

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

На правах рукопису

ПУШКАРЬОВА Надія Олександрівна

УДК 577.13:57.088.6:582.683.2

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

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної Академії Наук України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Кучук Микола Вікторович,
Інститут клітинної біології та
генетичної інженерії НАН України,
головний науковий співробітник

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Ємець Алла Іванівна,
Інститут харчової біотехнології та
геноміки НАН України,
завідувач відділу клітинної біології
та біотехнології

кандидат біологічних наук,
Голубенко Анастасія Володимирівна
НДЛ «Інтродукованого та природного фіторізноманіття»
ННЦ «Інститут біології та медицини»
КНУ ім. Тараса Шевченка,
науковий співробітник

Захист відбудеться «19» жовтня 2017 р. о 13-й годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 26.202.01 при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 148.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 148

Автореферат розісланий «__» вересня 2017 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

К. В. Листван

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Збереження біорізноманіття є глобальною проблемою, вирішення якої потребує залучення новітніх технологій. Протягом останніх десятиліть активно розвивається біотехнологія збереження рослин – напрям, який є одним з новітніх інструментів міжгалузевого підходу по запобіганню зниження чисельності видів. Біотехнологія збереження рослин доповнює традиційні методи захисту різноманіття *ex situ* та дає змогу зберігати види, що погано піддаються традиційному розмноженню та забезпечує збереження генетичних ресурсів (Белокурова, 2010).

Рід *Crambe* L. (Катран) належить до родини Хрестоцвітих (*Brassicaceae*) і налічує 44 види (Branca et al., 2011). Деякі види роду *Crambe* L. мають досить широкий спектр застосування – зелена маса та коріння використовується в харчових цілях, так само як олія із насіння (Прахова, 2013). Крім того, насіння може бути використане в хімічній та лакофарбовій промисловості, для очищення стічних вод від важких металів, виготовлення біопалива завдяки високому вмісту довголанцюгової ерукової кислоти (Прахова, 2013; Gonçalves et al., 2013). До Червоної книги України (2009) занесено 7 видів роду *Crambe* L. з різним природоохоронним статусом: *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. mitridatis*, *C. steveniana*, *C. maritima*, *C. grandifolia*. Деякі з перелічених видів включено до світових та європейських Червоних списків (Red List Europe, Red List EU 27, IUCN Red List, World Red List) (Bilz et al., 2011). Рід *Crambe* L. також занесено до списку дикорослих рослин, що можуть бути генетичним матеріалом для покращення цінних сільськогосподарських культур (Bilz et al., 2011). У зв'язку з деякими факторами (виключно насіннєве поновлення, низька конкурентна спроможність, руйнування екотопів, низький відсоток виживання паростків, збирання рослин та підземної частини людиною, випасання худоби) представники роду знаходяться під загрозою зникнення, тому для їх збереження необхідна розробка ефективних методів біотехнології для масового розмноження рослин та збереження генетичного матеріалу без нанесення шкоди природним популяціям.

Згідно з джерелами літератури, лише для виду *C. abyssinica* було розроблено та оптимізовано ефективні протоколи мікроклонального розмноження (Li et al., 2011; Gao et al., 1998). Також існують роботи по вивченню морфогенного потенціалу частини листка та кореня *C. maritima* (Bowes, 1976), *C. tataria* (Piovan et al., 2011) та *C. giberosa* (Магомедалиева, 2013). Для більшості видів роду *Crambe* L., які потребують заходів по збереженню їх чисельності, не було знайдено даних літератури по культивуванню рослин *in vitro* та дослідженню впливу методів біотехнології на їх морфологічну будову, біохімічний склад та молекулярно-генетичні зміни. Підбір та оптимізація методів введення в асептичну культуру з подальшим мікроклональним розмноженням видів роду *Crambe* L., що занесені до Червоної книги України, є актуальним завданням, направленим на збереження біорізноманіття рослин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась на базі відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України у рамках тем III-1-15 «Вивчення фізіолого-

біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних генів в рослинних системах» (№ держ. реєстрації 0115U000025, від 2014 року), III-5-16 «Розробка біотехнологій отримання природних гетерологічних сполук в рослинних системах» (№ держ. реєстрації 0116U000635, від 2015 року), а також в рамках підтримки об'єкту національного наукового надбання України «Колекція зародкової плазми рослин флори України та світової флори».

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

Для досягнення даної мети було поставлено наступні завдання:

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

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

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

Методи дослідження. Для досягнення мети дослідження було застосовано наступні методи: методи культури *in vitro* (введення рослин досліджуваних видів у культуру *in vitro* та дослідження умов їх мікроклонального розмноження); біохімічні методи (для визначення можливого впливу умов *in vitro* на біохімічні властивості досліджуваних рослин); молекулярно-генетичні методи (для визначення генетичних змін внаслідок культивування та розмноження рослин досліджуваних видів в асептичній культурі); статистичні методи.

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

Вперше було:

✓ введено в асептичну культуру рослини видів *C. koktebelica*, *C. steveniana* та *C. aspera*;

✓ створено колекцію асептичних культур рослин роду *Crambe* L., що потребують заходів по збереженню їх чисельності – *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та *C. maritima*;

✓ використано частину черешка в якості експланта для мікроклонального розмноження рослин *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та показано його високий морфогенний потенціал для всіх досліджуваних видів;

✓ досліджено морфогенний потенціал бічної бруньки рослин видів *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та *C. maritima* в культурі *in vitro* та показано шляхи отримання регенерантів шляхом прямого та непрямого органогенезу;

✓ використано частину листка як експлант для мікроклонального розмноження рослин видів *C. koktebelica*, *C. aspera*, *C. steveniana* та показано високу здатність даного типу експланта до ризогенезу для усіх досліджуваних видів;

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

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

✓ встановлено високу антиоксидантну активність екстрактів із вегетативних органів рослин *C. koktebelica*, *C. aspera*, *C. steveniana*, культивованих *in vitro*;

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

Практичне значення отриманих результатів. Було створено колекцію асептичних рослин рідкісних видів роду *Crambe* L. – *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та *C. maritima* та розроблено протоколи їх мікроклонального розмноження за використання різних типів експлантів (частина листка, черешка, кореня та бічної бруньки) шляхом підбору концентрації та комбінації регуляторів росту. Сформульовано оптимальні схеми швидкого мікроклонального розмноження, укорінення та адаптації рослин до ґрунтових умов, які можна застосовувати для подальшого повернення у природні місця зростання та відновлення їх чисельності.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно проведено інформаційний пошук, збір та аналіз літературних джерел за темою дисертації,

визначено актуальність проблеми, сформульовано мету й завдання дослідження, власноруч виконано експерименти, здійснено статистичний аналіз одержаних даних, написано усі розділи дисертації. Висновки та основні наукові положення було сформульовано разом з науковим керівником дисертаційної роботи. Основні результати отримано здобувачем особисто. Дані щодо складу жирних кислот у вегетативних органах рослин досліджуваних видів, що культивували в умовах *in vitro* та *in vivo* було отримано у співпраці зі співробітником Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України Хархотою М.А., що відображено у спільних публікаціях. Рослини досліджуваних видів, що культивували в умовах *in vivo*, було надано співробітниками Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України проф. Рахметовим Д.Б. та Національного науково-природничого музею НАН України к.б.н Калістою М.С.

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

Публікації. За темою дисертації опубліковано 14 робіт: 7 статей у фахових наукових журналах та 7 тез доповідей у матеріалах з'їздів і конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі списку умовних скорочень, анотації українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення, висновків та списку використаних джерел, що містить 188 посилань та додатків. Дисертація викладена на 155 сторінках комп'ютерного друку і містить 21 таблицю та 44 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури висвітлено проблему скорочення видового різноманіття рослинного світу та розглянуто роль методів біотехнології у збереженні біорізноманіття рослин, вказано основні прийоми та підходи, що застосовуються при роботі зі зникаючими видами *in vitro* та їх можливий вплив на ряд біохімічних характеристик та генетичну стабільність рослин, що зберігаються. Крім того, в огляді наведено ботанічний опис рослин роду *Crambe* L., зокрема досліджуваних рідкісних видів: *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana*, та *C. maritima*, показано потенційні шляхи їх прикладного застосування та відсутність всебічних досліджень рослин у культурі *in vitro*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Досліджували п'ять рідкісних видів роду *Crambe* L.: *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana*, та *C. maritima* у культурі *in vitro*. В якості вихідного матеріалу для започаткування асептичної культури використовували насіння досліджуваних видів, що було надане науковим співробітником Національного науково-природничого музею НАН України Калістою М.С., та проф. Д.Д. Рахметовим із Національного ботанічного саду імені Н.Н. Гришка НАН України та отримано із банку насіння Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Як первинні експланти для подальшого мікророзмноження використовували частину листка, черешка, кореня та бічну бруньку асептичних рослин рідкісних видів роду *Crambe*. Для дослідження біохімічних властивостей та генетичної мінливості у культурі *in vitro* використовували зелене верхівкове листя рослин, що культивували в асептичних умовах (протягом 30 днів на безгормональному живильному середовищі Мурасіге-Скуга (MS) (Murashige et al., 1962). В якості контролю – зелене верхівкове листя рослин, що культивували в умовах *in vivo*, від яких було взято вихідний матеріал для введення в асептичну культуру.

Поверхнева стерилізація вихідних експлантів та умови культивування асептичних рослин. Підготовку експлантів та введення їх у культуру *in vitro* проводили в асептичних умовах згідно з загальноприйнятими рекомендаціями (Кушнір та ін., 2005) та намагались оптимізувати для кожного із обраних видів. Спочатку з насінин механічним способом знімали шкаралупу (перикарп) та насінневу шкірку. Далі насіння занурювали у 70% етанол на 60 сек, потім у одну із стерилізуючих сполук: промисловий розчин «Білизна» (на 4-18 хв), діюцид (на 1-6 хв); 3% H₂O₂ (на 4-20 хв) або 50% H₂O₂ (на 4-12 хв). Після обробки стерилізуючими розчинами проводилась промивка експлантів стерильною дистильованою водою тричі по 5 хв. Далі експланти культивували в чашках Петрі на агаризованому живильному середовищі MS при 16-годинному фотоперіоді і температурі +24°C. Після підрахунку відсотку асептичного насіння та насіння, що проростало *in vitro*, робили висновок про оптимальні умови поверхневої стерилізації експлантів.

Дослідження умов мікроклонального розмноження асептичних рослин видів роду *Crambe* L.. На етапі мікроклонального розмноження рослин

досліджуваних видів вивчали вплив екзогенних регуляторів росту на процес утворення пагонів із тканин різних типів експлантів. Використовували фітогормони цитокінінової природи: БАП (0,3 мг/л - 5 мг/л), кінетин (0,1 мг/л - 5 мг/л) та ауксин: НОК (0,1 мг/л до 1,5 мг/л) (табл. 2). Культивування мікропагонів проводили в умовах культуральної кімнати (при 16-годинному фотоперіоді і температурі +24°C.). Період між пасажами становив 35-40 днів. Для кожної групи експлантів (10 шт., що культивували на одному з варіантів живильних середовищ) на етапі дослідження морфогенного потенціалу визначали: частоту пагоноутворення, середню кількість експлантів, утворених із одного експланта, частоту ризогенезу та інтенсивність наростання калюсної тканини.

Укорінення та адаптація мікропагонів до ґрунтових умов. Для укорінення рослин-регенерантів використовували середовище зі зменшеним удвічі вмістом макро- та мікросолей та сахарози. Мікропагони із добре розвинутою кореневою системою адаптували до нестерильних умов середовища. На даному етапі використовували різні типи субстратів: суміш торфу та піску (3:1), суміш торфу та перліту (2:1). Асептичні рослини висаджували у попередньо автоклавований субстрат. Протягом перших 10-15 діб підтримували високу вологість для уникнення висихання листків. Адаптацію до умов *ex vitro* проводили в приміщенні при освітленні люмінесцентними лампами за температури +23 ± 2°C. Ефективність адаптації оцінювали як процентне співвідношення рослин, що виживали у субстраті та починали утворювати асимілюючі листки до загального числа висаджених у ґрунт рослин.

Оцінка впливу умов культивування *in vitro* на біохімічні властивості рослин досліджуваних видів. Досліджували антиоксидантну активність (за допомогою радикалу 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил (DPPH) (Okawa et al., 2001), вміст загального розчинного білка (за методом Бредфорда (Bradford, 1976) та вміст поліфруктанів (за методом Селіванова з модифікаціями (Ерамков и др., 1987) на спектрофотометрі Eppendorf (Германія) та вміст жирних кислот відповідно до запропонованої R. Garces та M. Mancha методики (Garces and Mancha, 1993) із застосуванням газової хромато-мас-спектрометричної системи Agilent 6890N/5973inert (Agilent Technologies, США).

Молекулярно-генетичний аналіз. Визначення генетичної стабільності рослин *in vitro* проводили за допомогою полімеразної-ланцюгової реакції (ПЛР) на основі ISSR- та SSR-маркерів (Inter Simple Sequence Repeats та Simple Sequence Repeats) (Твардовская, 2010). З цією метою використовували SSR (gHGL218091, gHGL110933, gH032602 (Lowe et al., 2001)), Na10-F08 (Werner et al., 2015) та ISSR (UBC827, UBC864, UBC890 (Rasha et al., 2010), A17898, B17899, IS-05HB10 (Singhal et al., 2010)) праймери (Metabion, Німеччина).

Загальну ДНК виділяли за модифікованим ЦТАБ (цетилтриметиламонію бромід) методом (Brody et al., 2004). Суміш для ПЛР реакції (20 мкл) включала 0,5 мкМ специфічних праймерів, 10× Reaction Buffer B (Solis BioDyne, Латвія), 2 мкМ MgCl₂, 0,2 мкМ кожного дезоксирибонуклеозид-3-фосфату (Thermo Fisher Scientific, США), 1 од. полімерази FIREPol® DNA Polymerase (Solis BioDyne), 30 нг загальної рослинної ДНК.

Амплікони розділяли електрофорезом в агарозному гелі концентрацією 1,5% та 2% в LB (Lysogeny broth) буфері, що містив 0,1 мкг/мл бромистого етидію (Sambrook et al., 2001; Perrier et al., 2003). Гелі документували в УФ-світлі за допомогою фотосистеми Canon EOS 600D. Біоінформатичний аналіз отриманих фрагментів ДНК здійснювали за допомогою програмного забезпечення GelAnalyzer 2010a. Встановлення філогенетичних зв'язків проводили за допомогою програмного забезпечення DARwin 6.0 за допомогою UPGMA методу (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages) (Perrier et al., 2006).

Методи статистичної обробки. Статистичну обробку та аналіз отриманих даних проводили за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Excel 7.0 и Statistica 8.0. Дані подані у вигляді середніх значень і стандартних похибок ($M \pm m$). Для порівняння середніх значень незалежних вибірок використовували t-критерій Ст'юдента (Лакин, 1980).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати поверхневої стерилізації насіння. В результаті проведеної роботи було підібрано оптимальну схему поверхневої стерилізації насіння досліджуваних видів роду *Crambe* L, згідно якої в якості стерилізуючої сполуки доцільно використовувати діюцид з часом експозиції вихідних експлантів 3 хв. Така обробка насіння дає змогу отримати найбільшу кількість асептичних насінин, що проростали *in vitro* (рис. 1).

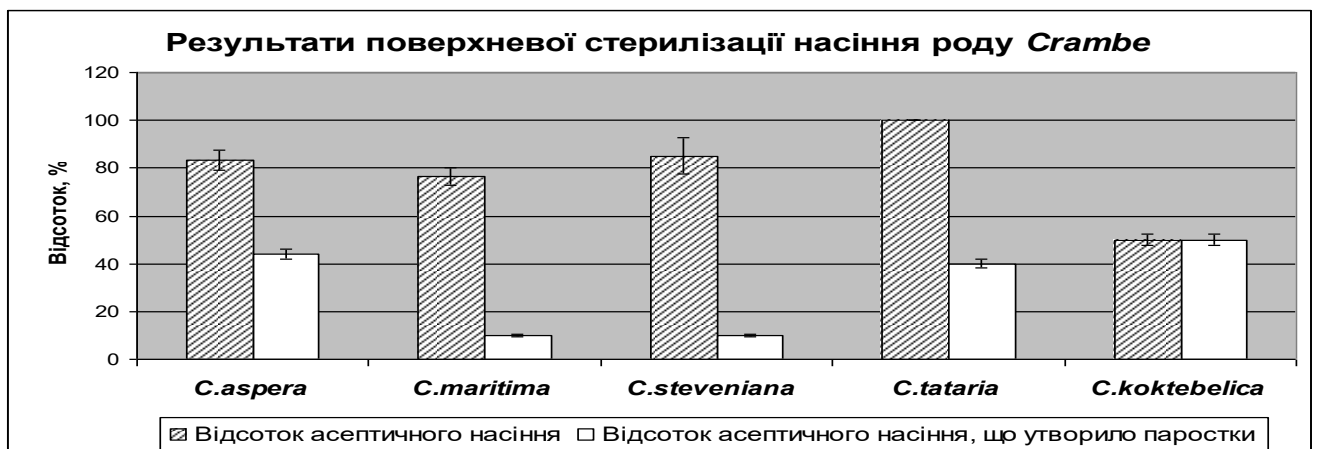


Рис.1. Результати поверхневої стерилізації насіння досліджуваних видів за використання діюциду (3 хв): Дані подано у вигляді $M \pm m$.

Оскільки насіння проростало у досить короткий термін після проведення процедури поверхневої стерилізації без застосування регуляторів росту можна стверджувати про локалізацію інгібіторів глибокого спокою, який притаманний представникам роду *Crambe* L., саме у шкірці насінини (оплодень). Такі припущення корелюють із дослідженнями інших авторів (Михайлова, 2015; Каліста та ін., 2012). Враховуючи високу схожість насіння *C. koktebelica* після зняття оплодня (95%) зазначену у публікаціях Калісти М.С. (Каліста та ін., 2012) можна стверджувати про значну втрату схожості насіння внаслідок зберіганні в умовах пониженої вологості за температури $+4^{\circ}\text{C}$ навіть протягом двох-трьох

років. Значна втрата схожості насіння показана не лише для виду *C. koktebelica*, а й для *C. maritima* та *C. steveniana*. Для інших досліджуваних видів здатність до проростання знижувалась, але все ж залишалась досить високою. Найкраще умови зберігання у банку насіння витримує насіння виду *C. maritima* (рис. 1).

Дослідження шляхів мікроклонального розмноження рослин *in vitro*. Для визначення оптимальних умов регенерації рослин досліджуваних видів *in vitro* використовували різні типи експлантів: частину листової пластинки, черешка, кореня та бічну бруньку (мікропагін для *C. aspera* та *C. maritima*).

Регенерація пагонів із пазушних бруньок. Розділення рослин-регенерантів на адвентивні та неадвентивні дає змогу використовувати отримані під час дослідження результати як для збереження біорізноманіття та можливого цінного генетичного для покращення сільськогосподарських культур або для селекційного виведення нових форм. Нами було встановлено умови прямої та непрямой регенерації із бічної бруньки досліджуваних видів та показано морфогенний потенціал даного типу експлантів. Також визначено відмінності у регенераційній здатності п'яти видів одного роду (табл. 1). Так, утворення пагонів шляхом прямої регенерації спостерігали для видів *C. koktebelica* та *C. tataria* на живильних середовищах із кінетином, а для видів *C. maritima*, *C. aspera* та *C. steveniana* на середовищі з БАП. При цьому, максимальна кількість пагонів утворених у даних випадках сильно не відрізнялась для усіх досліджуваних видів (табл. 1).

Табл. 1. Результати підбору оптимального вмісту регуляторів у живильному середовищі для регенерації пагонів із бічної бруньки шляхом прямого та непрямой органогенезу.

| Вид | Пряма регенерація | | Непряма регенерація | |
|-----------------------|-------------------|-------------|---------------------|--------------|
| | Регулятори росту | Пагони, шт. | Регулятори росту | Пагони, шт. |
| <i>C. koktebelica</i> | Кінетин 0,5 мг/л | 4,60 ± 1,30 | БАП 1 мг/л | 5,25 ± 0,81 |
| <i>C. tataria</i> | Кінетин 1,5 мг/л | 4,00 ± 0,70 | БАП 0,3 мг/л | 12,25 ± 3,86 |
| <i>C. aspera</i> | БАП 0,6 мг/л | 4,50 ± 1,29 | Кінетин 0,5 мг/л | 6,00 ± 0,89 |
| <i>C. steveniana</i> | БАП 0,6 мг/л | 5,30 ± 1,00 | БАП 0,6 мг/л | 5,30 ± 1,00 |
| <i>C. maritima</i> | БАП 1 мг/л | 4,00 ± 0,57 | Кінетин 0,1 мг/л | 4,00 ± 1,67 |

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

Було відмічено утворення пагонів із бічної бруньки разом з утворенням калюсної тканини. Шляхом непрямой органогенезу з однієї бруньки утворювалось більше пагонів, порівняно з прямим органогенезом, для видів *C. koktebelica*, *C. aspera* та *C. maritima*. Для виду *C. maritima* кількість утворених пагонів із калюсної тканини була практично такою ж, як і без утворення калюсу. Лише для виду *C. tataria* спостерігали набагато вищу ефективність розмноження шляхом непрямой органогенезу – із однієї бічної бруньки утворювалось майже втричі більше пагонів ніж без утворення калюсної тканини (табл. 1).

Дослідження морфогенного потенціалу кореневих експлантів. Згідно з даними літератури частина кореня є одним з найбільш ефективних експлантів для

регенерації пагонів *in vitro* для видів *C. maritima* та *C. tataria* (Bowes, 1976; Piovan et al., 2011; Магомедалиева, 2013). В результаті роботи підтверджено високу регенераційну здатність тканин кореня для виду *C. maritima* – частота регенерації та кількість утворених пагонів (рис. 2) була найвищою серед досліджуваних видів (табл. 2).

Табл. 2. Оптимальний вміст регуляторів росту у живильному середовищі для регенерації пагонів з корневих експлантів.

| Вид | Регулятори росту | Частота регенерації, % | Пагони, шт. |
|-----------------------|-------------------------------|------------------------|-------------|
| <i>C. koktebelica</i> | БАП 1 мг/л + НОК 0,1 мг/л | 20 | 1,00 |
| <i>C. tataria</i> | Кінетин 1 мг/л + НОК 0,5 мг/л | 30 | 2,67 ± 0,53 |
| <i>C. aspera</i> | БАП 1 мг/л + НОК 0,1 мг/л | 10 | 1,00 |
| <i>C. steveniana</i> | Кінетин 1 мг/л + НОК 0,1 мг/л | 40 | 1,00 |
| <i>C. maritima</i> | БАП 1 мг/л + НОК 0,1 мг/л | 100 | 3,90 ± 1,58 |

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

Для інших представників роду відзначали досить низьку частоту регенерації (табл. 2) з частини кореня. Було підтверджено ключову роль БАП в ініціації регенерації розеткових рослин (Piovan et al., 2011) з корневих експлантів для видів *C. koktebelica* та *C. aspera*. Для інших досліджуваних видів утворення пагонів відбувалось також за культивування на середовищі з кінетином та 1-нафтилоцтовою кислотою (НОК). Зокрема, для *C. tataria* та *C. steveniana* найвища частота регенерації була відмічена на живильних середовищах із кінетином (табл. 2).

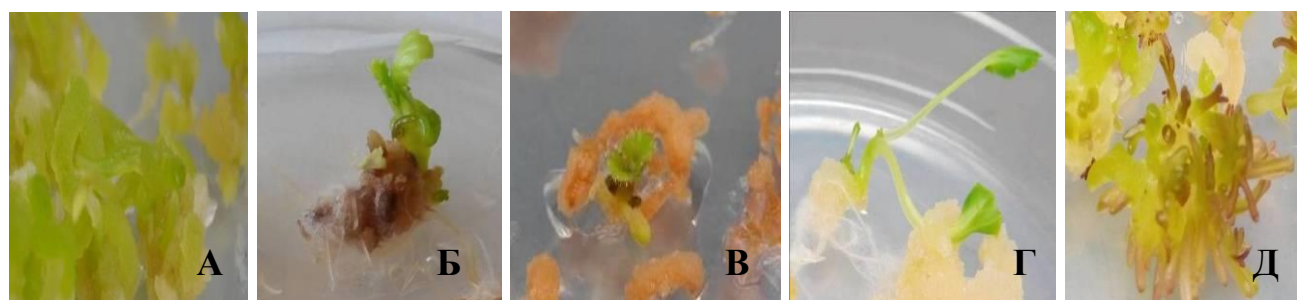


Рис. 2. Регенерація пагонів на корневих експлантах: А – *C. koktebelica* (БАП 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л); Б – *C. tataria* (кінетин 2,5 мг/л та НОК 0,5 мг/л); В – *C. aspera* (кінетин 2,5 мг/л та НОК 0,1 мг/л); Г – *C. steveniana* (кінетин 2,5 мг/л та НОК 0,1 мг/л); Д – *C. maritima* (БАП 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л).

З п'яти видів роду *Crambe* L. ефективність використання корневих експлантів для мікроклонального розмноження було підтверджено лише для виду *C. maritima*. Крім того, можна стверджувати про успішну регенерацію пагонів з частини кореня (рис. 2) за культивування з низьким вмістом цитокінінів (1 мг/л) та НОК (0,1-0,5 мг/л) у середовищі (табл. 2).

Дослідження морфогенного потенціалу листкових експлантів. Регенерацію пагонів з листкових експлантів (рис. 3) спостерігали як за

культивування з БАП, так і з кінетином у поєднанні з НОК. Хоча для усіх досліджуваних видів більш ефективним для мікроклонування виявився все ж БАП. Відмічено залежність частоти регенерації від вмісту НОК у середовищі – за низьких його концентрацій (0,1-0,5 мг/л) спостерігали найвищу частоту утворення пагонів (табл. 3). Збільшення вмісту НОК у середовищі веде до зниження частоти регенерації, що корелює із дослідженнями інших представників родини Хрестоцвітих (De-Ping Guo et al., 2005).

Табл. 3. Оптимальний вміст регуляторів росту в живильному середовищі для регенерації пагонів з листових експлантів.

| Вид | Гормональний склад середовища | Частота регенерації, % | Пагони, шт. |
|-----------------------|-------------------------------|------------------------|-------------|
| <i>C. koktebelica</i> | БАП 5 мг/л + НОК 0,5 мг/л | 28 | 1,00 |
| <i>C. tataria</i> | БАП 1 мг/л + НОК 0,1 мг/л | 38 | 2,60 ± 1,50 |
| <i>C. aspera</i> | БАП 5 мг/л + НОК 0,5 мг/л | 50 | 1,00 |
| <i>C. steveniana</i> | БАП 1 мг/л + НОК 0,1 мг/л | 80 | 1,87 ± 1,12 |
| <i>C. maritima</i> | БАП 2,5 мг/л + НОК 0,5 мг/л | 100 | 4,10 ± 1,39 |

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

Найбільшу регенераційну здатність листових експлантів відмічено для *C. maritima*, а найнижчу для *C. koktebelica*. Використання даного типу експланта для розмноження рослин в асептичній культурі є доцільним лише для видів *C. steveniana* та *C. maritima*.

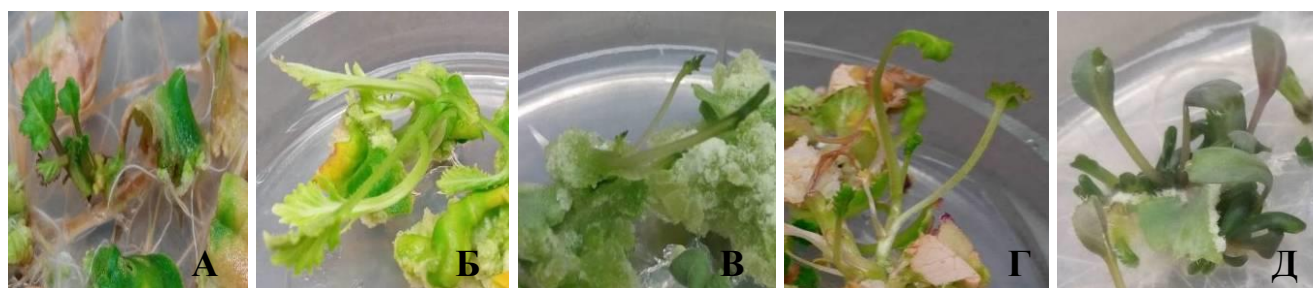


Рис. 3. Регенерація пагонів на листових експлантах: А – *C. koktebelica* (БАП 5 мг/л та НОК 0,1 мг/л); Б – *C. tataria* (БАП 2,5 мг/л та НОК 0,5 мг/л); В – *C. aspera* (БАП 5 мг/л та НОК 1 мг/л); Г – *C. steveniana* (БАП 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л); Д – *C. maritima* (кінетин 1 мг/л та НОК 1 мг/л).

Дослідження морфогенного потенціалу черешкових експлантів. Серед досліджених типів експлантів, використання частини черешка для мікроклонального розмноження дало змогу отримати регенерацію пагонів (рис. 4) з усіх експлантів для чотирьох із п'яти досліджуваних видів – *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та *C. maritima* (табл. 4). Крім того, було відмічено схожу з листовими експлантами роль НОК в індукції пагоноутворення – оптимальним є низький вміст ауксину (0,1-0,5 мг/л) у середовищі (табл. 4). Регенерацію з черешка було відмічено на середовищах, що містили як БАП, так і кінетин, однак саме культивування з БАП та НОК дало змогу отримати оптимальні протоколи

розмноження рослин. Висока концентрація БАП у середовищі (2,5-5 мг/л) була умовою високої частоти регенерації пагонів *de novo* для усіх досліджуваних видів, окрім *C. tataria* – спостерігали утворення пагонів з усіх експлантів за відносно низького вмісту БАП (1 мг/л) (табл. 4).

Табл. 4. Оптимальний вміст регуляторів росту в живильному середовищі для регенерації пагонів з черешкових експлантів.

| Вид | Гормональний склад середовища | Частота регенерації, % | Пагони, шт. |
|-----------------------|-------------------------------|------------------------|-------------|
| <i>C. koktebelica</i> | БАП 2,5 мг/л + НОК 0,1 мг/л | 60 | 1,00 |
| | БАП 5 мг/л + НОК 0,5 мг/л | 60 | 1,00 |
| <i>C. tataria</i> | БАП 1 мг/л + НОК 0,1 мг/л | 100 | 2,87 ± 1,24 |
| <i>C. aspera</i> | Кінетин 5 мг/л + НОК 0,1 мг/л | 70 | 8,42 ± 4,84 |
| | БАП 5 мг/л + НОК 1 мг/л | 100 | 3,14 ± 1,46 |
| <i>C. steveniana</i> | БАП 2,5 мг/л + НОК 0,1 мг/л | 100 | 1,90 ± 0,81 |
| <i>C. maritima</i> | БАП 2,5 мг/л + НОК 0,1 мг/л | 100 | 7,60 ± 2,25 |

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

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

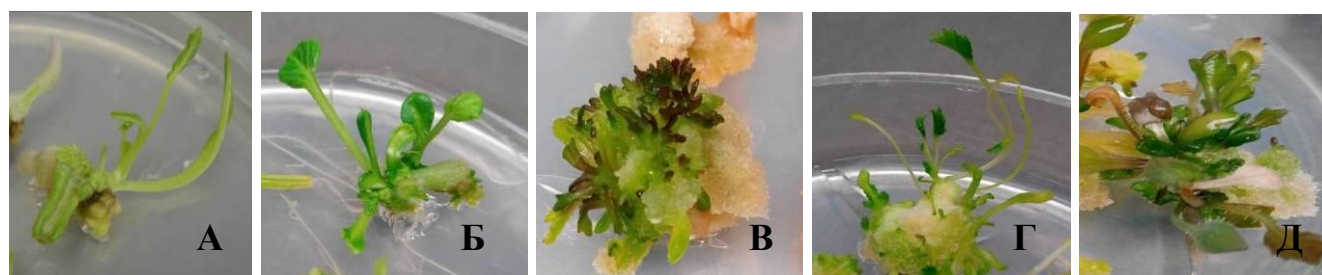


Рис. 4. Регенерація пагонів на черешкових експлантах: А – *C. koktebelica* (БАП 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л); Б – *C. tataria* (кінетин 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л); В – *C. aspera* (кінетин 5 мг/л та НОК 0,1 мг/л); Г – *C. steveniana* (БАП 2,5 мг/л та 1,5 мг/л); Д – *C. maritima* (кінетин 2,5 мг/л та НОК 0,1 мг/л).

Нами не було знайдено даних по дослідженню морфогенезу з тканин черешка для рідкісних видів роду *Crambe* L., тому показаний найвищий

морфогенний потенціал цього типу експланту є важливим для оптимізації протоколів мікроклонального розмноження представників даного роду.

Калюсогенез та ризогенез із різних типів експлантів. Кореневі експланти проявили більшу активність калюсогенезу в порівнянні з іншими органами рослин для усіх досліджуваних видів, окрім *C. aspera* – ініціація калюсної тканини по всій площі експланта (товщиною більше 10 мм) відбувалась частіше на черешкових експлантах. Утворення калюсу відбувалось за культивування як з БАП, так і з кінетином, але проліферація калюсної тканини по всій площі експланта спостерігалась лише за наявності БАП у середовищі, що також показано для інших видів роду (Piovan et al., 2011; Магомедалиева, 2013). Для листових та черешкових експлантів *C. maritima* відмічали найвищу активність калюсогенезу також на середовищі з кінетином, що може бути пояснено високим морфогенним потенціалом та вмістом ендогенних регуляторів росту у експлантах даного виду. Крім того, із кореня *C. steveniana* відмічали більш активну регенерацію калюса за культивування із кінетином. Утворений калюс відрізнявся за структурою та кольором залежно від типу експланта та гормонального складу середовища. Так, з корневих експлантів утворювався оводнений світло-коричневий калюс, з листових – світло-зелений, місцями білий рихлий калюс, а з черешкових – світло-зелений, місцями білий або жовто-зелений рихлий калюс (на середовищах з БАП).

На черешках та листках також спостерігали утворення коренів по всій площі експланту. Відмічено більшу здатність до ризогенезу листових експлантів усіх видів, культивованих на середовищі з кінетином та НОК. Відомо, що клітини меристеми можуть стати тотипотентними або плюрипотентними під впливом екзогенних регуляторів росту (Verdeil, 2007; Christianson, Warnik, 1983) – ауксини не тільки сприяють активній проліферації клітин експланта і формуванню морфогенної компетенції, але також визначають індукцію того чи іншого шляху морфогенеза.

Отже, було показано, що вибір експланта є важливим фактором у визначенні оптимальних схем регенерації рідкісних видів роду *Crambe* L., оскільки рівень ендогенних фітогормонів або різна чутливість до екзогенних регуляторів росту може відрізнятися у органів рослини та мати видоспецифічний характер (Piovan et al., 2011; Магомедалиева, 2013). Для досліджуваних видів роду *Crambe* L. була виявлена детермінованість органів до певного типу морфогенезу – з корневих експлантів утворюється калюс, з листових – корені, а з черешкових – пагони. Рослини-регенеранти, отримані за рахунок активації меристем, з більшою вірогідністю повторюють генотип вихідної форми. Розділення утворених пагонів залежно від типу морфогенезу (прямого та непрямого) дозволяє використовувати схеми регенерації як для збереження вихідних генотипів, так і для можливої селекційної роботи з метою отримання нових форм.

Укорінення та адаптація мікропагонів до умов *in vivo*. Згідно з численними рекомендаціями (Li et al., 2011; Bowes, 1976; Piovan et al., 2011; Li et al. 2010) укорінення мікропагонів досліджуваних видів проводили на безгормональному живильному середовищі MS. Найкраще укорінювались пагони виду *C. steveniana*, а найгірше – *C. maritima*. Для більшості видів зниження вмісту

сахарози та макро- і мікросолей у живильному середовищі викликала незначне підвищення частоти укорінення. Для двох видів, що із розетковим стеблом (*C. aspera* та *C. maritima*) спостерігали значне підвищення частоти укорінення у відповідь на культивування на середовищі MS/2 (рис. 5).

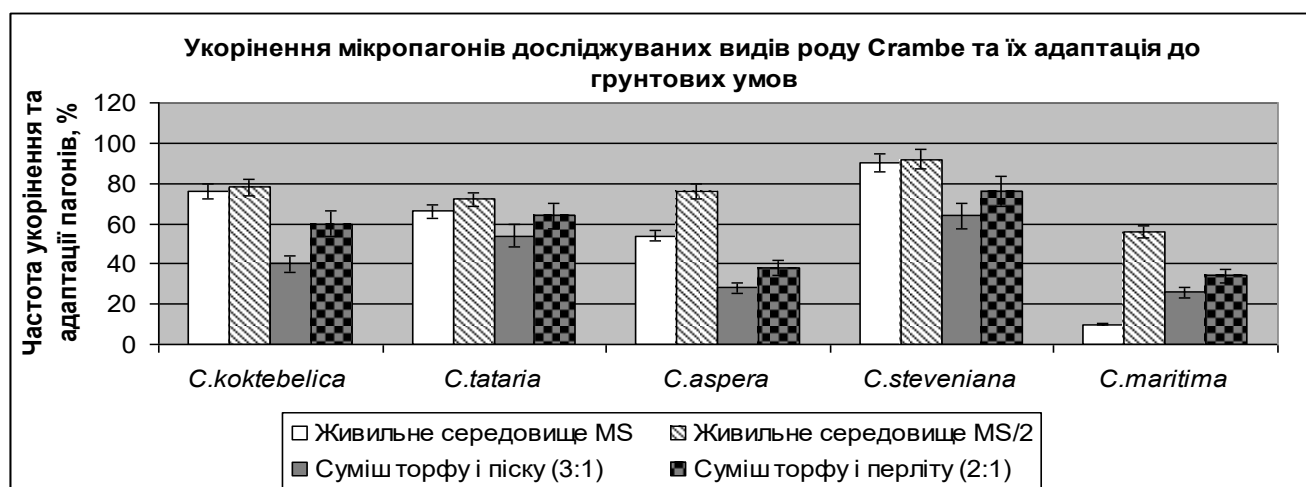


Рис. 5. Частота укорінення мікропагонів досліджуваних видів *in vitro* та їх адаптація до ґрунтових умов: дані подано у вигляді $M \pm m$.

У більшості рослин, що вирощували на суміші торфу та перліту, крупні листки починали засихати та відмиralи на 10-14 день після перенесення у ґрунтові умови. Лише на 18-25 день культивування спостерігали утворення нових асимілюючих листків. Для *C. aspera* та *C. maritima* перенесення рослин до ґрунтових умов викликало значне уповільнення росту. Для подолання стану спокою застосовували чергування високих та низьких температур. Так, після витримування рослини при $+5 \pm 2^\circ\text{C}$ протягом двох-трьох діб і перенесення до попередніх умов культивування ($+23 \pm 2^\circ\text{C}$) вдалося подолати стан спокою і досягти подальшого утворення асимілюючих листків.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO* НА БІОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТА ГЕНЕТИЧНУ СТАБІЛЬНІСТЬ РОСЛИН РІДКІСНИХ ВИДІВ РОДУ *CRAMBE* L.

Для оцінки можливого впливу процедури поверхневої стерилізації, асептичних умов культивування та мікроклонального розмноження на біохімічні характеристики визначали вміст загального розчинного білка, поліфруктанів, жирних кислот та антиоксидантну активність вегетативних органів рослин досліджуваних видів.

Вміст загального розчинного білка, поліфруктанів та антиоксидантна активність вегетативних органів досліджуваних видів, культивованих *in vitro* та *in vivo*. Згідно отриманих даних, для більшості рослин (*C. koktebelica*, *C. steveniana*, *C. maritima*), що культивували *in vitro*, відмічено збільшення вмісту загального розчинного білка у порівнянні з рослинами із ґрунтових умов (табл. 5). Відомо, що екзогенні регулятори росту, які використовують для мікроклонального розмноження *in vitro*, мають властивість активувати експресію

генів, що регулюють синтез розчинних та стресових білків (Mirzokhonova et al., 2007; Kumar et al., 2014). Ця властивість регуляторів росту може бути причиною виникнення різниці вмісту загального розчинного білка між рослинами, що культивували *in vitro* та *in vivo*.

Табл. 5. Антиоксидантна активність, вміст поліфруктанів та загального розчинного білка вегетативних органів рослин культивованих *in vitro* та *in vivo*.

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

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

Для двох досліджуваних видів (*C. steveniana*, *C. maritima*) не було встановлено суттєвих відмінностей за вмістом поліфруктанів у вегетативних органах рослин залежно від умов культивування. З іншого боку, для рослин *C. koktebelica* та *C. aspera* відмічали значне підвищення вмісту поліфруктанів у рослинах, що культивували *in vivo*, а для *C. tataria*, навпаки, вміст поліфруктанів був вищим у асептичних рослин (табл. 5). Такі результати пояснюються зниженням активності фотосинтезу, постачанням підземним органам вуглецю та іншими специфічними для асептичної культури особливостями, які можуть значно підвищувати синтез поліфруктанів у коренях та листках рослин, культивованих *in vitro* (Trevisan et al., 2014). Фруктани відіграють важливу роль у механізмі пристосування до зниження температури оточуючого середовища та засухи (беруть участь у стабілізації клітинних мембран, запобігають підвищенню осмотичного тиску та знижують точку замерзання (Hinch et al., 2000; Krasensky et al., 2012), а їх вміст у вегетативних органах та коренях рослин, що культивували *in vivo* може змінюватись протягом року (Steen et al., 1986).

Антиоксидантна активність (АОА) екстрактів з вегетативних органів досліджуваних рослин виявилась дуже високою та, в деяких випадках, перевищувала АОА розчину аскорбінової кислоти, яку було взято як еталон для оцінки досліджуваних зразків (1 мг/мл аскорбінової кислоти – 98,22%). АОА асептичних та неасептичних рослин для більшості досліджених видів суттєво не відрізнялась, лише рослини виду *C. steveniana*, культивовані *in vivo*, відзначились дещо вищою АОА ніж ті, що культивували *in vitro* (табл. 5). Результати дослідження корелюють з даними літератури, в яких описано високий вміст деяких компонентів антиоксидантної системи (флавоноїдів, кварцетину та ін.) (Gaspar et al., 2002; Bayram et al., 2012).

Вплив культивування *in vitro* на вміст жирних кислот рослин досліджуваних видів. У вегетативних органах рослин *C. tataria*, *C. steveniana* та *C. maritima*, що культивували *in vitro*, відмічено значне підвищення загального вмісту ЖК, для інших видів суттєвої різниці виявлено не було (табл. 6). Виявили зміну співвідношення між насиченими та ненасиченими ЖК у рослинах із різних умов зростання. Так, вміст насичених ЖК в асептичних рослинах був вищим, а в неасептичних містилось більше ненасичених ЖК (табл. 6). Така різниця може бути пов'язана з переходом частки певної ЖК у більш ненасичений стан під впливом умов навколишнього середовища. Відомо, що саме ліпіди клітинних мембран відіграють вирішальну роль у формуванні стійкості рослин до несприятливих умов існування, зокрема, стійкості до низьких температур. При зниженні температури оточуючого середовища, прискорюється синтез поліненасичених ЖК у мембранних ліпідах (Лось, 2005; Анисимович и др., 2010). За культивування *in vivo* можливі досить значні коливання температури навколишнього середовища що могло викликати зміну якісного складу ЖК у порівнянні з рослинами, що культивували *in vitro* за умов сталого температурного режиму.

Табл. 6. Загальний вміст жирних кислот у вегетативних органах рослин рідкісних видів роду *Crambe* L., що культивували *in vitro* та *in vivo*, мг/г.

| Види | Умови культивування | Жирні кислоти | Насичені жирні кислоти | Ненасичені жирні кислоти |
|-----------------------|---------------------|---------------|------------------------|--------------------------|
| <i>C. koktebelica</i> | <i>In vitro</i> | 3,64 ± 0,70 | 1,58 ± 0,01* | 1,25 ± 0,69 |
| | <i>In vivo</i> | 3,74 ± 0,54* | 0,70 ± 0,20* | 3,04 ± 0,68* |
| <i>C. tataria</i> | <i>In vitro</i> | 6,09 ± 0,51 | 1,94 ± 0,10* | 4,14 ± 0,41 |
| | <i>In vivo</i> | 2,65 ± 0,09* | 0,67 ± 0,04* | 1,95 ± 0,11* |
| <i>C. aspera</i> | <i>In vitro</i> | 4,78 ± 1,93 | 1,61 ± 0,37 | 3,16 ± 1,56 |
| | <i>In vivo</i> | 3,56 ± 0,06* | 0,95 ± 0,03* | 2,68 ± 0,10* |
| <i>C. steveniana</i> | <i>In vitro</i> | 5,81 ± 0,39 | 1,23 ± 0,88 | 4,58 ± 1,28 |
| | <i>In vivo</i> | 1,92 ± 0,23 | 0,47 ± 0,05* | 1,45 ± 0,19 |
| <i>C. maritima</i> | <i>In vitro</i> | 6,56 ± 2,22 | 1,83 ± 0,55 | 4,72 ± 1,67 |
| | <i>In vivo</i> | 2,74 ± 0,17 | 0,64 ± 0,06* | 2,07 ± 0,19 |

Примітка: Дані подано у вигляді $M \pm m$; «*» – $p \leq 0,05$.

Подальше дослідження виявило відмінності на рівні кожної з наявних ЖК у вегетативних органах рослин. Так, вміст пальмітинової та лауринової кислот був дещо вищим у асептичних рослин. Стеаринової кислоти містилось також більше у зразках, культивованих *in vitro* для усіх видів, окрім *C. maritima*. Домінуючою ЖК для рослин (як асептичних, так і неасептичних) усіх досліджуваних видів була α -ліноленова кислота. Її вміст відрізнявся в залежності від умов культивування – у зразках, отриманих з асептичних рослин, менша її кількість у порівнянні із рослинами із ґрунтових умов. Згідно із даними літератури, вміст α -ліноленової кислоти (однієї з найцінніших в харчовому раціоні людини) в найбільш вживаних видів родини *Brassicaceae* є нижчим за вміст даної ЖК в дослідних видах роду *Crambe* L. ($33,08 \pm 1,41\%$ – для рапсу, $33,79 \pm 1,53\%$ – для ріпи та $46,60 \pm 2,80\%$ –

для капусти) (Taylor et al., 2010). Отримані результати підтверджують цінність досліджуваних видів в сільському господарстві в якості кормової культури.

У зразках з вегетативних органів рослин *C. stevenaina* (*in vitro*), було знайдено невелику кількість лігноцеринової кислоти (C24:0 – $1,64 \pm 0,082$ моль%), а у вегетативних органах рослин, що росли в умовах *in vivo*, знайдено її мононенасичений аналог нервонової кислоти (C24:1 – $3,08 \pm 0,15$ моль%). Для зразків неасептичних рослин виду *C. tataria* встановлено наявність лігноцеринової кислоти (C24:0 – $0,44 \pm 0,02$ моль%), а в асептичних рослинах цього ж виду було показано наявність лише нервонової кислоти (C24:1 – $2,66 \pm 0,13$ моль%). Нервонова кислота має широкий спектр застосування при симптоматичному лікуванні розсіяного склерозу, хвороби Паркінсона, шизофренії, хвороб, пов'язаних з неврологічними розладами, використовується також для поліпшення пам'яті, лікування артриту, захворювань печінки, ожиріння та ін. (Sandhir et al., 1998; Sargent et al., 1994). Беручи до уваги широке та різнопланове використання нервонової кислоти, її наявність навіть у невеликій кількості у вегетативних органах рослин виду *C. steveniana*, вирощених в умовах відкритого ґрунту, дає можливість говорити про можливе використання даного виду в якості джерела C24:1, або предмету для біотехнологічного підвищення вмісту нервонової кислоти у зеленій масі рослин. Наявність лігноцеринової кислоти також було встановлено у рослинах культивованих *in vivo* видів *C. aspera* ($0,90 \pm 0,04$ моль%) та *C. maritima* ($1,60 \pm 0,08$ моль%), але у культивованих *in vitro* рослинах даних видів не було виявлено лігноцеринової або нервонової кислоти (рис. 3). Крім того, лише у рослинах *C. stevenaina* та *C. maritima*, культивованих *in vivo*, була наявна пальмітолеїнова кислота.

Оскільки представники роду в умовах відкритого ґрунту є полікарпними видами, за кілька років життєвого циклу вони змінюють кілька вікових станів, кожен з яких має ряд відмінностей (морфологічних, біохімічних тощо) (Михайлова, 2015; Каліста та ін., 2012). У значній мірі ці зміни пов'язані зі зміною складу ЖК, як одного із найважливіших механізмів пристосування до зовнішніх умов (Лось, 2005), тому відмінності за вмістом ЖК можуть бути пов'язані з різними віковими станами рослини в умовах *in vivo*. Рослини, культивовані *in vitro*, можуть бути джерелом отримання зеленої маси із сталим складом ЖК, оскільки за культивування та розмноження *in vitro* рослини досліджуваних видів досягали лише ювенільного вікового стану із подальшим переходом до іматурного стану після етапу адаптації.

Генетична мінливість у культурі *in vitro* рослин дослідних видів. Усі використані у даному дослідженні маркерні системи дали змогу отримати чіткі та відтворювані фрагменти, окрім ISSR-маркерів B17899 (для *C. maritima*) та HB10 (для *C. aspera*). ISSR- та SSR-праймери забезпечували ампліфікацію фрагментів у межах 270-2300 пар нуклеотидів (пн) та 80-190 пн відповідно. Найбільш інформативними серед ISSR-маркерів виявилися B17899, UBC890 та UBC827 (табл. 7).

Отримані після проведення ПЛР-аналізу результати за електрофоретичними спектрами використовувались з метою побудови дендрограм за допомогою UPGMA-методу. Зразки *in vitro* чотирьох досліджуваних видів (*C. maritima*,,

C. tataria, *C. aspera* та *C. koktebelica*) проявили значну генетичну подібність. У трьох з чотирьох *in vitro* генотипів *C. steveniana* встановлено значну генетичну подібність, однак, один *in vitro* зразок був генетично поліморфним по відношенню до решти *in vitro* зразків. Якщо припустити, що всі досліджувані зразки мали походження з біологічного матеріалу єдиної особини, то можна стверджувати, що жорсткі умови введення в культуру *in vitro* призвели до генетичних змін.

Табл. 7. Характеристика ISSR- та SSR-маркерних систем використаних для дослідження генотипів п'яти рідкісних видів роду *Crambe*.

| ISSR-маркери | <i>C. aspera</i> | | | <i>C. koktebelica</i> | | | <i>C. maritima</i> | | | <i>C. steveniana</i> | | | <i>C. tataria</i> | | |
|---------------|------------------|--------|------|-----------------------|--------|------|--------------------|--------|------|----------------------|--------|------|-------------------|--------|------|
| | АФ, шт | ПФ, шт | П, % | АФ, шт | ПФ, шт | П, % | АФ, шт | ПФ, шт | П, % | АФ, шт | ПФ, шт | П, % | АФ, шт | ПФ, шт | П, % |
| A17898 | 10 | 6 | 60 | 13 | 5 | 38 | 10 | 5 | 50 | 10 | 7 | 70 | 13 | 9 | 69 |
| B17899 | 8 | 8 | 100 | 9 | 6 | 67 | 1 | 0 | 0 | 5 | 5 | 100 | 8 | 7 | 87 |
| HB10 | - | - | - | 11 | 6 | 55 | 9 | 5 | 56 | 11 | 10 | 91 | 11 | 9 | 82 |
| IS-O5 | 13 | 10 | 80 | 12 | 5 | 42 | 16 | 15 | 94 | 13 | 11 | 85 | 15 | 12 | 80 |
| UBC827 | 11 | 1 | 9 | 10 | 6 | 60 | 11 | 6 | 55 | 12 | 6 | 50 | 13 | 9 | 69 |
| UBC864 | 11 | 3 | 27 | 17 | 5 | 29 | 11 | 4 | 36 | 12 | 10 | 83 | 13 | 8 | 62 |
| UBC890 | 20 | 13 | 65 | 16 | 10 | 62 | 20 | 12 | 20 | 22 | 18 | 82 | 19 | 17 | 89 |
| Мікросателіти | | | | | | | | | | | | | | | |
| SSR-маркери | АФ, шт | ПФ, шт | П, % | АФ, шт | ПФ, шт | П, % | АФ, шт | ПФ, шт | П, % | АФ, шт | ПФ, шт | П, % | АФ, шт | ПФ, шт | П, % |
| gHGL218091 | 2 | 2 | 100 | 3 | 3 | 100 | 2 | 2 | 100 | 4 | 4 | 100 | 3 | 3 | 100 |
| gHGL110933 | 3 | 3 | 100 | 2 | 2 | 100 | 4 | 4 | 100 | 2 | 2 | 100 | 3 | 3 | 100 |
| gH032602 | 2 | 2 | 100 | 2 | 2 | 100 | 2 | 2 | 100 | 3 | 3 | 100 | 3 | 3 | 100 |

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

ВИСНОВКИ

1. Опрацьовано методи біотехнології для збереження п'яти рідкісних видів роду *Crambe* L. та показано модифікаційний характер змін біохімічних властивостей рослин внаслідок культивування *in vitro* та значну генетичну подібність.

2. Розроблено протоколи поверхневої стерилізації насіння разом з методами подолання глибокого спокою та отримано колекцію асептичних рослин п'яти рідкісних видів роду *Crambe* L.

3. Визначено умови мікророзмноження рослин шляхом прямої та непрямой регенерації із бічної бруньки для усіх досліджуваних видів.

4. Досліджено морфогенний потенціал трьох типів експлантів та виявлено детермінованість органів до певного типу морфогенезу. Із корневих експлантів більш активно утворюється калюс, із листових – корені, а із черешкових – пагони. Вплив цитокінінів та тип морфогенезу спостерігали на трьох типах експлантів – за наявності кінетину у поєднанні із НОК у середовищі частіше спостерігали ризогенез, а за наявності БАП та НОК – пагоноутворення та калюсогенез.

5. Встановлено склад жирних кислот у вегетативних органах досліджуваних видів та показано збільшення вмісту жирних кислот з більшим ступенем ненасиченості (C16:1, C18:2, C18:3) та зміни якісного складу жирних кислот деяких видів, що культивували в умовах відкритого ґрунту.

6. Культивування *in vitro* викликає як підвищення, так і зниження вмісту загального розчинного білка та поліфруктанів для деяких із досліджуваних видів. Антиоксидантна активність залишалась сталою незалежно від умов культивування.

7. Показано відсутність генетичних змін внаслідок культивування в асептичних умовах для усіх досліджуваних видів, окрім *C. steveniana*, для якої встановлено генетичну поліморфність у зразках культивованих *in vitro*.

8. Досягнуто успішного укорінення пагонів на безгормональному середовищі MS та проведено адаптацію асептичних рослин до ґрунтових умов на субстраті суміш торфу та перліту.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Pushkarova N.O.** *Crambe tataria* Sebeok seeds and plants grown *in vitro* and *in vivo* fatty acid composition comparison / **N.O. Pushkarova**, M.S. Kalista, M.A. Kharhota, D.B. Rakhmetov, M.N. Kuchuk // *Potravinarstvo*. – 2016. – V. 10, N 1. – P. 494–498. *Особистий внесок здобувача: отримано асептичну культуру рослин, проведено аналіз результатів мас-спектрометричного вимірювання вмісту жирних кислот, зроблено висновки та написано текст статті.*

2. **Pushkarova N.O.** Biotechnology approaches for conservation of the endangered species *Crambe koktebelica* (Junge) N. Busch and effect of aseptic *in vitro* cultivation on its biochemical properties / **N.O. Pushkarova**, M.S. Kalista, M.A. Kharhota, D.B. Rakhmetov, M.N. Kuchuk // *Biotechnol. acta*. – 2016. – V. 9, N 4. – P. 19–27. *Особистий внесок здобувача: отримано асептичну культуру рослин, проведено визначення антиоксидантної активності, вмісту загального розчинного білка, поліфруктанів та аналіз результатів мас-спектрометричного вимірювання вмісту жирних кислот, зроблено висновки та написано текст статті.*

3. **Pushkarova N.** Phylogenetic study of *Crambe* species with ISSR markers / Lakhneko O., **Pushkarova N.**, Stepanenko A., Kuchuk M., Morgun B. // *Vestnik of the South-Kazakhstan state pharmaceutical academy Republican scientific journal*. – 2016. – V. 4, N 77. – P. 7–10. *Особистий внесок здобувача: отримано асептичну культуру рослин та проведено аналіз отриманих результатів.*

4. **Пушкарьова Н.О.** Отримання культури рослин зникаючого виду *Crambe steveniana* та вивчення впливу асептичних умов культивування на їх біохімічний склад / **Н.О. Пушкарьова**, М.С. Каліста, В.Б. Белокурова, М.В. Кучук // *Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна*. – 2016. – Т. 27. – С. 155–162. *Особистий внесок здобувача: отримано асептичну культуру рослин, визначено біохімічні характеристики рослин та проаналізовано отримані результати, зроблено висновки та написано текст статті.*

5. **Пушкарьова Н.О.** Ефективність поверхневої стерилізації насіння як важлива умова створення *in vitro* колекції рослин, що охороняються / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова, М.В. Кучук // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. – Т. 17. – С. 241–244. *Особистий внесок здобувача: перевірено різні схеми поверхневої стерилізації насіння рідкісних видів рослин з використанням чотирьох стерилізуючих сполук та різним часом експозиції, проведено аналіз отриманих даних, зроблено висновки та написано текст статті.*

6. **Пушкарьова Н.О.** Вивчення деяких біохімічних характеристик видів рослин, що охороняються, в культурі *in vitro* / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова, М.В. Кучук // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т. 19. – С. 182–184. *Особистий внесок здобувача: отримано асептичну культуру рослин, визначено біохімічні характеристики рослин та проаналізовано отримані результати, зроблено висновки та написано текст статті.*

7. **Пушкарьова Н.О.** Застосування регуляторів росту для мікроклонального розмноження *in vitro* рослин, що охороняються / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова, М.В. Кучук // Рідкісні рослини і гриби України та прилеглих територій: реалізація природоохоронних стратегій. Матеріали IV міжнародної конференції (м. Київ, 16-20 травня 2016 р.) – 2016. – С.218–222. *Особистий внесок здобувача: визначено умови прямої та непрямой регенерації пагонів з бічної бруньки рослин, проведено аналіз отриманих результатів та написано текст статті.*

8. **Пушкарьова Н.О.** Особливості введення в культуру *in vitro* деяких рідкісних та зникаючих видів флори України / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова // Наукові пріоритети розвитку аграрної сфери в умовах глобальних змін: матеріали міжнародної науково-практичної Інтернет конференції (Тернопіль, 4-5 грудня 2014 р.). – 2014. – С. 71-73. *Особистий внесок здобувача: перевірено різні схеми поверхневої стерилізації насіння рідкісних видів рослин з використанням чотирьох стерилізуючих сполук та різним часом експозиції, проведено аналіз отриманих даних, зроблено висновки та написано текст статті.*

9. **Пушкарьова Н.О.** Вивчення особливостей введення в асептичну культуру та пагоноутворення *in vitro* деяких видів рослин, занесених до Червоної книги України / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова // Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень: матеріали Другої міжнародної науково-практичної конференції (смт Путила, 24 квітня 2015 р.). – 2015. – С. 228-232. *Особистий внесок здобувача: перевірено різні схеми поверхневої стерилізації насіння рідкісних видів рослин з використанням чотирьох стерилізуючих сполук та різним часом експозиції, проведено аналіз отриманих даних, зроблено висновки та написано текст статті.*

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

перевірено різні схеми поверхневої стерилізації насіння виду *Crambe tataria* з використанням чотирьох стерилізуючих сполук та різним часом експозиції, проведено аналіз отриманих даних, зроблено висновки та написано текст статті.

11. **Пушкарьова Н.О.** Особливості мікроклонального розмноження *in vitro* *Crambe tataria* Sebeok / **Н.О. Пушкарьова**, В.Б. Белокурова // “Біотехнологія: звершення та надії”: IV Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених (Київ, 21-22 травня 2015 р.). – 2015. *Особистий внесок здобувача: визначено умови прямої та непрямой регенерації пагонів із бічної бруньки Crambe tataria, проведено аналіз отриманих результатів та написано текст статті.*

12. **Pushkarova N.O.** Seed surface sterilization as the first step in establishing *Crambe aspera* M. Bieb aseptic culture / **N.O. Pushkarova**, V.V. Belokurova, M.V. Kuchuk // Ukrainian society of cell biology international conference “Advances in cell biology biotechnology” (Lviv, 11-13 October 2015). – 2015. *Особистий внесок здобувача: перевірено різні схеми поверхневої стерилізації насіння виду Crambe aspera з використанням чотирьох стерилізуючих сполук та різним часом експозиції, проведено аналіз отриманих даних, зроблено висновки та написано текст статті.*

13. **Пушкарьова Н.О.** Вміст біологічно активних сполук в рослинах роду *Crambe* // **Н.О. Пушкарьова**, М.В. Кучук // Молодь і поступ біології: збірник тез XII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (Львів, 19-21 квітня 2016 р.). – 2016. – С. 133-134. *Особистий внесок здобувача: отримано асептичну культуру рослин роду Crambe, проведено визначення антиоксидантної активності, вмісту загального розчинного білка, поліфруктанів та аналіз отриманих результатів, зроблено висновки та написано текст статті.*

14. **Пушкарьова Н.О.** Молекулярно-генетичний аналіз рослин *Crambe koktebelica* // О.А. Бондар, О.Р. Лахнеко, **Н.О. Пушкарьова** // Біотехнологія XXI століття: матеріали XI Всеукраїнської науково-практичної конференції (Київ, 21 квітня 2017 р.). – 2017. – С. 16. *Особистий внесок здобувача: отримано асептичну культуру рослин п'яти рідкісних видів роду Crambe та проведено аналіз отриманих результатів.*

АНОТАЦІЯ

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

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

У дисертаційній роботі показано оптимальну схему отримання асептичної культури рослин п'яти рідкісних видів – *Crambe koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*,

C. steveniana, *C. maritima*. Досліджено умови ініціації прямої та непрямой регенерації із пазушних бруньок та визначено їх морфогенний потенціал. Встановлено детермінованість трьох типів експлантів (частина кореня, листка та черешка) до певного типу морфогенезу та показано найвищу регенераційну здатність черешкових експлантів. Визначено оптимальний склад регуляторів росту для досягнення успішної регенерації пагонів *de novo* на трьох типах експлантів усіх досліджуваних видів. Рослини-регенеранти успішно укорінювали та адаптували до ґрунтових умов. За результатами порівняння біохімічних характеристик рослин, що культивували *in vitro* та *in vivo*, встановили, що зміни мають модифікаційний характер та викликані відмінністю умов культивування. Крім того, була показана відсутність змін генотипу внаслідок культивування *in vitro* для усіх досліджуваних видів, окрім *C. steveniana*, для якої встановлено генетичну поліморфність у асептичних зразках.

Ключові слова: *Crambe koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana*, *C. maritima*, біорізноманіття, культура *in vitro*, генетичний поліморфізм.

АННОТАЦІЯ

Пушкарёва Н.А. Разработка способов микрклонального размножения и изучение влияния культивирования *in vitro* на биохимические свойства и генетическую изменчивость редких видов рода *Crambe*. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.20 «Биотехнология». – Институт клеточной биологии и генетической инженерии, Национальная академия наук Украины, Киев, 2017.

В диссертации показано оптимальную схему получения асептической культуры растений пяти редких видов – *Crambe koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana*, *C. maritima*. Изучены пути инициации прямой и непрямой регенерации из пазушных почек и установлен их морфогенный потенциал. Установлена детерминированность трех типов эксплантов (часть корня, листа и черешка) к определенному типу морфогенеза вместе с наивысшим регенерационным потенциалом черешковых эксплантов. Определен оптимальный состав регуляторов роста, необходимый для успешной регенерации побегов *de novo* на трех типах эксплантов всех исследуемых видов. Растения-регенеранты успешно укореняли и адаптировали к условиям *in vivo*. Согласно результатам сравнения биохимических характеристик растений культивируемых *in vitro* и *in vivo* установили, что изменения носят модификационный характер и вызваны отличием условий культивирования. Кроме того, было показано отсутствие изменений генотипа в результате культивирования *in vitro* для всех исследуемых видов, кроме *C. steveniana*, для которого была установлена генетическая полиморфность в асептических образцах.

Ключевые слова: *Crambe koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana*, *C. maritima*, биоразнообразие, культура *in vitro*, генетический полиморфизм.

SUMMARY

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

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

Optimal protocols of aseptic plants culture establishment were shown for five endangered species – *Crambe koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana*, *C. maritima*. Ways of direct and indirect regeneration from lateral buds initiation were shown and its morphogenic potential was established. The highest rates of direct organogenesis were gained as a result of lateral bud cultivation on the medium containing 0.6 mg/L of BA for *C. aspera* and *C. steveniana*, 1 mg/L of kinetin for *C. koktebelica* and 1.5 mg/L of kinetin for *C. tataria*.

Different ways of morphogenesis on three types of explants (root, leaf and petiole) was shown for all studied species. Petiole’s highest regeneration potential was shown as well. Optimal growth regulators composition for successful *de novo* regeneration on three types of explants was established for all studied species. Regeneration from petiole and leaf explants was dependant on NAA concentration in the medium – cultivation of explants with 0.1-0.5 mg/L of NAA resulted in the higher propagation rates for all studied species. Petiole and leaf explants had the ability to form roots all over the explant. Also, leaves of all the studied species were more frequent to form roots on the medium with kinetin and NAA. Thus, for the studied *Crambe* species a determinacy of different explants for a certain type of morphogenesis was found: roots initialized callus tissue (more than 100 mm wide), leaves formed roots across the entire explant and petioles – plantlets. The highest propagation rates were noted for *C. maritima* (for all types of explants studied) and the lowest propagation rates – for *C. koktebelica*, though petiole explants are advisable for its microclonal multiplication.

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

The changes in biochemical properties of *in vitro* and *in vivo* cultured plants were shown to be due to the difference in the cultivation conditions. Also, no changes in the genotype following *in vitro* cultivation for all studied species except for *C. steveniana* (genetic polymorphism in aseptic plants of which was demonstrated) were shown. Therefore, biotechnology methods for conservation of five endangered *Crambe* species were established.

Key words: *Crambe koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana*, *C. maritima*, biodiversity, *in vitro* culture, genetic polymorphism.