МОН УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА
(УНУС)

Факультет агрономії
Кафедра рослинництва

Допущено до захисту
„_____” _____ 2023 р.
Зав. кафедри к. с.–г. н., доцент
_____Віталій КРАВЧЕНКО

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
ступеня вищої освіти магістр

РОЗРОБКА Й ОПТИМІЗАЦІЯ ШЛЯХІВ ІНДУКЦІЇ МОРФОГЕНЕЗУ СОРТІВ ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ

Виконав: студент ІІ курсу, групи 26 м-а
Освітньої програми Агрономія
Спеціальності 201 Агрономія
ГУЛЬШАНОВ Данило Зурабович

Керівник: ЯЦЕНКО Вячеслав, доктор філософії,
старший викладач

Умань – 2023

ЗМІСТ

	Перелік умовних позначень	18
	Вступ	19
РОЗДІЛ 1	**БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ОТРИМАННЯ САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ**	25
1.1.	Біологічні особливості троянди ефіроолійної та способи її розмноження	25
1.2.	Біотехнологічні особливості розмноження ефіроолійних і декоративних сортів троянди	28
РОЗДІЛ 2	**ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕННЬ**	57
2.1.	Рослинний матеріал	57
РОЗДІЛ 3	**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**	
3.1	Культивування експлантатів рослин та індукція утворення мікропагонів	61
3.2.	Біохімічні методи дослідження	63
3.3.	Метод математичної апроксимації та регресійний аналіз	67
3.4.	Статистична обробка результатів досліджень	68
РОЗДІЛ 4	**РОЗРОБКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ШЛЯХІВ ІНДУКЦІЇ МОРФОГЕНЕЗУ СОРТІВ ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ**	92
4.1.	Непрямий морфогенез та регенераційна здатність тканин	92
4.2.	Особливості непрямого морфогенезу тканин і органів рослин та формування морфогенних модулів в калюсах	95
4.3.	Прямий морфогенез та власне клональне мікророзмноження	98
4.4.	Вплив складу живильного середовища на процеси перекисного окиснення ліпідів і активність ферментів оксидазного стресу	106
4.5.	Вплив оксикоричних та оксибензойних кислот на морфогенез, синтез фенольних сполук і пластидних пігментів рослин-регенерантів троянди ефіроолійної	108

ВСТУП

Актуальність теми. В Україні троянда ефіроолійна (*Rosa damascena* Mill.) є однією з провідних культур, яку вирощують у промислових масштабах на півдні та в центральній частині України. Потреби в сировині значно перевищують пропозиції виробництва, що пов’язано з поширенням хвороб різної етіології, втратою корисних властивостей, погіршенням фізіологічного стану рослин. Для промислового вирощування основним способом розмноження є живцювання, – насіннєве – практикують в основному для отримання підщеп і створення нових сортів троянди ефіроолійної. Однак, наявні методи розмноження не дозволяють ефективно оздоровити рослини від хвороб та отримати високоякісний садивний матеріал.

Метод клонального мікророзмноження на основі культури ізольованих тканин є найціннішим способом підтримання біорізноманіття колекцій багаторічних рослин (особливо об'єктів, представлених у колекції в єдиному екземплярі або в обмеженій кількості) у зв'язку з тим, що за умов культивування *in vitro* найбільшою мірою забезпечується стабільність генотипів рослин.

Для мікророзмноження рослин троянди метод культури тканин із використанням ізольованих тканин був започаткований у 70–80 рр. минулого століття. Проте до теперішнього часу практично не вивчені питання індукції і проходження етапів органогенезу кожного генотипу рослин. Не визначені кращі підходи щодо відбору ефективних індукторів морфогенезу *in vitro* та не вивчені механізми, які відповідають за оптимальну регенерацію троянди ефіроолійної, вирощування якої має вагоме значення для розвитку багатьох галузей агропромислового комплексу.

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

Мета та завдання дослідження. Метою роботи є розробка принципів цілеспрямованої оптимізації біотехнологічного процесу мікроклонального

розмноження троянди ефіроолійної (*Rosa damascena* Mill) з урахуванням особливостей фізіолого-біохімічних параметрів тканин і органів

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

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

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

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлено фізіологічні, морфологічні, анатомічні та біотехнологічні показники рослинного матеріалу, які дозволяють оптимізувати процес мікроклонального розмноження рослин сортів троянди ефіроолійної.

Особистий внесок – автор особисто провів аналіз наукової вітчизняної та зарубіжної літератури, за темою дипломної роботи, приймав участь у розробці методики досліджень, особисто проводив закладання польових дослідів, спостереження і дослідження в них, аналізував і узагальнював одержані дані.

Обсяг дипломної роботи становить: 64 сторінки друкованого тексту, 10 таблиць, 13 рисунків, 1 додаток, 64 літературних джерела.

РОЗДІЛ 1

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ОТРИМАННЯ САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ

1.1. Біологічні особливості троянди ефіроолійної та способи її розмноження

Троянда (*Rosa* L.) – це рід підродини розові (*Rosaidea* L.) сімейства Розоцвіті (*Rosaceae* L.), який включає близько 400 видів і більше 25 тис. сортів. Більшість з них декоративні і лише деякі використовуються як ефіроолійні. Троянда ефіроолійна один з найцінніших видів роду *Rosa* L., який користується значним попитом завдяки лікувальним властивостям, зокрема наявності в квітах ациклічних монотерпенових спиртів (гераніол, цитронелол, ліналоол, нерол) [1].

Батьківщиною ефіроолійної троянди, як стверджують багато вчених, є Іран. Деякі інші дослідники вважають її батьківщиною Сирію, де вона виростала в околицях міста Дамаска. Звідси і походить її назва – *Damascena* [2]. З Ірану, Сирії троянда була транспортована спочатку до Туреччини, Єгипту, Індії, потім до Болгарії, Іспанії, Франції, Росії та інших країн. Початок промислового обробітку з метою отримання ефірного масла належить до кінця XVII - початку XVIII ст.[3]. Вперше троянду ефіроолійну, як промислову культуру, почали обробляти в Болгарії більше 300 років тому. В основному висаджували одну з найбільш високоолійних форм дамаської троянди, яка пізніше була названа Казанликською (від назви міста). Ця троянда є чудовим прикладом народної селекції в сприятливих умовах її вирощування [4]. До України троянда ефіроолійна завезена в минулому сторіччі. У Криму перші посадки цієї культури були розміщені поблизу Севастополя (1877) і в селі Зуя (1894 г.).

В останні роки відбулося різке зменшення площ під цією культурою. За даними 2012 року в Криму ефіроолійна троянда обробляється на площі близько 70 га.

Троянда ефіроолійна являє собою багаторічний чагарник. Правильно сформована повновікова рослина троянди має зазвичай 6-12 основних гілок (провідників), численну кількість пагонів. У разі загибелі верхівкової бруньки з бічних можуть утворюватися нові пагони - вегетативні або генеративні [5].

У перший рік вегетації до кінця літа кущ дає 6-15 пагонів ростового типу, які зазвичай не гілкуються, не утворюють квітки і складають кістяк або основу куща. На наступний рік у верхній і середній частині цих пагонів утворюються укорочені квіткові гілочки, кожна з яких закінчується суцвіттям. З нижніх бруньок вегетативних гілок виростають ростові пагони. Укорочені плодові гілочки (квітконоси) розвиваються навесні першими. Відростання бруньок, що дають вегетативні гілки, починається пізніше, зазвичай після цвітіння. Основні гілки, що дають прирости, несуть на собі урожай квіток, як правило, протягом 4-6 років, а потім, залежно від умов, втрачають цю здатність, стають малопродуктивними, іноді зовсім засихають і їх необхідно видаляти при обрізанні кущів. Як багаторічний чагарник, троянда може рости на одному місці 20- 30 років. При належному догляді в сприятливих умовах плантацію троянди можна експлуатувати більш тривалий час. Існують посадки троянди (с. Шанів, Болгарія), вік яких перевищує 80 років.

Вміст ефірної олії в квітках значною мірою залежить від їх розвитку і часу збору. Максимальна кількість олії міститься в тільки що розкритих квітках, мінімальна – в нерозкритих бутонах і перезрілих квітках. Найбільш високий вихід ефірної олії з максимальним вмістом терпенових спиртів дають квітки троянди ранкового збору. Денний збір квіток навіть з подальшою їх ферментацією призводить до зниження загального виходу ефірної олії на 30–35 % і зменшення вмісту терпенових спиртів у ньому в три і більше разів [6]. Вміст ефірної олії протягом усього періоду збору квіток не постійний. Зміна цього показника пояснюється тим, що в збір послідовно надходять квітки різних порядків суцвіття – центральні, першого, другого і т. д.. В першу п'ятиденку збір троянди включає зазвичай тільки центральні квіти, в другу – на 82 % квітки першого порядку, в третю - на 75 % квітки другого порядку і в четверту – на 84 % квітки третього

порядку [7]. Ріст надземних органів і кореневої системи троянди відбувається в основному з середини квітня до кінця серпня.

Троянда ефіроолійна – світлолюбива рослина, вибаглива до ґрунту. Вона добре росте на багатих гумусом ґрунтах, що містять всі елементи живлення. Кращими для троянди вважаються наносні грунти річкових долин або глибокі супіщані чорноземи; добре придатні вилужені і середньовилужені суглинні ґрунти, а також темно-бурі гірничо-лісові ґрунти Південного берегу Криму. Ґрунти засолені, заболочені, з близьким рівнем ґрунтових вод (до 1,0–1,5 м), а також малопотужні, глинисті, сильнокарбонатні не придатні для розміщення плантацій троянди [8].

Троянда ефіроолійна вибаглива до вологи, при її недоліку дає слабкий приріст, низький урожай квіток, сильно уражається хворобами і шкідниками.

Незважаючи на багатогранність традиційних способів розмноження для декоративних і ефіроолійних сортів троянди (розмноження діленням куща, відводками, нащадками, гілками, живцями, щепленням та насінням) [9] популярності набирають методи, засновані на культивуванні ізольованих меристем *in vitro* [10]. Загальновідомо, що дані методи відрізняються вищою ефективністю і використовуються для масового розмноження найбільш цінних сортів і гібридів. Мікроклональне розмноження - масове безстатеве розмноження рослин в культурі клітин і тканин, при якому виникають форми рослин генетично ідентичні вихідному зразку [11]. Воно є формою штучного вегетативного розмноження в культурі *in vitro*, основаного на явищі регенерації, що призводить до утворення нових меристематичних тканин [12]. Метод культивування апікальних меристем пагонів квіткових рослин вперше був запропонований Ж. Морелем наприкінці 50-х початку 60-х років. А в середині 70-х років з'явилися дані про ефективне розмноження певних деревних і трав'янистих дводольних і однодольних рослин на основі методів культури тканин. З часом ці методи з одного боку послужили основою ряду напрямів в фізіології рослин, а з іншого - дозволили розробити сучасні технології масового розмноження рослин *in vitro*. Методичною основою клонального мікророзмноження є культивування на

штучних поживних середовищах ізольованих тканин і органів [13].

Відповідно до нормативної документації сировина троянди, яка поставляється на переробку, має бути свіжозібраною, в холодному стані. Квітки повинні бути з розгорнутими зовнішніми пелюстками або повністю розкритими з яскраво-жовтими пильовиками. У сировині троянди не допускається наявність сторонньої вологи, сміттєвої домішки, квіток, що змінили забарвлення в результаті самозігрівання, інших ефіроолійних рослин. Обмежені норми: масова доля сміттєвого домішку – не більше 5 %, домішки даної рослини (бутони, підсушені, перестиглі, зі зміненим забарвленням в результаті самозігріву) – не більше 9%, чашечки без пелюсток, квітконіжки и листки – не більше 5 % [14].

1.2. Біотехнологічні особливості розмноження ефіроолійних і декоративних сортів троянди

Дослідження і досягнення останніх років в області біотехнології рослин продемонстрували високий потенціал тканинних і клітинних технологій для створення вихідного матеріалу, розмноження і генетичного поліпшення рослин [15, 16]. Освоєння методичних основ і оптимізація процесів калюсоутворення і морфогенезу в культурі ізольованих тканин рослин мають важливе прикладне значення для отримання сомаклональних варіантів і створення нового вихідного матеріалу для селекції.

В останнє десятиліття все більше число видів, сортів і гібридів культурних рослин стають об'єктами біотехнологічних досліджень [17, 18]. Зріс інтерес до клітинних і тканинних культур не тільки одно-дворічних трав'янистих рослин, але і багаторічників, представлених чагарниками і деревними формами [19]. Троянда ефіроолійна – багаторічна деревна чагарникова рослина. Ця обставина в значній мірі ускладнює її використання в якості об'єкта культури ізольованих клітин, тканин і органів [20]. Перші спроби здійснити процес культивування експлантатів троянди *in vitro* були

зроблені на початку сімдесятих років [21]. На цьому етапі всі методичні питання вирішувалися емпіричним шляхом. Перш за все, незрозумілим було питання про те, чи можуть в принципі троянди бути введені в культуру *in vitro*, яким вимогам повинні відповідати маточні рослини, якого віку мають бути обрані об'єкти, який склад компонентів живильного середовища необхідний для розвитку ізольованих експлантатів. Дослідники, що працюють в даному напрямку, намагалися знайти відповідь на кожне з питань методом проб і помилок, так як вже перші результати показали, що троянда є об'єктом, який в силу своїх біологічних особливостей важко піддається різним маніпуляціям *in vitro*.

Специфіка об'єкта і складність вирішуваних завдань привели до того, що різні питання культури ізольованих клітин і тканин видів роду *Rosa* L. виявилися вивчені на сьогоднішній день вкрай нерівномірно. Основна частина наявного фактичного матеріалу присвячена проблемам клонального мікророзмноження декоративних і ефіроолійних сортів. Перші роботи в цьому напрямку були виконані в сімдесятих роках [22, 23]. Не зупиняючись детально на отриманих результатах відзначимо, що вони в значній мірі сприяли вирішенню ряду методичних питань, які отримали подальший розвиток у наступних роботах інших авторів [24, 25]. Було показано, що розвиток ізольованих меристем *in vitro* залежить від генотипу рослини-донора, його фізіологічного стану, сезонності і складу живильного середовища. Наступні роботи в цьому напрямку привели до створення ефективних прийомів мікророзмноження і оздоровлення рослин троянди, широко застосовуваних для виробництва посадкового матеріалу [26, 27, 28].

Іншим напрямком використання техніки *in vitro* стосовно троянди є ембріокультура. Ембріокультура є стерильною культуру зиготичних зародків. Культивування ізольованих зародків на штучних поживних середовищах давно використовується для вирішення різних питань теоретичного і прикладного характеру [29]. Перші роботи по культивуванню *in vitro* ізольованих зиготичних зародків покритонасінних рослин були виконані на початку XX століття. Основоположником цього методу є американський вчений Б. Ханнінг [30]. При

використанні даного методу зародок ізолюють з насіння або насіннєвої бруньки і поміщають в штучні умови, які замінять ендосперм (тобто на живильне середовище). Ембріокультура стала традиційним методичним підходом при експериментальних дослідженнях закономірностей ембріогенезу. Разом з тим цей методичний підхід цілком успішно використовується для вирішення різних практичних завдань, що виникають при міжвидовій (міжсортовій) гібридизації [31].

Метод культури ізольованих зародків троянди ефіроолійної почав розроблятися в 80-х роках і був пов'язаний з проблемою низького виходу гібридних рослин при схрещуванні різних видів і сортів [32]. У наступні роки цей метод отримав широкий розвиток і показав свою високу ефективність для отримання гібридних рослин троянди ефіроолійної при різних (більше 30) комбінаціях схрещування [33]. Вдалося показати, що вихід гібридних рослин визначався в значній мірі генотипом батьківських форм і складом живильного середовища. Однак, слід зазначити, що при культивуванні ізольованих зародків троянди генотип батьківських форм був більш лімітуючим фактором, ніж живильне середовище. В результаті експериментальних досліджень були підібрані живильні середовища щодо простого складу, придатні для вирощування ізольованих зародків від більшості комбінацій схрещування, що були використані в селекції [34].

Перші роботи по отриманню калюсної культури троянди ефіроолійної та її використанні були пов'язані з перспективою створення клітинних технологій для отримання ароматичних речовин з біомаси культивованих клітин [35, 36]. Калюсна культура була отримана при використанні в якості експлантатів пелюсток троянди ефіроолійної сортів КриМSька червона і Мічурінка. Було показано, що калюсні клітини зберігали здатність до біосинтезу ефірної олії, склад якої залежав від генотипу рослини-донора і його фізіологічного стану. Подальші дослідження в цьому напрямку показали, що накопичення ефірної олії в калюсних культурах залежало від складу живильного середовища, і в першу чергу, від концентрації і співвідношення регуляторів росту.

Інший аспект використання калюсних культур троянди - отримання рослин-регенерантів і сомаклональних варіантів. Для багатьох декоративних сортів вдалося показати можливість індукованого калюсогенезу при використанні в якості експлантатів листових дисків і стеблових сегментів [37]. Однак ці дослідження не дали можливості вирішити кінцеве завдання – отримання рослин-регенерантів. Даний напрямок роботи для троянди ефіроолійної також представляється перспективним, так як може відкрити нові підходи до створення вихідного матеріалу для селекції. Проте для реалізації цього напрямку необхідним є вирішення цілого ряду методичних питань, що пов'язані із отриманням морфогенних калюсних культур і рослин-регенерантів. Саме ці найбільш важливі питання залишаються не достатньо розробленими як для декоративних, так і для ефіроолійних сортів троянди.

Мікроклональне розмноження є сьогодні одним з найважливіших напрямків біотехнології. Існує декілька основних підходів до розмноження рослин з використанням культури *in vitro*: індукція рослин з апікальних і латеральних меристем, стимуляція пагоноутворення безпосередньо з клітин експлантатів, розмноження через калюсну культуру, використання для розмноження ізольованих протопластів. Однак, найбільш поширеним підходом до вирішення проблеми розмноження різних видів є культура ізольованих меристем [38]. На відміну від інших методів, використання культури меристем дозволяє з високою ефективністю отримувати генетично стабільні рослини, оздоровлені від вірусної, мікоплазменної та грибної інфекції. Ця обставина вигідно відрізняє метод культури меристем від розмноження на основі калюсної культури та культури ізольованих протопластів [39, 40, 41]. Незважаючи на дороговартісність даного процесу, пов'язаного з використанням дорогих реактивів та обладнання, мікроклональне розмноження з використанням культури меристем зберігає статус найбільш пріоритетного, і з економічної точки зору виправданого методу відтворення посадкового матеріалу багаторічних деревних (лікарських, ефіроолійних, квітково-декоративних, харчових) рослин. Це обумовлено тим, що роботи з мікроклонального розмноження можуть

проводитися не залежно від річного циклу, для їх реалізації необхідні обмежені робочі площі, в результаті їх роботи можна отримати високоякісний оздоровлений посадковий матеріал [42]. Метод мікроклонального розмноження на основі культури ізольованих меристем є одним з дуже цінних способів підтримки біорізноманіття колекцій багаторічних рослин (особливо об'єктів, представлених в колекції в одиничному екземплярі або в обмеженій кількості) у зв'язку з тим, що при культивуванні мікроклонів *in vitro* найбільшою мірою забезпечується стабільність генотипів репродуктивних видів рослин [43].

Метод культури тканин для мікророзмноження троянди з використанням ізольованих меристем почав розроблятися в 70 – 80 роках. Перші роботи в цьому напрямку показали, що для культивування меристем велике значення мають оптимальна величина і місце розташування експлантатів на рослини-донорі, а також генотипові особливості рослини-донора [44]. На даному етапі здавалося особливо проблематичним забезпечити приживлюваність хоча б одиничних меристем троянди, тому експериментатори спрощували свої завдання тим, що в якості вихідних експлантатів брали верхівки однорічних пагонів і пазушні бруньки. В якості первинних експлантатів рекомендували використовувати ізольовані апекси розміром 0,3 – 0,6 мм, видалені з латеральних бруньок, однак частіше розташовані на різних частинах пагона стеблові бруньки розміром 2 – 3 мм з ділянкою стебла 10 мм [45]. В окремих дослідах, наприклад на *R. canina* L., досліджували можливість регенерації рослин із зародків і їх фрагментів [46]. Отримані результати показали, що забезпечення необхідних умов для росту і розвитку ізольованих меристем троянди є досить непростимзавданням.

Експерименти, проведені різними дослідниками, виявили залежність приживлюваності і розвитку меристем від генотипу вихідної материнської рослини [47]. Поряд з цим було встановлено, що однією із важливих умов успішної регенерації експлантатів є період ізоляції меристем. Показано, що кращий час для взяття матеріалу і введення його в культуру *in vitro* є період

відновлення вегетації рослин (кінець квітня – травень). Для отримання високого коефіцієнту стерильних життєздатних експлантатів необхідним є правильний добір стерилізуючої речовини, який полягає в тому, щоб ефективно знешкодити патогенну мікрофлору і якомога менше пошкодити рослинні тканини. Стерилізуючий розчин повинен легко вимиватись з тканини дистильованою водою або розкладатись, щоб не отруювати тканину. Для ефективної стерилізації користуються уже відомою технікою стерилізації даного об'єкту або ж розробляють її експериментально для кожного конкретного випадку, оскільки один і той же орган у різних рослин вимагає різних умов стерилізації. В літературних джерелах спостерігається велика кількість запропонованих схем стерилізації рослинного матеріалу, які полягають в тому, щоб поєднувати стерилізуючи речовини один з одними в певній послідовності. Деякі вчені пропонують використовувати пергідроль 20 % – 2 хв, етиловий спирт 70 % – 1 хв та промисловий розчин «Доместос» 2 : 1 – 15 хв. За використання такої схеми дослідники отримали досить високий коефіцієнт стерильних життєздатних експлантатів (72–83 %). Інші автори також пропонують використовувати пергідроль 10 % – 1хв, етиловий спирт 70 % – 20 сек та 5 % гіпохлорид натрію – 5 хв. Поряд з цим зустрічаються роботи, в яких автори використовують більш токсичні ртуть вмісні стерилізатори,такі як сулема 0,1 % та діацид 0,1 % з різним часом експозиції, при цьому теж отримують високий коефіцієнт стерильних життєздатние експлантатів [48].

Одним з основних чинників, що впливають на процес мікроклонального розмноження троянди *in vitro*, є живильне середовище. При мікроклональному розмноженні різних видів і сортів використовують середовища, загальноприйняті в дослідженнях з культури ізольованих тканин: Т. Мурашіге і Ф. Скуга [49], Р. Уайта [50], О. Нічша [51], та інші в різних модифікаціях. Для культивування експлантатів зазвичай використовують як агаризовані, так і рідкі живильні середовища. Останні часто, мають певні переваги перед агаризованими, так як в них забезпечується більша рухливість

трофічних елементів, їх можна частково або повністю змінювати в процесі культивування.

Узагальнення перших робіт із розробки технології мікроклонального розмноження троянди продемонструвало, що найсприятливішим живильним середовищем для видів і сортів є модифіковані середовища Мурашіге, Скуга, які містять в загальноприйнятих концентраціях вуглеводи, вітаміни і синтетичні регулятори росту. При використанні цих модифікацій поживних середовищ було показано, що отримання рослин - регенерантів окремих сортів троянди можливо, але в дуже обмежених кількостях. Разом з тим, вдалося також встановити, що поряд з різними варіантами середовища Мурашіге, Скуга для культивування ізольованих меристем видів роду *Rosa* можна використовувати модифіковані живильні середовища Лу і де Фоссарда, а також Гамборга (Б-5), доповнені тиаміном, піридоксином, нікотиновою кислотою, вітаміном С, інозитолом, сахарозою, БАП та інші регулятори росту залежно від генотипу [53].

Аналіз розвитку ізольованих меристем представників роду *Rosa* L. показав, що для них характерне значне поглинання Ca, Mg, Fe, Mn з середовища культивування [54]. Можливо, це є результатом функціонування специфічних фізіологічних механізмів поглинання, характерних для даних видів рослин. За іншою інфорацією мінеральні складові не надають, ймовірно, вирішального впливу на процеси морфогенезу *in vitro*. Однак, як було показано в роботі M. Khosh-Khui, укорінення меристемних мікропоагонів декоративних сортів троянди краще відбувається на поживних середовищах із зниженою концентрацією мінеральних компонентів [55].

Вуглеводи є необхідним компонентом поживних середовищ для культивування ізольованих тканин і клітин. У багатьох дослідженнях по мікроклональному розмноженню декоративних сортів троянди в якості джерел вуглеводів використовується сахароза [56]. В деяких випадках її замінюють глюкозою. Д. Девіс [57] в дослідах по розмноженню троянди *in vitro* вивчав дію різних концентрацій сахарози (2, 4, 5, 6 і 8 %) на процес морфогенезу.

Було показано, що найбільш сприятливими для проліферації і субкультивування мікропагонів троянди є високі концентрації (3–5 %) сахарози в живильному середовищі. На етапі вкорінення рослин троянди використовували, як правило, більш низькі концентрації сахарози – 2 – 3 %.

Наявні на сьогоднішній день результати дають підставу вважати, що сахароза, як джерело вуглеводного харчування, значно впливає на процес морфогенезу в культурі тканин. Змінюючи рівень сахарози, можна істотно впливати на прояв морфогенетичного ефекту, що викликається екзогенними регуляторами росту [58]. Так, використання високих концентрацій сахарози (3 або 5 %) надавало виражений вплив на розвиток мікропагонів і рослин - регенерантів декоративних сортів троянди. Такі рослини на етапі адаптації до нестерильних умов характеризувалися швидким зростанням, кращою транспірацією, високим вмістом пігментів і крохмалю [59]. Поряд з цим, змінюючи концентрацію сахарози в живильному середовищі можна впливати на фотосинтетичну активність мікропагонів троянди *in vitro* [60].

Вітаміни виявляють вплив на морфогенез *in situ*. Водночас поки немає однозначних даних про стимулюючий вплив різних вітамінів на розвиток ізольованих меристем *in vitro*. Деякі дослідники застосовують середовища, надмірно збагачені різними вітамінами, натомість інші рекомендують виключати зазначені сполуки зі складу живильного середовища. Незважаючи на ці розбіжності, для культивування меристем троянди живильні середовища часто доповнюють тіаміном (B1), рибофлавіном (B2), піридоксином (B6), нікотиновою кислотою (PP), біотином.

В деяких випадках зростання експлантатів, проліферація калюса, диференціація органів поліпшуються в присутності рослинних екстрактів. Однак, невизначеність хімічного складу, і внаслідок цього відсутність стабільного ефекту, перешкоджає їх широкому використанню для клонального мікророзмноження рослин. Суперечливість експериментальних фактів про роль біологічно активних екстрактів в процесі мікророзмноження можна в деякій мірі

пояснити різними морфогенетичними реакціями, що проявляються в умовах *in vitro*.

Присутність вітамінів, рослинних екстрактів, гідролізату казеїну та інших біологічно активних речовин в живильному середовищі, виявляє помітний вплив на індукцію калюсогенезу і регенерацію пагонів і ембріоїдів. В тому випадку, коли розвиток пагонів відбувається за рахунок існуючих пазушних меристем або сформованих бруньок і ембріоїдів, вплив біологічно активних добавок стає несуттєвим, так як пагони здатні синтезувати необхідні для їх життєдіяльності речовини. На думку ряду авторів, вітаміни не відіграють істотної ролі при регенерації рослин в культурі ізольованих меристем більшості видів, у тому числі і видів троянди, так як фотосинтезуючі експлантатати мають здатність до синтезу всіх необхідних вітамінів [61].

Регулятори росту, які відіграють найважливішу роль в індукції поділу в клітинах експлантатів, утворенні калюсу та регуляції морфогенезу, мають вагоме значення і в процесі клонального мікророзмноження рослин. В даний час для розмноження в умовах *in vitro* дослідники застосовують різні регулятори росту: аденін, кінетин, 6-бензіламінопурін (БАП), ізопентеніладенін, тідіазурон, гіберелову кислоту (ГК), β-індоліл-3-масляну кислоту (ІМК), β- індоліл-3-оцтову кислоту (ІОК), α-нафтилоцтову кислоту (НОК) [62].

Згідно з експериментальними даними Е.А. Поповича та ін. [63], БАП стимулював розвиток пазушних бруньок пагонів малини, вишні, сливи, яблуні, також, на думку ряду авторів, від однієї меристеми можна було отримати кілька тисяч рослин на рік. Культивування ізольованих меристем троянди ефіроолійної сорту КриМSька червона (*Rosa gallica*) на живильному середовищі з цитокінінами приводило до формування протягом місяця пагону розміром до 8 мм, з подальшою індукцією пазушних бруньок.

Багатьма дослідниками показано стимулюючу дію БАП на активізацію росту експлантатів і розмноження різних сортів троянди *in vitro*. Були запропоновані різні оптимальні концентрації БАП залежно від генотипу. У ранніх

зарубіжних роботах по клонального мікророзмноженню троянди експериментатори використовували відносно високі концентрації БАП – 2,0 – 3,0 мг/л. Разом з тим було показано, що в процесі культивування пагонів може відбуватися поступове накопичення регуляторів росту в культивованих тканинах вище необхідного фізіологічного рівня і проявлятися їх токсична дія. Використання високих концентрацій цитокінінів з метою отримання максимального коефіцієнта розмноження викликає такі небажані для мікроклонального розмноження ефекти, як зміна морфологіїпагонів, придушення проліферації пазушних меристем, зменшення здатності до вкорінення. Використання живильних середовищ з мінімальною концентрацією цитокінінів, а також чередування циклів культивування на середовищах з високим і низьким рівнем регуляторів росту, допомагає уникнути токсичної дії цитокінінів, обумовленого постійною присутністю їх в живильному середовищі. Дані свідчать, що ініціювання проліферації первинних експлантатів троянди досягалася введенням в живильне середовище низьких концентрацій БАП– 0,2–1,0 мг/л в залежності від сорту.

Концентрація БАП 0,5 мг/л була недостатньою для активації росту і розмноження пагонів декоративних троянд сортів Тетяна, American Pride, Lancome, Burgund, Green Ice, Granate, Coralin. Також показано, що збільшення БАП до 1,0–1,5 мг/л стимулювало процес мікророзмноження у всіх вивчених зразків і приводило до утворення 4 – 6 пагонів на одному субкультивування. Дія підвищених доз БАП, на думку дослідників, сприяло омолоджуванню, що збільшувало швидкість росту і розмноження і покращувало ризогенез рослин. Також було показано, що сортоспецифічні особливості визначають успішність мікророзмноження.

Для підсилення росту на початковій стадії розвитку мікропагонів декоративних сортів троянди рекомендують додавати до живильного середовища гіберелова кислоту в низьких концентраціях 0,1; 0,3; 0,5 мг/л. Проте, для деяких сортів троянди гіберелова кислота мала незначний вплив [64].

РОЗДІЛ 2
ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Рослинний матеріал

У дослідженнях використовували сорти троянди ефіроолійної (*Rosa damascena* Mill.) Лада, Лань, Радуга, які характеризуються високою продуктивністю та рекомендовані для плантаційного розмноження з метою використання у фармацевтичній та харчовій галузях промисловості.

Сорт Радуга. Автори Л. Г. Назаренко та Л. А. Грищенко. За даними конкурсного сортовипробування в середньому за 12 квітозборів (1979–1990 рр.) врожайність квіток становила 33 ц/га. Масова частка ефірного масла від сирої маси квіток – 0,125 %. Збір олії з гектара – 4,12 кг. Переробку квіток сорту Радуга найкраще проводити методом екстракції для отримання трояндового масла-абсолю. Сорт пластичний, швидкоплідний (врожайність квіток на 2-й рік вегетації досягає 30 – 36 ц/га), у разі загибелі від несприятливих умов зимівлі центральної бруньки здатний утворювати генеративні (квіткові) пагони з бічних бруньок. Кущ цього сорту компактний, має високу пагоноутворювальну здатність, придатний для механізованого обрізки куща. Шипуватість пагонів середня. Квітки яскраво-рожеві.

Сорт Лань. Автори – Л. Г. Назаренко та Л. А. Грищенко. В конкурсному випробуванні урожайність квіток цього сорту в середньому за дев'ять квітозборів (1984–1991 рр.) в кореневласні культурі обробітку склав 50,0, в прищепленій – 64,4 ц/га. Масова частка ефірної олії від маси свіжих квіток - 0,118 %. Збір ефірної олії з 1 га – 6,44 кг. Переробку квіток сорту Лань краще проводити методом гідродистиляції. Сорт технологічний. Якщо від несприятливих умов загинули центральні бруньки, з бічних (дочірніх)утворюються, як правило, ростові пагони. Кількість колючок на пагонах невелика – 2–3 шт. на 10 см. Сорт практично стійкий до ураження іржею. Квітки світло- рожеві.

Сорт Лада. Автори Л. Г. Назаренко та Л. А. Грищенко. За даними конкурсного сортовипробування в середньому за 2002 – 2005 рр. врожайність квіток цього сорту склала 53,6 ц/га, масова частка декантинованої олії в свіжих

квітках – 0,032 %, збір декантированої ефірної олії (за болгарською технологією) - 1,76 кг/га. Вміст екстракту в квітках сорту Лада – 0,313 % (стандарт – 0,322 %), збір екстракту з 1 га – 16,3 кг (контроль – 5,86 кг). Переробка квіток можлива як методом гідродистиляції, так і екстракції. Кущ напівзімкнутий, висотою 146 см, діаметром 163 см, добре облиственний, з високою пагоноутворюваною здатністю. Шипуватість пагонів середня (на 10 см довжини пагона 16 шипів). Сорт характеризується високою бутоноутворюваною здатністю (до 500 квіток на кущі); зимостійкий (4,7 бала), здатний утворювати квіткові пагони з бічних бруньок у разі загибелі центральної бруньки, практично стійкий до ураження іржею. Квітки блідо-рожеві.

РОЗДІЛ 3
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Методологія добору рослинного матеріалу

Як рослини-донори використовували типові за фенотипом, не пошкоджені хворобами та шкідниками двохрічні рослини троянди ефіроолійної. Частини однорічних пагонів завдовжки 4−7 см з верхівковими та бічними бруньками відбирали на стадії активної вегетації рослин-донорів та в фенологічній фазі опаду листків. Повторюваність дослідів 3−15-кратна, кількість зразків, використаних у досліді – 10−30 шт.

Для отримання калюсної тканини використовували стерильні листкові пластинки (S=0,40−0,50 см^2) та частини стебел з пазушними бруньками (l=0,5−0,8 см).

Для дослідження регенераційної здатності досліджуваних культур використовували різні типи експлантатів фрагменти стебел з однією брунькою завдовжки 10−15 мм, вегетативні бруньки завдовжки 3−5 мм та апікальні меристеми з листковими примордіями завдовжки 0,3−0,5 мм.

Рослини, клоновані *in vitro* у проблемній науково-дослідній лабораторії фітовірусології та біотехнології, використовували для закладання маточника.

3.2. Спосіб стерилізаціїя рослинного матеріалу

Поверхні органів рослин інфіковані спорами різних мікроорганізмів; внутрішні тканини вважаються стерильними, хоч і в них можуть знаходитись непатогенні бактерії.

Обробка тканин спиртом руйнує восковий шар на листках, посилює дію стерилізуючих речовин. Етиловий спирт використовували для попередньої стерилізації у концентрації 70% (Укрзооветпромпостач, Україна). Для стерилізації рослинного матеріалу використовували 0,1% розчин сулемb ($HgCl_2$) з різним часом експозиції. Після цього фрагменти пагонів відмивали від стерилізуючих

розчинів у стерильній дистильованій воді: після хлормісних розчинів промивання тканини проводили 3 рази впродовж 10 хв, після ртутьвмісних − 4−5 рази впродовж 10−15 хв.

Стерилізацію рослинного матеріалу проводили за наступною схемою:

− експлантататати витримували у мильному розчині 15−20 хв, відмивали у проточній воді 15 хв, ополіскували у дистильованій, занурювали у 70% етиловий спирт на 60 с, стерилізували у розчині стерилізуючої речовини та відмивали від останньої у стерильній воді.

− експлантататати витримували у мильному розчині 15-30 хв, відмивали у проточній воді 15-30 хв, ополіскували у дистильованій, занурювали у 70 % етиловий спирт на 50−60 с, стерилізували у розчині стерилізуючої речовини та відмивали від останньої у стерильній воді.

Простерилізовані частин пагонів переносили на стерильну чашку Петрі з фільтрувальним папером. Стерильними інструментами з пагонів виділяли фрагменти стебел з однією брунькою завдовжки 10−15 мм, які культивували по 1 шт у пробірках. Кількість експлантатів необхідних для досліду становила 15 шт, повторюваність 15-ти кратна. Ефективність стерилізації (%) визначали як відношення асептичних життєздатних експлантатів до загальної кількості введених в умови *in vitro*.

Асептичні умови створювали за методами, загальноприйнятими у біотехнології [63]. Стерилізацію лабораторного посуду, інструментів, матеріалів та живильних середовищ проводили згідно загальноприйнятих методик. Ф. Отримання експлантатів, їх субкультивування проводили в ламінарних боксах марки YLGH-19 (Німеччина).

3.3. Культивування експлантатів рослин та індукція утворення мікропагонів

Регенераційну здатність експлантатів, які вводили в культуру *in vitro* у квітні-травні та серпні-вересні на б/г MS та QL, досліджували у двох варіантах: фрагменти мікропагонів (10−15 мм) та вегетативні бруньки (3−5 мм). Після

отримання мікропагонів *in vitro* із вегетативних бруньок їх культивували згідно з методикою культивування фрагментів мікропагонів.

Культивування здійснювали на базових безгормональних живильних середовищах MS та QL [63] (табл. 2.1.). Послідовність і строки проходження етапів морфогенезу в культурі ізольованих фрагментів мікропагонів *in vitro* троянди ефіроолійної сортів Лань, Лада й Радуга проводили шляхом культивування мікроживців *in vitro* (1,0−1,5 см) на базовому MS, ½MS, ¼MS, QL, ½QL, WPM, DKW та Андерсона із додаванням регуляторів росту ауксинового (0,01−0,5 мг/л ІОК) та цитокінінового (0,1−2,0 мг/л БАП, 0,1−1,0 мг/л ТДЗ) типів дії. До живильних середовищ вносили 100 мг/л мезоінозитолу, 15−30 г/л сахарози та 6,8−6,9 г/л агару. Показник кислотності (pH) середовища доводили до рівня 5,7−5,8.

Фіксування морфометричних показників (довжина мікропагона, кореневої системи, коефіцієнт розмноження) рослин-регенерантів проводили на 28−30-ту добу культивування. Мікропагони вирощували в культуральному посуді по 4−5 шт. Повторюваність досліду 3−10-ти кратна (у кожному досліді використовували 10 шт. експлантатів).

Таблиця 3.1

Компоненти базових живильних середовищ

Компоненти	MS	QL
Макроелементи		
NH_4NO_3	1650,0	400,0
KNO_3	1900,0	1800
$CaCl_2 \times 2H_2O$	440,0	-
$MgSO_4 \times 7H_2O$	370,0	175,8
KH_2PO4	170,0	270,0
$(CaNO_3)_2 \times 4H_2O$	-	833,8
Мікроелементи		
KI	0,83	0,08
H_3BO_3	6,2	6,20
$MnSO_4 \times 4H_2O$	22,3	0,75
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	8,6	8,6
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0,25	-
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,025	0,025
$CoCl_2 \times 6H_2O$	0,025	0,025
$Na_2EDTA \times 2H_2O$	37,3	37,3
$FeSO_4 x \times 7H_2O$	27,8	27,8

Повторюваність досліду трьохразова (у кожному досліді використовували 10 шт. експлантатів).

3.4. Біохімічні методи дослідження

Визначення вмісту фотосинтетичних пігментів

Вміст фотосинтетичних пігментів у листках сортів троянди ефіроолійної визначали на спектрофотометрі Optizen POP (Корея) за загальноприйнятою методикою. Пігменти з фотосинтезуючих тканин рослини екстрагували у ацетоні. Вміст Хл *a* і Хл *b* та каротиноїдів вимірювали за довжиною хвиль (D) 440 та 648 нм. В екстрактах також визначали вміст каротиноїдів (k), які інтенсивно поглинають світло за 440 нм і не поглинають його за 648 нм. Максимум поглинання у червоній ділянці спектру Хл *a* знаходиться за довжиною хвилі 662 нм, а Хл *b* – 644 нм. Для визначення вмісту хлорофілів у рослинах вибирали довжину хвилі, при яких спектри поглинання Хл *a* і Хл *b* перетинаються (перекриваються). Концентрацію (С) пігментів визначали за формулами 2.1, 2.2, 2.3, 2.4:

$$C_a = 9{,}78 \times D_{662} - 0{,}99 \times D_{644}$$

$$C_b = 21{,}43 \times D_{644} - 4{,}65 \times D_{662}$$

$$C_a + C_b = 5{,}13 \times D_{662} + 20{,}44 \times D_{644}$$

$$C_k = 4{,}7 \times D_{440} - (1{,}38 \times D_{662} + 5{,}48 \times D_{644}$$

де C_a – концентрація Хл *a*;

C_b – концентрація Хл *b*;

C_k – концентрація каротиноїдів;

D_{440} – оптична щільність суміші за довжини хвилі 440 нм;

D_{662} – оптична густина екстракту за довжини хвилі 662 нм;

D_{644} – оптична густина екстракту за довжини хвилі 644 нм.

Визначення вмісту поліфенолів

Вміст розчинних поліфенолів визначали за методом Folin Ciocoalteu в модифікації Singleton Rossi, який базується на реакції фенолів з реактивом Фоліна-Чокальтеу. Реактив складається з суміші фосфорно- вольфрамової й фосфорно-молібденової кислот, які відновлюються при окисненні фенолів до суміші оксидів. При цьому розчин набуває блакитного забарвлення, яке пропорційне кількості фенольних речовин, загальний вміст яких оцінювали спектрофотометрично (спектрофотометр Optizen POP (Корея)). Для визначення оптичної густини використовували стандартні кювети. Для проведення експерименту заповнювали пробірки 0,5 мл екстракту, 2,5 мл розведеного реактиву Фоліна-Чокальтеу, через 3 хв додавали 2,5 мл Na_2CO_3. У контрольні пробірки відповідно додавали по 0,5 мл 80 %-го етанолу. Пробірки з сумішшю інтенсивно струшували і залишали на 2 години. Вміст фенольних сполук в екстракті визначали за допомогою калібрувальної кривої, побудованої по галовій кислоті. Далі розраховували вміст внутрішньоклітинних фенольних сполук у зразку за формулою:

$$Ф = (C \times V \text{ екстракту})/(m \times 1000),$$

де Ф – загальний вміст внутрішньоклітинних фенольних сполук, мг/г;

С – концентрація фенольних сполук, л;

V екстракту – загальний об’єм екстракту, мл;

m – маса наважки, г;

1000 – коефіцієнт переведення л в мл (об’єму екстракту) [64].

Визначення вмісту флавоноїдів

Для кількісного визначення суми флавоноїдів у зразках троянди використовували методику спектрофотометричного аналізу. Для цього сухе листя троянди ефіроолійної зважували на електронних вагах і екстрагували етанолом (1 : 10) та проводили вимірювання на спектрофотометрі. Концентрацію визначали за калібрувальною кривою по кверцетину.

Для дослідження хімічного складу метаболітів, що синтезуються в листках і стеблах експлантатів *in vitro* в період посттравматичного стресу використовували три сорти троянди ефіроолійної: Лань, Лада і Радуга. Індивідуальні речовини визначали методом ТШХ на силікагелі G (Sorbfil F254) у двох системах розчинників: 1) хлороформ - оцтова кислота - метанол - вода (60: 32: 12: 8); 2) етилацетат - оцтова кислота - мурашина кислота - вода (100: 11: 11: 26). Для виявлення хімічної природи речовин хроматограми обробляли хромогенними реагентами. Наявність терпеноїдів у зразку на хроматограмі виявляли розчином анісового альдегіду. Наявність кумаринів у метанольних (MeOH) екстрактах визначали за лактонною пробою і якісної реакції на диазотовану сульфанілову кислоту. Загальний вміст фенольних сполук визначали методом спектрофотометрії за використання реактива Фоліна-Чекольтеу. Кількість флавоноїдів визначали за довжиної хвилі λ=419 нм на сканувальному спектрофотометрі Optizen Pop. У якості стандарта використовували кверцетин (Merk, Germany).

3.5. Метод математичної апроксимації та регресійний аналіз

Регресійний аналіз динаміки показників інтенсивності мікроклонального розмноження рослин методом прямого морфогенезу здійснювали із застосуванням спеціалізованого програмного забезпечення Sigma Plot. Для математичного моделювання біотехнологічних процесів використовували логнормальні і логістичні функції. Аналіз розподілу емпіричних даних на нормальність проводили методом Шапіра-Уілка.

Кореляційний та факторний аналіз

Для визначення залежності зміни вмісту фенольних сполук і пігментів у листках троянди ефіроолійної під впливом оксикоричних кислот використовували кореляційний аналіз – метод, що вивчає кількісні характеристики кореляційних зв’язків. Суть кореляційного аналізу полягає у побулові, рішенні й аналізі економіко-математичної моделі у вигляді рівняння зв’язку між результативною та факторною або факторними ознаками: $y= f(x)$ або $y=f(x_1,x_2,...x_n)$ [77].Статистична

обробка результатів досліджень

Статистичне опрацювання експериментальних даних здійснювали з використанням пакету програм MS Excel. У таблицях наведені середні арифметичні значення та їх основні похибки. Результати досліджень представлені у вигляді m±s, де m – середнє арифметичне результатів, одержаних із декількох повторень; s – стандартна похибка.

РОЗДІЛ 4
РОЗРОБКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ШЛЯХІВ ІНДУКЦІЇ МОРФОГЕНЕЗУ СОРТІВ ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ

4.1. Непрямий морфогенез та регенераційна здатність тканин

На перших етапах мікроклонального розмноження на базальній частині експлантатів утворюється щільна калюсна тканина зеленого кольору. Після перенесення цієї тканини на середовище з цитокініновими та ауксиновими регуляторами росту відбувається активне наростання мікророзеток. Тому актуальним було дослідження калюсоутворення з різних частин рослини. Результати експериментів з утворення калюсів може бути використане для селекційних досліджень.

Для ініціації калюсоутворення у рослин троянди ефіроолійної як експлантататати використовували листкові пластинки та частини стебел з пазушними бруньками (рис. 4.1.).

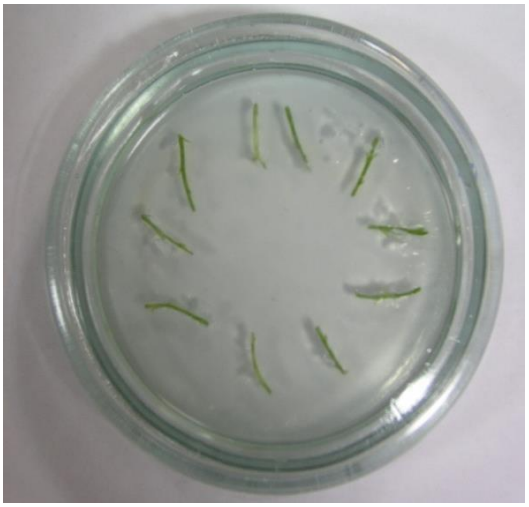


Рис. 4.1. Фрагменти мікропагона троянди ефіроолійної сорту Лада

На живильних середовищах початок калюсогенезу експлантатів троянди ефіроолійної зафіксували на частинах листкової пластинки на 7−9 добу, на мікропагонах − на 10−14 добу культивування. У подальшому калюс субкультивували на живильних середовищах, доповнених різними регуляторами росту (табл. 4.1).

Візуально перші ознаки морфогенезу (зміну забарвлення з світло-жовтого на світло-салатове) у культурі калюсу зафіксували на 2 добу культивування. Морфогенетичний потенціал калюсу значною мірою залежить від гормонального фактору, а саме: вдало підібрані концентрації та співвідношення регуляторів росту повинні забезпечити отримання великої кількості мікропагонів *in vitro*.

Таблиця 4.1

Вплив середовища та концентрації регуляторів росту на культивування калюсної тканини

№ п/п	Морфометричні показники	Склад живильного середовища			
		MS + 0,5 мг/л БАП	QL + 2,0 мг/л БАП +0,1 мг/л ІОК	½MS + 0,150 мг/л ТДЗ +0,05 мг/л НОК	QL + 0,5 мг/л БАП
1	Забарвлення калюсу, 30 доба культивування	світло-жовте	світло-жовте з осередками темно-салатового	салатове з осередками темно-зеленого	салатове з осередками темно-зеленого
2	Консистенція калюсу, 30 доба культивування	рихла	середньої щільності	щільна	щільна
3	Регенерація мікропагонів, шт	-	10-15	5-10	12-25
4	Інтенсивність калюсоутворення,	+	++	+++	++

Примітки: «+» - низька інтенсивність калюсоутворення; «++» - середня інтенсивність калюсоутворення; «+++» - висока інтенсивність калюсоутворення.

Аналіз експериментальних даних свідчить, що використання лише БАП на середовищі MS не привело до отримання морфогенного калюсу. Консистенція залишилася рихлою, забарвлення – світло-жовтим. При культивуванні калюсу на середовищі QL + 0,5 мг/л БАП на 30 добу отримали морфогенний калюс із темно-зеленими зонами, а на 40 добу почали формуватись розетки та мікропагони.

На середовищі з половинним вмістом макро та мікро солей (½ MS), 0,150 мг/л ТДЗ та 0,05 НОК відбувається активне наростання калюсних тканин. Регенерацію мікропагонів фіксували на 45 добу (рис. 4.2)

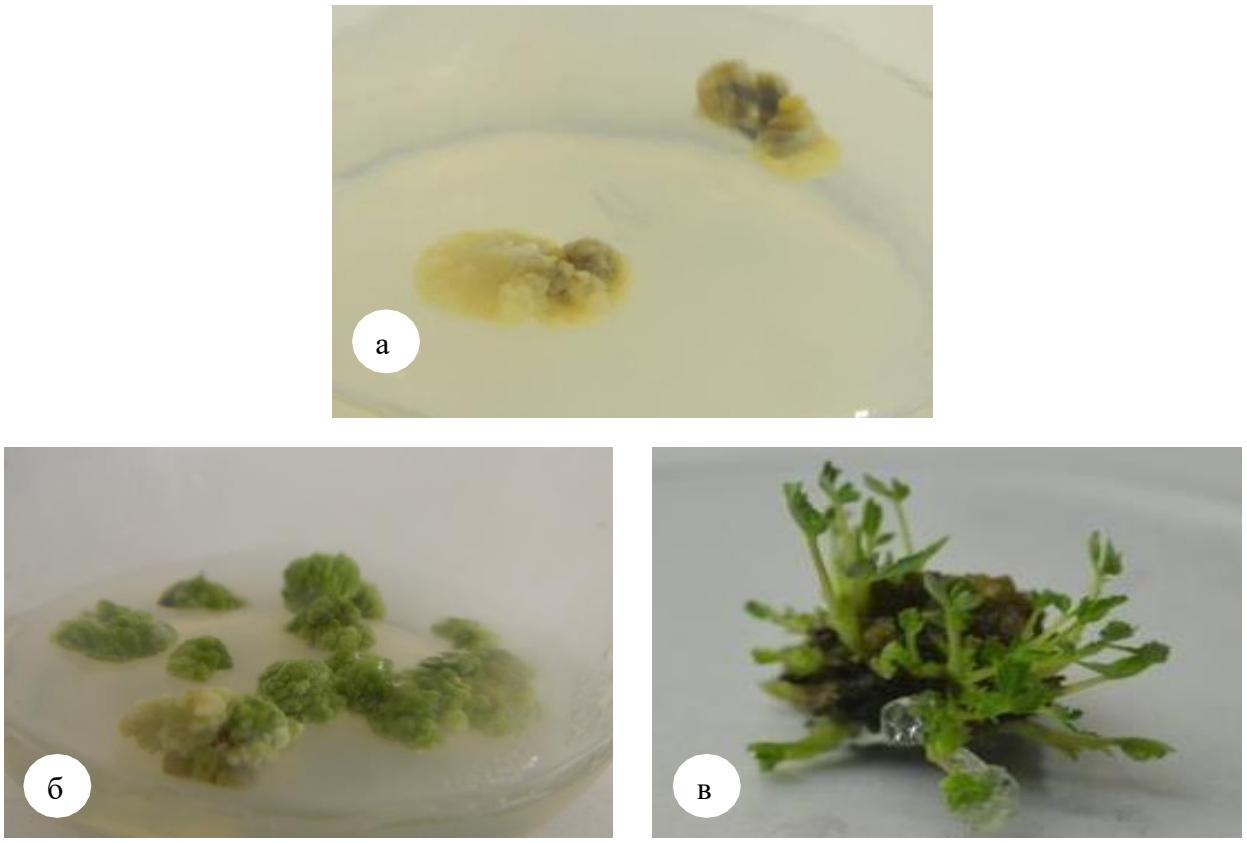


Рис. 4.2. Непрямий морфогенез троянди ефіроолійної: а) початковий етап формування калюсу (середовище MS + БАП (0,5мг/л)); б) морфогенна калюсна тканина твердої консистенції (½MS + 0,150 мг/л ТДЗ + 0,05 мг/л НОК; в) закладання бруньок у калюсній культурі (QL +0,5 мг/л БАП).

Таким чином, для регенерації калюсної тканини у троянди ефіроолійної рекомендовано культивувати листкові пластинки та частини стебел з пазушними бруньками на живильному середовищі QL + 0,5 мг/л БАП. Активне наростання калюсних тканин та регенерація мікропагонів спостерігали на середовищі з додаванням у 2 рази зменшеної мінеральної складової живильного середовища (½ MS), 0,150 мг/л ТДЗ та 0,05 мг/л НОК.

4.2. Особливості непрямого морфогенезу тканин і органів рослин та формування морфогенних модулів у калюсах

Під впливом гормональних стимулів на базальних частинах пагонів експлантатів і на поверхнях листків, що дотикаються до живильного середовища з необхідними для проліферації клітин компонентами, активно утворюються калюсні тканини. На перших етапах формування вони представлені пухкою світло-зеленою масою, яка розпадається на конкременти при механічному навантаженні. Поступово калюсна тканина твердіє і набуває інтенсивного жовто-зеленого забарвлення, яке обумовлено синтезом хлорофілу і каротиноїдів у хлоренхімних клітинах (рис. 4.3).

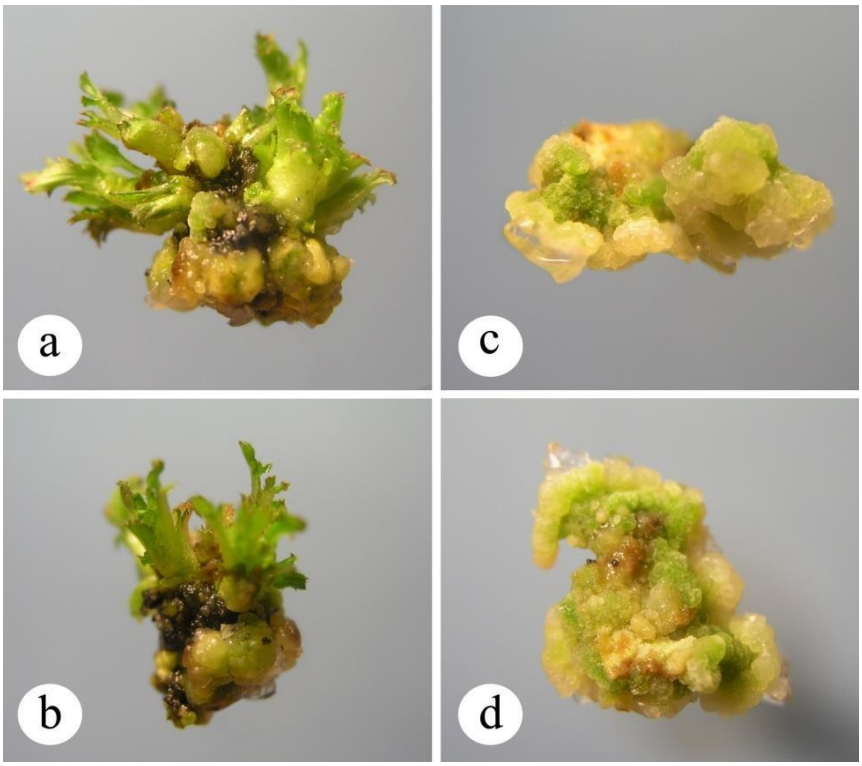


Рис. 4.3. Морфогенний калюс на різних стадіях формування аксіальних структур: a, b – первинні регенеранти на морфогенному калюсі; c, d – формування морфогенних структур у калюсній тканині.

На світлі клітини поверхневого шару калюсу накопичують у вакуолях поліфеноли (елагі- і галотаніни, проантоцианідини, ди- і тримери флаван-3-олів).

За умов доступу кисню вони активно окислюються фенолоксидазами. Через збільшення вмісту окислених продуктів клітини буріють і поступово відмирають.

У більшості досліджених зразків морфогенних калюсів троянди ефіроолійної промеристемні зони, що представлені дрібними клітинами з густою цитоплазмою, знаходились в оточені великих клітин із відкладеннями в клітинних стінках β-(1→3)-глюканів (калози). Калоза – біополімер, що у рослинному організмі виконує захисні і регуляторні функції [17]. Її синтез індукується збільшенням загального пулу іонів кальцію в цитоплазмі рослинних клітин [6], дією еліситорів [9], механічними впливами [67]. Відкладення β-(1→3)-глюканів впливають на симпластний транспорт метаболітів в тканинах і створюють систему бар'єрів, що перешкоджають транслокації патогеннів і переносу високомолекулярних сполук через плазмалему [17]. Біополімер створює в калюсах троянди ефіроолійної передумови для селективного транспорту метаболітів і градієнтного перерозподілу продуктів первинного і вторинного метаболізму.

Меристемоїдні конуси, або модулі та компактні групи промеристемних клітин можуть функціонувати, як центри синтезу регуляторів росту. В оточенні недиференційованих клітин паренхіми відповідні центри поступово формують навколо себе спеціалізовані тканини, ініціюють формування васкулярної системи, поступової диференціації клітин основних запасних, провідних і прокамбіальних тканин, у яких визначаються структурні елементи аксіального органу.

За просторово-структурною організацією морфогенні зони в системі калюсних тканин троянди ефіроолійної представлені меристемоїдами. Потенційно кожен з них здатен утворювати апікальні меристеми з примордіями листків і формувати первинні пагони. Оскільки в таких умовах органогенез відбувається *de novo,* перші метамери з причин відсутності необхідного оточення, біохімічної і просторової невпорядкованості мають ознаки тератогенезу. Перші акти органогенезу завершаються утворенням структур з аномальною будовою. Для них характерна відсутність чіткої мережі провідних пучків, часткова просторова дезорієнтація положення клітин у тканинах. Відповідно порушується

міжклітинний зв'язок і екстра целюлярний сигналінг. Первинні органи мають обмежений ріст, втім вони виконують важливі функції: починаючи активно фотосинтезувати, утворюють необхідні для нормального розвитку гормони і регулятори росту.

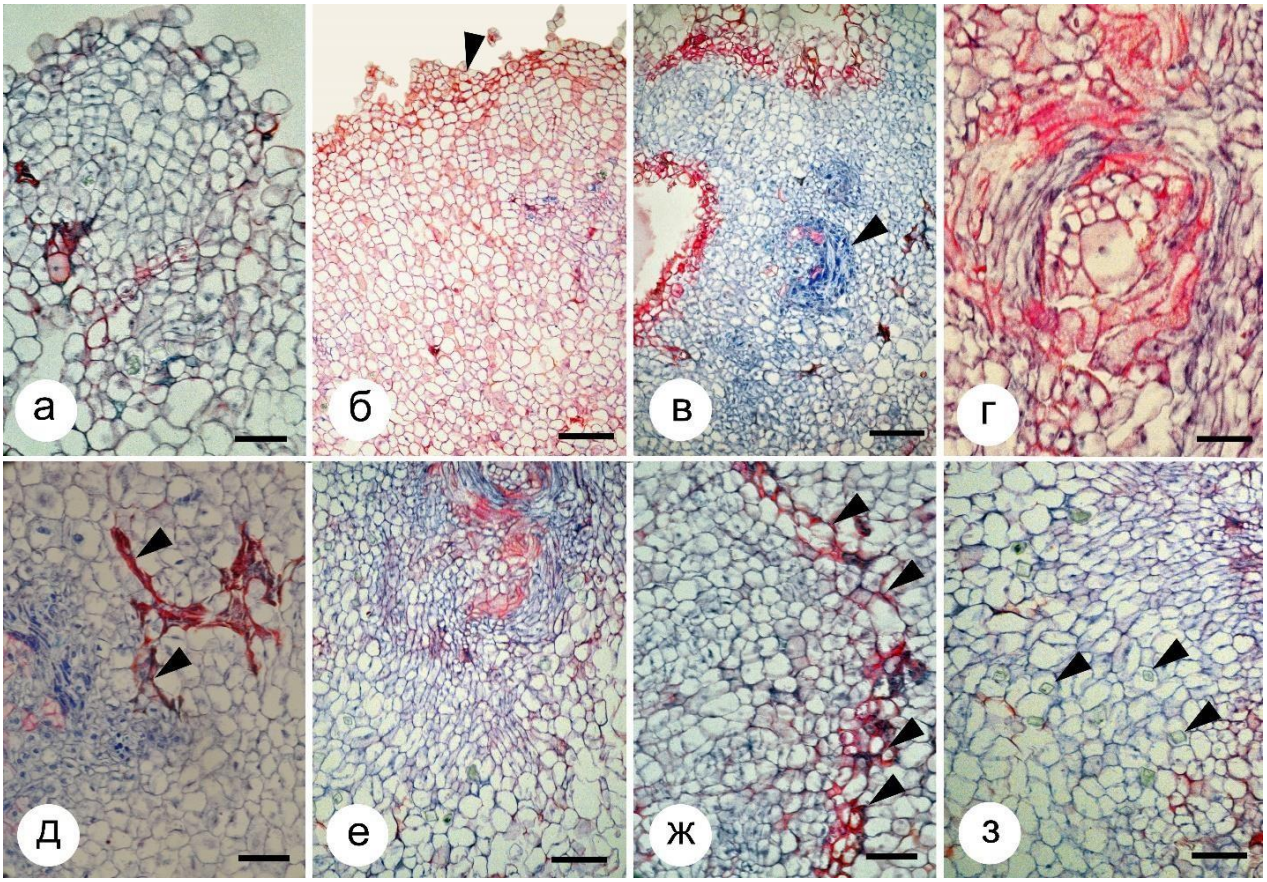


Рис. 4.4. Просторова організація і гістогенез морфогенних структур в калюсах троянди ефіроолійної сорту Лань: а-б – проліферація клітин неморфогенного калюсу; в – утворення промеристемних зон в оточені прошарків клітин з лігніфікованими клітинними стінками; г,е – диференціація клітин з утворенням проваскулярних тканин; д – облітерація клітин паренхіми; ж – формування гістохімічних бар’єрів (показано стрілками), що розділяють паренхіму калюсу на окремі зони; з – відкладення в клітинах калюсу (ідіобластах) крупних призматичних кристалів солей щавлевої кислоти (показано стрілками); лінійка: б,в,е –100 мкм, а,г,д,ж,з – 50 мкм.

Кожен з таких новоутворених модулів зазвичай частково або повністю виокремлений від неморфогенної зони калюсу крупними паренхімними клітинами із розвинутими вторинними клітинними стінками (рис. 4.4, д, ж). Подальша реалізація морфогенного потенціалу даних структур залежить від умов культивування культури, а також від функціональної активності меристемоїдних зон.

Швидкість регенераційних процесів і нормальний розвитку органів у системі калюсних тканин залежить від збалансованості компонентів живильного середовища, співвідношення регуляторів росту і ключових ендоклітинних метаболітів, синтез яких також залежить від інтенсивності і режиму освітлення..

4.3. Прямий морфогенез та власне клональне мікророзмноження

Для масового мікроклонального розмноження троянди ефіроолійної, шляхом методу активації вже існуючих в рослині меристем, використовували живильні середовища MS, QL та WPM із додаванням до їх складу різних груп цитокінінів та ауксинів: 6-БАП, ТДЗ, НОК та ІОК як окремо, так і комбінуючи між собою. Додатково до середовища додавали сахарозу (0,3 %), мезоінозит (100 мг/л) та агар (0,7 %), pH середовища 5,7-5,8.

Експлантатати культивували при освітленні 3-4 тис. лк., t 24±2 ºС, з вологістю повітря 70 % та 16 - годинним фотоперіодом.

Для ефіроолійних культур синтетичний аналог цитокініну ТДЗ в низьких концентраціях більш ефективний в порівнянні з традиційними похідними пуринів. На основі цих даних було проведено дослідження гормонального впливу ТДЗ на ріст та розвиток експлантатів троянди ефіроолійної в культурі *in vitro* на живильному середовищі за прописом MS.

Експлантатати, отримані на безгормональному середовищі MS, розділяли на сегменти, які формували бруньку, одну чи дві листкові пластинки та стебло розміром не більше 1 см. Такі сегменти культивували на живильних середовищах протягом 30 діб (табл. 4.2).

Виявили, що найоптимальнішою концентрацією тідіазурону для множинного пагоноутворення експлантатів троянди ефіроолійної є 0,1 та 0,5 мг/л – 2-8 пагонів на експлантататі, довжиною 10-25 мм (рис. 4.5.). Розетки розвинені, зелені, добре відділяються одна від одної, листки рівномірно сформовані, однорідного зеленого забарвлення. На базальній частині утворюється морфогенний калюс.

Таблиця 4.2

Вплив концентрації ТДЗ на множинне пагоноутворення експлантатів троянди ефіроолійної (сорт Лань)

Живильне середовище	Гормони ТДЗ мг/л	Пагонів на експлантатат, шт.	Довжина пагонів, мм
MS 1	0,1	4-6	10-12
MS 2	0,2	3-4	2-5
MS 3	0,5	2-8	10-25
MS 4	1,0	1-2	5-10
MS 5	2,0	1-3	2-8

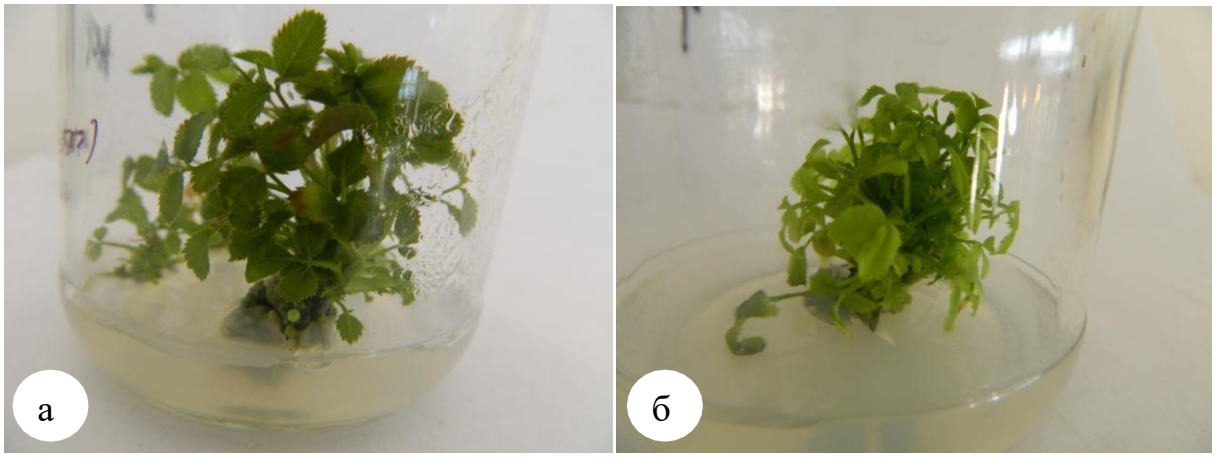


Рис. 4.5. Утворення мікропагонів на експлантататах троянди ефіроолійної на середовищі MS 1 (а) та MS 3 (б) (сорт Лань, 30 доба культивування).

На середовищі MS 1, 4, 5 концентрація ТДЗ 0,2, 1,0, 2,0 мг/л, відповідно, негативно впливала на процес пагоноутворення та зовнішній вигляд

експлантатата (розетки короткі, погано розвинені; листки дрібні, світло-зеленого забарвлення) (рис. 4.6.).

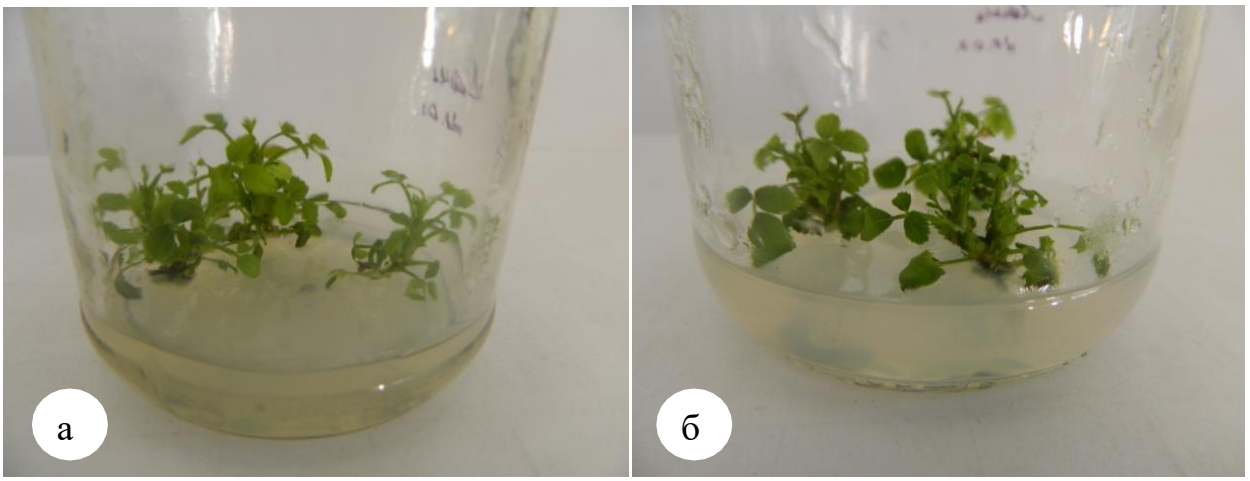


Рис. 4.6. Впливу високих концентрацій ТДЗ на експлантатати в культурі *in vitro* (30 доба культивування): а) MS 4; б) MS 5.

Як основний спосіб розмноження на етапі субкультивування застосовували зняття апікального домінування та індукцію розвитку пазушних бруньок. Для цього середовища, які рекомендують для МКР троянд ефіроолійних, доповнювали цитокінінами та ауксинами та висаджували експлантатати, розміром 1–1,5 см з 1–2 міжвузлями (табл. 4.3). За результатами проведених досліджень встановлено, що у троянди ефіроолійна сорту Лань найкращі морфометричні показники на середовищі MS з додаванням 0,5 мг/л та 1,0 мг/л БАП – на 1-му експлантататі при тривалості культивування 60 діб утворились 4-8 мікропагонів довжиною 2,5 – 5,0 см (рис 4.7). Використання 0,1 мг/л та 0,2 мг/л БАП стимулювало утворення адвентивних бруньок із стеблових експлантатів (з 1-го експлантатату при тривалості культивування 60 діб утворилось від 1 до 4 мікропагонів), але необхідної довжини для перенесення їх на середовище для ризогенезу вони не досягли. Як показано в таблиці 4.3, при додаванні до середовища лише БАП гальмується формування кореневої системи, що узгоджується з результатами інших авторів.

Таблиця 4.3

Вплив концентрацій 6-БАП на регенерацію мікропагонів *in vitro* сортів Лань, Лада, Радуга троянди ефіроолійної (живильне середовище MS, 60 діб в культурі *in vitro*)

Сорт	Морфометричні показники	Концентрація 6-БАП, мг/л						
		0,1	0,2	0,5	1,0	1,5	2,0	4,0
Лань	Довжина стебла, см	2,0-2,5	1,7 - 2,5	2,5 - 5,0	3,0 - 4,5	1,5 - 2,0	3,0 - 4,0	-
	Кількість пагонів з 1 експлантатату, шт.	2-4	1-2	4-8	2-4	1-3	2-5	-
	Наявність кореневої системи	-	-	-	-	-	-	-
Лада	Довжина стебла, см	1,0-2,0	1,0-2,0	1,5-2,5	1,5-2,0	1,0-1,5	0,8-1,0	-
	Кількість пагонів з 1 експлантатату, шт.	1	1-2	1-2	2-3	1-2	1	-
	Наявність кореневої системи	-	-	-	-	-	-	-
Радуга	Довжина стебла, см	1,0-1,5	1,0-1,5	1,0-2,0	1,0-2,0	1,0-1,5	-	-
	Кількість пагонів з 1 експлантатату, шт.	1	1	1-2	1-2	1	-	-
	Наявність кореневої системи	-	-	-	-	-	-	-

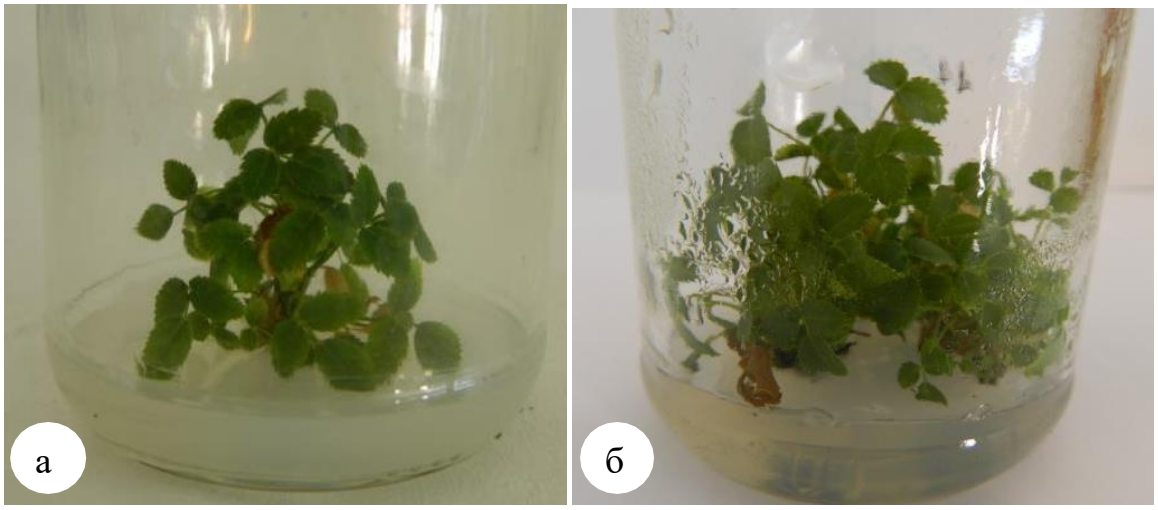


Рис. 4.7. Регенерація мікропагонів троянди ефіроолійної сорту Лань на середовищі: а) MS+БАП (0,5 мг/л) та б) MS+БАП (1,0 мг/л) (60 доба культивування).

Для сортів Лада та Радуга додавання до середовища MS БАП у різних концентраціях гальмує процеси регенерації мікропагонів (рис. 4.8). Концентрація 4 мг/л мала летальний вплив на експлантатати рослин троянди ефіроолійної.

Встановлено, що баланс між ауксинами та цитокінінами має істотний вплив на ефективність протікання процесів морфогенезу в культурі троянди ефіроолійної (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

Вплив регуляторів росту ауксинової і цитокінінової групи на ріст й розвиток *in vitro* троянди ефіроолійної сортів Лань, Лада та Радуга

№ п/п	Морфометричні показники	Склад живильного середовища			
		MS+ 0,5 мг/л БАП +0,1 мг/л ІОК	MS+ 0,1 мг/л БАП +0,5 мг/л ІМК	QL+ 0,5 мг/л БАП +0,1 мг/л ІОК	QL + 0,1 мг/л БАП +0,5 мг/л ІМК
1	2	3	4	5	6
1	Довжина стебла, см	1,5-2,0	0,5-1,0	1,0-2,5	0,5-1,0
2	Кількість міжвузлів, шт	2-3	1	2-3	1
3	Довжина кореневої системи, см	-	-	-	-
4	Наявність калюса у мікропагонів, %	70	-	70	-
5	Інтенсивність калюсоутворення,	++	-	+	-

Примітка: інтенсивність калюсоутворення «+» - низька; «++» - середня; «+++» - висока.

Перевага масової долі цитокінінів над ауксинами (БАП 5: ІОК 1) стимулювало утворення пагонів та їх ріст як на середовищі MS, так і на QL. На базальній частині пагону формується щільний калюс з активними меристематичними зонами. На середовищі, з перевагою масової долі ауксинів над цитокінінами (ІМК 5:БАП 1) відбувається пригнічення ростових процесів, експлантатат втрачає тургор, пагін жовтіє, засихає (рис. 4.8).

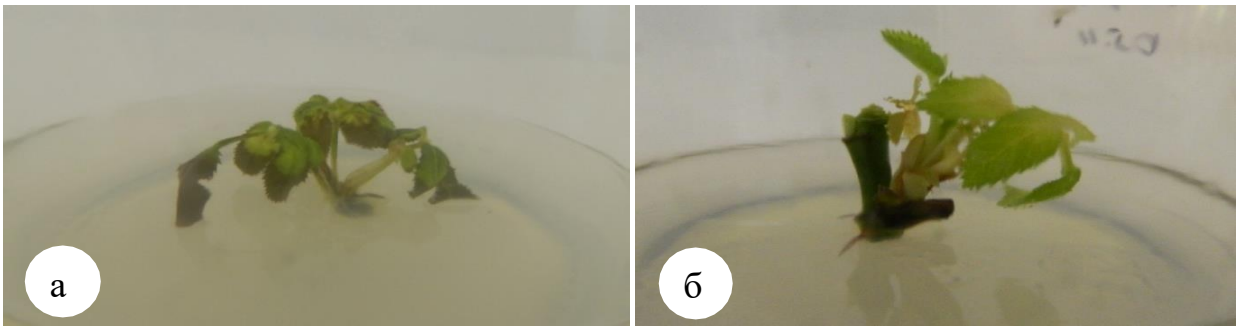


Рис. 4.8. Гальмівнивний вплив високих концентрацій БАП (4 мг/л) на експлантататати троянди ефіроолійної сортів Лада (а) та сорт Радуга (б) (30 доба культивування).

Ефективність регенерації рослин в умовах *in vitro* значною мірою визначається правильним добором мінеральних компонентів живильного середовища, їх концентрацією і співвідношенням [51, 53, 61]. В якості основного способу розмноження на етапі субкультивування застосовували декапітацію пагонів для зняття апікального домінування та індукцію розвитку пазушних бруньок (табл. 4.5.)

Встановлено, що для кожного етапу мікроклонального розмноження сортів троянди ефіроолійної підібрано живильні середовища та необхідні регулятори росту для отримання сформованих рослин – регенерантів (рис. 4.9). За підібраних оптимальних умов рослини субкультивували протягом 8 пасажів.

Для сорту Лань при введенні у культуру *in vitro* необхідно використовувати живильні середовища за прописом MS та QL без додавання регуляторів росту. Для МКР та отримання рослин – регенерантів сорту Лань застосовували MS + 0,5 мг/л БАП,+ 0,01 мг/л ІОК, MS + 0,1 мг/л ТДЗ та QL + 0,5 мг/л БАП. Коефіцієнт розмноження становив 1:8 – 1:14, довжина пагонів від 3,0 до 5,0 см. Для отримання рослин – регенерантів, готових для адаптації до умов *ex situ*, експлантататати необхідно переносити на живильне середовище ½ MS б/г, MS б/г та QL б/г для формування кореневої системи. Тривалість циклу культивування на даних середовищах становить 60 – 80 діб, довжина кореневої системи – 2,5 – 8,0 см відповідно.

Таблиця 4.5

Мікроклональне розмноження сортів троянди ефіроолійної

Варіант	Живильне середовище	Морфометричні показники мікропагонів *in vitro*			Тривалість циклу культивування, діб	Тип мікроклонального розмноження	Призначення живильного середовища
		довжина мікропагона, см,	довжина кореневої системи, см	коефіцієнт розмноження			
Лань							
1	MS б/г QL б/г	1,3÷1,9	–	–	10−15	–	введення експлантатів у культуру *in vitro*
2	MS 0,5 мг/л БАП, 0,01 мг/л ІОК; MS 0,1 мг/л ТДЗ; QL 0,5 мг/л БАП	3,0÷5,0	–	1:8−1:14	80−90	а. р.м. е.[2], п. м.[3]	мкр.[4], отримання р.-р.[5]
3	½ MS б/г; MS б/г; QL б/г	3,0÷6,0	2,5-8,0	–	60-80	п. м.	ризогенез
Радуга							
4	MS 0,5 мг/л БАП	1,5÷2,0	–	–	12−17	–	введення експлантатів у культуру *in vitro*
5	MS 0,1 мг/л ТДЗ; Андерсона з подвійним вмістом Fe-хелату 2,0 мг/л БАП, ½ MS б/г	1,0÷2,0	1,0-1,5	1:2−1:4	50−65	п. м.	мкр.
Лада							
6	MS 1,0 мг/л БАП, ½ MS б/г	1,0÷2,0	–	–	15-20	–	введення експлантатів у культуру *in vitro*
7	Андерсона 0,5 мг/л БАП; QL 2,0 мг/л БАП; WPM 1,5 мг/л БАП, 0,1 мг/лНОК, ½ MS б/г	2,0÷3,5	1,0-2,0	1:2-1:6	80-90	а. р.м. е.	мкр.

Примітки:1. Без гормонів росту (б/г); 2. Активація росту меристем експлантатату (а. р. м. е.); 3. Прямий морфогенез (п. м.); 4. Мікроклональне розмноження (мкр.);5. Рослини-регенеранти (р.-р.).

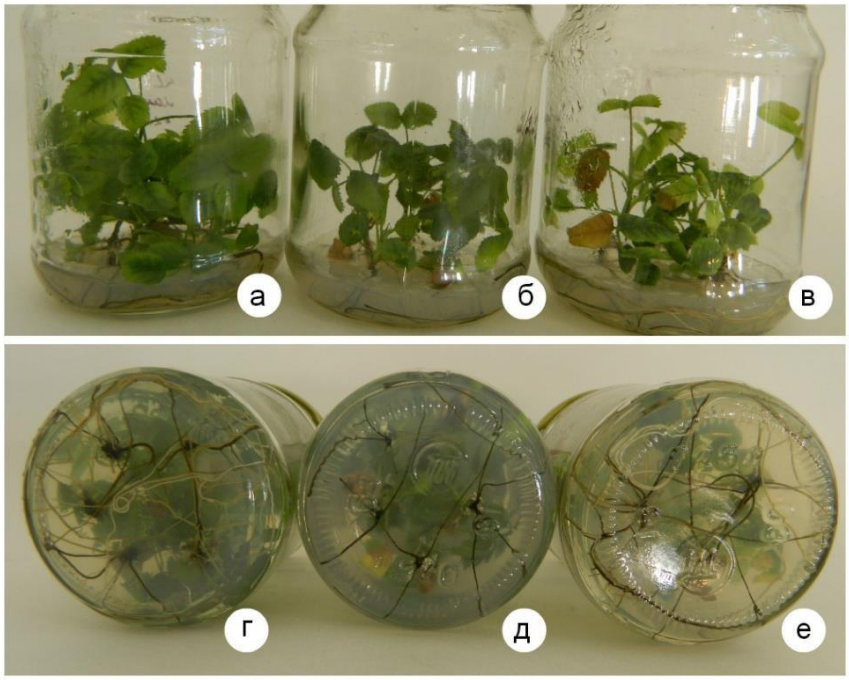


Рис. 4.9. Сформовані рослини – регенеранти троянди ефіроолійної та ризогенез мікропагонів: а,г – сорт Лань (середовище ½ MS б/г, MS б/г та QL б/г); б,д – сорт Лада (середовищі ½MS б/г); в,е – сорт Радуга (середовище ½MS б/г).

Введення в культуру *in vitro* експлантатів сорту Радуга проходило на живильному середовищі MS з додаванням 0,5 мг/л БАП. Для мікроклонального розмноження експлантататати переносили на живильні середовища MS + 0,1 мг/л ТДЗ; Андерсона з подвійним вмістом Fe^{2+} + 2,0 мг/л БАП. За таких умов культивування коефіцієнт розмноження становив 1:2–1:4, довжина пагонів сягала від 1,0 до 2,0 см, коренева система – 1,0–1,5 см. Тривалість циклу культивування 50–65 діб.

Оптимальні показники для сорту Лада при введенні в культуру *in vitro* були відмічені при культивувати на живильному середовищі Андерсона + 0,5 мг/л БАП та MS + 1,0 мг/л БАП. Формування рослин-регенерантів відбувалося на живильних середовищах Андерсона + 0,5 мг/л БАП; QL + 2,0 мг/л БАП; WPM + 1,5 мг/л БАП, + 0,1 мг/л НОК. У сорту Лада найбільш тривалий цикл культивування 80–90 діб. Коренева система формується на середовищі ½ MS б/г, але не достатньо розвинута (2-3 кореня довжиною від 1,0 до 2,0 см), висота

пагонів при цьому становила від 2,0 до 3,5 см. Коефіцієнт розмноження дорівнював 1 : 2–1 : 6.

Використання, як джерела енергії, сахарози у концентрації 20 г/л та 40 г/л у першому випадку не викликало істотних змін, а в другому – призвело до відставання у рості порівняно з контролем. Результати експериментів показали, що використання сахарози у концентрації 30 г/л є найбільш оптимальною, приріст стебла становив на 50 % більше ніж на аналогічному середовищі з додаванням 40 г/л сахарози. Отримані результати дослідження узгоджуються з результатами інших авторів.



Рис. 4.10. Масове клонування *in vitro* рослин-регенерантів троянди ефіроолійної.

Таким чином, нами підібрано оптимальні концентрації мінеральних і вуглеводних складових живильного середовища MS, що забезпечують масове отримання оптимально розвинутих рослин-регенерантів (рис. 4.10)

4.4. Вплив складу живильного середовища на процеси перекисного окиснення ліпідів і активність ферментів оксидазного стресу

Активація перикисного окиснення ліпідів (ПОЛ) супроводжується окислювальною деструкцією ліпідів мембран і накопиченням продуктів окиснення, які є реакційно активними по відношенню до макромолекул клітин.

Гідропероксиди ліпідів здатні взаємодіяти з SH – групами білків, що може змінювати їх просторову структуру, знижувати, або повністю гальмувати активність ферментів. Накопичуючись, пероксиди порушують цілісність мембран, впливаючи на їхню прохідність. У подальшому перетворенні гідро пероксиди перетворюються в альдегіди, які виявляють високо-агресивну реакційну здатність. Малоновий діальдегід може ковалентно зв’язуватись з аміногрупами білків, у тому числі інтегральних. Утворюючи поперечні зшивки малоновий альдегід порушує функцію мембранних білків, що знижує селективні властивості мембран, їх здатність до трансмембранного переносу молекул.

За результатами наших досліджень встановлено, що у різних сортів троянди ефіроолійної у однакових умовах культивування на ризогенному середовищі за прописом Мурашіге і Скуга з половинним вмістом макро і мікро солей без додавання регуляторів росту накопичення в листках тіобарбітурової кислоти має певні сортові відмінності. Найбільший вміст продуктів ПОЛ в листках характерно для сортів троянди Лада, дещо менші для сорту Радуга. Найстабільнішим за даним показником виявився сорт Лань (рис. 4.11). Виявлені особливості складно пояснити лише складом ЖС і умовами культивування. Враховуючи, що досліджувані рослини-регенеранти мають однаковий вік, а листки, що збирали для аналізу мали однакове просторове положення на мікропагонах, то очевидно, що загальний рівень накопичення продуктів ПОЛ є генетично детермінованим і пов'язаним з загальним фізіологічним станом рослин, який залежить від їхньої вибагливості до умов культивування.

За показниками загального антиоксидантного потенціалу, визначений за швидкістю біохімічної трансформації 1,1-дифеніл-2-пікрил-гідрозилу, який є ідеальним акцептором для вільних радикалів, встановлено, що найвищою антиоксидантну активністю мають сорти Лань і Радуга.

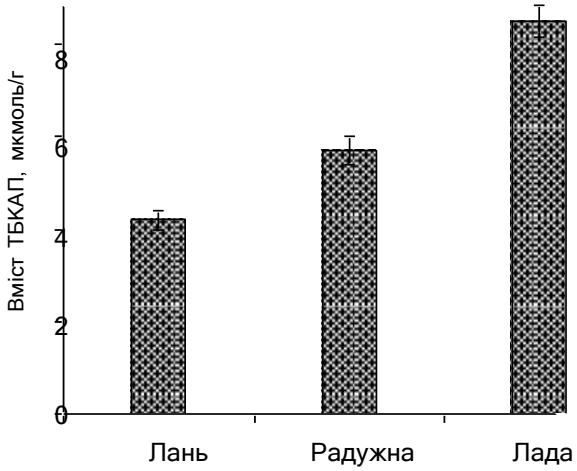


Рис. 4.11. Вміст ТБКАП у листках рослин-регенерантів троянди ефіроолійної на етапі активного пагоноутворення *in vitro* .

Враховуючи, що процес утворення вільних радикалів прискорює процеси старіння організму, можна підійти до обґрунтування маркерних ознак за якими має відбуватись вибраковування рослин перед введенням їх в культуру *in vitro* для масового отримання садивного матеріалу.

Серед індивідуальних сполук листків троянди ефіроолійної, які мають антиоксидантні властивості, є фенольні сполуки, зокрема хлорогенова і ферулова кислоти, а також широкий спектр флавоноїдів, серед яких особливе місце займають глікозиди кемпферолу та кверцетину (в тому числі рутин) [25].

Активність пероксидази у тканинах первинних експлантатів, порівняно з рослинами-донорами на початку введення рослин в культуру *in vitro* збільшувалась у 2,5-3 рази. З часом активність ферменту знижувалась і залежала від загального стану експлантатів. Особливо така тенденція була виражена за ознаками значного ушкодження тканин, виділення у живильне середовище і окиснення фенольних сполук. У пагонів, на яких починався процес активації росту пазушних бруньок пероксидаза зберігала високу активність.

Таким чином, показник активності пероксидази являється важливим фізіологічним маркером життєздатності рослини і виявляє адаптаційний потенціал рослини, що може бути використано при відборі рослин-донорів.

4.5. Вплив оксикоричних та оксибензойний кислот на морфогенез, синтез фенольних сполук і пластидних пігментів рослин-регенерантів троянди ефіроолійної

Фенольні сполуки у рослинному організмі виконують різноманітні функції. В аспекті біотехнології рослин на особливу увагу заслуговують процеси, що пов'язані з регуляцією росту і розвитку рослин, регенерацією тканин та органів *in vitro*. У наших дослідах ми розглянули роль деяких фенольних сполук в регуляції процесів прямого і непрямого морфогенезу троянди ефіроолійної сорту Лада, які б могли регулювати активність ферментів фенілпропаноїдного синтезу.

З часом, у регенераційно здатних експлантатів синтез фенольних сполук занижується, рослини адаптуються до компонентів ЖС і штучно створених умов. Достатня збалансованість рослинного організму, яка зберігається протягом декількох пасажів, дозволяє використовувати генетично однорідний і стабілізований в культурі *in vitro* матеріал для визначення регуляторних функцій деяких оксибензойних і оксикоричних кислот в регенерації тканин і органів троянди ефіроолійної.

Узагальнені результати впливу простих фенольних сполук на морфогенні процеси троянди ефіроолійної в культурі *in vitro* представленов табл. 4.6. За даними таблиці очевидно, що у низьких концентраціях, що співставні, з концентрацією ауксинів і цитокінінів, досліджувані біологічно активні сполуки здатні суттєво впливати на гістогенез і органогенез рослин.

З'ясовано, що майже всі без виключення фенольні кислоти у троянди ефіроолійної індукують калюсогенез. Найбільшу стимуляцію росту показали метильовані кислоти. Ванілінова кислота стимулювала калюсоутворення та пригнічувала гемогенез троянди ефіроолійної. Ріст пагонів в культурі *in vitro* дещо уповільнювався, втім кислота стимулювала калюсогенез на фоні пригнічення ризогенезу. Висока рістстимулююча активність ванілінової кислоти обумовлена наявністю метокси групи у 3 положені (рис. 1.1, а).

Таблиця 4.6

Вплив оксибензойних і оксикоричних кислот (концентрація $1 \cdot 10^{-6}$мМ) на регенерацію рослин троянди ефіроолійної сорту Лань в культурі *in vitro*

Модифікатор	Довжина пагона, мм	Ризогенез	Калюс	Кількість міжвузлів, шт.
Контроль	15-20	+	-	2-4
Ванілінова кислота	8-15	+	+++	1-2
Сирінгова кислота	7-20	-	+	1-3
Галова кислота	7-20	-	+	2-3
р-Кумарова кислота	10-25	-	-	3-4
Кавова кислота	7-15	-	++	1-3
Ферулова кислота	10-15	-	+	2-3

Примітка: інтенсивність калюсоутворення «+» - низька; «++» - середня; «+++» - висока.

Додаткові метоксигрупи в молекулі ванілінової кислоти у 5 положені (4-гідроксі-3,5-диметоксібензойна кислота) сприяли зниженню калюсогенної дії модифікованого ЖС, до складу якого вона входила. При додаванні сирінгової кислоти ефект гальмування процесів закладання міжвузлів і формування пагонів суттєво знижувався. Для сирінгової кислоти характерна здатність інгібіювати альфа – глюкозидази і при високих концентраціях уповільнювати процеси розкладання сахарози на глюкозу і фруктозу, впливати на транспорт і обмін вуглеводів у клітинах і рослинний організм в цілому.

Оксикоричні кислоти також були ідукторами калюсогенезу у пагонів троянди ефіроолійної в зоні їх безпосереднього контакту з ЖС. На рослини-регенеранти троянди ефіроолійної незначну стимулюючу дію на ріст пагонів розтягуванням виявила р-кумарова кислота (рис. 4.12). За умов її додавання до живильного середовища пагони видовжувались на 20-30 % інтенсивніше по відношенню до контролю, збільшувалась також загальна площа листків складного листка.

Ферулова і кавова кислота у концентрації $1 \cdot 10^{-6}$мМ викликала незначну калюсогенну активність і пригнічувала процеси росту пагонів через розтягнення міжвузлів. Збільшення заміщених атомів водню в ароматичному кільці на оксигрупи у формулах оксикоричних кислот створювало передумови для ініціації утворення на базальних частинах експлантатів не морфогенних калюсних тканин. Отже в експерименті були виявлені ефекти, що можуть бути пов'язані з блокуванням екзогенними фенольними кислотами транспорту ауксинів, накопиченням регуляторів росту в нижній частині стебел з подальшою активацією проліферації клітин.

Дослідження пігментного комплексу в листках рослин троянди ефіроолійної на модифікваних ЖС показали, що найбільший вміст хлорофілів було визначено в контролі і ЖС, що містило $1 \cdot 10^{-6}$ М р-кумарової кислоти. Кумарова кислота спричинила підвищення вмісту хлорофілу *a* на 4,6 %. Втім, уміст хлофіла *b* і каротиноїдів залишалися майже незмінними (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

Вплив оксикоричних кислот на вміст пластидних пігментів у листках троянди ефіроолійної *in vitro*

Пігменти та їх співвідношення	К	В	С	Кв	Ф	Г	Км
Хл *a**, мг/г	7,55±0,10	6,99±0,12	6,56±0,12	5,14±0,08	5,94±0,05	5,34±0,06	7,90±0,08
Хл *b*, мг/г	2,97±0,01	2,52±0,06	2,40±0,08	2,02±0,01	2,33±0,03	2,05±0,02	2,93±0,03
Хл (*a+b)*, мг/г	10,52±0,13	9,51±0,14	8,95±0,10	7,16±0,03	8,27±0,09	7,39±0,08	10,83±0,12
a / b	2,54	2,77	2,74	2,54	2,54	2,60	2,70
Кр, мг/г	3,02±0,03	2,68±0,07	2,56±0,02	2,13±0,02	2,37±0,01	2,25±0,02	3,10±0,04
Хл(a+b) / Кр	3,48	3,55	3,50	3,36	3,49	3,28	3,49

Примітки: Хл – хлорофіл, Кр – каротиноїди; К – контроль; В– ванілінова, С – сирінгова, Кв – кавова, Ф – ферулова, Г – галова, Км – р-кумарова кислоти, $p \leq 0,05$

Електроні спектри показали, що за умов додавання до ЖС ферулової кислоти збільшується пік, який відповідає значенню оптичної густини у 417 нм, що пов'язано з активацією синтезу допоміжних пігментів групи ксантофілів (рис. 4.12).

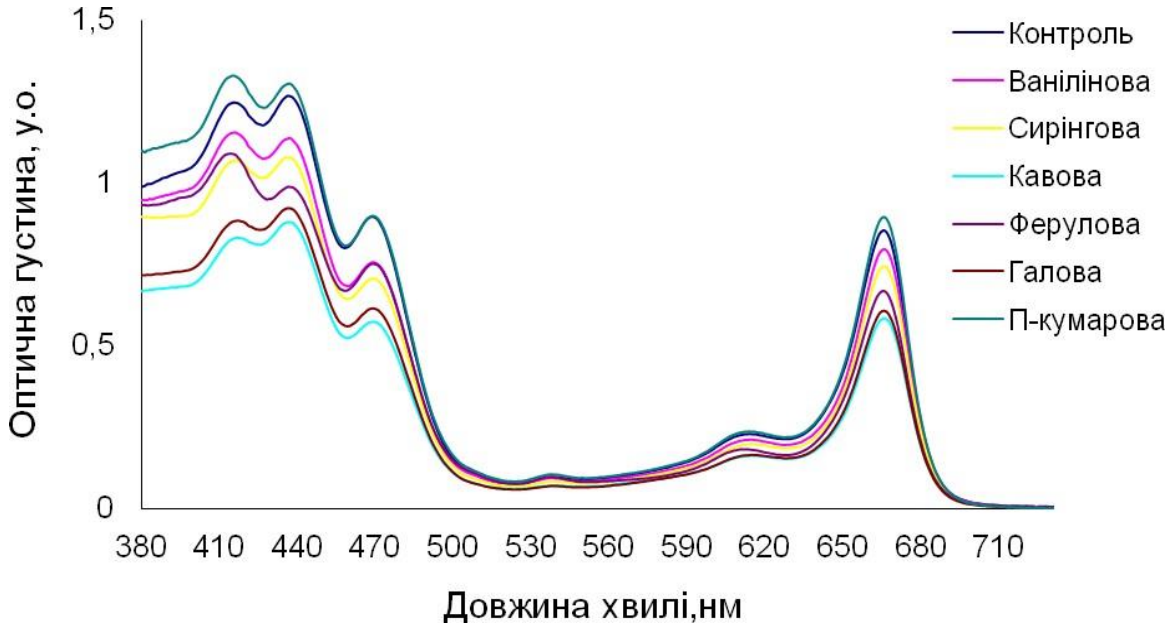


Рис. 4.12. Електронні спектри хлорофілів і каротиноїдів листків троянди ефіроолійної *in vitro* за умов додавання до живильного середовища оксикоричних кислот.

За впливом фенольних кислот на вміст хлорофілів рослини-регенеранти розташувались наступним чином: кавова < галова < ферулова < сирінгова < ванілінова < р-кумарова.

Отже за наявністю 4-окси і 3-метокси груп фенольні кислоти виявляли стимулюючу дію. За умов збільшеня кількості оксигруп (кавова і галова кислота) оксибензойні і оксикоричі кислоти сприяють зниженню суми хлорофілів у листках. Оскільки значна частка фенольних сполук синтезується в хлоропластах і опосередковано пов’язана з процесами фотосинтезу логічним є той факт, що у листках троянди під впливом кавової і галової кислоти виявлено найменшу кількість фенолів, зокрема катехінів і флавоноїдів. Найбільшу стимулювальну дію на фенілпропаноїдний синтез здійснювала ванілінова кислота. Під її впливом порівняно з контролем кількість загальних фенолів у листках збільшувалась 2,0-2,1 рази (табл. 4.8).

Таблиця 4.8

Вплив оксикоричних кислот на вміст фенольних сполук у листках троянди ефіроолійної *in vitro*

Кислота	Фн	Фл	Кт	Фн/Фл	Фн/Кт
Ванілінова	56,8±2,02	31,0±1,9	64,5±1,1	1,83	0,88
Сирінгова	44,5±1,8	28,6±0,9	25,2±0,9	1,55	1,76
Кавова	25,2±1,5	22,1±0,9	11,7±0,3	1,14	2,16
Ферулова	33,9±1,5	29,8±0,5	7,8±0,4	1,14	4,36
Галова	22,5±1,2	23,5±0,3	3,2±0,5	0,96	7,02
р-Кумарова	43,9±1,8	35,6±0,4	23,8±0,7	1,23	1,85
Контроль	27,5±1,9	33,0±1,3	16,5±0,5	0,83	1,67

Примітка: $p \leq 0,05$

Значну перебудову фенольного синтезу в листках викликала галова кислота. Так, на фоні зменшування загального пулу фенолів значно зменшувався показник співвідношення кількості фенолів до катехінів. Враховуючи той факт, що катехіни при окиснювані створюють токсичні сполуки і значно ускладнюють живлення тканин, використання галової кислоти у мМ концентраціях може бути перспективним на перших етапах введення сортів троянди ефіроолійної в умови *in vitro*. За впливом оксикоричних і оксибензойних кислот на вміст фенольних сполук у листках троянди ефіроолійної вони розташовувались наступним чином: галова < кавова < ферулова < р-кумарова < сирінгова < ванілінова; за вмістом катехінів ряд дещо змінюється: галова < ферулова < кавова < р-кумарова < сирінгова < ванілінова. Отже оксибензойні кислоти з однією і двома метоксигрупами стимулюють фенілпропаноїдний синтез, що призводить до нагромадження фенольних сполук у листках і пагонах троянди.

Проведення множинного кореляційного аналізу дозволило встановити певну міру взаємозв’язків між процесами синтезу пластидних пігментів і нагромадження у листках фенольних сполук (табл. 4.9).

Встановлено, що найтісніші зв’язки існують між кількісними показниками вмісту загальних фенолів і катехінів(r=0,89), а також фенолів та співвідношенням суми хлорофілів до каротиноїдів (r=0,99).

Таблиця 4.9

Кореляційна матриця залежності зміни вмісту фенольних сполук і пігментів у листках троянди ефіроолійної під впливом оксикоричних кислот

	Фн*	Фл	Кт	Хл*a*	Хл*b*	Хл *a+b*	a/b	Кр	(a+b) / Кр
Фн*	1,00	0,50	**0,89**	0,57	0,50	0,57	0,75	0,57	**0,99**
Фл	0,50	1,00	0,46	**0,96**	**0,93**	**0,96**	0,14	**0,96**	0,45
Кт	0,89	0,46	1,00	0,61	0,57	0,61	0,64	0,61	**0,85**
Хл*a*	0,57	0,96	0,61	1,00	**0,96**	**1,00**	0,25	1,00	0,50
Хл*b*	0,50	0,93	0,57	0,96	1,00	**0,96**	0,11	**0,96**	0,45
Хл*a+b*	0,57	0,96	0,61	1,00	0,96	1,00	0,25	1,00	0,50
a / b	0,75	0,14	0,64	0,25	0,11	0,25	1,00	0,25	0,72
Кр	0,57	0,96	0,61	1,00	0,96	1,00	0,25	1,00	0,50
(a+b) / Кр	0,99	0,45	0,85	0,50	0,45	0,50	0,72	0,50	1,00

Примітки: Хл – хлорофіл, Кр – каротиноїди; К – контроль; В– ванілінова, С – сирінгова, Кв – кавова, Ф – ферулова, Г – галова, Км – р-кумарова кислоти, $p \leq 0,05$

Останній має певну біологічну обумовленість, яка пов’язана з тим, що підвищення вмісту допоміжних пігментів ксантофілового ряду зазвичай пов’язано з необхідністю створення захисних систем, спрямованих на зниження негативної дії активних форм кисню, радикалів і інших продуктів окиснювального стресу. Оскільки підвищення значення даного показника супроводжується зниженням фотосинтетичної активності, відповідне уповільнення активності фенольного синтезу є її очевидним наслідком. Висока кореляція між вмістом каротиноїдів і флавоноїдів (r=0.96) саме характеризують збалансованість двох регуляторно-захисних систем, спільні функції яких полягають у зменшені шкодочинної дії продуктів окиснювального стресу на мембрани та інші важливі компоненти клітин. Для троянди ефіроолійної також характерний тісний позитивний взаємозв’язок між кількісними показниками каротиноїдів і вмістом хлорофілу *b* (r=0,96) і сумою хлорофілів (r=1,00). Даний факт підтверджує здатність оксикоричних і оксибензойних кислот здійснювати відчутний вплив на важливі ланки метаболізму рослини. За даними факторного аналізу було з’ясовано, що оксикоричні кислоти мають певні особливості, що пов’язані з наявністю в структурі молекули окси- і метоксигруп, і займають у площині двох факторів відповідне розташування (рис. 4.13).

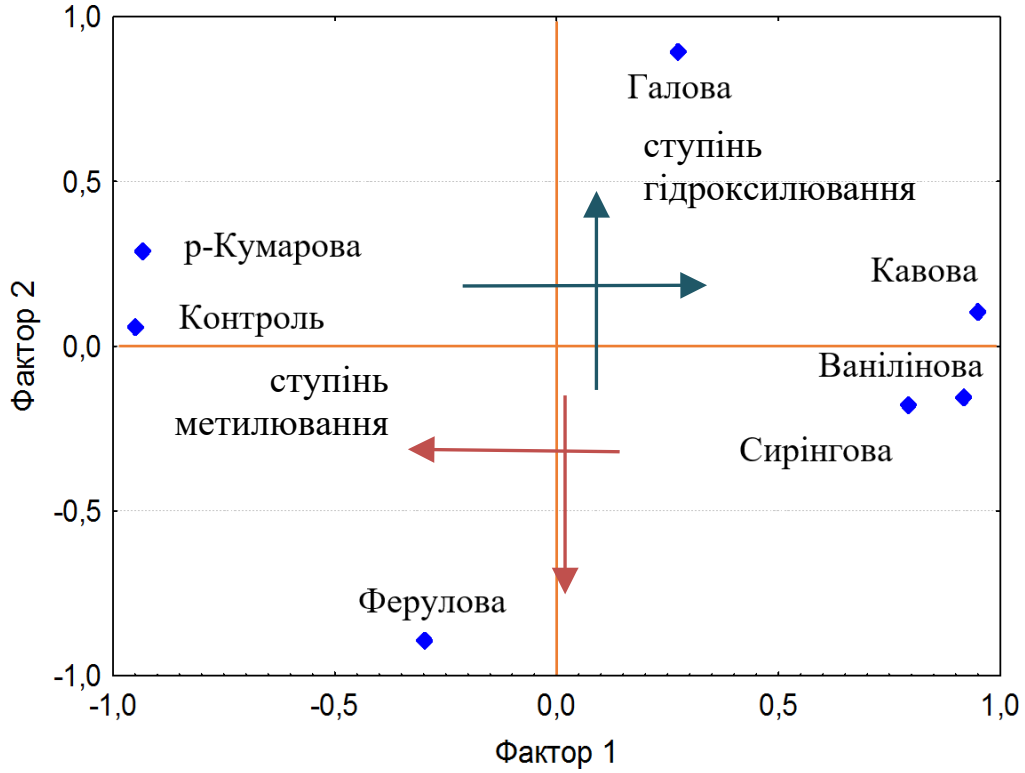


Рис. 4.13. Результати факторного аналізу впливу оксикоричних кислот на синтез фенольних сполук і пластидних пігментів у листках троянди ефіроолійної *in vitro.*

Підвищення кількості гідроксильних груп в молекулах сприяє уповільненню синтезу загальних фенолів і катехінів (галова кислота). Наявність однієї – двох метоксигруп в структурі бензольного кільця надає оксибензойним кислотам властивості активізувати фенілпропаноїдний синтез (ванілінова, сирінгова). Наявність заміщуувачів в структурі оксикоричних кислоти послаблюють їх потенційний вплив на синтез фенольних сполук в листках.

Висновки до четвертого розділу:

1. Для регенерації калюсної тканини у троянди ефіроолійної рекомендовано культивувати листкові пластинки та частини стебел з пазушними бруньками на живильному середовищі QL + 0,5 мг/л БАП.

2. Морфогенні зони в системі калюсних тканин троянди ефіроолійної представлені меристемоїдами. На початкових стадіях гемогенез завершується

утворенням структур з аномальною будовою, для яких характерна відсутність чіткої мережі провідних пучків та атипова просторова орієнтація клітин у тканинах.

3. Найоптимальнішою концентрацією тідіазурону для множинного пагоноутворення експлантатів троянди ефіроолійної є 0,1 та 0,5 мг/л – 2-8 пагонів на експлантататі, довжиною 10-25 мм.

4. Для МКР та отримання рослин – регенерантів сорту Лань застосовували MS

+ 0,5 мг/л БАП,+ 0,01 мг/л ІОК, MS + 0,1 мг/л ТДЗ та QL + 0,5 мг/л БАП. Коефіцієнт розмноження становив 1:8 – 1:14, довжина пагонів від 3,0 до 5,0 см. На живильному середовищі ½MS б/г, MS б/г та QL б/г відбувалося формування кореневої системи. Тривалість циклу культивування на даних середовищах становить 60 – 80 діб, довжина кореневої системи – 2,5 – 8,0 см відповідно.

5. Для МКР сорту Радуга експлантататати переносили на живильні середовища MS + 0,1 мг/л ТДЗ; Андерсона з подвійним вмістом Fe-хелату + 2,0 мг/л БАП. За таких умов культивування коефіцієнт розмноження становив 1:3 – 1:7, довжина пагонів сягала від 1,0 до 2,0 см, коренева система – 1,0 – 1,5 см. Тривалість циклу культивування 50- 65 діб.

6. Для МКР сорту Лада рекомендовано використовувати наступні живильні середовища: Андерсона + 0,5 мг/л БАП; QL + 2,0 мг/л БАП; WPM + 1,5 мг/л БАП,

+ 0,1 мг/л НОК. У сорту Лада найбільш тривалий цикл культивування 80 – 90 діб. Коренева система формується на середовищі ½MS б/г, але розвинута погано (2-3 кореня довжиною від 1,0 до 2,0 см), висота пагонів при цьому становила від 2,0 до3,5 см. Коефіцієнт розмноження дорівнював 1:2 – 1:4.

7. За показниками загального антиоксидантного потенціалу було встановлено, що найвищою антиоксидантною активністю мали сорти Лань і Радуга.

8. Серед індивідуальних сполук, що містяться у листках троянди ефіроолійної і володіють антиоксидантними властивостями є фенольні сполуки, зокрема хлорогенова і ферулова кислоти, а також широкий спектр флавоноїдів, серед яких особливе місце займають глікозиди кемпферолу і кверцетину.

9. Серед оксикоричних і оксибензойних кислот, які були використані у дослідженнях, найбільшу стимулювальну дію на фенілпропаноїдний синтез здійснювала ванілінова кислота. Під її впливом порівняно з контролем кількість загальних фенолів у листках збільшувалась 2,0-2,1 рази.

10. Підвищення кількості гідроксильних груп в молекулах сприяє уповільненню синтезу загальних фенолів і катехінів (галова кислота). Наявність однієї – двох метоксигруп в структурі бензольного кільця надає оксибензойним кислотам властивості активізувати фенілпропаноїдний синтез.

РОЗДІЛ 5
ОРГАНІЗАЦІЯ УМОВ ОХОРОНИ ПРАЦІ ТА УМОВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА \

5.1. Виробничі фактори виробництва калюсних культур, що впливають на навколишнє середовище

Проблема профілактики негативного впливу біологічних чинників виробничого середовища на організм людини та навколішнє природньо середовище набуває все актуальнішого соціально-гігієнічного й медико-біологічного значення.

При виробництві калюсних культур споживається велика кількість води та повітря, які забруднюються мікроорганізмом-продуцентом, органічними та мінеральними речовинами. Склад стічних вод та відпрацьованого повітря дуже складний.

У процесі виробництва калюсних культур робітники підпадають під вплив таких виробничих чинників, як мікроклімат та біологічний фактор, до якого належить багатокомпонентний органічний пил, що включає умовно-патогенну мікрофлору.

Мікроорганізми зазвичай не вважаються патогенними для людини, проте інколи здатні викликати отруєння їжі токсинами. Їх спори здатні виживати при значному та тривалому нагріванні, тому не вмирають при звичайних методах приготування їжі. При проростанні спор при зберіганні продуктів, ці бактерії викликають утворення слизкого шару на поверхні продуктів, за що відповідають довгі полісахариди, які вони секретують. При неправильному поводженні в лабораторії з даними мікроорганізмами можливе виникнення отруєння працівників.

У повітрі ці бактерії знаходяться у вигляді спор завдяки їхньому пасивному та активному розсіюванню, причому їхня кількість залежить від багатьох факторів. Вивчення мікобіоти повітря має важливе санітарно-гігієнічне та фітопатологічне значення. Підвищена кількість бактерій у повітрі виробничих приміщень під час виробництва калюсних культур негативно

впливає на здоров’я персоналу. Потрапляючи в легені при диханні, спори можуть осідати на слизових оболонках та уражувати їх внаслідок заселення та виділення токсичних речовин. Ступінь ураження та клінічні прояви захворювання залежать від кількості спор у повітрі, чутливості та імунного статусу організму.

За даними літератури, вплив на здоров’я працюючих здійснюють не лише спори/клітини бактерій, але й клітинні фрагменти, яким досі приділяють мало уваги. Доведено, що дрібні частинки (менше 2,5 мкм) чітко зумовлюють побічні ефекти на здоров’я людей. Встановлено, що значна кількість імунологічно активних часток мають розміри суттєво менші, ніж спори, що виділяються з поверхонь, забруднених грибами. Дуже маленькі частинки (0,3 мкм) кількісно перевищували кількість спор більш ніж у 320 разів. Проблема розпізнавання таких часток полягає в тому, що дрібні й дуже дрібні клітинні фрагменти неможливо виявити традиційними методами дослідження зразків біоаерозолів. Проте попередніми знахідками фрагментів міцелія (великі фрагменти, що виявляються при світловій мікроскопії) підтверджена така можливість.

Показано, що концентрація фрагментів бактерій у повітрі приміщень досягає рівня від 29 до 146 частинок у 1 м3, тобто до 6,3 % усіх елементів. Бельгійські вчені повідомили, що частинки бактерійя часто відриваються від забруднених поверхонь і деякі з цих фрагментів залишаються життєздатними і можуть проростати.

Бактеріальні клітини можуть викликати захворювання алергенного характеру. У осіб з серйозними імунодефіцитними станами може бути пряма інфекція. Основним шляхом потрапляння бактерій та їх спор в організм є шлунково-кишковий тракт та органи дихання.

5.2. Методи очистки стічних вод при виробництві калюсних культур

З метою уникнення забруднень навколишнього середовища необхідно очищати стічні води виробництва калюсних культур.

1. Механічні методи усунення забруднень

Суть механічного методу полягає в тому, що із стічних вод видаляють механічні домішки (нерозчинні). Механічне очищення дозволяє видаляти з стічних вод до 60–75 % нерозчинних домішок. Цей метод очистки стічних вод є найбільш дешевим.

Спорудження для механічної очистки стічних вод: решітки (або УФС – установка фільтрувальна самоочищаюча) і сита; пісколовки; первинні відтстійники; мембранні елементи [20].

Для затримання великих частинок органічного і неорганічного походження застосовують решітки і сита. Максимальна ширина складає 16 мм. Далі стоки проходять через пісколовки, де відбувається осадження дрібних частинок під дією сили тяжіння і жироловки, за допомогою якої відбувається видалення з поверхні води гідрофобних речовин шляхом флотації.

Для звільнення стічних вод від дуже маленьких частинок застосовують фільтрування шляхом пропускання через шар зернистого матеріалу. Досить поширеними є мембранні фільтри. Після такої очистки стічні води направляють на первинні відстійники для видалення зважених частинок, здебільшого органічного походження. Як показали дослідження, в осад випадає більше 80 % зважених речовин. Зниження БСК складає 20–30 %.

Так, кору видаляють зі стічних вод за допомогою барабанних і сітчастих фільтрів. Волокна фільтрують через сітчасті фільтри з подальшим відстоюванням в горизонтальних або вертикальних відстійниках.

Механічну очистку як самостійний метод застосовують тоді, коли освітлена вода після цього способу очистки може бути використана в технологічних процесах виробництва і спущена у водойми без порушення їх екологічного стану. У всіх інших випадках механічна очистка слугує першим етапом очистки стічних вод.

2. Фізико-хімічні методи усунення забруднень

Фізико-хімічна очистка полягає в тому, що в стічні води вводять речовину-реагент (коагулянт чи флокулянт). Вступаючи в хімічну реакцію з

домішками, які знаходиться у воді, ця речовина сприяє повному видаленню нерозчинних домішок, колоїдів і частини розчинних з'єднань. При цьому

зменшується концентрація шкідливих речовин в стічних водах, розчинні з'єднання переходять в нерозчинні чи розчинні, але не шкідливі, змінюється реакція стічних вод (відбувається їх нейтралізація) тощо. В залежності від необхідного ступеня очистки стічних вод фізико-хімічна очистка може бути завершальною чи другою стадією перед біологічною.

Найчастіше з фізико-хімічних методів застосовуються коагуляція, окислення, сорбція, екстракція і т.д.

3. Біологічні методи усунення забруднень

Серед методів очищення стічних вод велику роль відіграє біологічний метод, заснований на використанні закономірностей біохімічного і фізіологічного самоочищення річок й інших водоймищ.

Біологічна очистка передбачає деградацію органічних речовин стічних вод мікроорганізмами (бактеріями і найпростішими). На даному етапі відбувається мінералізація стічних вод, видалення органічного азоту і фосфору, головною метою є зниження БСК5. Можуть використовуватися як аеробні, так і анаеробні організми.

Очищення стоків з високою концентрацією забруднюючих речовин краще використовувати анаеробний метод очистки. Перевагою цього методу в порівнянні з аеробним є отримання енергетично цінного біопалива. Також, слід відзначити, що анаеробний процес здійснюється при невеликих потребах в електроенергії, не потребує додаткових поживних речовин в процесі ферментації, майже не вимагає технологічного обслуговування, відсутність запаху, оскільки реактор закритий.

Інтенсивність процесу очистки стічних вод в тій чи іншій установці визначається окислювальною потужністю установки, під якою розуміють число грамів кисню, який отримують з 1 м3 установки за добу і використовують для зниження біологічної потреби в кисні стічних вод, окислення амонійних солей до нітритів і нітратів, а також для підвищення вмісту в стічних водах розчинного кисню. Окислювальна потужність для різних установок коливається в широких межах

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Відбір рослин-донорів троянди ефіроолійної для мікроклонального розмноження необхідно проводити за спектрофотометричними показниками й за розробленою шкалою вмісту фенольних сполук.
2. Для мікроклонального розмноження сортів троянди ефіроолійної рекомендується технологія поетапного прямого органогенезу. Культивування рослин-регенерантів доцільно здійснювати на розроблених нами живильних середовищах. Для ризогенезу пагонів використовувати експлантати сортів троянди розміром від 1,0 см.
3. Запропоновано способи оцінки технологічності сортів та модель оптимізації циклічного процесу мікроклонального розмноження рослин- регенерантів троянди ефіроолійної.
4. Для адаптації регенерантів сорту Лань рекомендовано застосовувати двокомпонентні субстрати.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mohanty C, Mohanty A, Das A, Kar D. Comparative performance of some rose varieties under open and protected environment. Asian Journal of Horticulture. 2011;6(2):288-293.
2. Nadeem M, Khan MA, Riaz A, Ahmad R. Evaluation of growth and flowering potential of rosa hybrida cultivars under Faisalabad climatic conditions. Pak istan Journal of Agricultural Science. 2011;48(4):283-288.
3. Polara N, Viradia R, Khimani R. Evaluation of different rose cultivars in summer under south Saurashtra condition. Journal of Ornamental Horticulture. 2004;7(3and4):102-105.
4. Qasim M, Ahmad I, Ahmad T. Optimizing fertigation frequency for Rosa hybrida L. Pakistan Journal of Botany. 2008;40(2):533-545.
5. Ramzan A, Hanif M, Tariq S. Performance of Rosa Hybrida cultivars under agroclimatic conditions of Islamabad, Pakistan Journal of Agricultural Research. 2014;52(1):153-159.
6. Ranchana P, Selvaraj N, Jawaharlal M, Kumar CSR, Anita B. Cut rose varieties suitable for organic farming system in Nilgiris, Tamil Nadu. Journal of Biological and Chemical Research. 2014;31(1):104-108.
7. Shahrin S, Roni M, Taufique T, Mehraj H, Jamal Uddin A. Study on flowering characteristics and categorization of rose cultivars for color, fragrance and usage. Journal of Bioscience and Agriculture Research. 2015;4(1):20-30.
8. Singh P, Dubey R, Singh R, Kumar R. Evaluation of floribunda rose (Rosa hybrida L.) cultivars for landscape use under Punjab condition. Journal of Horticultural Sciences. 2013;8(2):271-275.
9. Suganthi P, Pugalendhi L, Subramanian S, Anand M, Kalarani K. Per se performance of Dutch rose (Rosa hybrida L) varieties under polyhouse in Shevaroy hills. International Journal of Chemical Studies. 2019;7(2):1477-1479.
10. Venkatesha K, Gupta A, Rai AN, Jambhulkar SJ, Bisht R, Padalia RC. Recent developments, challenges, and opportunities in genetic improvement of essential oilbearing rose (Rosa damascena): A review. Industrial Crops and Products. 2022;184:114984.

11. Candi F.A., Kazaz O. (2009) Biotechnology of roses: progress and future peospects. Suleyman Dermirel Univer. Orman Fakultesi Dergisi (Seri:A, vol.1, pp. 167-183.
12. Das P (2010) Mass cloning of Rose and Mussaenda, popular garden plants, via somatic embryogenesis. Hort.Sci., vol. 37, pp. 70-78.
13. Sapargali O., Nam S.V., Vecherko N.A., Mukhambetzhanov S.K., Mursalieva V.K. (2010) Influence of the genotype on the microclonal propagation of roses. Abstracts of international conference "Actual problems of botanical research", Almaty, pp. 341-343.
14. Ali M, Baloch SK, Seema N et al (2018) Influence of phytohormones on callus indication and micrpropagation on rose (*Rosa indica* L.). BJBAS 14:9–11.
15. Davoudi Pahnekolayi M, Samiei L, Tehranifar A, Shoor M (2015) The effect of medium and plant growth regulators on micropropagation of Dog rose (*Rosa canina* L.). JPMB 3(1):61–71.
16. Badalamenti O, Carra A, Oddo E, Carimi F, Sajeva M (2016) Is in vitro micrografting a possible valid alternative to traditional micropropagation in Cactaceae? Pelecyphora aselliformis as a case study. Springerplus 5(1):201. https ://doi.org/10.1186/s40064-016-1901-6.
17. Baktir I, Hazar D, Usyal S, Ozel S (2005) Possible uses of dogrose branches and rose hips for ornamental purposes. Acta Hortic 690:97–99. https ://doi.org/10.17660 /ActaH ortic .2005.690.13
18. Byrne DH, Klein P, Yan M et al (2018) Challenges of breeding rose rosette–resistant roses. HortScience 53(5):604–608. https ://doi.org/10.21273 /HORTS CI125 5.
19. Cabrera RI, Perdomo P (2003) Reassessing the salinity tolerance of greenhouse roses under soilless production conditions. HortScience 38(4):533–536.
20. Carins T (2003) Classification/horticultural classification schemes. In: Roberts AV, Debener T, Gudin S (eds) Encyclopedia of rose science. Elsevier, Oxford, pp 117–124.
21. Davoudi Pahnekolay M, Tehranifar A, Samiei L, Shoor M (2015) Optimization of the micro-propagation protocol of two native rose species of Iran (*Rosa canina* and *Rosa beggeriana*). In: III international conference on quality management in supply chains of ornamentals 1131:87–96. https ://doi.org/10.17660 /ActaH ortic .2016.1131.12

22. Folta KM, Gardiner SE (2009) Genetics and genomics of rosaceae, plant genetics and genomics: crops and models 6. Springer,New York.

23. Giovannini A, De Benedetti L, Crippa F, Mercuri A (2015) Micropropagation of old cultivars of scented cut roses. Acta Hortic 1155:613–618. https ://doi.org/10.17660 /ActaH ortic .2017.1155.89.

24. Gupta J, Dubey RK (2018) Factors affecting post-harvest life of flower crops. Int J Curr Microbiol App Sci 7(1):548–557. https ://doi.org/10.20546 /ijcma s.2018.701.065.

25. Ishihuro Y, Fukui H, Kageyama K, Matsumoto S (2006) Observation of attachment of *agrobacterium tumefaciens* to rose cell surface using TEM in relation to resistance responses to crown gall disease. In: XXVII international horticultural congress-IHC2006: international symposium on sustainability through integrated and organic 767:451–456. https ://doi.org/10.17660 /ActaH ortic.2008.767.53.

26. Khaskheli AJ, Khaskheli MI, Khaskheli MA et al (2018) Proliferation, multiplication and improvement of micro-propagation system for mass clonal production of rose through shoot tip culture. Am J Plant Sci 9(02):296. https ://doi.org/10.4236/ajps.2018.92024.

27. Malik M, Warchol M, Pawlowska B (2018) Liquid culture systems affect morphological and biochemical parameters during *Rosa canina* plantlets in vitro production. Not Bot Horti Agrobot 46(1):58–64. https ://doi.org/10.15835 /nbha4 61108 80

28. Nybom H, Werlemark G (2017) Realizing the potential of health-promoting rosehips from dogroses (*Rosa* sect. *Caninae*). Curr Bioact Compd 13:3–17.

29. Rasouli O, Ahmadi N, Monfared SR, Sefidkon F (2018) Physiological, phytochemicals and molecular analysis of color and scent of different landrace of *Rosa damascena* during flower development stages. Sci Hortic-Amsterdam 231:144–150. https ://doi.org/10.1016/j.scien ta.2017.12.010

30. Roosta HR, Bagheri V, Kian H (2017) Effect of different planting substrates on vegetative and physiologic characteristics and nutrients content of rose (*Rosa hybrida* var. Grandgala) in hydroponic system. J Sci Technol Greenh Culture 7(28):Pe27–pe39.

31. Tabesh F, Jafarkhani Kermani M, Khayam Nekouei M, Mousavi A, Khalighi A (2013) In vitro propagation of damask rose (*Rosa damascena* cv. Ispahan). Ann Bio Res 4:134–138.
32. Yeo KH, Choi KY, Rhee HC, Choi GL, Lee YB (2017) Erratum to: optimal levels of N, P, and K for the cultivation of single-stemmed roses in a closed hydroponic system. Hortic Environ Biotechnol 58(1):101–101. https ://doi.org/10.1007/s1358 0-017-0120-6.
33. Bao, Y., G. Liu, X. Shi, W. Xing, G. Ning, J. Liu, and M. Bao. 2012. Primary and repetitive secondary somatic embryogenesis in Rosa hybrida 'Samantha'. Plant Cell Tissue Organ Cult. 109: 411–418, https://doi.org/10.1007/s11240-011-0105-6.
34. Burrell, A.M., R.D. Lineberger, K.S. Rathore, and D.H. Byrne. 2006. Genetic variation in somatic embryogenesis of rose. HortScience 41:1165–1168, https://doi.org/10.21273/HORTSCI. 41.5.1165.
35. Byrne, D.H. 2015. Advances in rose breeding and genetics in North America. Acta Hortic. 1064:89–98, https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1064.11.
36. Cai, Y., L. Tang, H. Chen, Y. Li, R. Liu, and J. Chen. 2022. Somatic embryogenesis in Rosa chinensis cv, 'Old Blush'. Plant Cell Tissue Organ Cult. 149:645–656, https://doi.org/10.1007/s11240-022-02299-0.
37. Debener, T., C. Bartels, and L. Mattiesch. 1996. RAPD analysis of genetic variation between a group of rose cultivars and selected wild rose species. Mol. Breed. 2:321–327, https://doi.org/10.1007/BF00437910.
38. Dohm, A., C. Ludwig, D. Schilling, and T. Debener. 2001. Transformation of roses with genes for antifungal proteins to reduce their susceptibility to fungal diseases. Acta Hortic. 572:105–111. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.572.12.
39. Hsia, C. and S.S. Korban. 1996. Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of Rosa hybrida and Rosa chinensis var. minima. Plant Cell Tissue Organ Cult. 44(1):1–6, https://doi.org/10.1007/BF00045906.
40. Jacob, Y., C. Teyssier, S. Reynders-Aloisi, and S.C. Brown. 1995. Use of flow cytometry for the rapid determination of ploidy level in the genus Rosa. Acta Hortic. 424:273–278, https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1996.424.49.

41. Kim, C.K., J.Y. Oh, J.D. Chung, A.M. Burrell, and D.H. Byrne. 2004. Somatic embryogenesis and plant regeneration from in-vitro-grown leaf explants of rose. HortScience 39:1378–1380, https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.6.1378.

42. Kintzios, S., C. Manos, and O. Makri. 1999. Somatic embryogenesis from mature leaves of rose (Rosa sp.). Plant Cell Rep. 18:467–472, https://doi.org/10.1007/s002990050605.

43. Kunitake, H., H. Imamizo, and M. Mii. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seed-derived calli of rugosa rose (Rosa rugosa Thunb.). Plant Sci. 90:187–194, https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90239-V.

44. Li, X., S.F. Krasnyanski, and S.S. Korban. 2002. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in Rosa. J. Plant Physiol. 159:313–319, https://doi.org/10.1078/0176-1617-00688.

45. Marchant, R., M.R. Davey, J.A. Lucas, and J.B. Power. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Floribunda rose (Rosa hybrida L.) cvs. Trumpeter and Glad Tidings. Plant Sci. 120: 95–105, https://doi.org/10.1016/S0168-9452(96) 04479-2.

46. Roberts, A.V., K. Yokoya, S. Walker, and J. Mottley. 1995. Somatic embryogenesis in Rosa spp., p. 277–288. In: S. Jain, P. Gupta, and R. Newton (eds.). Somatic embryogenesis in woody plants. Springer, Dordrecht, the Netherlands. https://doi. org/10.1007/978-94-011-0491-3_15.

47. Rout, G.R., B.K. Debata, and P. Das. 1991. Somatic embryogenesis in callus cultures of Rosa hybrida L. cv. Landora. Plant Cell Tissue Organ Cult. 27:65–69, https://doi.org/10.1007/BF00048208.

48. Vergne, P., M. Maene, G. Gabant, A. Chauvet, T. Debener, and M. Bendahmane. 2010. Somatic embryogenesis and transformation of the diploid Rosa chinensis cv Old Blush. Plant Cell Tissue Organ Cult. 100:73–81, https://doi.org/10.1007/s11240-009-9621-z.

49. Xing, W., M. Bao, H. Qin, and G. Ning. 2010. Micropropagation of Rosa rugosa through axillary shoot proliferation. Acta Biol. Cracov. Ser.; Bot. 52:69–75, https://doi.org/10.2478/v10182-010-0025-5.

50. Yokoya, K., S. Walker, and V. Sarasan. 1995. Regeneration of rose plants from cell and tissue cultures. Acta Hortic. 424:333 338, https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1996.424.61.
51. Zakizadeh, H., T. Debener, S. Sriskandarajah, S. Frello, and M. Serek. 2008. Regeneration of miniature potted rose (Rosa hybrida L.) via somatic embryogenesis. Eur. J. Hortic. Sci. 73:111–117.
52. Arene L, Pellegrino C, Gudin S (1993) A comparison of the somaclonal variation level of Rosa hybrida L. cv Meirutral plants regenerated from callus or direct induction from different vegetative and embryonic tissues. Euphytica 71:83–90.
53. Chen JR, Wu L, Hu BW, Yi X, Liu R, Deng ZN, Xiong XY (2014) The influence of plant growth regulators and light quality on somatic embryogenesis in China rose (Rosa chinensis Jacq.). J Plant Growth Regul 33:295–304.
54. Jang HR, Lee HJ, Park BJ, Pee O-J, Paek K-Y, Park S-Y (2016) Establishment of embryogenic cultures and determination of their bioactive properties in Rosa rugosa. Hortic Environ Biotechnol 57:291–298.
55. Basim E., Basim H. Antibacterial activity of Rosa damascene essential oil. Fitoterapia, 2003. 74:394. 396p.
56. Marchant R, Davey MR, Lucas JA, Power JB (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration in Floribunda rose (Rosa hybrida L.) cvs. trumpeter and glad tidings. Plant Sci 120:95–105.
57. Buege JA, Aust SD Microsomal lipid peroxidation. Method. Enzymol, 1978. 52. pp. 302−310
58. Van der Salm TP, Van der Toorn CJ, ten Cate CHH, Dubois LA, De Vries DP, Dons HJ (1994) Importance of the iron chelate formula for micropropagation of Rosa hybrida L. 'Moneyway'. Plant Cell Tissue Organ Cult 37:73–77.
59. Zeinipour M, Azadi P, Majd A, Kermani MJ, Irian S (2015) Effect of stress factors on somatic embryogenesis of rose. Int J Biosci 6:255–265.
60. Canli FA, Kazaz S (2009). Biotechnology of roses progress and future prospects. Süleyman Demirel Üniver. Orman Fakültesi Dergisi (Seri:A), 1: 167-183.
61. Khosh-Khui M, De Silva JAT (2006). In vitro culture of the *Rosa* species. Floricult. Ornamen. Plant Biotechnol. 2: 514-527.

62. Murashige T., Skoog A., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiology, *15*: 473–497.

63. Gunes E.,Turkey rose oil production and marketing: a review on problem and opportunities. Journal of Applied Sciences, 2005. 5:Pp.1871–1875.

64. Олійник О.О., Клюваденко А.А., Мельничук М.Д. Розробка біотехнологічних прийомів розмноження троянди ефіроолійної (*Rosa damascena* Mill). XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», м. Львів, 19-21 квітня 2016: тези доповіді. Л.С. 130−131.