

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
доцент Нипорко Олексій Юрійович
Протокол №____ засідання кафедри
від “ ____ ” _____ 2022 р.

КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO* *ASTRAGALUS DASYANTHUS* PALL.

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студентки спеціальності
091 «Біологія»
ОП «Біологія (високі технології)»
Нестеренко Марії Володимирівни

Науковий керівник:
доцент кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
к.б.н., доцент **Футорна Оксана Андріївна**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2022 р.

АНОТАЦІЯ

Нестеренко М.В. Культивування *in vitro* *Astragalus dasyanthus* Pall. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

Було випробувано культивування *Astragalus dasyanthus* Pall. *in vitro* на середовищах MS (Murashige and Skoog) і ½ MS без регуляторів росту. Для отримання стерильних проростків, насіння витримували в 70%-розчині етанолу (1 хв), у 0,1 %-розчині HgCl₂ (10 хв), 50 %-розчині «Білизна» (8 хв) та тричі промивали дистильованою водою (по 10 хв). Насіння *Astragalus* було розділено на 4 групи: 1 група – без обробки, 2 група – обробка 10 %-розчином янтарної кислоти, 3 група – обробка 10 %-розчином сульфатної кислоти, 4 група – механічною скарифікацією наждачним папером. Насіння з кожної групи висадили по 7 банок по 5 насінин на MS і по 7 банок по 5 насінин на ½ MS. Банки з висадженими на середовищі експлантами зберігали в культиваційній кімнаті з освітленням 16/8 годин та температурою 24±1°C.

Підрахунок вирощених експлантів проводили через 2 дні, 1 тиждень, 2 тижні, 3 тижні та через місяць після культивування. Було виявлено, що найбільший приріст експлантів спостерігається при обробці насіння механічним пошкодженням. Обробка 10 %-розчином янтарної кислоти та 10 %-розчином сульфатної кислоти, а також відсутність обробки не призводять до стрімкого росту експлантів. Через місяць після культивування на середовищах MS і ½ MS спостерігалися побіління *Astragalus*, хлороз листя, побуріння кореня та поживного середовища, що пов'язано з виділенням та накопиченням фенольних сполук. Це свідчить про те, що середовища MS і ½ MS не є оптимальними для тривалого культивування рослини. В подальшому буде продовжуватися підбір поживних середовищ для культивування *Astragalus in vitro*.

Ключові слова: *Astragalus dasyanthus*, поживне середовище, *in vitro*

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Біологічні особливості виду та цінність рослинної сировини <i>Astragalus dasyanthus</i> Pall.....	6
1.2. Режим збереження популяцій та заходи з охорони видів роду <i>Astragalus</i>	7
1.3. Культивування <i>Astragalus in vitro</i>	8
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	13
2.1. Приготування поживного середовища.....	13
2.2. Обробка насіння та культивування <i>in vitro</i>	13
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	15
3.1. Стан експлантів після культивування.....	15
3.2. Підбір оптимальних середовищ.....	24
ВИСНОВКИ.....	26
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	27
ДОДАТКИ.....	32

ВСТУП

Інтродукція *Astragalus dasyanthus* Pall. (*Fabaceae*) в ботанічних садах і його реінтродукція в природні та штучні фітоценози, відновлення природної рослинності на антропогенно трансформованих територіях сприятимуть збереженню даного виду. Рослини здатні синтезувати та накопичувати різноманітні речовини, що виявляють біологічну активність та мають фармакологічне значення. Ідентифікація цих речовин, встановлення структури та специфіки біологічної дії призвели до того, що в останні десятиліття для лікування та профілактики різних захворювань все ширше використовуються лікарські засоби на основі рослинної сировини. Наприклад, при лікуванні серцево-судинних та онкологічних захворювань препарати, одержані з рослин, складають близько 50%. При цьому в медицині використовуються близько 3000 видів рослин, з них більше 100 спеціально вирощуються, інші зростають в своїх природних місцезростаннях [1]. Тому природні запаси рослинних лікарських ресурсів швидко зникають, під загрозою зникнення потрапляють види, які є цінними в фармакологічному відношенні. У зв'язку з цим стає актуальним пошук альтернативних джерел сировини для фармакології. В останні роки в якості такого альтернативного джерела розглядають рослинну біомасу (калюсну або суспензійну культуру), вирощуючи в умовах контрольованого експерименту *in vitro*. Заміна природної лікарської сировини на гарантовано одержувану біомасу є одним із радикальних способів, що дозволяє зберегти ресурси зникаючих видів лікарських рослин. Астрагал шерстистоквітковий (*Astragalus dasyanthus* Pall.) – цінна лікарська рослина, зростає в Україні. Колись широко поширений вид сьогодні занесено в Червону книгу України, Європейський Червоний список і Червоний список Міжнародного Союзу охорони природи [2, с. 438]. Усі частини рослин містять тритерпенові глікозиди, флавоноїди, полісахариди, сполуки заліза, кальцію, алюмінію, магнію, стронцію, молібдену, ванадію, марганцю, натрію, кремнію, фосфору, барію. У науковій медицині настої *A. dasyanthus* призначають при

гіпертонії, хронічної серцевій недостатності, набряках різного походження [1]. Оскільки природні ресурси *A. dasyanthus* досить обмежені, актуальним є розробка прийомів отримання біомаси даного виду.

Об'єкт дослідження – насіння *Astragalus dasyanthus* Pall.

Предмет дослідження – ріст і розвиток *A. dasyanthus* в умовах *in vitro* за різного способу обробки насіння.

Мета роботи – дослідити вплив різних способів обробки насіння на ріст і розвиток *A. dasyanthus* Pall. в умовах *in vitro*.

Завдання роботи:

підібрати метод обробки насіння *A. dasyanthus* для культивування *in vitro*;

дослідити схожість насіння *A. dasyanthus* в залежності від способу обробки;

підібрати оптимальний склад поживного середовища Мурасіге-Скуга для культивування *A. dasyanthus*;

дослідити динаміку росту експлантів *A. dasyanthus* за різної обробки насіння в умовах *in vitro*;

з'ясувати проблеми культивування *A. dasyanthus* в умовах *in vitro*.

Робота містить 29 додатків, які надають додаткову інформацію за темою дослідження.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічні особливості виду та цінність рослинної сировини

Astragalus dasyanthus Pall.

Astragalus dasyanthus Pall. належить до роду *Astragalus* родини *Fabaceae*. Зустрічається на півдні Центральної та Східної Європи, на Балканах, у Передкавказзі, в лісостеповій і степовій зоні України [2, с. 438].

Наводимо узагальнену біолого-екологічну характеристику виду та його природоохоронний статус на основі даних з Червоної книги України 2009 року видання.

Життєва форма – багаторічна трав'яна рослина; гемікриптофіт, 10 – 40 см заввишки, безстеблова або з розвиненим стеблом рослина, густо опушена довгими м'якими волосками. Листки 10 – 20 см завдовжки, непарно-пірчасті, з 21 – 37 листочків; листочки довгасто-яйцеподібні або овальні. Квітки яскраво-жовті, зібрані в щільні, головчасті суцвіття, квітконоси відстовбурчено волосисті, не перевищують листків (додаток А). На території України цвітіння – у червні-серпні, плодоношення – у липні-серпні. Розмноження відбувається насінням. Біб до 1 см завдовжки, волохатий, яйцеподібний. *A. dasyanthus* є ксерофітом. Зростає *A. dasyanthus* переважно на степових схилах балкових систем та долин річок, в заростях степових чагарників, узліссі та галявинах байрачних лісів [2, с. 438].

Види роду *Astragalus* мають великий потенціал для озеленення посушливих міст, оскільки вони дуже стійкі до посухи і ростуть на землях, які отримують менше 400 мм опадів на рік і виробництва високоякісних кормів, які можуть бути використані для створення пасовищ та штучних луків. Види роду *Astragalus* також мають високу економічну цінність для виробництва трагакантової камеді, яка використовується як емульгатор, стабілізатор і

загусник у фармацевтиці та харчових продуктах. Вони також важливі для боротьби з ерозією через їхню стрижневу кореневу систему [3-9].

Рослини роду *Astragalus* є цінною лікарською сировиною та використовуються в медицині та фармацевтичній промисловості. Лікарська сировина містить тритерпенові глікозиди, флавоноїди, полісахариди, сполуки заліза, кальцію, алюмінію, магнію, стронцію, молібдену, ванадію, марганцю, натрію, кремнію, фосфору, барію, селену, циклоартанові геніни та глікозиди, природні антиоксиданти, токоферол. *Astragalus* має судинорозширювальну, імуностимулюючу, гепатопротекторну, гіпохолестеринемічну, антиперспірантну, протівірусну та протидіабетичну властивості. Має здатність уповільнювати процеси старіння, інгібувати процеси окислення ліпідів, виявляти седативну, цитотоксичну, антиоксидантну, антибактеріальну, протипухлинну та протизапальну активності [1, 3, 4, 10-19, 24].

1.2. Режим збереження популяцій та заходи з охорони видів роду *Astragalus*

Вид занесений до Європейського червоного списку та Червоного списку МСОП. Природне збереження видів роду *Astragalus* ускладнене через низьку насіннєву продуктивність. Це зумовлено ускладненим природним проростанням насіння через тверду насіннєву оболонку, великою мінливістю всередині популяції або між популяціями (до прикладу, різні форми суцвіть і стебел, різноманітні кольори віночків, несинхронізоване цвітіння), перехресним запиленням всередині рослини або між рослинами та тривалим періодом росту [20, 21, 35].

Природні ресурси *A. dasyanthus* виснажуються з кожним роком через значну антропогенну діяльність. Розорювання степових ділянок, випасання худоби, посилений збір рослин як лікарської сировини – це все призводить до

зменшення чисельності виду та виснаження рослинних ресурсів. *A. dasyanthus* занесений до Червоної книги України, Європейського червоного списку та Червоного списку Міжнародного союзу охорони природи. У Червоній книзі України природоохоронний статус виду визначено як вразливий – такий, що у найближчому майбутньому може бути віднесений до категорії зникаючих, якщо триватиме дія факторів, які негативно впливають на стан їх популяцій [2, с. 5, 438].

Методи збереження рослин *ex situ* та *in situ* є актуальними на сьогоднішній день через великий ризик вимирання рослин та втрати їхньої генетичної мінливості. Але через деградацію природнього середовища існування розвиток збереження *in situ* ускладнений, тому метод *ex situ* є дієвим методом збереження виду. Методи збереження *ex situ* полягають у зборі відібраних або репрезентативних зразків генетичного різноманіття кожного виду та зберіганні їх поза природними умовами середовища виду. З цією метою ботанічними садами та спеціальними установами здійснюється зберігання банків насіння, польових генних банків, культури тканин і клітин, кріоконсервація рослин, що перебувають під загрозою зникнення [25, 35]. В Україні види *Astragalus* зберігаються у колекціях Криворізького (*Astragalus cretophilus*, *Astragalus odessanus*) та Донецького (*A. cretophilus*) ботанічних садів НАН України, в Ботанічному саду ім. акад. О.В. Фоміна (*A. cretophilus* та *A. odessanus*) [22].

1.3. Культивування *Astragalus in vitro*

Крім вище вказаних методів збереження рослин *ex situ*, методи біотехнології рослин можуть бути використаними для вирішення проблеми збереження генофонду, а саме метод мікроклонального розмноження рослин в умовах *in vitro*. Переваги цього методу, порівняно з ускладненим насіннєвим або вегетативним розмноженням, полягає у високому коефіцієнті

розмноження та у позбавленні рослинного матеріалу від вірусних, бактеріальних та грибних інфекцій [13].

Проте головний недолік культивування рослин *in vitro* полягає у високому рівні соматональних варіацій під час тривалих періодів культивування. Причинами варіацій є генотип, джерело експланту, тип культивування та час культивування *in vitro*. Основою генетичних та епігенетичних варіацій є цитологічні аномалії, зміна послідовності ДНК, активація генів або приглушення генів. Епігенетичні зміни можуть також включати цитогенетичну нестабільність через модифікацію гетерохроматину, що викликає фенотипічні варіації через модуляцію функції гена. Епігенетичний контроль експресії генів можна визначити як соматично або мейотично спадкову зміну експресії генів, яка є потенційно оборотною і не зумовлена модифікацією послідовності ДНК. Для дослідження та виявлення генетичної варіації між двома типами калюсів *Astragalus chrysochlorus* проведено RADP (випадково ампліфікований поліморфний аналіз ДНК), виміряно рівні транскрипту РНК для двох ключових ензимів важливого фенілпропанового шляху, PAL (фенілаланінаміакліази) і С4Н (циннамат-4-гідроксилази), за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції [10, 28, 29].

На основі отриманих даних різних авторів, можна стверджувати, що багато видів роду *Astragalus* є важливими об'єктами досліджень з культивування *in vitro*.

Наприклад, було проведено багато досліджень регенерації рослин *Astragalus adsurgens*, *Astragalus sinicus*, *Astragalus cicer*, *Astragalus melilotoides*, *Astragalus polemoniicus*, *Astragalus chrysochlorus*, *Astragalus racemosus*, *Astragalus canadensis* та *Astragalus nezaketae* [11, 21, 28, 29].

Для дослідження культур тканин використовують гіпокотиль, епикотиль, листок сім'ядолі, стовбуровий вузол та експланти листя. Найчастіше для отримання експлантів висаджують насіння на поживне середовище MS (Murashige and Skoog) без регуляторів росту, яке містить вітаміни, макро- та

мікроелементи, сахарозу та агар. Насіння попередньо обробляють розчином сульфатної кислоти або механічною скарифікацією для підвищення схожості. Через деякий час пророщені експланти використовуються для отримання гіпокотилу, епикотилу, листка сім'ядолі, стовбурового вузла та експлантів листя, з подальшим культивуванням на середовищі MS з додаванням регуляторів росту для індукції калюсу та регенерації пагонів [31]. Регулятори росту, які додають для регенерації пагонів: а-нафтилоцтова кислота (NAA) в поєднанні з цитокінін 6-бензиламінопурином (BA) і цитокініноподібним N-(2-хлор-4-піридил)-N'-фенілсечовиною (CPPU) – для індукції сходів *Se-*гіперакумулятора *A. racemosus* та неаккумулятора *A. canadensis*; TDZ (тідіазурон) – для утворення калюсу та регенерацію пагонів з експлантів листків і черешків *A. cariensis*; 2,4-D (2,4-дихлорфеноксоцтова кислота), BA (6-бензиламінопурин), кінетин та аскорбінова кислота – для одержання калюсних культур *A. dasyanthus* [1, 6, 11].

Рослини, регенеровані шляхом мікророзмноження, в подальшому використовуються для виявлення вторинних метаболітів, які можуть бути необхідними для виготовлення лікарських препаратів.

За допомогою НРТЛС (високоєфективної тонкошарової хроматографії) проведено метаболічний аналіз для дослідження вмісту сполук флавоноїдного типу у калюсі *A. chrysochlorus*, а також проведено одновимірну НРТЛС для швидкого та чутливого скринінгу аномалій фенольних компонентів [10].

Здійснено дослідження фенольного складу, антибактеріальних та антиоксидантних властивостей регенерованого *in vitro* та вирощеного в польових умовах *Astragalus gymnolobus*. Метанольні екстракти з листя *A. gymnolobus*, вирощених у польових умовах та *in vitro*, досліджували на наявність кумарину, апігеніну, кавової кислоти, рутину, кверцетину, глюкозиду лютеоліну-7-О-β-D та мірицетину. Виявлено, що екстракт має антибактеріальну активність проти *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* та *Streptococcus pyogenes*. Антиоксидантну активність

метанольних екстрактів листя *A. gymnolobus* було визначено за активністю поглинання вільних радикалів, вмістом загального фенолу та флавоноїдів [4].

За допомогою HPLC (високоєфективної рідинної хроматографії) та TLC (тонкошарової хроматографії) виділено флавоноїди у культурі клітин *Astragalus missouriensis*. Основним ідентифікованим агліконом був кверцетин як у вільній, так і у зв'язаній формі (як глікозиди). Ізокверцитрин (кверцетин-3-0-глюкозид) і кверцитрин (кверцетин-3-0-рамнозид) були основними флавоноїдними глікозидами у всіх досліджених клітинних лініях. Виявлено також рутин (кверцетин-3-0-рутинозид), гіперозид (кверцетин-3-0-галактозид), скополетин і фенолкарбонову кислоти – р-кумарову та хлорогенову. Встановлено, що кверцетин проявляє антипроліферативну дію проти різних ліній ракових клітин та пригнічує проліферацію клітин раку шлунка та товстої кишки. Також антипроліферативну та цитотоксичну властивості мають сапоніни, отримані з культур клітин *Astragalus glycyphyllos* за допомогою методу LC-MS (рідинної хроматографії-мас-спектрометрії). В ході перевірки на цитотоксичність на панелі різних злоякісних клітин людини та визначення значення половини максимальної інгібуючої концентрації (IC_{50}), виявлено, що багаті сапонінами фракції показали високу ефективність проти клітин раку сечового міхура [12, 15].

Шляхом хроматографії на TLC досліджено вміст тритерпенових глікозидів в корінні рослини *Astragalus babatagi* у різних системах розчинників. Ці сполуки підвищують енергетичний потенціал міокарда, сприяють інгібуванню процесів перекисного окиснення ліпідів, стабілізують антиоксидантну та NO-ергічну системи [37].

Таким чином, за літературними джерелами з'ясовано:

A. dasyanthus Pall. поширений на півдні Центральної та Східної Європи, на Балканах, у Передкавказзі, в лісостеповій і степовій зоні України;

A. dasyanthus є ксерофітом та зростає на степових схилах балкових систем та долин річок, заростях степових чагарників, узліссях та галявинах байрачних лісів;

природоохоронний статус *A. dasyanthus* в Україні визначено як вразливий, вид занесений до Червоної книги України, Європейського червоного списку та Червоного списку Міжнародного союзу охорони природи;

A. dasyanthus використовують в текстильній промисловості, для озеленення міст, боротьби з ерозією, виробництва кормів та камеді трагаканта, а також в медицині та у виробництві лікарських засобів;

репродуктивні можливості *A. dasyanthus* обмежені через низьку насінневу продуктивність виду;

чисельність виду зменшується та природні ресурси *A. dasyanthus* виснажуються з кожним роком через значну антропогенну діяльність;

для збереження виду застосовують різноманітні методи, серед них і метод мікророзмноження рослин в умовах *in vitro*, перевага якого полягає у високому коефіцієнті розмноження та отриманні матеріалу, позбавленого від вірусних, бактеріальних та грибкових інфекцій;

метод культивування рослин в умовах *in vitro* може в подальшому використаний для дослідження та одержання сполук, які можуть бути використані для виробництва лікарських препаратів.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Приготування поживного середовища

Для приготування 4 л середовища $\frac{1}{2}$ MS взяли: 200 мл макросолей, 2 мл мікросолей, 10 мл FeEDTA ((етилендінітрило)тетраацетатоферрату), 80 г сахарози, 400 мг мезо-інозиту, 2 мл вітаміну B₁, 2 мл вітаміну B₆, 2 мл вітаміну PP, 32 г агару. Наважку агару розчинили у 2 л води і поставили на 20 хв у сушильну шафу розчинятися. Для приготування 4 л середовища в стакан налили 1 л дистилляту і додали точно відмірену кількість розчинів макро- і мікросолей, Fe-хелат і вітамінів. Зважили потрібну кількість мезо-інозиту і цукрози. Після додавання у середовище всіх компонентів додали воду до потрібного об'єму (2 л) і довели рН до 5,6 за допомогою 2 мл 0,1N КОН. Додали розчинений агар до розчину з солями та трішки охолодили. Розлили тепле середовище у банки (80 шт., по 2 см) і закрили кришками, не закручуючи їх. Простерилізували середовище та воду в автоклаві при тиску 1 атм. (температура 115-120°C), протягом 15-20 хвилин (після прогріву автоклаву) [22].

2.2. Обробка насіння та культивування *in vitro*

Використали насіння *A. dasyanthus* Pall. «Фаворит» 2020 року збору. Відраховували насіння в 4 мішечки по 40 насінин. Обробили насіння і підписали олівцем групу за типом обробки: 1 група – без обробки; 2 група – обробка розчином янтарної кислоти 10 % 10 мг в 10 мл води; 3 група – обробка розчином сульфатної кислоти 10 %; 4 група – механічне пошкодження наждачним папером [31]. Насіння в стерильних умовах помістили у 70% етанолу на 1 хв [32]. Стерильним пінцетом перенесли мішечки з насінинами у

стерилізуючий розчин HgCl_2 (сулема) 0,1 % і витримали протягом 10 хвилин [33]. Потім насіння промили у стерильній дистильованій воді протягом 10 хвилин. Стерильним пінцетом перенесли мішечки з насінинами у стерилізуючий розчин «Білизна» 50 % і витримали протягом 8 хвилин. Стерильним пінцетом перенесли мішечки із банки з останнім стерилізуючим розчином у банку із стерильною дистильованою водою і двічі промили стерильною дистильованою водою по 10 хвилин.

Мішечки з промитим насінням стерильним пінцетом перенесли на стерильний фільтрувальний папір, щоб забрати надлишок води (перед кожною маніпуляцією інструменти обробляли в спирті та обпалювали в полум'ї спиртівки).

Стерильним пінцетом перенесли насінини на поживне середовище у банки. Відкрили банку, стерильним пінцетом помістили насінину на середовище, обпалили горло банки і кришку у полум'ї спиртівки, після чого закрили банку. Висадили насіння з кожного мішечка по 7 банок по 5 насінин на MS і по 7 банок по 5 насінин на $\frac{1}{2}$ MS. Підписали банки.

Банки з експлантами, висадженими на середовище, перенесли в культивуваційну кімнату з освітленням 16/8 годин та температурою 24 ± 1 °C.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Стан експлантів після культивування

Підрахунок вирощених експлантів було проведено через 2 дні, 1 тиждень, 2 тижні, 3 тижні та через місяць після культивування. Графічну та статистичну обробку даних здійснено за допомогою програмного пакета Origin 8.0.

Кількість пророслих експлантів *A. dasyanthus* на середовищі MS без обробки насіння: через 2 дні після культивування – 0 експлантів; через тиждень – 10 експлантів; через 2 тижні – 10 експлантів; через 3 тижні – 11 експлантів; через місяць – 14 експлантів.

Кількість пророслих експлантів *A. dasyanthus* на середовищі $\frac{1}{2}$ MS без обробки насіння: через 2 дні після культивування – 2 експланти; через тиждень – 4 експланти; через 2 тижні – 6 експлантів; через 3 тижні – 7 експлантів; через місяць – 8 експлантів.

Кількість пророслих експлантів *A. dasyanthus* на середовищі MS з обробкою насіння 10 %-розчином янтарної кислоти: через 2 дні після культивування – 0 експлантів; через тиждень – 2 експланти; через 2 тижні – 4 експланти; через 3 тижні – 6 експлантів; через місяць – 7 експлантів.

Кількість пророслих експлантів *A. dasyanthus* на середовищі $\frac{1}{2}$ MS з обробкою насіння 10 %-розчином янтарної кислоти: через 2 дні після культивування – 1 експлант; через тиждень – 5 експлантів; через 2 тижні – 8 експлантів; через 3 тижні – 9 експлантів; через місяць – 10 експлантів.

Кількість пророслих експлантів *A. dasyanthus* на середовищі MS з обробкою насіння 10 %-розчином сульфатної кислоти: через 2 дні після культивування – 2 експланти; через тиждень – 5 експлантів; через 2 тижні – 9 експлантів; через 3 тижні – 11 експлантів; через місяць – 12 експлантів.

Кількість пророслих експлантів *A. dasyanthus* на середовищі $\frac{1}{2}$ MS з обробкою насіння 10 %-розчином сульфатної кислоти: через 2 дні після культивування – 3 експланти; через тиждень – 4 експланти; через 2 тижні – 6 експлантів; через 3 тижні – 6 експлантів; через місяць – 7 експлантів.

Кількість пророслих експлантів *A. dasyanthus* на середовищі $\frac{1}{2}$ MS з обробкою насіння механічним пошкодженням: через 2 дні після культивування – 13 експлантів; через тиждень – 19 експлантів; через 2 тижні – 20 експлантів; через 3 тижні – 20 експлантів; через місяць – 20 експлантів.

Кількість пророслих експлантів *A. dasyanthus* на середовищі MS з обробкою насіння механічним пошкодженням: через 2 дні після культивування – 7 експлантів; через тиждень – 17 експлантів; через 2 тижні – 21 експлантів; через 3 тижні – 22 експлантів; через місяць – 22 експлантів.

За отриманими даними визначали показники схожості насіння (рис. 3.1) за формулою:

Показник схожості = (кількість пророслих експлантів \div загальна кількість насіння) \times 100 %.

Було встановлено, що:

- показники схожості насіння без обробки (контроль), вирощеного на середовищі MS: через 2 дні після культивування – 0 %; через тиждень – 25 %; через 2 тижні – 25 %; через 3 тижні – 27,5 %; через місяць – 35 %;

- показники схожості насіння без обробки (контроль), вирощеного на середовищі $\frac{1}{2}$ MS: через 2 дні після культивування – 5,7 %; через тиждень – 11,4 %; через 2 тижні – 17,14 %; через 3 тижні – 20 %; через місяць – 22,9 %;

- показники схожості насіння з обробкою 10 %-розчином янтарної кислоти, вирощеного на середовищі MS: через 2 дні після культивування – 0 %; через тиждень – 5,7 %; через 2 тижні – 11,4 %; через 3 тижні – 17,14 %; через місяць – 20 %;

- показники схожості насіння з обробкою 10 %-розчином янтарної кислоти, вирощеного на середовищі $\frac{1}{2}$ MS: через 2 дні після культивування –

2,9 %; через тиждень – 14,3 %; через 2 тижні – 22,9 %; через 3 тижні – 25,7 %; через місяць – 28,5 %;

- показники схожості насіння з обробкою 10 %-розчином сульфатної кислоти, вирощеного на середовищі MS: через 2 дні після культивування – 6,6 %; через тиждень – 16,6 %; через 2 тижні – 30 %; через 3 тижні – 36,6 %; через місяць – 40 %;

- показники схожості насіння з обробкою 10 %-розчином сульфатної кислоти, вирощеного на середовищі $\frac{1}{2}$ MS: через 2 дні після культивування – 8,5 %; через тиждень – 11,4 %; через 2 тижні – 17,14 %; через 3 тижні – 17,14 %; через місяць – 20 %;

- показники схожості насіння з обробкою механічною скарифікацією, вирощеного на середовищі $\frac{1}{2}$ MS: через 2 дні після культивування – 37,14 %; через тиждень – 54,3 %; через 2 тижні – 57,14 %; через 3 тижні – 57,14 %; через місяць – 57,14 %;

- показники схожості насіння з обробкою механічною скарифікацією, вирощеного на середовищі MS: через 2 дні після культивування – 20 %; через тиждень – 48,5 %; через 2 тижні – 60 %; через 3 тижні – 62,9 %; через місяць – 62,9 %.

Встановлено, найбільші показники схожості були за механічної скарифікації насіння і становили 57-62%, тоді як найменші – за обробки 10 %-розчином янтарної кислоти (20 %), та 10 %-розчином сульфатної кислоти (20 %).

Низькі показники схожості насіння без обробки, з обробкою 10 %-розчином янтарної кислоти та 10 %-розчином сульфатної кислоти зумовлені тим, що насінню без обробки важко проростати через його тверді оболонки, а малі концентрації сульфатної та янтарної кислоти не роблять оболонку насіння більш проникною для води та кисню. Згідно з літературними джерелами, лише при 40 % розчині сульфатної кислоти спостерігається вихід насіння зі стану спокою та максимальна схожість насіння астрагалу [34]. Обробка насіння механічною скарифікацією є найкращою для звільнення насіння від спокою та

підвищення схожості насіння. Це підтверджується у роботах з надрізання оболонки насіння у *Astragalus polemoniicus* та *Astragalus cariensis* – при механічній скарифікації шляхом надрізу оболонки насіння скальпелем схожість насіння різко зростає [35, 36].

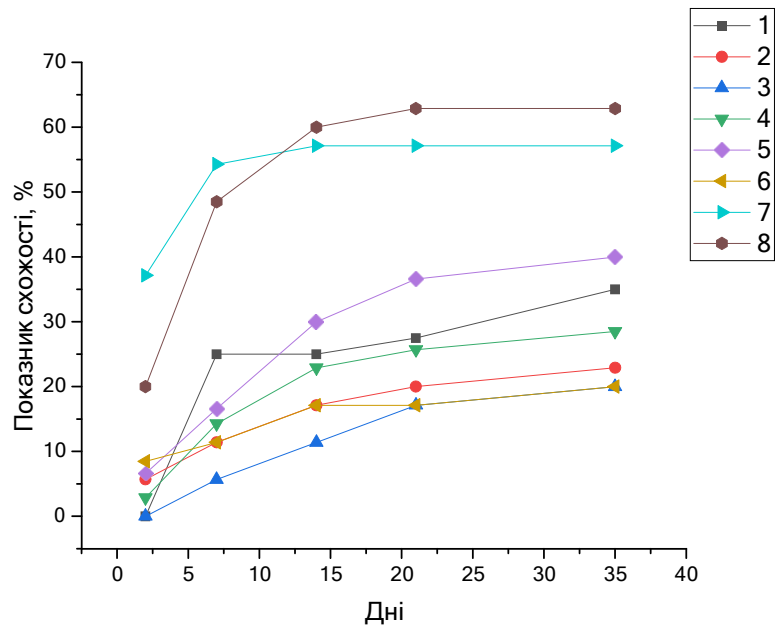


Рис. 3.1. Показник схожості насіння *Astragalus dasyanthus*. 1 – середовище MS, без обробки насіння; 2 – середовище $\frac{1}{2}$ MS, без обробки насіння; 3 – середовище MS, обробка насіння 10 %-розчином янтарної кислоти; 4 – середовище $\frac{1}{2}$ MS, обробка насіння 10 %-розчином янтарної кислоти; 5 – середовище MS, обробка насіння 10 %-розчином сульфатної кислоти; 6 – середовище $\frac{1}{2}$ MS, обробка насіння 10 %-розчином сульфатної кислоти; 7 – середовище $\frac{1}{2}$ MS, обробка насіння механічною скарифікацією; 8 – середовище MS, обробка насіння механічною скарифікацією

На сьомий день після культивування насіння вже проросло (рис. 3.2, додаток Б, додаток В, додаток Г, додаток Д, додаток Е, додаток Є, додаток Ж). Якісні показники росту та розвитку експлантів *A. dasyanthus* на сьому добу культивування представлені в табл. 3.1.

Таблиця 3.1.

**Якісні показники росту та розвитку експлантів *Astragalus dasyanthus* Pall.
на 7 день культивування**

Контроль	Янтарна кислота	Сульфатна кислота	Механічна скарифікація
MS			
поява первинного кореня	-	поява первинного кореня	поява первинного кореня
розпрямляється гіпокотиль	-	розпрямляється гіпокотиль	розпрямляється гіпокотиль
сім'ядолі	-	сім'ядолі	сім'ядолі
1/2 MS			
поява первинного кореня	Поява первинного кореня	поява первинного кореня	поява первинного кореня
розпрямляється гіпокотиль		розпрямляється гіпокотиль	розпрямляється гіпокотиль
сім'ядолі		сім'ядолі	сім'ядолі



Рис. 3.2. Експланти *Astragalus dasyanthus* через тиждень після культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS, насіння без обробки

На 14 добу спостерігається поява епикотилу, стебла, вузлів та листя.
(рис. 3.3, додаток З, додаток И, додаток I, додаток Ї, додаток Й, додаток К,

додаток Л). Якісні показники росту та розвитку експлантів *A. dasyanthus* на 14 день культивування представлені в табл. 3.2.

Таблиця 3.2.

Якісні показники росту та розвитку експлантів *Astragalus dasyanthus* Pall. на 14 день культивування

Контроль	Янтарна кислота	Сульфатна кислота	Механічна скарифікація
MS			
Поява епикотилію, стебла, вузлів та листя.	поява первинного кореня	Поява епикотилію, стебла, вузлів та листя.	Поява епикотилію, стебла, вузлів та листя.
Кількість листків 5 листків на експлант	розпрямлюється гіпокотиль	Кількість листків $5,5 \pm 0,7$ листків на експлант	Кількість листків $5,5 \pm 0,7$ листків на експлант
	сім'ядолі		
1/2 MS			
Поява епикотилію, стебла, вузлів та листя.	поява первинного кореня	Поява епикотилію, стебла, вузлів та листя.	Поява епикотилію, стебла, вузлів та листя.
Кількість листків $4,5 \pm 0,7$ листків на експлант	розпрямлюється гіпокотиль	Кількість листків 5 листків на експлант	Кількість листків $3,75 \pm 0,5$ листків на експлант
	сім'ядолі		



Рис. 3.3. Експланти *Astragalus dasyanthus* через 2 тижні після культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS, обробка насіння 10 %-розчином сульфатної кислоти

Якісні показники росту та розвитку експлантів *A. dasyanthus* на 21 добу (рис. 3.4., додаток М, додаток Н, додаток О, додаток П, додаток Р, додаток С, додаток Т) представлені в табл. 3.3.



Рис. 3.4. Експланти *Astragalus dasyanthus* через 3 тижні після культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS, обробка насіння механічною скарифікацією

Таблиця 3.3.

Якісні показники росту та розвитку експлантів *Astragalus dasyanthus* Pall. на 21 день культивування

Контроль	Янтарна кислота	Сульфатна кислота	Механічна скарифікація
MS			
Формування пагонів першого порядку	Формування пагонів першого порядку	Формування пагонів першого порядку	Формування пагонів першого порядку
Збільшення кількості справжніх листків	Збільшення кількості справжніх листків	Збільшення кількості справжніх листків	Збільшення кількості справжніх листків
Кількість листків $5,125 \pm 0,6$ листків на експлант	Кількість листків 5 листків на експлант	Кількість листків $5,57 \pm 1,13$ листків на експлант	Кількість листків $6,5 \pm 0,7$ листків на експлант
$\frac{1}{2}$ MS			

Формування пагонів першого порядку	Формування пагонів першого порядку	Формування пагонів першого порядку	Формування пагонів першого порядку
Збільшення кількості справжніх листків	Збільшення кількості справжніх листків	Збільшення кількості справжніх листків	Збільшення кількості справжніх листків
Кількість листків $6,6 \pm 3,5$ листків на експлант	Кількість листків $5,5 \pm 0,7$ листків на експлант	Кількість листків $5,57 \pm 1,13$ листків на експлант	Кількість листків $7,14 \pm 3,5$ листків на експлант

Якісні показники росту та розвитку експлантів *A. dasyanthus* через місяць (рис. 3.5., додаток У, додаток Ф, додаток Х, додаток Ц, додаток Ч, додаток Ш, додаток Щ) представлені в табл. 3.4.

Таблиця 3.4.

Якісні показники росту та розвитку експлантів *Astragalus dasyanthus* Pall. через місяць

Контроль	Янтарна кислота	Сульфатна кислота	Механічна скарифікація
MS			
Формування пагонів першого і другого порядку	Формування пагонів першого і другого порядку	Формування пагонів першого і другого порядку	Формування пагонів першого і другого порядку
Збільшення кількості справжніх листків	Збільшення кількості справжніх листків	Збільшення кількості справжніх листків	Збільшення кількості справжніх листків
Нарощення біомаси рослини	Нарощення біомаси рослини	Нарощення біомаси рослини	Нарощення біомаси рослини
Видовження пагонів	Видовження пагонів	Видовження пагонів	Видовження пагонів
Кількість листків $13,5 \pm 5,4$ листків на експлант	Кількість листків 6 листків на експлант	Кількість листків $12 \pm 3,5$ листків на експлант	Кількість листків $11 \pm 3,5$ листків на експлант
1/2 MS			

Формування пагонів першого і другого порядку	Формування пагонів першого і другого порядку	Формування пагонів першого і другого порядку	Формування пагонів першого і другого порядку
Збільшення кількості справжніх листків	Збільшення кількості справжніх листків	Збільшення кількості справжніх листків	Збільшення кількості справжніх листків
Нарощення біомаси рослини	Нарощення біомаси рослини	Нарощення біомаси рослини	Нарощення біомаси рослини
Видовження пагонів	Видовження пагонів	Видовження пагонів	Видовження пагонів
Кількість листків $9,6 \pm 2,8$ листків на експлант	Кількість листків $8 \pm 2,9$ листків на експлант	Кількість листків $13,6 \pm 4$ листків на експлант	Кількість листків $11,75 \pm 2,75$ листків на експлант

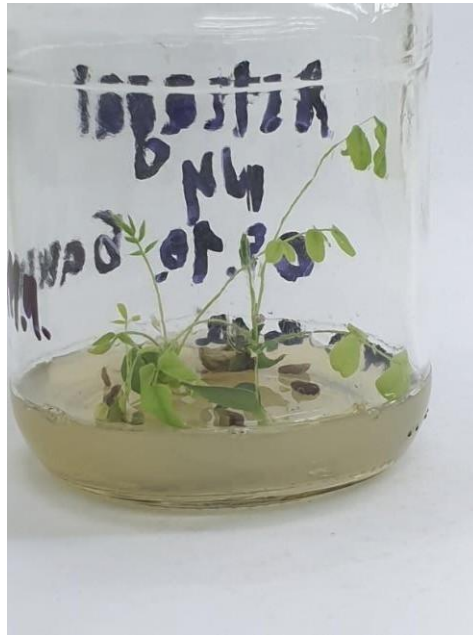


Рис. 3.5. Експланти *Astragalus dasyanthus* через місяць після культивування на середовищі MS, обробка насіння механічною скарифікацією

Встановлено, що при тривалому культивуванні *A. dasyanthus* в умовах *in vitro* спостерігається хлороз, побуріння коренів, що свідчить про виділення та накопичення поліфенольних сполук у середовищі. У дослідженні Закірової з культивування виду *Astragalus babatagi* на поживному середовищі MS вказано, що до кінця 4 тижня калюси набували темно-коричневого кольору.

Після 3 тижня культивування сповільнювалося зростання калюсів, крім того, до кінця 4-го тижня поживне середовище навколо калюсів набувало коричневого кольору, що свідчило про виділення та накопичення поліфенольних сполук у середовищі, внаслідок чого на 30-35-й день калюси гинули. [37]. У дослідженні Чакір з культивування клітинних суспензій *Astragalus chrysochlorus* вказано, що відбувається пригнічення росту клітин, і разом з цим клітини забарвлені в бордово-червоний колір. Вважається, що речовини, які відповідають за бордово-червоний колір, можуть відповідати фенольним сполукам [3, 38].

У дослідженні То з культивування виду *A. dasyanthus* на середовищі MS і ½ MS вказано, що при культивуванні на середовищі ½ MS спостерігалось значне побіління астрагалу та загибель декількох проростків, на середовищі MS при тривалому культивуванні рослини з часом починають біліти [39].

3.2. Підбір оптимальних середовищ

Результати дослідження показали, що середовища MS і ½ MS не підходять для тривалого культивування *A. dasyanthus*. В такому випадку постає питання оптимізації умов культивування шляхом підбору інших поживних середовищ. Наводимо різні варіанти поживних середовищ, які можуть бути використані в подальших дослідженнях, їхній вплив на ростові процеси та вміст вторинних метаболітів на основі даних різних авторів.

Крім культивування на середовищі MS і ½ MS також відомо про культивування *A. dasyanthus* на середовищі Гамборга (B5) з додаванням 0,5 мг/л ІМК (індоліл-3-масляної кислоти). В порівнянні з культивуванням на середовищі MS і ½ MS, при якому спостерігалось побіління рослин та пригнічення росту, при культивуванні на середовищі Гамборга (з додаванням 0,5 мг/л ІМК) спостерігався інтенсивний ріст [39]. Проте є випадок, де

середовища B5 і GD (Gresshoff and Doy) викликали пожовтіння, а середовище MS показало найбільше збільшення довжини пагонів [40].

При використанні середовищ SH (Schenk and Hildebrandt), B5, $\frac{1}{2}$ SH, $\frac{1}{2}$ B5 було виявлено усі типи астрагалозидів, а при використанні середовищ MS і $\frac{1}{2}$ MS знайдено астрагалозид I, II і III, але не було виявлено жодних астрагалозидів IV. Проте зазначено, що на середовищі B5 було отримано найменшу біомасу волосистого кореня астрагалу, а найбільшу - на середовищі SH [41].

В дослідженні Тайкової зазначено, що контрольний індекс зростання (без додавання селену) калюсної культури більший при середовищі MS (6,0), ніж при середовищі Гамборга та Евелега (5,2). З додаванням до поживного середовища Гамборга та Евелега B5 (I) селену у концентрації 5,0 мг/л індекс зростання калюсної культури знижувався до 3,4; з додаванням до поживного середовища MS (I) селену у концентрації 5,0 мг/л індекс зростання калюсної культури знижувався до 4,2. З додаванням до середовища B5 (II) селену концентрації 10,0 мг/л ростовий індекс знизився до 2,7; з додаванням до середовища MS (II) селену концентрації 10,0 мг/л, ростовий індекс знизився до 3,6 порівняно з контролем. З додаванням до поживного середовища B5 (III) селену з концентрацією 15,0 мг/л ростова активність калюсу була зменшена до 1,2; з додаванням до поживного середовища MS (III) селену концентрації 15,0 мг/л, ростова активність калюсу зменшувалась до 1,5 порівняно з контролем [42].

В майбутньому планується провести підбір оптимального середовища для насінневого розмноження *A. dasycanthus* в умовах *in vitro* з вище вказаних варіантів поживних середовищ. Вирощені експланти можна в подальшому культивувати на середовищах з додаванням регуляторів росту або досліджувати культури на вміст вторинних метаболітів.

ВИСНОВКИ

1. Досліджено вплив трьох способів обробки насіння, вирощеного на середовищах MS і $\frac{1}{2}$ MS на ріст і розвиток *A. dasyanthus* в умовах *in vitro*. Встановлено, що ефективнішим способом обробки насіння була механічна скарифікація.

2. Встановлено, найбільші показники схожості були за механічної скарифікації насіння і становили 57-62%, тоді як найменші – за обробки 10 %-розчином янтарної кислоти (20 %), та 10 %-розчином сульфатної кислоти (20 %).

3. Показано, що експланти *A. dasyanthus* краще розвивались на повному поживному середовищі MS.

4. На 7 день після культивування спостерігається поява первинного кореня, повністю розпрямляється гіпокотиль, який витягує листки сім'ядолі з середовища назовні. На 14 день після культивування з'являється епикотиль, стебло, вузли та листя. На 21 день культивування формуються пагони першого порядку, збільшується кількість справжніх листків. Через місяць формуються пагони першого і другого порядку, збільшується кількість справжніх листків, нарощується біомаса рослини та видовжуються пагони.

5. Встановлено, що при тривалому культивуванні *A. dasyanthus* в умовах *in vitro* спостерігається хлороз, побуріння коренів, що свідчить про виділення та накопичення поліфенольних сполук у середовищі. Необхідно в подальшому провести підбір модифікованого середовища для оптимізації умов росту експлантів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бугара І.О. Одержання та цитологічний аналіз калусних культур астрагалу шерстистоквіткового (*Astragalus dasyanthus* Pall.) / І.О. Бугара, І.М. Юркова, А.М. Бугара // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2008. – Т. 21 (60). – № 1. – С. 9-14.
2. Коротченко І.А. Астрагал шерстистоквітковий / І.А. Коротченко, Л.І. Крицька // Червона книга України. Рослинний світ. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – С. 438.
3. Cakir O. Defensive and secondary metabolism in *Astragalus chrysochlorus* cell cultures, in response to yeast extract stressor / O. Cakir, S. Ari // Academy of Environmental Biology. – 2009. – Vol. 30, № 1. – P. 51-55.
4. Yildirim A. B. In vitro Culture of Endemic *Astragalus gymnolobus* Fischer and Comparison of its Antibacterial, Antioxidant, and Phenolic Profiles with Field Grown Plants / A. B. Yildirim, E. Uyar, A. Ucar Turker // J. Agr. Sci. Tech. – 2020. – Vol. 22, № 3. – P. 815-828.
5. Turgut-Kara N. Micropropagation of *Astragalus maximus* Willd. / N. Turgut-Kara, S. Arı // Biotechnology and Biotechnological Equipment. – 2006. – Vol. 20. – P. 20-22.
6. Erisen S. The effect of thidiazuron on the *in vitro* shoot development of endemic *Astragalus cariensis* in Turkey / S. Erisen, E. Atalay, M. Yorgancilar // Turkish Journal of Botany. – 2011. – Vol. 35. – P. 521-526.
7. Cho H.J. Increasing tryptophan synthesis in a forage legume *Astragalus sinicus* by expressing the tobacco feedback-insensitive anthranilate synthase (ASA2) gene / H.J. Cho, J.E. Brotherton, H.S. Song, J.M. Widholm // Plant Physiology. – 2000. – Vol. 123. – P. 1069–1076.
8. Rios J.L. A review of the pharmacology and toxicology of *Astragalus* / J.L. Rios, P.G. Waterman // Phytotherapy Research. – 1998. – Vol. 11. – P. 411–418.

9. Dogan, M. The production of gum tragacanth from *Astragalus microcephalus* in Turkey - A contribution towards a balanced environment // M. Dogan, T. Ekim and D.M.W. Anderson // *Biological Agriculture & Horticulture*. – 1985. – Vol. 2 – P. 329-334.
10. Turgut-Kara N. Effects of long-term culture of *Astragalus chrysochlorus* callus on morphology, genetic structure, gene expression and metabolism / N. Turgut-Kara, B. U. Kahraman // *Plant Biosystems*. – 2015. – Vol. 149, No. 2. – P. 329–336.
11. Hung C.-Y. Development of an Efficient Plant Regeneration System for the Selenium-hyperaccumulator *Astragalus racemosus* and the Nonaccumulator *Astragalus canadensis* / C.-Y. Hung and J. Xie // *HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science*. – 2008. – Vol. 43, № 7. – P. 2138–2142.
12. Ionkova I. Optimization of flavonoid production in cell cultures of *Astragalus missouriensis* Nutt. (*Fabaceae*) / *Pharmacognosy Magazine*. – 2009. – Vol. 4. – P. 92-97.
13. Umralina A.P. Introduction in *in vitro* culture of endemic *Astragalus duanensis* Saposhn. ex Sumn species / A.P. Umralina, K. Dongvon // *Известия ВУЗов*. – 2013. – № 5. – С. 66-70.
14. Popova P. Induction of flavonoid biosynthesis by *in vitro* cultivation of *Astragalus glycyphyllos* L. / P. Popova, Y. Zarev, A. Shkondrov, I. Krasteva, I. Ionkova // *Pharmacia*. – 2020. – Vol. 67, № 2. – P. 95–99.
15. Shkondrov A. Production of saponins from *in vitro* cultures of *Astragalus glycyphyllos* and their antineoplastic activity / A. Shkondrov, I. Krasteva, I. Ionkova, P. Popova, Y. Zarev, R. Mihaylova, Spiro Konstantinov // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. – 2019. – Vol. 33. – P. 1413-1418.
16. Bedir E. A new flavonol glycoside from the aerial parts of *Astragalus vulnerariae* / E. Bedir, I. Çalış, S. Piacente, C. Pizza, I.A. Khan // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 2000. – Vol. 48. – P. 1994–1995.

17. Tang, W. Chinese Drugs of Plant Origin / W. Tang, G. Eisenbrand // Springer-Verlag. Berlin. –1992.
18. He Z.Q. Constituents of *Astragalus membranaceus* / Z.Q. He, J.A. Findlay // Journal of natural products. – 1991. – Vol. 54. – P. 810-815.
19. El Sedakhy N. Antimicrobial isoflavans from *Astragalus* species / N. El Sedakhy, A.M. Asaad, R.M. Abdallah, S.M. Toaima, S.M. Abdel-Kader, F.R. Stermitz // Phytochemistry. – 1994. – Vol. 36. – P. 1387-1389.
20. Luo J.-P. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus cultures of *Astragalus adsurgens* Pall. / J.-P. Luo, J.-F. Jia, Y.-H. Gu, J. Liu // Plant Science. – 1999. – Vol. 143. – P. 93–99.
21. Luo J.-P. Plant regeneration from callus protoplasts of the forage legume *Astragalus adsurgens* Pall. / J.-P. Luo, J.-F. Jia // Plant Cell Reports. – 1998. – Vol. 17. – P. 313–317.
22. Перегрим Ю. Вегетативне розмноження *ex situ* *Astragalus cretophilus* Klokov та *Astragalus odessanus* Besser / Ю. Перегрим, А. Голубенко // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Інтродукція та збереження рослинного різноманіття. – 2014. – Вип. 1. – С. 51-55.
23. Hasancebi S. Micropropagation and root culture of Turkish endemic *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae) / S. Hasancebi, N. Turgut-Kara, Ö. Çakir, Ş. Ari // Turkish Journal of Botany. – 2011. – Vol. 35. – P. 203-210.
24. YaJing L. Establishment of Efficient Callus Induction System of *Astragalus mongholicus* Bge. / L. YaJing, X. Juzhan, C. Guilin // Acta Horticulturae. – 2011. – Vol. 925. – P. 265-270.
25. Heywood V.H. Plant conservation: Old problems, new perspectives / V.H. Heywood, J.M. Iriondo // Biological Conservation. – 2003. – Vol. 113, № 3. – P. 321–335.
26. Cho H.-J. Improved shoot regeneration protocol for hairy roots of the legume *Astragalus sinicus* / H.-J. Cho, J.M. Widholm // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2002. – Vol. 69, № 3. – P. 259-269.

27. Hou S.-W. High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotyl and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis / S.-W. Hou, J.F. Jia // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* – 2004. – Vol. 79, № 1. – P. 95-100.
28. Kaeppler S.M. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants / S.M. Kaeppler, H.F. Kaeppler, Y. Rhee // *Plant Molecular Biology*. – 2000. – Vol. 43. – P. 179–188.
29. Bairu M.W. Physiological and developmental problems encountered by in vitro cultured plants / M.W. Bairu, M.E. Kane // *Plant Growth Regulation*. – 2011. – Vol. 63. – P. 101–103.
30. Cho H.J.J. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of the legume *Astragalus sinicus* (chinese milk vetch) / H.J.J Cho, M. Widholm, N. Tanaka, Y. Nakanishi, Y. Murooka // *Plant Science*. – 1998. – Vol. 138. – P. 53-65.
31. Dilaver Z. Breaking seed dormancy and micropropagation of perennial vulneraria milkvetch (*Astragalus vulnerariae* DC.) / Z. Dilaver, M. Mirzapour, H. Kendir // *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*. – 2017. – Vol. 16, № 4. – P. 79–88.
32. Turgut-Kara N. *In vitro* plant regeneration from embryogenic cell suspension culture of *Astragalus chrysochlorus* (*Leguminosae*) / N. Turgut-Kara, S. Arı // *African Journal of Biotechnology*. – 2008. – Vol. 7, № 9. – P. 1250-1255.
33. Luo J.-P. Callus induction and plant regeneration from hypocotyl explants of the forage legume *Astragalus adsurgens* / J.-P. Luo, J.-F. Jia // *Plant Cell Reports*. – 1998. – Vol. 17. – P. 567–570.
34. Basalma D. TDZ-induced plant regeneration in *Astragalus cicer* L. / D. Basalma, S. Uranbey, D. Gürlek, S. Özcan // *African Journal of Biotechnology*. – 2008. – Vol. 7, № 8. – P. 955-959.
35. Erisen S. Callus induction and plant regeneration of the endemic *Astragalus nezaketae* in Turkey / S. Erisen, M. Yorgancilar, E. Atalay, M. Babaoglu, A. Duran // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2010. – Vol. 13. – P. 13-14.

36. Mirici S. High frequency of adventitious shoot regeneration from leaf and leaf petiol of endemic *Astragalus polemoniicus* Bunge / Selçuk University Agricultural Faculty Publications. – 2004. – Vol. 18, № 34. – P. 31-34.
37. Zakirova R.P. Phytochemical Study of *Astragalus babatagi* and Introduction of the Plant Into *In Vitro* Culture / R. P. Zakirova, M. A. Agzamova, I. M. Isaev // Вестник СВФУ. – 2018. – №2 (64).
38. Verpoorte R. Secondary metabolism. In: Metabolic engineering of plant secondary metabolism / R. Verpoorte, A. Alfermann // Kluwer Academic Publishers, Netherlands. – 2000. – P.1-29.
39. То М. / Культивування *in vitro* та отримання бородатих коренів *Astragalus dasyanthus* // «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScienceAdvances»: Матеріали XVIII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених (м. Київ, 2020 р.) – Київ: ПАЛИВОДА А.В., 2020. – С. 260-262.
40. Cano-Castillo M. *In Vitro* Propagation of *Astragalus nitidiflorus* (*Leguminosae*), an Endemic and Endangered Species from South-East of Spain / M. Cano-Castillo, F. Serrano-Martínez, J.L. Casas // Acta Horticulturae. – 2009. – Vol. 812. – P. 545-550.
41. Park Y. J. Enhancing Astragaloside Production in *Astragalus membranaceus* through Growth Media and Auxins / Y. J. Park, J. K. Kim, S. U. Park // OnLine Journal of Biological Sciences. – 2018. – Vol. 18. – P. 116-122.
42. Тайкова В.П. Вплив селену на ростові характеристики *Astragalus dasyanthus* (Pall.) в культурі *in vitro* / В.П. Тайкова, Л.М. Теплицька // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62). – № 2. – С. 157-162.

ДОДАТКИ

Додаток А

Astragalus dasyanthus Pall.

* Джерело: Коротченко І.А. Астрагал шерстистоквітковий / І.А. Коротченко, Л.І. Крицька // Червона книга України. Рослинний світ. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – С. 438.

Експланти *Astragalus dasyanthus* через тиждень після культивування на середовищі MS, насіння без обробки



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через тиждень після культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS, обробка насіння 10 %-розчином янтарної кислоти



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через тиждень після культивування на середовищі MS, обробка насіння 10 %-розчином янтарної кислоти



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через тиждень після культивування на середовищі MS, обробка насіння 10 %-розчином сульфатної кислоти



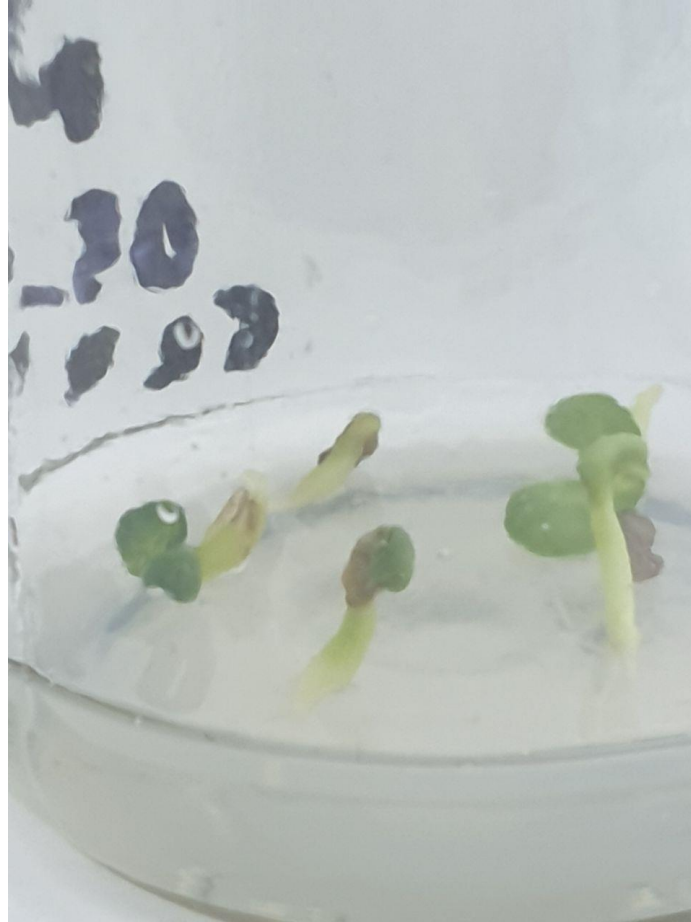
(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через тиждень після культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS, обробка насіння 10 %-розчином сульфатної кислоти



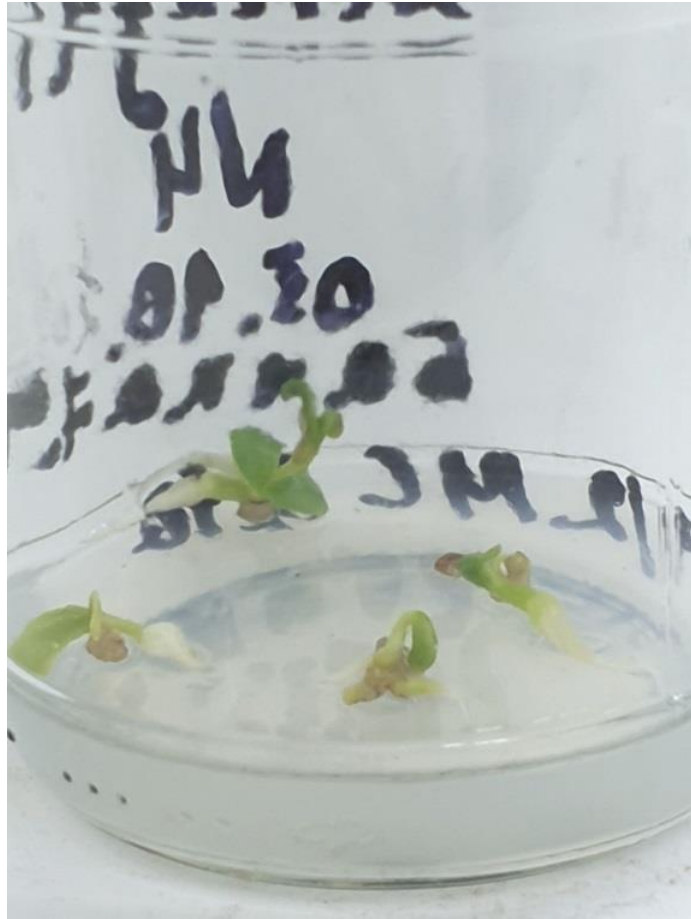
(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через тиждень після культивування на середовищі MS, обробка насіння механічною скарифікацією



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через тиждень після культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS, обробка насіння механічною скарифікацією



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через 2 тижні після культивування на середовищі MS, насіння без обробки



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через 2 тижні після культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS, насіння без обробки



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через 2 тижні після культивування на середовищі MS, обробка насіння 10 %-розчином янтарної кислоти



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через 2 тижні після культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS, обробка насіння 10 %-розчином янтарної кислоти



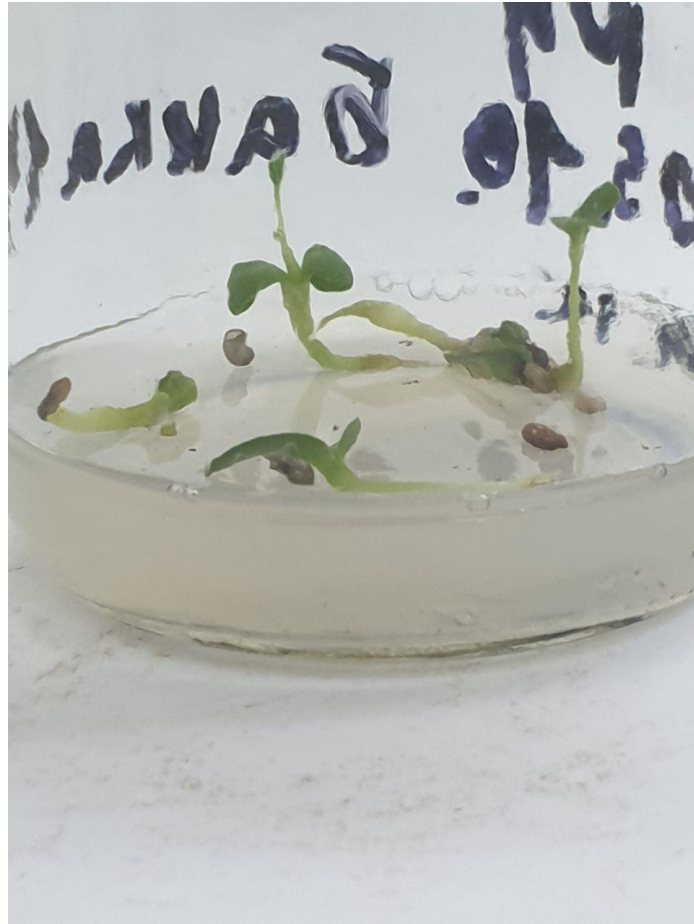
(Автор – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через 2 тижні після культивування на середовищі MS, обробка насіння 10 %-розчином сульфатної кислоти



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через 2 тижні після культивування на середовищі MS, обробка насіння механічною скарифікацією



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через 2 тижні після культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS, обробка насіння механічною скарифікацією



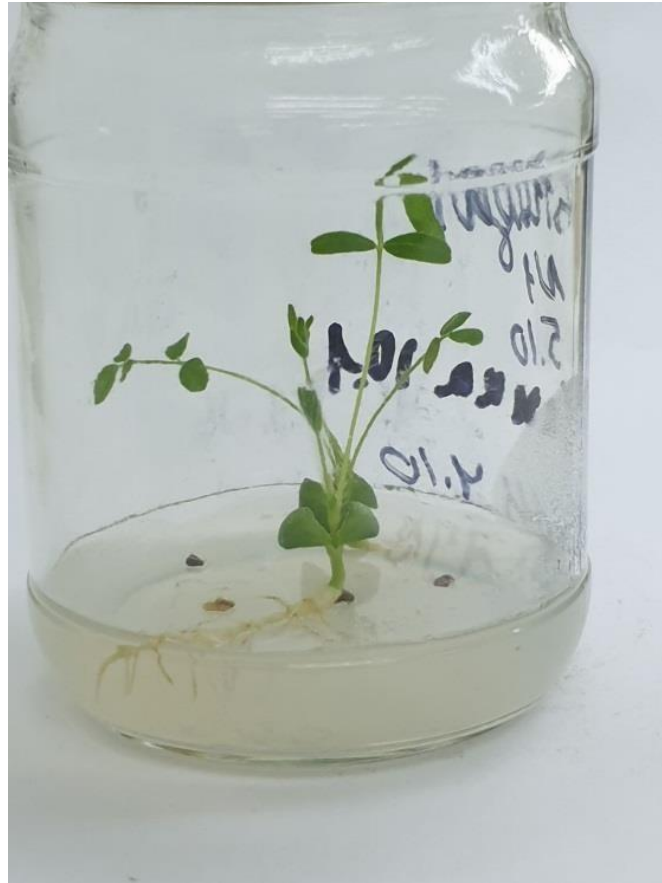
(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через 3 тижні після культивування на середовищі MS, насіння без обробки



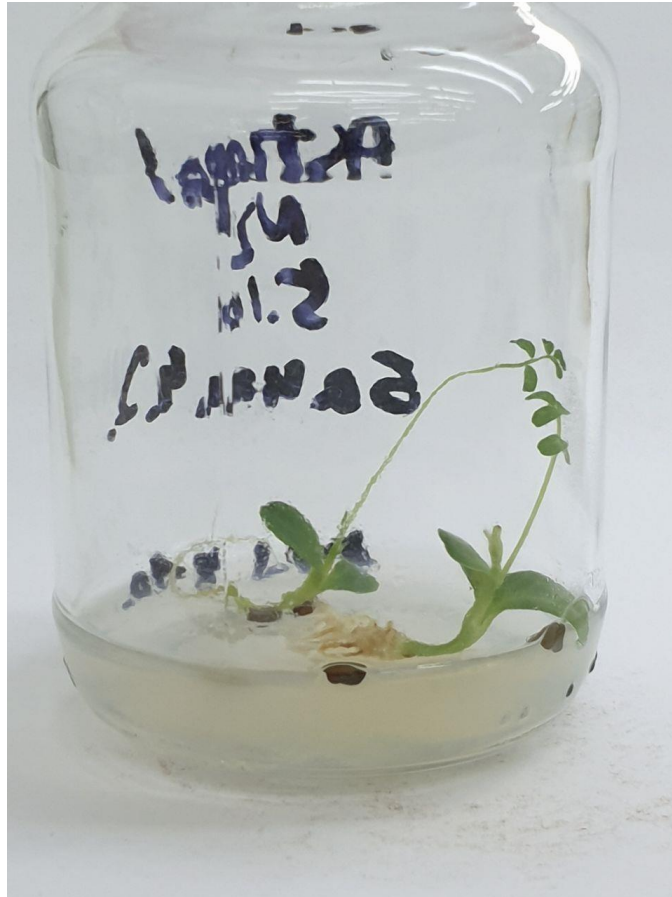
(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через 3 тижні після культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS, насіння без обробки



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через 3 тижні після культивування на середовищі MS, обробка насіння 10 %-розчином янтарної кислоти



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через 3 тижні після культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS, обробка насіння 10 %-розчином янтарної кислоти



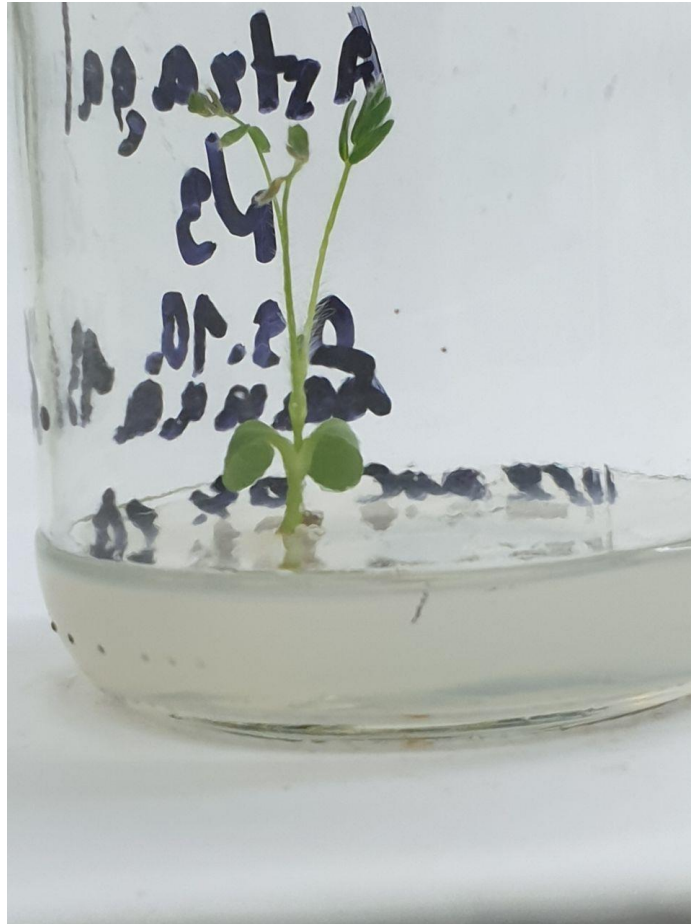
(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через 3 тижні після культивування на середовищі MS, обробка насіння 10 %-розчином сульфатної кислоти



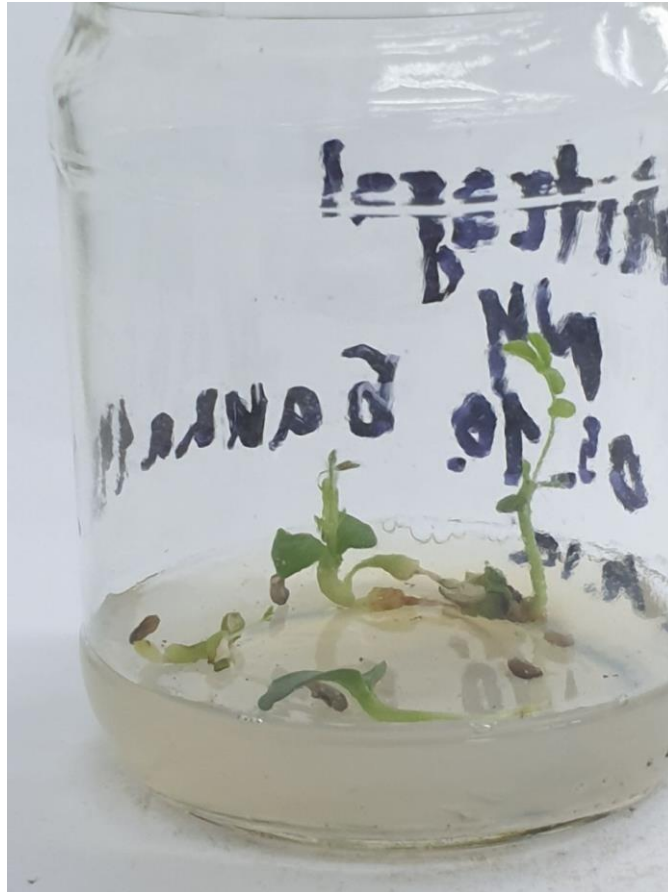
(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через 3 тижні після культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS, обробка насіння 10 %-розчином сульфатної кислоти



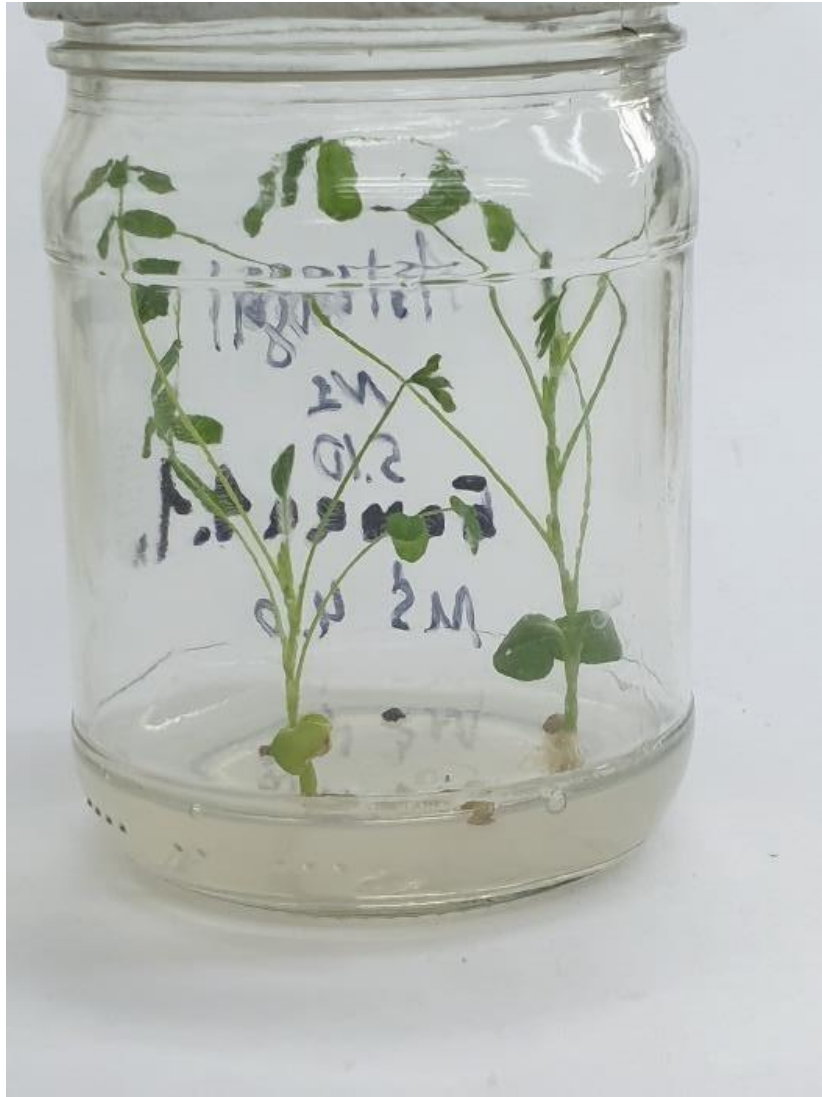
(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через 3 тижні після культивування на середовищі MS, обробка насіння механічною скарифікацією



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через місяць після культивування на середовищі MS, насіння без обробки



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через місяць після культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS, насіння без обробки



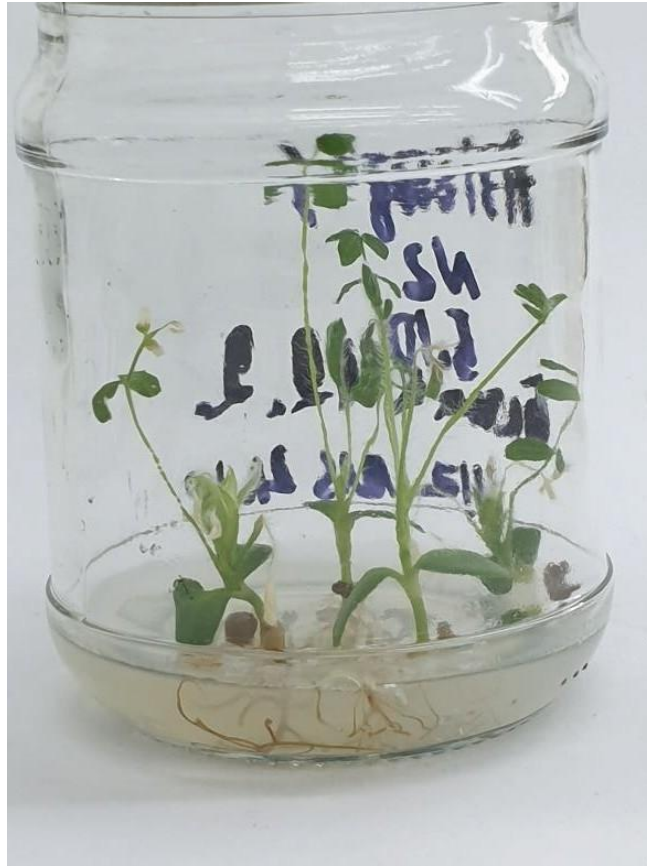
(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через місяць після культивування на середовищі MS, обробка насіння 10 %-розчином янтарної кислоти



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через місяць після культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS, обробка насіння 10 %-розчином янтарної кислоти



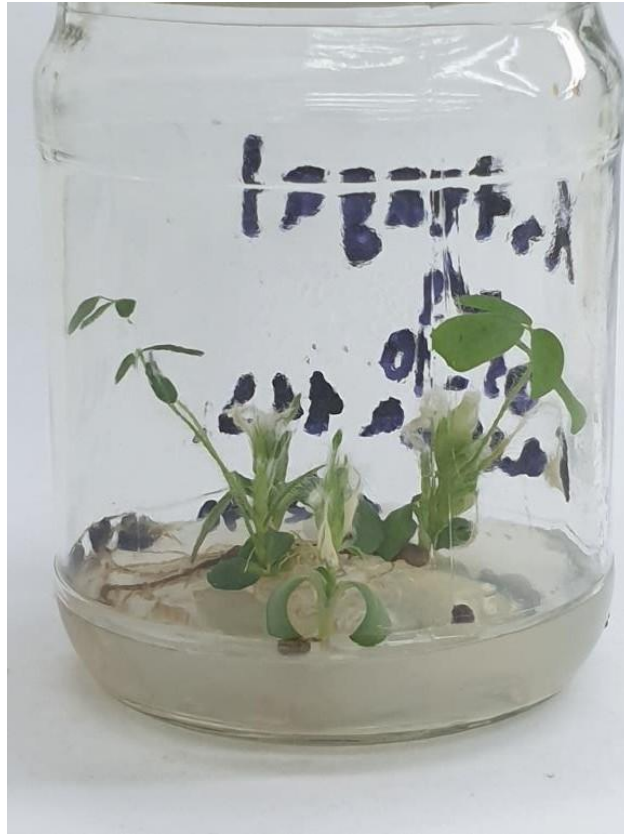
(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через місяць після культивування на середовищі MS, обробка насіння 10 %-розчином сульфатної кислоти



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через місяць після культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS, обробка насіння 10 %-розчином сульфатної кислоти



(Автор фото – М. Нестеренко)

Експланти *Astragalus dasyanthus* через місяць після культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ MS, обробка насіння механічною скарифікацією



(Автор фото – М. Нестеренко)