При зниженні температури оточуючого середовища, прискорюється синтез поліненасичених ЖК у мембранних ліпідах. За культивування *in vivo* можливі досить значні коливання температури навколишнього середовища що могло викликати зміну якісного складу ЖК у порівнянні з рослинами, що культивували *in vitro* за умов сталого оптимального температурного режиму.

Подальше дослідження виявило відмінності на рівні кожної з наявних ЖК у вегетативних органах рослин. Так, вміст пальмітинової та лауринової ЖК був дещо вищим у асептичних рослин. Стеаринової кислоти містилось також більше у зразках, культивованих *in vitro* для усіх видів окрім *C. maritima*. Домінуючою ЖК для рослин (як асептичних, так і неасептичних) усіх досліджуваних видів була α -ліноленова кислота. Її вміст відрізнявся в залежності від умов культивування – у

зразках, отриманих з асептичних рослин, її кількість була меншою у порівнянні з рослинами з ґрунтових умов. Отримані результати підтверджують цінність досліджуваних видів в сільському господарстві в якості кормової культури.

У зразках з вегетативних органів рослин *C. steveniana* (*in vitro*), було відмічено невелику кількість лігноцеринової кислоти, а у рослинах культивованих *in vivo* знайдено її моновенасичений аналог нервонової кислоти. Для зразків неасептичних рослин виду *C. tataria* встановлено наявність лігноцеринової кислоти, а в асептичних рослинах цього ж виду було показано наявність лише нервонової кислоти. Нервонова кислота має широкий спектр застосування при симптоматичному лікуванні розсіяного склерозу, хвороби Паркінсона, шизофренії, хвороб, пов'язаних з неврологічними розладами тощо, тому її наявність навіть у невеликій кількості у вегетативних органах рослин виду *C. steveniana*, вирощених в умовах відкритого ґрунту, дає можливість говорити про можливе використання даного виду в якості предмету для біотехнологічного підвищення вмісту нервонової кислоти у зеленій масі рослин. Наявність лігноцеринової кислоти, також було встановлено у рослинах, культивованих *in vivo* видів *C. aspera* та *C. maritima* ($1,60 \pm 0,08$ моль%), але у рослинах культивованих *in vitro* даних видів не було виявлено лігноцеринової або нервонової кислоти. Крім того, лише у рослинах *C. steveniana*, культивованих *in vivo*, була наявна пальмітолеїнова кислота.

Оскільки представники роду в умовах відкритого ґрунту є полікарпними видами, за кілька років життєвого циклу вони змінюють кілька вікових станів, кожен з яких має ряд відмінностей (морфологічних, біохімічних тощо). У значній мірі ці зміни пов'язані зі зміною складу ЖК, як одного з найважливіших механізмів пристосування до зовнішніх умов, тому відмінності за вмістом ЖК можуть бути пов'язані з різними віковими станами рослини в умовах *in vivo*. Рослини, культивовані *in vitro*, можуть бути джерелом отримання зеленої маси зі сталим складом ЖК, оскільки за культивування та розмноження *in vitro* рослини досліджуваних видів досягали лише ювенільного вікового стану з подальшим переходом до іматурного стану після етапу адаптації.

Усі використані у даному дослідженні маркерні системи дали змогу отримати чіткі фрагменти, окрім ISSR-маркерів B17899 (для *C. maritima*) та HB10 (для *C. aspera*). ISSR- та SSR-праймери забезпечували ампліфікацію фрагментів у межах 270-2300 пар нуклеотидів (пн) та 80-190 пн відповідно. Найбільш інформативними серед ISSR-маркерів виявилися B17899, UBC890 та UBC827. Оскільки для більшості досліджуваних видів досі не було описано дієвих маркерних систем, отримані нами результати є важливими для подальшого дослідження рідкісних видів роду *Crambe*. Отримані після проведення ПЛР-аналізу результати свідчать про відсутність генетичних змін внаслідок культивування та розмноження чотирьох досліджуваних видів *in vitro* (*C. maritima*, *C. tataria*, *C. aspera* та *C. koktebelica*), тому рекомендовані нами схеми мікроклонального розмноження можуть бути використані з метою збереження цінного генетичного матеріалу в асептичній культурі. Оскільки у одного з чотирьох *in vitro* генотипів *C. steveniana* встановлено генетичний поліморфізм по відношенню до решти *in vitro* зразків можна стверджувати, що жорсткі умови введення в культуру *in vitro* призвели до генетичних змін. Тому мікроклонування з метою збереження чисельності рослин виду *C. steveniana* слід проводити за використання знижених концентрацій регуляторів росту, а процедуру поверхневої стерилізації з застосуванням менш активних стерилізуючих сполук.

ВИСНОВКИ

1. Опрацьовано методи біотехнології для збереження п'яти рідкісних видів роду *Crambe* L. та показано модифікаційний характер змін біохімічних властивостей рослин внаслідок культивування *in vitro* та значну генетичну подібність.
2. Розроблено протоколи поверхневої стерилізації насіння разом з методами подолання глибокого спокою та отримано колекцію асептичних рослин п'яти рідкісних видів роду *Crambe* L.
3. Визначено умови мікророзмноження рослин шляхом прямої та непрямой регенерації з бічної бруньки для усіх досліджуваних видів.
4. Досліджено морфогенний потенціал трьох типів експлантів та виявлено детермінованість органів до певного типу морфогенезу. З корневих експлантів більш активно утворюється калюс, з листкових – корені, а з черешкових – пагони. Вплив цитокінінів та тип морфогенезу спостерігали на трьох типах експлантів – за наявності кінетину у поєднанні з НОК у середовищі частіше спостерігали ризогенез, а за наявності БАП та НОК – пагоноутворення та калюсогенез.
5. Встановлено склад жирних кислот у вегетативних органах досліджуваних видів та показано збільшення вмісту жирних кислот з більшим ступенем ненасиченості (C16:1, C18:2, C18:3) та зміни якісного складу жирних кислот деяких видів, що культивували в умовах відкритого ґрунту.
6. Культивування *in vitro* викликає як підвищення, так і зниження вмісту загального розчинного білка та поліфруктанів для деяких з досліджуваних видів. Антиоксидантна активність залишалась сталою незалежно від умов культивування.
7. Показано відсутність генетичних змін внаслідок культивування в асептичних умовах для усіх досліджуваних видів, окрім *C. steveniana*, для якої встановлено генетичну поліморфність у зразках культивованих *in vitro*.
8. Досягнуто успішного укорінення пагонів на безгормональному середовищі MS та проведено адаптацію асептичних рослин до ґрунтових умов на субстраті суміш торфу та перліту.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белокурова В.Б. Методи біотехнології в системі заходів зі збереження біорізноманіття рослин / В.Б. Белокурова // Цитология и генетика. – 2010. – Т. 44, № 3. – С. 58-72.
2. Branca F. *Brassica* / F. Branca, E. Cartea // Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Oilseeds. (Ed. C. Kole). – Heidelberg: Springer, 2011. – P. 17-36.
3. Wang Y.P. Development of rapeseed with high erucic acid content by asymmetric somatic hybridization between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica* / Y.P. Wang, K. Sonntag, E. Rudloff // Theor. Appl. Genet. – 2003. – Vol. 106. – P. 1147-1155.
4. Appel O. Cruciferae / O. Appel, I. Al-Shebaz // The families and genera of vascular plants, vol 5: Flowering plants-Dicotyledons. Malvales Capparales and non-betalain Caryophyllales. (Eds. K. Kubitzki, C. Bayer). – Berlin: Springer, 2003. – P. 75-174.
5. Prina A. A taxonomic revision of *Crambe* section *Dendrocrambe* (*Brassicaceae*) / A. Prina, J.B. Martine´z-Laborde // Bot. J. Linn. – 2008. – Vol. 156. – P. 291-304.
6. Прахова Т.Я. Новая нетрадиционная масличная культура – Крамбе абиссинская / Т.Я. Прахова // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2013. – Т. 8, № 106. – С. 8-10.
7. The use of *Crambe abyssinica* seeds as adsorbent in the removal of metals from waters / A.C.Jr. Gonçalves, F. Rubio, A.P. Meneghel [et al.] // Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient. – 2013. – Vol.17, №.3. – P. 306-311.
8. IUCN Red List of Threatened Species [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <http://www.iucnredlist.org>.
9. European Red List of Vascular Plants / M. Bilz, S.P. Kell, N. Maxted, R.V. Lansdown // Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2011. – P. 142.
10. Li X. Highly efficient in vitro regeneration of the industrial oilseed crop *Crambe abyssinica* / X. Li, A. Ahlman, H. Lindgren, L.-H. Zhu // Ind. Crop. Prod. – 2011. – Vol. 33. – P. 170-175.

11. Studies on the Plant regeneration from single cell culture of *Crambe abyssinica* / H.B. Gao, Y. Wang, F. Gao, P. Luo // Hereditas (Beijing). – 1998. – Vol. 20 (suppl.). – P. 50-52.
12. Bowes B.G. *In vitro* morphogenesis of *Crambe maritima* L. / B.G. Bowes // Protoplasma. – 1976. – Vol. 89. – P. 185-188.
13. Piovan A. *Crambe tataria*: actions for *ex situ* conservation / A. Piovan, G. Cassina, R. Filippini // Biodivers. Conserv. – 2011. – Vol. 20. – P. 359-371.
14. Future habitat loss and the conservation of plant biodiversity / X. Giam, C.J.A. Bradshaw, H.T.W. Tan, N.S. Sodhi // Biol. Cons. – 2010. – Vol. 143. – P. 1594-1602.
15. Leung D.W.M. Plant biotechnology helps quest for sustainability: With emphasis on climate change and endangered plants. / D.W.M. Leung // Climate change and sustainable development (Ed. R. Reck) – Louisville: Linton Atlantic Books, 2010. – P. 247-250.
16. Rao N.K. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology / N.K. Rao // Afr. J. Biotech. – 2004. – Vol. 3, № 2. – P. 136-145.
17. Davies T.J. Extinction risk and diversification are linked in a plant biodiversity hotspot / T.J. Davies // PLoS Biology. – 2011. – Vol. 9, № 5. – С 1-9.
18. Концепція національної екологічної політики України на період до 2020 року від 17 жовтня 2007 р. N 880-р. [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=880-2007-%F0>.
19. Конвенція про охорону біологічного різноманіття від 1992 року Конвенцію ратифіковано Законом N 257/94-ВР від 29.11.94 [Електронний ресурс] – Режим доступу : http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/995_030.
20. Конвенція про збереження мігруючих видів диких тварин (Про приєднання до Конвенції див. Закон N 535-XIV (535-14) від 19.03.99) [Електронний ресурс] – Режим доступу : http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/995_136.
21. Конвенція про охорону дикої флори та фауни і природних середовищ існування в Європі Берн, 19 вересня 1979 року [Електронний ресурс] – Режим доступу : http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/995_032.

22. Сытник К.М. Биотическое разнообразие: его изучение, сохранение и обогащение / К.М. Сытник // Альгология. – 2010. – Т. 20, № 3. – С. 368-382.
23. Мінняйло А.А. Біорізноманіття агроландшафтів: фауністичні дослідження / А.А. Мінняйло // Бюлетень Інституту сільського господарства степової зони НААН України. – 2013. – Т. 4. – С. 139-142.
24. Андреев Л.Н. Роль ботанических садов России в сохранении биологического разнообразия растений / Л.Н. Андреев, Ю.Н. Горбунов // Биологическое разнообразие. Интродукция растений: Материалы III Международной научной конференции (Санкт-Петербург, 23-25 сентября 2003 г.). – СПб: БИН РАН, 2003. – С. 5-7.
25. Новикова Т.И. Сохранение редких и полезных растений в коллекции Центрального сибирского ботанического сада / Т.И. Новикова, А.Ю. Набиева, Т.В. Полубоярова // Вестн. ВОГиС. – 2008. – Т. 12, № 4. – С. 564-572.
26. Engelmann F. Technologies and strategies for ex situ conservation / F. Engelmann, J.M.M. Engels // Managing Plant Genetic Diversity (Eds. J.M.M. Engels, V.R. Rao, A.H.D. Brown, M.T. Jackson). – Wallingford, UK: CABI Publishing, 2002. – P. 89-104.
27. Roberts E.H. Predicting the storage life of seeds / E.H. Roberts // Seed Sci. Technol. – 1973. – Vol. 1. – P. 499-514.
28. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity / F. Engelmann // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2011. – Vol. 47. – P. 5-16.
29. Pence V.C. Controlling contamination during in vitro collecting / V.C. Pence, J.A. Sandoval // In vitro collecting techniques for germplasm conservation (Eds. V.C. Pence, J.A. Sandoval et al.). – Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute, 2002. – P. 30-40.
30. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools / B.M. Reed, V. Sarasan, M. Kane [et al.] // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2011. – Vol. 47. – P. 1-4.
31. Tandon P. Prospects of plant conservation biotechnology in India with special reference to northeastern region / P. Tandon, S. Kumaria // Biodiversity: Status and

Prospects (Eds. P. Tandon, M. Sharma, R. Swarup). – New Delhi, India: Norasa Publishing House, 2005. – P. 79-91.

32. Rani V. Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: A critical reappraisal / V. Rani, S.N. Raina // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2000. – Vol. 36. – P. 319-330.

33. Grout B.W.W. Meristem-tip culture for propagation and virus elimination / B.W.W. Grout // *Plant Cell Culture Protocols* (Ed. R.D. Hall). – Totowa: Humana Press Inc. –1990. – P. 115-125.

34. Вечернина Н.А. Сохранение биологического разнообразия редких, исчезающих видов, уникальных форм и сортов растений методами биотехнологии : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня док. биол. Наук : 03.00.05 «Ботаніка», 03.00.12 «Фізіологія рослин» / Вечернина Нина Александровна. – Новосибирск, 2006. – 32 с.

35. *In vitro* conservation of *Mandevilla moricandiana* (Apocynaceae): short-term storage and encapsulation–dehydration of nodal segments / S.Z. Cordeiro, N.K. Simas, A.B. Henriques, A. Sato // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2014. – Vol. 50. – P. 326-336.

36. Bell R.L. *In vitro* tissue culture of pear: Advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation / R.L. Bell, B.M. Reed // *Proc. 8th IS on Pear.* – 2002. – P. 412-418.

37. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений / И.В. Митрофанова // *Физиология и биохимия культурных растений.* – 2009. – Т. 41, № 6. – С. 496-508.

38. Cruz-Cruz C.A. Biotechnology and conservation of plant biodiversity / C.A. Cruz-Cruz, M.T. González-Arno, F. Engelmann // *Resources.* – 2013. – Vol. 2. – P. 73-95.

39. Vitrifcation as an approach to cryopreservation / G.M. Fahy, D.R. MacFarlane, C.A. Angell, H.T. Meryman // *Cryobiology.* – 1984. – Vol. 21. – P. 407-426.

40. Журавлев Ю.Н. Морфогенез у растений *in vitro* / Ю.Н. Журавлев, А.М. Омелько // *Физиология растений.* – 2008. – Т. 55, № 5. – С. 643-664.

41. Phillips C. Invited review: *In vitro* morphogenesis in plants – recent advances / C. Phillips // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2004. – Vol. 40. – P. 342-345.
42. Christianson M.L. An embryogenic culture of soybean: towards a general theory of somatic embryogenesis / M.L. Christianson // *Tissue culture in forestry and agriculture* (Eds. R.R. Henke, K.W. Hughes, M.J. Constantin, A. Hollaender). – New York: Plenum Press, Springer, 1985. – P. 83-103.
43. Christianson M.L. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis / M.L. Christianson, D.A. Warnik // *Dev. Biol.* – 1983. – Vol. 95, № 2. – P. 288-293.
44. Christianson M.L. Phenocritical times in the process of *in vitro* shoot organogenesis / M.L. Christianson, D.A. Warnik // *Dev. Biol.* – 1984. – Vol. 101. – P. 382-390.
45. Hochedlinger K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency / K. Hochedlinger, K. Plath // *Development.* – 2009. – Vol. 136, № 4. – P. 509-523.
46. *In vitro* morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides* / Y.H. Komatsu, K.D. Batagin-Piotto, G.E. Brondani [et al.] // *J. For. Res.* – 2011. – Vol. 22, № 2. – P. 209-215.
47. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? / J.L. Verdeil, L. Alemanno, N. Niemenak, T.J. Tranbarger // *Trends Plant Sci.* – 2007. – Vol. 12, № 6. – P. 245-252.
48. Competence, determination, and meristemoid plasticity in tobacco organogenesis *in vitro* / H.S. Dhaliwal, N.S. Ramesar-Fortner, E.C. Yeung, T.A. Thorpe // *Can. J. Bot.* – 2003. – Vol. 81, № 6. – P. 611-621.
49. Schwarz O.J. Propagation from nonmeristematic tissues: Organogenesis / O.J. Schwarz, A.R. Sharma, R.M. Beaty // *Plant development and biotechnology* (Eds. R. N. Trigiano, D. J. Gray) – Boca Raton: CRC Press LLC, 2005. – P. 159-172.
50. Батыгина Т.Б. От микроспоры – к сорту / Т.Б. Батыгина, Н.Н. Круглова, В.Ю. Горбунова и др. // – М.: Наука, 2010. – 174 с.

51. Jimenez V.M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis / V.M. Jimenez // Plant Growth Regul. – 2005. – Vol. 47. – P. 91-110.
52. Komamine A. Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures – morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology / A. Komamine, N. Murata, K. Nomura // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2005. – Vol. 41. – P. 6-10.
53. Raghavan V. Developmental biology of flowering plants / V. Raghavan // New York: Springer, 2000. – P. 354.
54. Steward F.C. Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells / F.C. Steward, M.O. Mapes, K. Hears // Am. J. Bot. – 1958. – Vol. 45. – P. 705-708.
55. Jimenez V.M. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and nonembryogenic cultures of carrot / V.M. Jimenez, F. Bangerth // Physiol. Plant. – 2001. – Vol. 111. – P. 389-395.
56. Protoplast regeneration and stem embryogenesis of haploid androgenic rape / W. Thomas, F. Hoffmann, I. Potrykus, G. Wenzel // Mol. Gen. Genet. – 1976. – Vol. 145. – P. 245-247.
57. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants / F.R. Quiroz-Figueroa, R. Rojas-Herrera, R.M. Galaz-Avalos, V.M. Loyola-Vargas // Plant Cell. Tiss. Org. Cult. – 2006. – Vol. 86. – P. 285-301.
58. Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat / F. Delporte, A. Pretova, P. du Jardin, B. Watillon // Protoplasma. – 2014. – Vol. 251. – P.1455-1470.
59. Lim K.-B. Influence of genotype, explant source, and gelling agent on *in vitro* shoot regeneration of Chrysanthemum / K.-B. Lim, S.J. Kwon, S.I. Lee // Hort. Environ. Biotechnol. – 2012. – Vol. 53, № 4. – P. 329-335.
60. Bhojwani S.S. Plant tissue culture: An introductory text / S.S. Bhojwani, P.K. Dantu // – New Delhi: Springer, 2013. – 309 p.

61. Магомедалиева В.К. Особенности морфогенеза и регенерации Катрана бугорчатого *in vitro* fundamental research. / В.К. Магомедалиева // Biol. Sci. – 2013. – Т. 10. – С. 114-118.
62. Regeneration and transformation of *Crambe abyssinica* / W. Qi, I.E.M. Tinnenbroek-Capel, J.G. Schaart [et al.] // BMC Plant Biology. – 2014. – Vol. 14. – P. 235.
63. Development of an Agrobacterium-mediated stable transformation method for industrial oilseed crop *Crambe abyssinica* ‘BelAnn’ / S. Chhikaraa, I. Duttaa, B. Paulosea [et al.] // Ind. Crops Prod. – 2012. – Vol. 37. – P. 457-465.
64. Genetic transformation of the oilseed crop *Crambe abyssinica* / X. Li, A. Ahlman, X. Yan [et al.] // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2010. – Vol. 100. – P. 149-156.
65. Yancheva S.D. Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during *in vitro* organogenesis in apple / S.D. Yancheva, S. Golubowicz, E. Fisher [et al.] // Plant Sci. – 2003. – Vol. 165. – P. 299-309.
66. Ziv M. Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes *in vitro* / M. Ziv, H. Lilien-Kipnis // Plant Cell Rep. – 2000. – Vol. 19. – P. 845-850.
67. Garay-Arroyo A. Hormone symphony during root growth and development / A. Garay-Arroyo, M. De La Paz Sanchez, B. Garcia-Ponce [et al.] // Dev. Dynam. – 2012. – Vol. 241. – P. 1867-1885.
68. Plant development and biotechnology (Eds. R. N. Trigiano, D. J. Gray) – Boca Raton: CRC Press LLC, 2005. – P. 358.
69. Systemic signaling of the plant N status triggers specific transcriptome responses depending on the N source in *Medicago truncatula* / S. Ruffel, S. Freixes, S. Balzergue. [et al.] // Plant Physiol. – 2008. – Vol. 146, № 4. – P. 2020-2035.
70. Ramage C.M. Inorganic nitrogen requirements during shoot organogenesis in tobacco leaf discs / C.M. Ramage, R.R. Williams // J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53. – P. 1437-1443.
71. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco / P. Walch-Liu, G. Neumann, F. Bangerth, C. Engels // J. Exp. Bot. – 2000. – Vol. 51. – P. 227-237.

72. Woodward A.J. The effect of nitrogen source and concentration, medium pH and buffering on *in vitro* shoot growth and rooting in *Eucalyptus marginata* / A.J. Woodward, I.J. Bennett, S. Pusswonge // Sci. Hortic. – 2006. – Vol. 110. – P. 208-213.
73. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.
74. Quoirin M. Un premier bilan de dix années de recherche sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux / M. Quoirin, P. Lepoivre, P. Boxus // Rapport de la Station des Cultures Fruitières et Maraîchères de Gembloux. – 1977. – P. 93-117 (in French).
75. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on nitrogen source / C.C. Chu, C.C. Wang, C.S. Sun [et al.] // Sci. Sin. – 1975. – Vol. 18. – P. 659-668.
76. Lloyd G. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture / G. Lloyd, B. McCown // Proceedings of the International Plant Propagators' Society. – 1980. – Vol. 30. – P. 421-427.
77. Червона книга України. Рослинний світ / Ред. Я.П. Дідух // К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
78. Prina A.O. Taxonomic review of the genus *Crambe* sect. *Crambe* (*Brassicaceae*, *Brassicaceae*) / A.O. Prina // Anales Jard. Bot. Madrid. – 2009. – Vol. 66, № 1. – P. 7-24.
79. Катран (растение) // Большая советская энциклопедия : [в 30 т.] 3-е изд. (гл. ред. А.М. Прохоров). – М.: Советская энциклопедия, 1969-1978.
80. Artus N.N. Arsenic and cadmium phytoextraction potential of *Crambe* compared with indian mustard / N.N. Artus // J. Plant. Nut. – 2006. – Vol. 29. – P. 667-679.
81. Дідух Я.П. Катран коктебельський / Я.П. Дідух // Червона книга України. Рослинний світ. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – С. 360.
82. Дідух Я. П. Катран татарський / Я.П. Дідух // Червона книга України. Рослинний світ. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – С. 365.
83. Дідух Я.П. Катран шершавий / Я.П. Дідух // Червона книга України. Рослинний світ. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – С. 358.

84. Дідух Я.П. Катран стевена / Я.П. Дідух // Червона книга України. Рослинний світ. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – С. 364.
85. Дідух Я.П. Катран морський / Я.П. Дідух // Червона книга України. Рослинний світ. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – С. 361.
86. Paunescu A. Hormonal regulation of somatic embryogenesis and organogenesis in *Alyssum borzaeanum* Nyár. *in vitro* culture system / A. Paunescu // Electron. J. Biol. – 2009. – Vol. 5, № 3. – P. 45-48.
87. Hanus-Fajerska E. *In vitro* multiplication and acclimatization of *Biscutella laevigata* (*Brassicaceae*) to cultivation in greenhouse conditions / E. Hanus-Fajerska, A. Wiszniewska, E. Muszyńska // BioTechnologia. J. Biotechnol. Computat. Biol. Bionanotechnol. – 2012. – Vol. 93, № 2. – P. 97-101.
88. Roest S. Plant regeneration from protoplasts: a literature review / S. Roest, L.J.W. Gilissen // Acta Bot. Neerl. – 1989. – Vol. 38, № 1. – P. 1-23.
89. Drew R.L.K. Fellows generation of seakale (*Crambe maritima* L.) plantlets by tissue culture / R.L.K. Drew, J.R. Fellows // Ann. Bot. – 1986. – Vol. 58. – P. 179-181.
90. Хапугин А.А. *Lunaria rediviva* L. (*Cruciferae*) из Мордовского государственного природного заповедника им. П. Г. Смидовича в условиях *in vivo* и *in vitro* / А.А. Хапугин, Г.В. Андрюшечкина // Живые и биокосные системы. – 2014. – № 7.
91. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro* / Е.М. Ветчинкина, И.В. Ширнина, С.Ю. Ширнин, О.И. Молканова. // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. – 2012. – Т. 7. – С. 109-118.
92. Poljsak B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress / B. Poljsak // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2011. – Vol. 2011. – P. 1-15.
93. Poljsak B. The Neglected Significance of “Antioxidative Stress” / B. Poljsak, I. Milisav // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1-12.
94. Blokhina O. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review / O. Blokhina, E. Virolainen, K.V. Fagerstedt // Ann. Botan. – 2003. – Vol. 91. – P. 179-194.

95. Агаджанян А.Х. Антиоксидантные свойства некоторых лекарственных растений / А.Х. Агаджанян, А.А. Агаджанян // Биолог. журн. Армении. – 2012. – Т. 4, № 64. – С. 76-79.
96. Razavi S.M. Chemical composition, allelopathic and cytotoxic effects of essential oils of flowering tops and leaves of *Crambe orientalis* L. from Iran / S.M. Razavi, S.Nejad-Ebrahimi // Nat. Prod. Res. – 2009. – Vol. 23, № 16. – P. 1492-1498.
97. Determination of antioxidant activity of *Crambe Cordifolia* / S.M. Bukhari, N. Simic, H.L. Siddiqui, V.U. Ahmad // World Appl. Sci. J. – 2013. – Vol. 22, № 11. – P. 1561-1565.
98. Скрининг антиоксидантных свойств экстрактов из листьев растений семейства *Orchidaceae* Juss. / Т.М. Черевченко, Р.В. Иванников, И.В. Лагута [и др.]. // Докл. НАН Украины. – 2016. – № 11. – С. 87-92.
99. Влияние регуляторов роста на изоферментный состав супероксиддисмутазы в растениях люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) *in vitro* / А.А. Балакина, А.А. Терентьев, Е.А. Калашникова, С.Л. Белопухов // Бутлеровские сообщения. – 2012. – Т. 29, № 1. – С. 55-61.
100. *Crambe* meal in diets supplemented with enzyme complex solid state fermentation (SSF) for Nile tilapia / G.S. Moura, M.M. Pedreira, E.A.T. Lanna [et al.] // Afr. J. Agric. Res. – 2015. – Vol. 10, № 4. – P. 289-294.
101. Korsrud G.O. A comparison of the nutritional value of crambe and camelina seed meals with egg and casein / G.O. Korsrud, M.O. Keith, J.M. Bell // Can. J. Anim. Sci. – 1978. – Vol. 58. – P. 493-499.
102. Pereira J.A.A. Nutritional evaluation of processed crambe meal for rats / J.A.A. Pereira, A.W. Kirleis, T.R. Cline // J. Anim. Sci. – 1981. – Vol. 53, № 5. – P. 1278-1285.
103. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures / T. Gaspar, T. Franck, B. Bisbis [et al.] // Plant Growth Regul. – 2002. – Vol. 37. – P. 263-285.

104. Nikita retrotransposon movements in callus cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) / E. Bayram, S. Yilmaz, H. Hamat-Mecbur [et al.] // J. Plant Mol. Biol. – 2012. – Vol. 5, № 3. – P. 211-217.
105. Effects of elevated CO₂ concentration and water deficit on fructan metabolism in *Viguiera discolor* Baker / V.F. Oliveira, E.A. Silva, L.B. Zaidan, M.A. Carvalho // Plant. Biol. (Stuttg). – 2013. – Vol. 15, № 3. – P. 471-482.
106. Specific effects of fructo- and glucooligosaccharides in the preservation of liposomes during drying / D.K. Hinch, E. Zuther, E.M. Hellwege, A. Heyer // Glycobiol. – 2002. – Vol. 12, № 2. – P.103-110.
107. Бадретдинова З.А. Фруктаны сельскохозяйственных культур / З.А. Бадретдинова, А.В. Канарский // Весник Казанского технологического университета. – 2013. – Т. 16, № 19. – С. 207-210.
108. *In vitro* culture and fructan production by *Vernonia herbacea* (Asteraceae). / F. Trevisan, E.P. Chu, M. Gaspar, M.A.M. Carvalho // Acta Physiol. Plant. – 2014. – Vol. 36. – P. 2299-2307.
109. Rustan A.C. Fatty acids: structures and properties / A.C. Rustan, C.A. Drevon // Encyclopedia of life sciences. – 2005. – P. 1-7.
110. Omega-3 fatty acids – nutritional aspects / C.A. Drevon, M.S. Nenseter, I.R. Brude [et al.] // Can. J. Cardiol. – 1995. – Vol. 11 (suppl. G). – P. 47-54.
111. Генетичний поліморфізм популяцій *Gentiana Lutea* L. (*Gentianaceae*) з Чорногірського масиву українських Карпат // М.З. Мосула, І.І. Конвалюк, В.М. Мельник [та ін.] // Цитология и генетика. – 2014. – Т. 48, № 6. – P. 33-39.
112. Мінливість морфогенної та неморфогенної культури тканин *Ungernia Victoris* за результатами RAPD-аналізу / О.М. Бублик, І.О. Андрєєв, К.В. Спірідонова, В.А. Кунах // Вісн. Укр. Тов. генетиків і селекціонерів. – 2008. – Т. 6, № 1. – P. 44-51.
113. RAPD- та ISSR-аналіз генетичної мінливості у культурі тканин та органів тирличу звичайного (*Gentiana Pneumonanthe* L.) / І.І. Конвалюк, В.М. Мельник, Н.М. Дробик [та ін.] // Вісн. Укр. Тов. генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т. 9, № 1. – P. 22-31.

114. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding / M.P. Reddy, N.Sarla, E.A. Siddiq // *Euphytica*. – 2002. – Vol. 128. – P. 9-17.
115. Larkin P.J. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement / P.J. Larkin, W.R. Scowcroft // *Theor. Appl. Genet.* – 1981. – Vol. 60. – P. 197-214.
116. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge / B. McClintock // *Science*. – 1984. – Vol. 226, № 4676. – P. 792-801.
117. Кунах В.А. Механізми та деякі закономірності соматоклональної мінливості рослин / В.А. Кунах // *Вісник Укр. Тов. генетиків і селекціонерів*. – 2003. – № 1. – С. 101-106.
118. Хон Б. Мобильность генома растений / Б. Хон, Э.М. Денис // – *Агропромиздат*, 1990. – 271 с.
119. Somaclonal variation in plants regenerated by organogenesis from callus culture of strawberry (*Fragaria x ananassa*) / A.N. Popescu, V.S. Isac, M.S. Coman, M.S. Radulescu // *Acta Horticulturae*. – 1997. – Vol. 439. – P. 89-96.
120. Mishiba K.-I. Ploidy distribution in the explant tissue and the calluses induced during the initial stage of internode segment culture of *Asparagus officinalis* L. / K.-I. Mishiba, K.-I. Tawada, M. Mii // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. – 2006. – Vol. 42. – P. 83-88.
121. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry / N.S. Nehra, K.K. Kartha, C. Stushnott, K.L. Giles // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1992. – Vol. 29. – P. 257-268.
122. Panda S. Chloroplast and nuclear DNA studies in a few members of the *Brassica oleracea* L: group using PCR-RFLP and ISSR-PCR markers: a population genetic analysis / S. Panda, J.P. Martin, I. Aguinagalde // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – Vol. 106. – P. 1122-1128.

123. Genetic diversity in woad (*Isatis tinctoria* L.) accessions detected by ISSR markers / L. Rocha, S. Martins, V. Carnide [et al.] // Plant Genet. Resour. - C. – 2011. – Vol. 9. – P. 210-213.
124. Mohammed S. Morphological and molecular characterization of *Lepidium sativum* population collected from Ethiopia / S. Mohammed, K. Tesfaye // Afr. J. Plant Sci. – 2015. – Vol. 9. – P. 215-222.
125. Bond J.M. Genetic diversity in *Crambe maritima* along the English Channel: the role of ocean currents in determining population structure / J.M. Bond, R. Daniels, F. Bioret // Ecography. – 2005. – Vol. 28. – P. 374-384.
126. Briard M. Wild seakale (*Crambe maritima* L.) diversity as investigated by morphological and RAPD markers / M. Briard, A. Horvais, J.Y. Peron // Sci. Hort. – 2002. – Vol. 95. – P. 1-12.
127. Phylogeny of the Macaronesian endemic *Crambe* section *Dendrocrambe* (*Brassicaceae*) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA / J. Francisco-Ortega, J. Fuertes-Aguilar, S.-C. Kim [et al.] // Am. J. Bot. – 2002. – Vol. 89. – P. 1984-1990.
128. Genetic diversity among progenies of *Crambe abyssinica* Hochst for seed traits / A.C.C. Lara-Fiozeze, C.A. Tomaz, S.L. Fiozeze [et al.] // Ind. Crops Prod. – 2013. – Vol. 50. – P. 771-775.
129. Prina A. A taxonomic revision of *Crambe*, sect. *Leptocrambe* (*Brassicaceae*) / A. Prina // Bot. J. Linn. Soc. – 1999. – Vol. 133. – P. 509-524.
130. Prina A. Taxonomic review of the genus *Crambe* sect. *Crambe* (*Brassicaceae*, *Brassicaceae*) / A. Prina // An. Jard. Bot. Madr. – 2009. – Vol. 66. – P. 7-24.
131. Warwick S.I. Genetic variation in the *Crambe abyssinica*–*C. hispanica*–*C. glabrata* complex / S.I. Warwick, R.K. Gugel // Genet. Resour. Crop Evol. – 2003. – Vol. 50. – P. 291-305.
132. Tarikahya-Hacioglu B. Molecular diversity of the wild *Crambe* (*Brassicaceae*) taxa in Turkey detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). / B. Tarikahya-Hacioglu // Ind. Crops Prod. – 2016. – Vol. 80. – P. 214-219.

133. Marhold K. Polyploidy, hybridization and reticulate evolution: lessons from the *Brassicaceae* / K. Marhold, J. Lihova // Plant Syst. Evol. – 2006. – Vol. 259. – P. 143-174.
134. Warwick S.I. Brassicaceae: chromosome number index and database on CD-Rom / S.I. Warwick, I.A. Al Shehbaz // Plant Syst. Evol. – 2006. – Vol. 259. – P. 237-248.
135. Ільїнська А.П. *Crambe koktebelica* (Junge) N. Busch – Катран коктебельський / А.П. Ільїнська, Я.П. Дідух, В.М. Бровдій // Екофлора України. – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – Т. 5. – С. 148-149.
136. Ільїнська А.П. *Crambe tataria* Sebeok – Катран татарський / А.П. Ільїнська, Я.П. Дідух, В.М. Бровдій // Екофлора України. – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – Т. 5. – С. 156-157.
137. Ільїнська А.П. *Crambe aspera* M. Bieb. – Катран шершавий / А.П. Ільїнська, Я.П. Дідух, В.М. Бровдій // Екофлора України. – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – Т. 5. – С. 152-153.
138. Ільїнська А.П. *Crambe steveniana* Rupr. – Катран стевена / А.П. Ільїнська, Я.П. Дідух, В.М. Бровдій // Екофлора України. – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – Т. 5. – С. 158-159.
139. Ільїнська А.П. *Crambe maritima* L. – Катран морський / А.П. Ільїнська, Я.П. Дідух, В.М. Бровдій // Екофлора України. – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – Т. 5. – С. 150-151.
140. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко // М.: Наука, 1964. – 272 с.
141. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. // К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
142. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры / В.Б. Белокурова, Е.В. Листван, П.Д. Майстров [и др.] // Цитология и генетика. – 2005. – Vol. 39, № 1. – P. 41-51.

143. Г.П. Кушнір. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька // К.: Наук. думка, 2005. – 271 с.
144. DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medical plants / M. Okawa, J. Kinjo, T. Nohara, M. Ono // Biol. Pharm. Bull. – 2001. – Vol. 24, № 10. – P. 1202-1205.
145. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ерамков, В.В. Арасимович, Н.П. Ярош и др. // – Л.: Агропромиздат, 1987. – 143с.
146. Степанченко Н.С. Количественное определение содержания белка / Н.С. Степанченко, Г.В. Новикова, И.Е. Мошков // Физиология растений. – 2011. – Т. 58, №4. – С. 624-230.
147. Garces R. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues / R. Garces, M. Mancha // Anal. Biochem. – 1993. – Vol. 211. – P. 139-143.
148. Lyons J.M. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plant / J.M. Lyons, T.A. Wheaton, H.K. Pratt // Plant Physiol. – 1964. – Vol. 39. – P. 262-268.
149. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин // – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.
150. High-throughput development of simple sequence repeat markers for genetic diversity research in *Crambe abyssinica* / W. Qi, F. Lin, Y. Liu [et al.] // BMC Plant Biol. – 2016. – Vol. 16. – P. 139.
151. Степаненко А.І. Розробка систем молекулярно-генетичних маркерів для детекції якісних ознак у пшениці та ячменю : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : 03.00.20 «Біотехнологія» / Антон Ігорович Степаненко. – Київ, 2015. – 29 с.
152. Stewart C.N. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications / C.N. Stewart, L.E. Via // Bio Techniques. – 1993. – Vol. 14, № 5. – P. 748-749.

153. Genetic polymorphism of some medicinal plants belonging to *Brassicaceae* using molecular markers / R.M.A. Khalil, K.A. Soliman, N.A.K.F. Rashed, S.A. Ibrahim // Egypt. J. Genet. Cytol. – 2010. – Vol. 39. – P. 41-55.
154. Genetic stability of micropropagated plants of *Crambe abyssinica* Hochst using ISSR markers / E.T. Werner, T.C.B. Soares, A.B.P.L. Gontijo [et al.] // Genet. Mol. Res. – 2015. – Vol. 14, № 4. – P. 16450-16460.
155. Brody J.R. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis / J.R. Brody, S.E. Kern // Anal. Biochem. – 2004. – Vol. 333. – P. 1-13.
156. GNU Image Manipulation Program. [Электронный ресурс] – Режим доступа : <http://www.gimp.org/>.
157. GelAnalyzer. [Электронный ресурс] – Режим доступа : <http://www.gelanalyzer.com/index.html>.
158. Perrier X. DARwin software [Электронный ресурс] / X. Perrier, J.P. Jacquemoud-Collet // – 2006. – Режим доступа : <http://darwin.cirad.fr/>.
159. Шмараева А.Н. Рост и развитие *Crambe maritima* L. (сем. *Brassicaceae*) в условиях интродукции в ботаническом саду ЮФУ / А.Н. Шмараева, Ж.Н. Шишлова, В.В. Федяева // Научный журнал КубГАУ. – 2014. – Vol. 96, № 02. – С. 1-14.
160. Михайлова О.А. Особенности онтогенеза *Crambe maritima* L. в условиях *ex situ* / О.А. Михайлова // Ученые записки Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2015. – Т. 1(67), № 2. – С. 105-115.
161. Каліста М.С. Особливості насінневого розмноження та репродуктивна стратегія *Crambe koktebelica* (Junge) N. Busch. / М.С. Каліста, О.Ф. Щербакова // Вісник біосферного заповідника «Асканья-Нова». – 2013. – Т. 2, № 53. – С. 93-101.
162. Hazarika B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants / B.N. Hazarika // Sci. Hortic. – 2006. – Vol. 108. – P. 105-120.
163. Kaviani B. Micropropagation of *Matthiola incana* using BA and IBA / B. Kaviani // Iranian J. Plant Physiol. – 2014. – Vol. 4, № 3. – P. 1071-1078.

164. Sedlák J. *In vitro* establishment and proliferation of red currant cultivars / J. Sedlák, F. Paprštejn. // Hort. Sci. (Prague). – 2012. – Vol. 39, № 1. – P. 21-25.
165. Soni M. Rapid *in vitro* propagation, conservation and analysis of genetic stability of *Viola pilosa* / M. Soni, R. Kaur // Physiol. Mol. Biol. Plants. – 2014. – Vol. 20, № 1. – P. 95-101.
166. Chen W.L. Elimination of *in vitro* contamination, shoot multiplication, and *ex vitro* rooting of *Aglaonema* / W.L. Chen, D.M. Yeh // Hort. Sci. – 2007. – Vol. 42. – P. 3629-3632.
167. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот / Д.А. Лось // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 163-198.
168. *Brassica carinata* – a new molecular farming platform for delivering bio-industrial oil feedstocks: case studies of genetic modifications to improve very long-chain fatty acid and oil content in seeds / D.C. Taylor, K.C. Falk, C.D. Palmer [et al.] // Biofuels. Bioprod. Bioref. – 2010. – Vol. 4, № 5. – P. 538-561.
169. Localization of nervonic acid beta-oxidation in human and rodent peroxisomes: impaired oxidation in Zellweger syndrome and X-linked adrenoleukodystrophy / R. Sandhir, M. Khan, A. Chahal, I. Singh // J. Lipid Res. – 1998. – V. 39, № 11. – P. 2161-2171.
170. Sargent, J.R. Nervonic acid and demyelinating disease / J.R. Sargent, K. Coupland, R. Wilson // Med. Hypoth. – 1994. – Vol. 42, № 4. – P. 237-242.
171. Лось Д.А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений / Д.А. Лось // Вестник РАН. – 2005. – Т. 75, № 4. – С. 338-345.
172. Ильинская Л.И. Продукты липоксигеназного окисления жирных кислот как сигнальные молекулы в индуцированной устойчивости растений (обзор) / Л.И. Ильинская, О.Л. Озерецковская // Прикладная биохимия и микробиология. – 1998. – Т. 34, № 5. – С. 467-479.
173. Параметры антиоксидантной активности соединений: относительная антиоксидантная активность чая / И.П. Анисимович, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека [и

др.] // Научные ведомости. Серия Естественные науки. – 2010. – Т. 9(80), № 11. – С. 104-110.

174. Mirzokhonova G. Synthesis proteins of plants-regenerants of potatoes in process tuberation *in vitro* / G. Mirzokhonova, K. Aliev // Rep. Acad. Sci. Republ. Tadzhikistan. – 2007. – Vol. 2, № 50. – P. 171-176. (In Russian).

175. *In vitro* organogenesis secondary metabolite production and heavy metal analysis in *Swertia chirayita* / V. Kumar, K.S. Singh, R. Bandopadhyay [et al.] // Cent. Eur. J. Biol. – 2014. – Vol. 9. – P. 686-698.

176. Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying / D.K. Hinch, E.M. Hellwege, A.G. Heyer, J.H. Crowe // Eur. J. Biochem. – 2000. – Vol. 267. – P. 535-540.

177. Krasensky J. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks / J. Krasensky, C. Jonak // J. Exp. Bot. – 2012. – Vol. 63. – P. 1593-1608.

178. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells / M.R. Bolouri-Moghaddam, K. Le Roy, L. Xiang [et al.] // FEBS J. – 2010. – Vol. 277. – P. 2022-2037.

179. Effects of a cold treatment of the root system on white clover (*Trifolium repens* L.) morphogenesis and nitrogen reserve accumulation / E. Goulas, F. Le Dily, J. Ozouf, A. Ourry // J. Plant Physiol. – 2003. – Vol. 60. – P. 893-902.

180. Steen E. Carbohydrates in roots and rhizomes of perennial grasses / E. Steen, K. Larsson // New Phytol. – 1986. – Vol. 104. – P. 339-346.

181. Fructan metabolism and changes in fructan composition during cold acclimation in perennial ryegrass / S.W. Abeynayake, T.P. Etzerodt, K. Jonavičienė [et al.] // Front. Plant Sci. – 2015. – Vol. 6. – P. 329.

182. Endogenous hormone concentrations correlate with fructan metabolism throughout the phenological cycle in *Chrysolaena obovata* / A.P. Rigui, M. Gaspar, V.F. Oliveira [et al.] // Ann. Bot. – 2015. – Vol. 115, № 7. – P. 1163-1175.

183. Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor /

A.M. Shohael, M.B. Ali, K.W. Yu [et al.] // Process Biochem. – 2006. – Vol. 41, № 5. – P. 1179–1185.

184. Baskaran P. *In vitro* plant regeneration, phenolic compound production and pharmacological activities of *Coleonema pulchellum* / P. Baskaran, M. Moyo, J. Van Staden // S. Afr. J. Bot. – 2014. – Vol. 90. – P. 74-79.

185. *In vitro* propagation, phytochemical analysis, and evaluation of free radical scavenging property of *Scrophularia kakudensis* Franch tissue extracts / A. Manivannan, P. Soundararajan, Y.G. Park, B.R. Jeong // BioMed Res. Int. – 2015. – Vol. 2015. – P. 480564.

ДОДАТКИ

Додаток 1. Дослідження заходів направлених на збереження рідкісних та зникаючих видів флори України.

Табл. 21. Характеристика видів рослин родини *Brassicaceae*, що охороняються зі складу колекції світової флори *in vitro*.

№	Вид*	Природо-охоронний статус*	Розмноження та розведення у спеціально створених умовах*	Наявність асептичних культур
1	<i>Alyssum borzaeanum</i> Nyár.	Вразливий	Відомостей немає	Рослини, калюсні лінії, ембріогенні культури
2	<i>Alyssum gymnopodium</i> P.Smirn.	Вразливий	Ботанічні сади	Відомостей немає
3	<i>Alyssum savranicum</i> Andrz.	Зникаючий	Відомостей немає	Відомостей немає
4	<i>Biscutella laevigata</i> L.	Рідкісний	Відомостей немає	Рослини, калюсні лінії
5	<i>Brassica taurica</i> Tzvelev	Зникаючий	Ботанічні сади	Відомостей немає
6	<i>Cardamine graeca</i> L.	Вразливий	Ботанічні сади	Відомостей немає
7	<i>Cardamine tenera</i> S.G. Gmelin ex C.A.	Зникаючий	Відомостей немає	Відомостей немає

	Meyer			
8	<i>Cochlearia pyrenaica</i> DC.	Зникаючий	Відомостей немає	Відомостей немає
9	<i>Crambe aspera</i> M. Bieb.	Вразливий	Відомостей немає	Відомостей немає
10	<i>Crambe grandiflora</i> DC.	Вразливий	Відомостей немає	Відомостей немає
11	<i>Crambe koktebelica</i> (Junge) N. Busch	Рідкісний	Відомостей немає	Відомостей немає
12	<i>Crambe maritima</i> L.	Вразливий	Ботанічні сади	Ембріогенні культури, калюсні лінії, рослини
13	<i>Crambe mitridatis</i> Juz.	Вразливий	Відомостей немає	Відомостей немає
14	<i>Crambe pinnatifida</i> W.T.Aiton	Вразливий	Відомостей немає	Відомостей немає
15	<i>Crambe steveniana</i> Rupr.	Вразливий	Ботанічні сади	Відомостей немає
16	<i>Crambe tataria</i> Sebeok	Вразливий	Відомостей немає	Калюсні лінії, рослини
17	<i>Diplotaxis cretacea</i> Kotov	Вразливий	Відомостей немає	Відомостей немає
18	<i>Draba aizoides</i> L.	Зникаючий	Відомостей немає	Відомостей немає
19	<i>Erysimum krynkense</i> Lavrenko	Зникаючий	Відомостей немає	Відомостей немає

20	<i>Erysimum</i> <i>ucranicum</i> J. Gay.	Вразливий	Відомостей немає	Відомостей немає
21	<i>Isatis littoralis</i> Steven ex DC.	Вразливий	Відомостей немає	Відомостей немає
22	<i>Lepidium</i> <i>syvaschicum</i> Kleopow	Вразливий	Відомостей немає	Відомостей немає
23	<i>Lepidium</i> <i>turczaninowii</i> Lipsky	Зникаючий	Відомостей немає	Відомостей немає
24	<i>Lunaria rediviva</i> L.	Неоцінений	Ботанічні сади	Рослини
25	<i>Matthiola</i> <i>fragrans</i> Bunge	Рідкісний	Ботанічні сади	Рослини
26	<i>Raphanus</i> <i>maritimus</i> Sm. s.l.	Вразливий	Відомостей немає	Відомостей немає
27	<i>Schivereckia</i> <i>podolica</i> (Besser) Andr. ex DC.	Неоцінений	Ботанічні сади	Відомостей немає
28	<i>Sobolewsia</i> <i>sibirica</i> (Willd.) P.W.Ball	Рідкісний	Відомостей немає	Відомостей немає
29	<i>Subularia</i> <i>aquatica</i> L.	Зниклий у природі	Відомостей немає	Відомостей немає
30	<i>Syrenia talijevii</i> Klokov	Вразливий	Відомостей немає	Відомостей немає

Примітка: «*» – згідно з даними «Червоної книги України».

Додаток 2. Приклади типових електрофореграм розділення продуктів ампліфікації використаних у дослідженні SSR- та ISSR-маркерних системи.

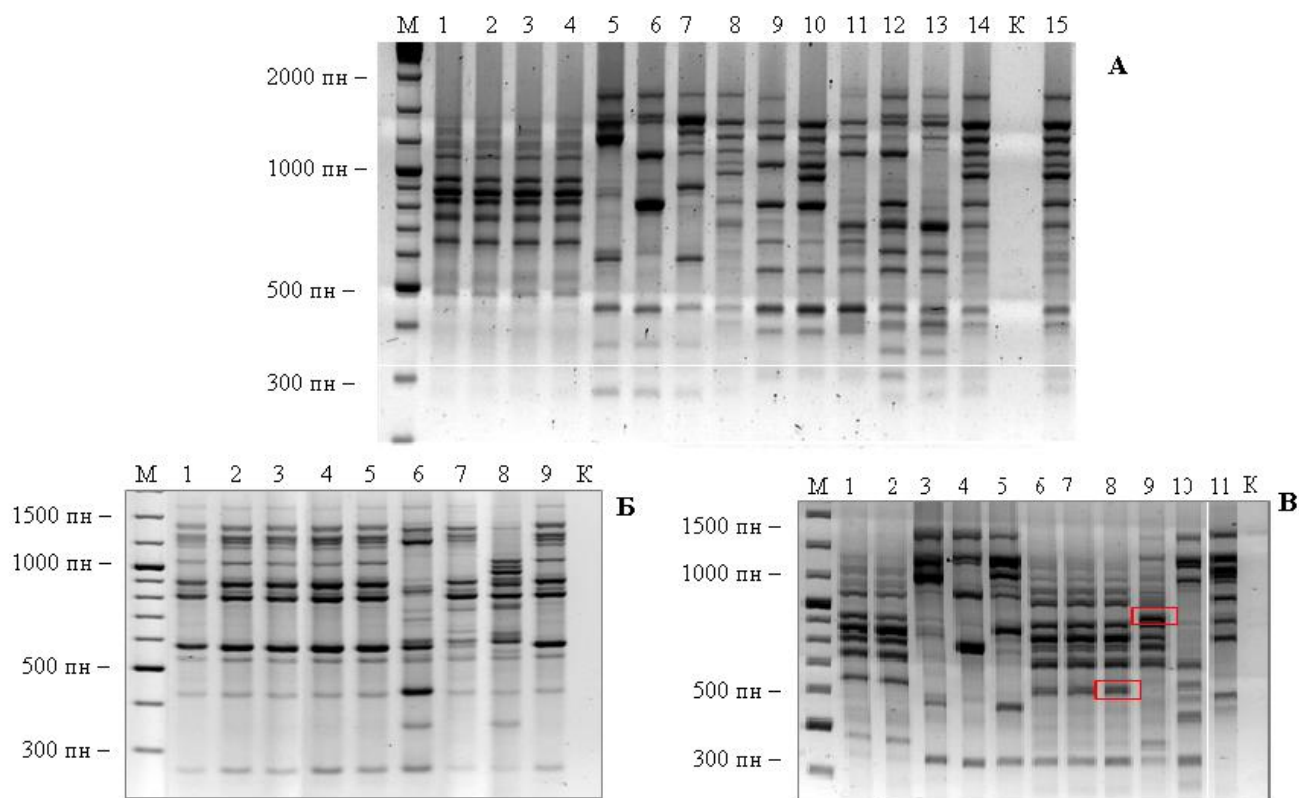


Рис. 44. Типова електрофореграма розділення продуктів ампліфікації однієї з найбільш інформативних ISSR-маркерних системи UBC890:

А – доріжки: 1-4 – *in vitro* зразки *C. tataria*; 5-7 – *in vivo* зразки *C. tataria*; 8, 14-15 – *in vitro* зразки *C. maritima*; 9-13 – *in vivo* зразки *C. maritima*; М – маркер молекулярної маси; К – негативний контроль без внесення ДНК.

Б – доріжки: 1-5, 9 – *in vitro* зразки *C. aspera*; 6-8 – *in vivo* зразки *C. aspera*; М – маркер молекулярної маси; К – негативний контроль без внесення ДНК.

В – доріжки: 1-2 – *in vitro* зразки *C. tataria*; 3-5 – *in vivo* зразки *C. tataria*; 6-9 – *in vitro* зразки *C. steveniana*; 10 – *in vivo* зразок *C. steveniana*; 11 – *in vitro* зразок *C. aspera*; М – маркер молекулярної маси; К – негативний контроль без внесення ДНК.