

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

ТАРАН ОКСАНА ПЕТРІВНА

УДК 581.14:635.21; 578.4; 616-036.22

РЕГЕНЕРАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ РОСЛИН КАРТОПЛІ ЗА ДІЇ АБІОТИЧНИХ
ЧИННИКІВ У КУЛЬТУРІ *IN VITRO* ТА *EX VITRO*

03.00.12 – фізіологія рослин

ДИСЕРТАЦІЯ

на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
доктор біологічних наук
ст.н.с. Міщенко Л.Т.

Київ 2011

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1. Адаптаційні реакції рослинного організму на вплив абіотичних чинників в умовах культури <i>in vitro</i>	11
1.2. Вплив абіотичних чинників на етапі відбору і підготовки маточних рослин до введення в культуру <i>in vitro</i>	16
1.2.1. Вплив гравітації на рослинні організми.....	19
1.3. Вплив абіотичних чинників у процесі введення експлантатів у культуру <i>in vitro</i>	26
1.4. Адаптація рослин <i>in vitro</i> до умов <i>ex vitro</i>	35
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	40
2.1. Об'єкт досліджень.....	40
2.2. Методика дослідження впливу модельованої мікрогравітації на інфекцію X-вірусу картоплі у рослинах картоплі.....	40
2.3. Дослідження впливу монохроматичного світла на модельні об'єкти при клональному мікророзмноженні.....	42
2.4. Культивування експлантатів та регенерантів при мікроклональному розмноженні.....	44
2.5. Вплив світла визначеного складу на морфогенез живців картоплі в культурі <i>in vitro</i>	47
2.6. Методика досліджень бульбоутворення у картоплі у культурі <i>in vitro</i>	50
2.7. Методика проведення досліджень при адаптації мікробульб та рослин до умов <i>ex vitro</i>	51
2.8. Статистична обробка даних.....	56
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	57

3.1. Індукція морфогенезу експлантатів картоплі під впливом світла визначеного спектрального складу	57
3.2. Морфогенез рослин у культурі <i>in vitro</i>	65
3.2.1. Вплив умісту вуглеводів та екзогенних регуляторів росту на адаптацію регенерантів	65
3.2.2. Вплив світла червоної ділянки спектра на розвиток регенерантів та ендогенний баланс індолілоцтової кислоти (ІОК) та гібереліну (ГК ₃)	71
3.2.3. Вплив світла червоної ділянки спектра на бульбоутворення <i>in vitro</i> у регенерантів картоплі	78
3.3. Адаптація мікробульб та регенерантів до умов <i>ex vitro</i>	83
3.3.1. Вплив світла на розвиток проростків мікробульб	83
3.3.2. Взаємний вплив світла і вологи на розвиток проростків бульб картоплі	88
3.3.3. Розвиток рослин картоплі з мікробульб, які опромінювали монохроматичним світлом	89
3.3.4. Адаптація регенерантів культури <i>in vitro</i> до умов <i>ex vitro</i>	92
3.3.5. Дослідження впливу брасиностероїду на адаптаційний потенціал рослин картоплі у культурі <i>ex vitro</i>	100
3.4. Адаптаційні реакції рослин картоплі за дії модельованої мікрогравітації	107
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	129
ВИСНОВКИ	139
ПРОПОЗИЦІЇ ДЛЯ ПРАКТИКИ	141
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	142

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

<i>ex vitro</i>	перенесення регенерантів з культуральних посудин та подальша їх адаптація до природних умов
СС	синє світло, (400-500 нм, мах. $\lambda=450$ нм)
ССЛ	монохроматичне світло лазера, $\lambda=488$ нм
Φ_{730}	форма фітохрому, яка поглинає світло з мах. $\lambda=725$ нм
Φ_{660}	форма фітохрому, яка поглинає світло з мах. $\lambda=665$ нм
ЧС	червоне світло (600-700 нм. мах. $\lambda=660$ нм)
БС	біле світло (інтегральний спектр)
ДЧС	дально-червоне світло (700-730 нм. мах. $\lambda=720$ нм)
ІОК	індоліл-оцтова кислота
ГК ₃	гіберелова кислота
ЗТ-ПЛР	зворотно-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція
РНК	рибонуклеїнова кислота
ВСМП	вірус смугастої мозаїки пшениці
СВК	<i>S</i> – вірус картоплі
МВК	<i>M</i> – вірус картоплі
ХВК	<i>X</i> – вірус картоплі
УВК	<i>Y</i> – вірус картоплі

ВСТУП

Здатність рослинних клітин, тканин і органів розвиватися в культурі *in vitro* обумовлює успішність біотехнологічних прийомів культивування рослин. Однак досить часто у біотехнологічній практиці виникає проблема зниження регенераційної здатності експлантатів, що стає головною перешкодою у біотехнологічному використанні економічно важливих рослин, а також зменшує ефективність методів збереження різних видів у культурі *in vitro*. Вважають, що основною причиною виникнення цього явища є стресовий вплив на експлантати умов культивування. Тому основною стратегією оптимізації біотехнологічного процесу є швидке подолання стресу, яке залежить від адаптаційних можливостей експлантатів [112, 133, 192]. У зв'язку з цим набуває актуальності дослідження адаптаційного потенціалу різних модельних об'єктів в умовах *in vitro* відповідно до етапів мікроклонального розмноження.

Інфікованість маточних рослин на етапі їх відбору і підготовки для вичленення експлантатів значно погіршує результативність експериментів, особливо у випадках, коли мікроклональне розмноження застосовують для оздоровлення рослин від патогенів. Для подолання цього явища використовують різні абіотичні чинники, зокрема підвищену температуру, різні хімічні реагенти, електричні імпульси тощо. Разом з тим, істотними недоліками застосування цих методів є пошкоджуючий ефект високих температур та фітотоксичність хімічних речовин [8, 163]. Отже, пошук нових комбінацій абіотичних чинників для оздоровлення рослин, зокрема від вірусної інфекції, є актуальним завданням. Дослідженнями [47, 259] встановлено елімінацію вірусної інфекції за дії модельованої мікрогравітації в інтактних рослинах пшениці, що відкриває перспективи застосування цього чинника з метою звільнення рослин від вірусів. Це дозволить розширити методологічну базу оздоровлення рослин від вірусів та виявити адаптаційні можливості культури картоплі за дії модельованої мікрогравітації.

Попередньо проведені фрагментарні дослідження на різних модельних об'єктах свідчать, що фотоморфогенетичні реакції, які виникають у рослин у відповідь на кількість, якість, та тривалість дії світла можуть ефективно впливати на ростові і структурні особливості рослин за рахунок збереження їх гомеостазу і синхронізації метаболічних процесів з умовами оточуючого середовища [12]. Це важливо враховувати при мікроклональному розмноженні, оскільки подальший розвиток виділених експлантатів при введенні їх в культуру *in vitro* залежить від адекватності умов культивування потребам даного виду [315, 325, 333]. Вважають, що потреби в світлі певного спектру у різних видів рослин визначаються генетично [31, 91], тому необхідні детальні дослідження впливу різного спектрального складу світла для окремих видів рослин, особливо для економічно важливих культур. Зважаючи на вищезгадане, для оптимізації існуючих біотехнологій рослин, в тому числі картоплі, ми провели дослідження впливу світла різного спектрального складу, приділивши основну увагу регенерації рослин з експлантатів та інтенсивності бульбоутворення у регенерантів в умовах *in vitro*.

Актуальне значення мають і дослідження, проведені на завершальному етапі мікроклонального розмноження, оскільки швидка адаптація регенерантів до природних умов визначає ефективність усього біотехнологічного процесу культивування рослин [39, 99, 349]. Для забезпечення фізіологічних потреб рослин в умовах культури *ex vitro* необхідні оптимальні умови, в тому числі із залученням штучних субстратів для культивування регенерантів, що сприятиме посиленню їх адаптації до природних умов. У зв'язку з цим буде актуальним дослідження впливу синтетичних аналогів нового класу фітогормонів – брасиностероїдів для підвищення адаптаційного потенціалу рослин в культурі *ex vitro*.

Зв'язок роботи з науковими програмами. Робота виконана у рамках тем, зокрема, лабораторії клонального мікророзмноження Інституту картоплярства УААН, „Розробити сортову технологію одержання мікробульб, що забезпечує скорочення строків бульбоутворення в культурі *in vitro*, визначити прийоми і методи діагностики оздоровленого матеріалу”, № д/р 0201U006184 (1995-2000) та

науково-дослідної лабораторії кафедри вірусології ННЦ „Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка: „Дослідження перебігу вірусної інфекції у сільськогосподарських культур за дії різних абіотичних чинників”, № д/р 0105U007796 (2005); „Моніторинг вірусної інфекції у рослинах картоплі та визначення параметрів адаптації культури до абіотичних та біотичних чинників”, № д/р 0106U011981 (2006); „Гравічутливість системи „вірус – рослина-хазяїн” та її використання для зниження репродукції вірусів”, № д/р 0107U009135 (2007); „Аналіз змін у системі „вірус – рослина-хазяїн” у *Solanum tuberosum* за умов модельованої мікрогравітації”, № д/р 0107U007053 (2007); „Взаємовідносини системи „вірус – рослина-хазяїн” за умов модельованої мікрогравітації”, № д/р 0108U005923 (2008); „Дослідження гравічутливості системи „вірус – рослина-хазяїн” в умовах зміненої гравітації”, № д/р 0108U010610 (2008); „Розробка методів оздоровлення картоплі в системі сучасного картоплярства”, № д/р 0109U0007288 (2009-2010).

Мета і завдання досліджень. Метою нашої роботи було з’ясування регенераційної здатності та адаптаційного потенціалу рослин картоплі за дії абіотичних чинників: світла визначеного спектрального складу і модельованої мікрогравітації (із використанням 3D кліностатів) та розробка шляхів оптимізації мікроклонального розмноження культури. Для досягнення цієї мети поставлено такі завдання:

- Виявити та охарактеризувати вплив опромінення світлом визначеного спектрального складу на процеси росту і розвитку різних модельних об’єктів: апікальних меристем, регенерантів, одноузлових живців, проростків мікробульб картоплі у культурі *in vitro* та *ex vitro*.
- Дослідити регенераційну здатність живців регенерантів в культурі *ex vitro* та під впливом фітогормону з класу брасиностероїдів.
- Дослідити гравічутливість системи „фітовірус – рослина-хазяїн” та з’ясувати її вплив на репродукцію вірусів за умов кліностакування.
- На основі виявлених закономірностей обґрунтувати принципи оптимізації мікроклонального розмноження картоплі.

Об'єкт дослідження – регенераційна здатність картоплі в культурі *in vitro* та *ex vitro*.

Предмет дослідження – закономірності прояву регенераційної здатності різних модельних об'єктів картоплі *in vitro* та *ex vitro* за дії абіотичних чинників: світла різного спектрального складу та модельованої мікрогравітації.

Методи дослідження – світлооптична мікроскопія, метод ізольованих тканин та органів, метод мікроклонального розмноження (дослідження розвитку експлантатів в культурі *in vitro*), імуноферментний аналіз (визначення вмісту фітогормонів і антигенів фітовірусів), зворотно-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція (визначення РНК фітовірусів), електронна мікроскопія (дослідження морфології вірусів), морфометричний аналіз модельних об'єктів, статистична обробка результатів досліджень.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше досліджено вплив світла різного спектрального складу на різні модельні об'єкти в культурі картоплі *in vitro*. Виявлено зростання морфогенетичної активності у експлантатів та регенерантів у культурі *in vitro* під впливом цього чинника. Отримано нові дані щодо впливу світла різного спектрального складу на фітогормональний склад у регенерантах картоплі. Доведено зростання адаптаційного потенціалу при регенерації рослин в умовах *ex vitro* з використанням нового штучного субстрату для культивування та при застосуванні брасиностероїду. Вперше проведено дослідження щодо впливу модельованої мікрогравітації на репродукцію у рослинах картоплі вірусів різних таксономічних груп. Виявлено зниження вмісту антигенів вірусів у тканинах рослин картоплі під впливом тривалого кліностагування та встановлено існування різних за гравічутливістю систем „фітовірус – рослина-хазяїн”. Застосування комбінації методів модельованої мікрогравітації та культури апікальних меристем дозволило одержати регенеранти картоплі *in vitro*, вільні від вірусної інфекції.

Практичне значення. В результаті проведених досліджень визначено параметри оптимізації технологічного процесу культивування картоплі в умовах *in vitro*. Запропоновано спосіб передпосадкової адаптації мікробульб картоплі та

спосіб адаптації регенерантів при перенесенні їх з культури *in vitro* до умов *ex vitro*. Розроблені параметри культивування рослин у культурі *ex vitro*. Рекомендований новий штучний субстрат для культивування одновузлових живців із регенерантів в культурі *ex vitro*. Обґрунтовано підходи для розробки методів оздоровлення рослин із застосуванням екологічно безпечних прийомів, зокрема, із використанням модельованої мікрогравітації та одержання безвірусного посадкового матеріалу картоплі *in vitro*.

Особистий внесок здобувача. Здобувач самостійно здійснила інформаційний пошук та аналіз літературних джерел, безпосередньо брала участь у плануванні та проведенні дослідів і спостережень, обробці та узагальненні експериментальних даних, формулюванні висновків та підготовці матеріалу до друку. Автор щиро вдячна за допомогу у проведенні експериментів, в інтерпретації даних та узагальненні одержаних результатів д.б.н., проф. Булаху А.А., к.б.н., ст.н.с. Самохвалу Є.Г., що знайшло відображення у спільних публікаціях. Основні теоретичні та експериментальні ідеї було розроблено за участю наукового керівника д.б.н., с.н.с. Міщенко Л.Т.

Апробація роботи. Результати досліджень доповідались: на науково-практичній конференції молодих вчених і спеціалістів „Стан та перспективи досліджень у картоплярстві” (Немішаєве, 1994); Международной конференции, посвященной 70-летию НИИКГ „Научное обеспечение картофелеводства России: состояние, проблемы”, (Коренево, РФ, 2001); 36th COSPAR Scientific Assembly (Benjin, China, 2006); 26th Annual international gravitation physiology meeting „Life in space for life on earth” (Cologne, Germany, 2005); 7-й Українській конференції з космічних досліджень (Євпаторія, 2006 р.); 13th International Conference „Human and nature safety” (Kauno r., Republic of Lithuania, 2007); III Міжнародній конференції „Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі: фізіологічні та екологічні аспекти” (Львів, 2007); 2-му з’їзду Українського товариства клітинної біології, (Київ, 2007); III Національному конгресі з біоетики (Київ, 2007); 1th International Trans Caucasus Conference on Plant Pathology (Tbilisi, Georgia, 2008); Международной научно-практической конференции

„Теоретические основы применения биотехнологии, генетики и физиологии растений в современной селекции растений и растениеводстве” (Брянск, 2009); Международной научно-практической конференции „Современная биотехнология: фундаментальные проблемы, инновационные проекты и бионанотехнология” (Брянск, 2010); 38th COSPAR Scientific Assembly (Bremen, Germany, 2010); Simpozionului științific internațional „Conservarea diversității plantelor” (Chișinău, Moldova, 2010).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 7 статей у фахових виданнях, затверджених переліком ВАК України, та 21 наукову працю у різних наукових виданнях. Здобувач є співавтором 4 патентів України.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, 4 розділів, висновків, рекомендацій виробництву та списку використаних джерел. Робота викладена на 141 сторінці, ілюстрована 18 таблицями та 50 рисунками. Список використаних джерел містить 358 найменувань, в тому числі 262 іноземною мовою.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Адаптаційні реакції рослинного організму на вплив абіотичних чинників в умовах культури *in vitro*

Біотехнології розмноження рослин складаються з кількох етапів, які відрізняються різними умовами культивування. Саме зміни середовища перебування викликають у рослинного організму стан стресу, при якому збільшення несприятливої дії того чи іншого чинника оточуючого середовища веде до початкової дестабілізації функцій організму, їх послідууючої нормалізації та підвищення стійкості організму. У зв'язку з цим, для оптимізації існуючих біотехнологій дослідження дії абіотичних чинників на рослини є актуальними.

Реакції рослинного організму в процесі взаємодії з чинниками оточуючого середовища протікають по різному, залежно від сили чинника, що діє, часу дії і власних адаптаційних можливостей, які визначаються наявністю генетико-функціональних особливостей. Співвідношення різних показників життєдіяльності організму, які забезпечують адекватне пристосування його систем, буде відповідати нормі реакції за умови, що діючий чинник не викликає порушення гомеостазу та перенапруження регуляторних механізмів [4, 21].

Надпорогові зміни одного чи кількох факторів середовища викликають стрес. Загальна теорія стресу була розроблена Г. Сельє стосовно організмів вищих тварин та людини [67], хоча у подальшому ця теорія була визнана загально-біологічною. Стрес у рослин або фітострес визначає реакції рослинного організму на несприятливі умови існування [50]. Згідно концепції стресу, відповідь рослин може відбуватися у чотири фази:

1. фаза тривоги, що означає початок стресу. Характерними ознаками є відхилення від функціональної норми, зниження життєздатності та ін.

2. фаза резистентності. Виникнення процесів протидії стресу (адаптація, репарація, стійкість).
3. фаза виснаження. Кінцева стадія, яка виникає при дії тривалого стресу, що перевищує адаптаційні можливості організму. Викликає хронічне захворювання або смерть.
4. фаза регенерації. Фізіологічна функція організму відновлюється після припинення дії стресу за умови, що пошкодження було слабким.

Ця концепція дозволяє припустити, що рослини в стані специфічного напруження, викликаного дією стресора, та за умов обмеженої життєздатності можуть виживати під дією постійного стресу, однак метаболічна активність та швидкість росту у них значно знижені [32, 233].

Теорія стресу передбачає, що у відповідь на дію чинників різної природи включаються однакові механізми відповіді, тобто виникає адаптаційний синдром. Згідно з відомими уявленнями про загальний адаптаційний синдром, неспецифічні захисні реакції є первинними і виникають у відповідь на будь-яку пошкоджуючу дію [4, 67].

Сучасні дані щодо реалізації адаптаційної відповіді свідчать, що відповідь біологічних систем на стрес (стрес-реакція) пов'язана зі змінами окиснювально-антиоксидантної рівноваги [15, 32, 165, 238, 324]. Розвиток стресу співпадає з підвищенням вільно-радикального окиснення та перекисного окиснення ліпідів. Окиснювальний „вибух” необхідний для мобілізації енергетичних ресурсів для адекватної стрес-відповіді, при цьому активно витрачаються антиоксидантні резерви біологічної системи. Мобілізація антиоксидантних резервів тканини спрямована на нормалізацію редокс-статусу та забезпечення гомеостазу. Рівень підвищення вільно-радикального окислення та перекисного окислення ліпідів відповідає рівню антиоксидантної мобілізації, що приводить систему до стану спокійної життєдіяльності за умови припинення дії стресора. В умовах тривалої дії стресора або його надзвичайно сильного впливу відбувається виснаження

захисних (антиоксидантних та ін.) механізмів, що призводить до третьої стадії стресу [4].

Таким чином, стрес – це форма взаємодії організму і середовища, однією з характерних особливостей якої є дестабілізація функцій організму. На відміну від стресу, при зміні чинників середовища в межах норми в рослині відбуваються процеси регулювання її функцій. Важливою проблемою є виявлення спільних ланок і схем реалізації механізмів адаптації до стресу та регуляторних механізмів організму.

Взаємодія рослинного організму з оточуючим середовищем має два напрямки. Перший – швидка аклімація у відповідь на сезонні та добові зміни екологічних факторів та на короткочасну дію надмірної дози якого-небудь фактора. Другий – довготривала адаптація, під час якої формуються спеціалізовані адаптаційні механізми, завдяки чому рослини можуть функціонувати в умовах довготривалої дії стресорного фактора [32, 38, 288].

Актуальність досліджень адаптаційних реакцій рослин пов'язана із все ширшим упровадженням рослинних біотехнологій, оскільки культивування рослин в умовах *in vitro* дозволяє вирішувати значне коло прикладних і фундаментальних проблем. Метод мікроклонального розмноження застосовують у світі для вирощування близько 1000 видів декоративних, овочевих, технічних і деревних культур [254]. Значного прогресу досягнуто при використанні культури *in vitro* у відновленні природних ценозів [213, 277]. Фізіологічні дослідження метаболізму рослин, біохімії клітинного циклу, механізму морфогенезу, дії фітогормонів і ін. були доповнені даними, одержаними з допомогою культури тканин. Широкі можливості генної інженерії також пов'язані з використанням культури *in vitro* для одержання нових сортів з цінними властивостями [8, 28, 39].

Умови культури *in vitro* є специфічними і відрізняються від умов природного перебування рослин. Встановлено, що адаптаційні зміни у рослин *in vitro* викликані впливом таких чинників середовища, як газообмін, вологість, освітлення [99, 119, 225].

Використання закритих контейнерів для культивування рослин *in vitro* обмежує притік CO₂ і відтік газоподібних рослинних продуктів. Оскільки об'єм CO₂, який може дифузно поступати через ватно-марлевий корок, забезпечує тільки 5-6% потреби регенерантів, це суттєво впливає на ріст і розвиток рослин [90, 100, 119]. При використанні щільних матеріалів для закривання отвору пробірки ці показники погіршуються [183, 287]. За умов зниженого газообміну вологість повітря у культуральних посудинах вища, ніж у природних умовах [226, 287].

Для забезпечення вертикального розміщення експлантатів у середовище культивування часто додають речовини, які його ущільнюють, тим самим водний потенціал значно зменшується [18, 189, 226, 295]. Тверда консистенція живильного середовища призводить до зниження водного потенціалу у 10 разів порівняно з ґрунтовим розчином при нормальному зволоженні ґрунту [175, 189]. У природних умовах рушійною силою транспірації служить різниця водного потенціалу між рослиною та атмосферою, яка досягає 1000 бар. У закритих системах культиваційних посудин такий градієнт відсутній [176, 280], що значно знижує доступність для регенерантів мінеральних речовин та вуглеводів живильного середовища [113, 319].

Використання рідкого живильного середовища часто викликає вітрифікацію (гіпергідратацію). При мікроклональному розмноженні використовують живці з відкритою поверхнею зрізу, яка безпосередньо контактує з живильним середовищем. Це призводить до того, що рідке живильне середовище вільно проникає у міжклітинний простір стебла та листків і заповнює майже весь вільний газовий простір пагона. Це явище супроводжується втратою у рослин здатності до коренеутворення, а також зменшенням відносної сухої маси рослин, зменшенням вмісту целюлози у клітинних стінках і ін. [112, 203, 357].

Продихи регенерантів в наслідок змін у водно-газовому режимі середовища перебування весь час залишаються відкритими і втрачають здатність закриватися навіть після перенесення в умови *ex vitro* [99, 155]. Вирощування в умовах високої (більше 90%) відносної вологості повітря у культиваційних посудинах призводить до формування у регенерантів зовсім незначного шару епікутикулярного воску

[99,178], що викликає значну втрату вологи листками в умовах культури *ex vitro*. У багатьох видів рослин в умовах культури *in vitro* формуються листки, нездатні розвиватися в подальшому за умов *ex vitro* [152,289].

Для культури *in vitro* характерна низька інтенсивність освітлення ($12-70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), пов'язана з розсіюванням світлового потоку при проходженні крізь скло культуральної посудини, а також з використанням певного типу освітлювальних приладів [199, 349]. При культивуванні рослин в умовах *in vitro* підтримується відносно висока постійна температура (25 ± 3 °C), що впливає на перебіг фізіологічних процесів [171, 225, 357]. Наявність у живильному середовищі цукрів, а також штучне низькоінтенсивне освітлення сприяє формуванню у регенерантів міксотрофного типу живлення [107, 200, 262, 268]. Фотосинтетичний потенціал рослин за таких умов знижується [16, 199], оскільки зменшується вміст хлорофілу та змінюється функціональна структура фотосинтетичного апарату [98, 138, 336]. При перенесенні в умови *ex vitro* листки рослин на протязі певного часу не здатні до фотосинтезу [150, 336].

У культуральне середовище зазвичай вносяться високі дози регуляторів росту для забезпечення розвитку регенерантів. Після перенесення в умови *ex vitro* ці рослини можуть пошкоджуватись раптовими змінами умов навколишнього середовища і потребують періоду акліматизації для регуляції нормального розвитку [199, 287, 349].

Таким чином, умови культури *in vitro* є стресовими для рослин, проте в процесі мікроклонального розмноження рослини адаптуються до них. Про це свідчить і збільшення на кілька порядків, порівняно з природними умовами, швидкості розмноження регенерантів. Адаптаційні реакції сприяють прискоренню авто-селекційних процесів культури у бік відбору рослин, які краще ростуть за умов *in vitro*. Через 15 пасажів, навіть без вибракування недостатньо розвинутих рослин, популяція регенерантів картоплі у культурі *in vitro* на 95 % складалась з рослин, які швидко ростуть за цих умов [16].

Для подальшого вдосконалення та розвитку мікроклонального розмноження стратегія оптимізації технологічного процесу повинна опиратися на адаптаційні

можливості рослини, оскільки швидке подолання стресу сприяє підвищенню потенціалу продуктивності культури.

Отже, стрес у регенерантів картоплі в культурі *in vitro* виникає при проведенні основних технологічних етапів мікроклонального розмноження, оскільки кожен з цих етапів характеризується своїми специфічними умовами [30,39]. Абіотичні чинники, які діють на рослини на кожному з цих етапів, можуть мати регулюючий вплив, посилюючи чи послаблюючи адаптаційні можливості рослинного організму. Тому було проведено аналіз даних щодо впливу абіотичних чинників на рослини в культурі *in vitro* на різних етапах мікроклонального розмноження.

1.2. Вплив абіотичних чинників на етапі відбору і підготовки маточних рослин до введення в культуру *in vitro*

На першому етапі мікроклонального розмноження проводять вибір експлантатів та введення їх у культуру *in vitro*. Для цього відбирають рослини, типові для даного виду чи сорту та вживають заходи щодо зниження рівня інфікованості експлантатів [39, 87, 163, 164]. Методи оздоровлення, які застосовуються сьогодні у мікроклональному розмноженні, базуються на застосуванні абіотичних чинників та включають культуру верхівкових меристем [8, 9, 110, 87], термотерапію [128, 182, 342], хіміотерапію [122, 270, 293, 341, 343, 356] та електротерапію [123, 148, 149, 301].

Оскільки інфікування клітини вірусами супроводжується глибокою перебудовою самого вірусного матеріалу і компонентів клітини-хазяїна, внаслідок чого виникає нова система – комплекс „вірус-клітина”. Функціональна організація цієї системи визначається взаємодією вірусних та клітинних компонентів і суттєво відрізняється від функціонування незараженої вірусом клітини.

Процес інфікування вірусом рослини певною мірою обумовлений особливостями генотипів обох організмів, однак значний вплив на перебіг подій при інфікуванні можуть справляти зовнішні умови, зокрема абіотичні чинники оточуючого середовища. Вивчення впливу чинників, які змінюють напрямок

протікання патологічного процесу у системі „вірус–рослина-хазяїн” має важливе значення для глибшого розуміння явища елімінації вірусів у рослині.

Теоретичне обґрунтування явища оздоровлення інфікованих вірусом рослинних об’єктів дозволило виділити кілька аспектів цього питання. По-перше, результатом певного співвідношення швидкості росту апекса рослини та швидкості поширення вірусу є виникнення у рослині безвірусних ділянок. На цьому положенні ґрунтується метод культури меристем. Його автори вважали, що поширення вірусу по рослині відстає від швидкого росту кінчика пагона, завдяки чому виникає безвірусна зона в області меристеми [260]. Це припущення було пізніше підтверджене цитологічними дослідженнями, які виявили, що проникненню вірусу в меристемну зону перешкоджає будова провідної системи апекса. Переміщення вірусу по рослині завдяки механізму дальнього транспорту по провідній системі обмежується в зоні апекса через відсутність зрілих елементів цієї системи. Повільне просування вірусу від клітини до клітини через систему плазмодесм значно відстає від поділу та наростання клітин у апексі [26].

По-друге, вивчення впливу фізичних факторів на репродукцію вірусів виявило зниження швидкості цього процесу під дією підвищених температур [247]. Обмеження інтенсивності репродукції вірусів або стабільності віріонів під впливом цього фактора суттєво не впливає на швидкість росту рослини, однак змінює співвідношення між її ростом і накопиченням вірусних часток. Таким чином, термотерапія дозволяє збільшити вихід вільних від вірусів тканин із інфікованих рослин [164]. Ефект елімінації вірусної інфекції, який справляє електричний струм у рослинній тканині, є також ефектом термотерапії. Температура, при якій вірусний нуклеопротеїн експонується у „тепловій ванні”, яку утворює рослинна тканина, викликає його денатурацію, а отже і інактивацію вірусу [148, 179, 236, 297, 301].

По-третє, елімінація вірусів може відбуватися шляхом інгібування їх реплікації компонентами живильного середовища. Механізм цього процесу маловивчений, однак існує значний фактичний матеріал, який підтверджує це положення. Перші публікації, де було описане явище інгібування або симптоми

супресії вірусів, з'явилися ще у 50-х роках минулого століття [247]. Вони лягли в основу методу хіміотерапії, який, з певними модифікаціями, застосовується у практичних роботах по оздоровленню рослин від вірусів. Існує значна кількість хімічних сполук, які мають антивірусну активність, із них найбільше практичне застосування має віразол (синонім рибавірин). Застосування цієї сполуки у живильному середовищі дозволило досягти елімінації ряду вірусів УВК, ХВК, SBK та MBK у регенерантах з меристем картоплі [122, 182].

Однак, використання цих методів досить часто породжує проблеми, які призводять до обмеження переваг активного оздоровлення. Це, насамперед, проблеми збереження ідентичності сорту у ліній оздоровленого меристемного матеріалу [48]. Збільшенню ймовірності виникнення змінених рослин при оздоровленні сприяють фактори, дія яких має комплексне вираження: вплив температури, антивірусних речовин та компонентів живильного середовища, гетерогенність вихідних експлантатів, руйнування кореляційних зв'язків при виділенні меристем, ефект поранення, тощо. Підвищені температури негативно впливають на подальшу культивування регенерантів. Для культури картоплі, крім того, властиве так зване явище фізіологічного виродження, яке індукується підвищеними температурами і призводить до значного зниження продуктивності рослин [128, 198].

Слід також зазначити, що при введенні експлантатів у культуру *in vitro* в окремих сортів може проявитися специфічна реакція на її умови. Крім того, використання різних методів оздоровлення, що мають значну часову тривалість призводить до ускладнень технологічного процесу культивування та зниження ефективності використання оздоровленого матеріалу у насінництві культур [10, 329].

Таким чином, не зважаючи на істотний прогрес у технології оздоровлення рослин від вірусних інфекцій, проблема удосконалення та розробки нових методів, які б не мали негативних наслідків для подальшого розвитку рослин та оточуючого середовища, досить актуальна у наш час.

Модельована мікрогравітація, як фактор впливу на перебіг реакцій у системі „вірус–рослина-хазяїн”, майже не досліджувалася, проте було виявлено ефект пригнічення репродукції вірусу смугастої мозаїки пшениці у інтактних рослин під впливом кліноостатування [47]. Розкриття механізму реалізації цього ефекту може виявити нові шляхи посилення захисних реакцій рослинного організму до вірусної інфекції, а, отже, і можливостей оздоровлення рослин від вірусів. Тому зупинимось докладніше на дослідженнях, присвячених ролі гравітації у розвитку рослинного організму.

1.2.1. Вплив гравітації на рослинні організми

Гравітація, крім сильних та слабких ядерних сил і електромагнітних взаємодій, є четвертою основною силою в природі. Визначною властивістю гравітації, як екологічного чинника, є її постійність і всюдисущість [69, 305]. Відповіддю рослинного організму на вплив цього екологічного чинника є позитивний гравітропізм у коренів та негативний гравітропізм у пагонів. Гравітропізм органів рослини описується як процес, який складається із сприйняття, трансдукції сигналів і фаз ростової відповіді [62, 276, 299, 334]. Сучасні уявлення про гравітропізм базуються на положенні, що сприйняття сили тяжіння рослиною здійснюється в результаті направленої тиску на мембрани ендоплазматичного ретикулуму і плазмалему тих важких частинок (статолітів), що знаходяться в цитоплазмі чутливих до гравітації клітин (статоцитів). Функцію статолітів можуть виконувати великі внутрішньоклітинні органоїди – амілопласти, хлоропласти [115, 125, 160]. Осідання амілопалстів, як вважають, активізує рецептори, які залучені у трансдукцію сигналу. Це призводить до формування фізіологічного сигналу, який проявляється у згині кінчика органа в умовах його горизонтального розміщення [212].

У кожній із стадій гравітропізму значна роль відводиться цитоскелету клітини. У сприйнятті сили тяжіння і трансдукції сигналу, як припускають, седиментовані амілопласти взаємодіють із системою актину в статоцитах, що викликає основний напрям передачі сигналу [101, 115, 160, 334]. Показано, що мікрофіламенти виконують функцію індикатора зміни гравітації у клітинах

кореневого чохлака кореня. Відмічається стійка експресія гена актину за умов зміни гравітації [162].

Місцем рецепції гравітропічного стимулу в корені служать клітини центральної частини кореневого чохлака, а диференціальна відповідь росту, пов'язана з гравістимуляцією, відбувається в зоні розтягнення [62, 305]. У пагонах рослини клітини, розташовані в спеціалізованих тканинах, наприклад, ендодермі гіпокотилів, сприймають силу тяжіння і генерують сигнал, який транспортується до периферійних тканин [115]. Сучасні дослідження показали, що сила тяжіння може сприйматися не тільки спеціалізованими тканинами, а також і недиференційованими культурами клітин [162, 331] і клітинами одноклітинних водоростей [93].

Трансдукція сприйнятого гравітаційного сигналу відбувається одночасно із зміщенням органодів. Відмічено збільшення поперечного електричного потенціалу (позитивного знизу), пов'язаного із змінами у напруженні мембран, а також зі зміною унаслідок цього транспорту іонів, зокрема іонів Ca^{2+} [116, 132]. Учась іонів кальцію в гравітропічній реакції рослин продемонстрована в дослідженнях з використанням слабкого комбінованого магнітного поля [6].

При гравістимуляції виявлена також зміна транспорту ауксину: збільшення його концентрації не менше ніж у два рази в нижніх клітинах у порівнянні з верхніми клітинами органів. Ріст верхньої або нижньої сторони органів рослини змінюється у залежності від чутливості клітин різних тканин до ауксину, внаслідок чого спостерігається вигин кореня вниз, а пагона – вгору [132]. Проте, клітинний механізм перерозподілу ауксину у рослині не ідентифікований [187, 228], а у недавніх дослідженнях показано, що деякі ранні фази гравітропізму не залежать від цього механізму [132]. Крім ауксину, як вважають, у формуванні гравітаційної відповіді беруть участь і інші фітогормони, зокрема брасиностероїди [202]. Виявлено, що екзогенне застосування брасиностероїду стимулювало гравітропічну відповідь у первинних коренях кукурудзи.

Деякі результати вказують, що первинні сигнали сприйняття гравітаційного стимулу також залежать від транскрипційного і трансляційного регулювання. У рослинах рису (*Oryza sativa* L.) було ідентифіковано новий унікальний ген *LAZY1* і встановлено, що гравітропізм колеоптелів включає як залежні від цього гена, так і незалежні сигнальні шляхи. Проте, тільки *LAZY1*-залежний шлях залучає асиметричний розподіл ауксину через орган [354].

У передачі первинних сигналів гравітропізму рослин бере участь інозитол-1,4,5-трифосфат, який пов'язує сприйняття сили тяжіння з ініціацією гравітропічної відповіді [334]. Таким чином, у передачі гравітропічного сигналу у рослинному організмі задіяні різні механізми, проте, в даний час їх послідовність та можливість взаємодії точно не встановлена.

Взаємодія гравітації та інших екологічних чинників призводить до складної диференційованої відповіді, в якій дія чинників часто модулюється. Відомо, що у більшості випадків гравітропічна відповідь коренів і пагонів стимулюється під впливом світла. Проте, у деяких рослинах обробка червоним світлом призводить до зменшення гравітропічної чутливості [328]. Освітлення коренів крес-салату (*Lepidium sativum* L.) викликало зміни у формуванні гравічутливості клітин колумели. Освітлення при кліноостатуванні стимулювало ріст статоцитів коренів та збільшення кількості амілопластів у клітинах 3–6-го рядів колумели, що сприяло збільшенню площі клітин колумели. В умовах модельованої мікрогравітації, при освітленні як червоним, так і синім світлом ріст коренів пригнічувався, проте подовження гіпокотилів стимулювалося [184].

У природних умовах на розвиток кореневої системи впливає вологість навколишнього середовища. Встановлено, що для сприйняття як градієнтів вологи, так і сили тяжіння рослини використовують кореневий чохлик. Недавні дослідження продемонстрували, що в умовах водного стресу, який супроводжується деградацією амілопластів в клітинах осі кореня, відбувається пригнічення подальшого розвитку гравітропічної відповіді кореня *Arabidopsis* [195, 196]. Це демонструє, що гідротропізм та гравітропізм мають спільні шляхи

трансдукції, проте можуть мати специфічні механізми реалізації відповіді організму.

З розвитком космічних досліджень гравітаційна біологія одержала нові можливості для з'ясування ролі гравітації у просторовій орієнтації органів рослин, впливу мікрогравітації на морфогенез та диференціювання клітин та тканин рослин [36, 222]. Дослідження окремих чинників космічного польоту на біологічні системи вищого і нижчого порядку дозволили сформулювати положення, що основними діючими факторами виступають невагомість (мікрогравітація) і космічна радіація [43, 44]. Було сформульовано гіпотезу, що механізм сприйняття і реалізації гравітаційного стимулу в клітинах відповідно до їх еколого-фізіологічного статусу передбачає реорганізацію цитоскелету і просторовий перерозподіл основних клітинних органел [36, 62].

Використання у дослідженнях клітин вищих рослин дозволило виявити наступні закономірності: 1) в умовах мікрогравітації гравірецептори формуються, але не функціонують; 2) нормальне просторове розташування органів рослин в цих умовах обумовлено тим, що неможливість здійснення гравітропічної реакції компенсується фото- і хемотропізмами; 3) спрямованість руху і просторової орієнтації органів рослин визначається градієнтом світлового потоку [36, 62, 93].

Також було встановлено, що мікрогравітація не виявляє мутагенної дії і не призводить до виникнення в організмі мутацій генного або хромосомного типів. Перебування живих організмів в умовах мікрогравітації модифікує спектр і темп мутацій, таким чином, впливаючи на напрям та інтенсивність еволюційного процесу [62]. Доведено, що чинники космічного польоту дестабілізують макро- і мікроструктури вищих рослин та їх клітинних органел, що є однозначною відповіддю клітин на зміну умов існування [242].

Проте, дія мікрогравітації для рослинних організмів, які ведуть прикріпленій спосіб життя, є однозначно стресовим чинником [4]. У дослідженнях з рослинними об'єктами в умовах модельованої мікрогравітації виявили зміни показників перекисного окиснення ліпідів та вільно-радикального окиснення, яке супроводжується зниженням антиоксидантної активності. На

думку авторів, в умовах кліноостатування виявлене типове проходження фаз стресу у рослин [58].

Значна кількість даних свідчить про те, що при мікрогравітації змінюється інтенсивність та прояв фізіологічних, біохімічних та цитологічних реакцій рослини. Виявлено, що в умовах модельованої мікрогравітації відбувається затримка процесу ранньої деконденсації хроматину в ядрах клітин коренів гороху [3]. В умовах модельованої мікрогравітації встановлено перерозподіл рибосомальної ДНК у ядерцевих компонентах, яке супроводжується змінами ультраструктури ядерця. Припускають, що при цьому знижується рівень транскрипції рибосомальної ДНК [68].

У насінні рослин пшениці *Triticum aestivum* L., які вирощувались в умовах космічного польоту, зафіксовано деформацію зерен крохмалю у порівнянні з наземним контролем [181]. Було виявлено, що накопичення протеїну в умовах космічного польоту значно знижувалося, у той же час вміст крохмалю зростав у рослин *Brassica rapa* L. сорту “Astroplants”. Також рівень гліукозинолатів підвищувався у тканинах рослин, які культивувалися в умовах космічного польоту. Маса насіння, одержаного з рослин *Brassica rapa* L., вирощених в цих умовах виявилася удвічі меншою порівняно з масою насіння з рослин, вирощених в умовах наземного контролю [201, 271].

Зниження кількісних (відсоток схожого насіння, сира та суха маса проростків) та якісних (вміст вільних цукрів та крохмалю) показників встановлено при дослідженні впливу реального космічного польоту на розвиток проростків руколи (*Eruca sativa* Mill.) [298]. Автори відмічають також зниження вмісту суми хлорофілів та каротиноїдів у проростках, які експонувалися в умовах мікрогравітації.

За довготривалого кліноостатування спостерігали підвищення рівнів синтезу та нагромадження крохмалю у мінібульбах картоплі поряд зі зниженням вмістів моно- й дицукрів, а також відзначали підвищення активності фосфорилази [94, 95]. У складі крохмалю амілопластів підвищувався також відносний вміст амілози.

В умовах модельованої мікрогравітації відмічені значні зміни у структурі клітин кореня буряка (*Beta vulgaris* L.). Так, встановлено, що розмір мітохондрій у клітинах меристеми кореня зменшувався. Діаметр колумели зростав, а висота її клітин зменшувалася, що призводило до зменшення розмірів органа [153]. При клінонестатуванні знижувався об'єм пластид та площа проламелярного тіла у клітинах проростків ячменю, а також пригнічувалось формування хлоропластів з етіопластів в умовах освітлення [1]. Відмічено, що за довжиною листків клінонестатовані рослини ячменю перевищували нерухомі контрольні. У них також зафіксоване зниження об'єму хлоропластів, крохмальних зерен і пластоглобул [2]. Ці дані можуть свідчити про процеси адаптації рослин до дії модельованої мікрогравітації.

Умови мікрогравітації призводили до змін форми мітохондрій, що супроводжувалося зростанням оводненості клітини [220, 221]. Припускають, що відповіддю проростків сої на умови мікрогравітації є зміни морфології й ультраструктури мітохондрій, що корелює із зниженням рівня енергетичного обміну речовин в статоцитах.

Встановлено, що цей чинник впливає на диференціацію та розвиток вторинної ксилеми та луб'яних волокон у рослин *Prunus jamasakura* [261].

Основні молекулярні механізми гравітропізму поки що досконало не досліджені, проте для деяких видів рослин ідентифіковані гени, які запускають реакції геотропізму кореня. Так, виявлено що гени *ARG1* и *AUX1* [300], *PIN3* [228] та *RHG* [173] беруть участь у формуванні гравітропічної відповіді у *Arabidopsis*. Припускають, що відповідь на гравітаційний стимул на ранніх стадіях розвитку сіянців огірка (*Cucumis sativus* L.), можливо, пов'язана з діяльністю гена *CS-IAA1* [300].

Незважаючи на значні досягнення у дослідженні впливу гравітації на розвиток рослин, все ще чітко не з'ясована роль амілопластів у сприйнятті гравітропічного стимулу. Також залишається недослідженим значний масив проблем гравітропізму щодо видової специфічності гравітаційної відповіді, що

має важливе значення для культивування рослин. Незначна кількість досліджень проведена щодо взаємної дії інших екологічних чинників у формуванні та трансдукції гравітаційного сигналу. Актуальність досліджень впливу мікрогравітації на рослинні організми також пов'язана із необхідністю створення ланок життєзабезпечення космонавтів під час пілотованих космічних експедицій [153, 259, 286].

Досить обмежені дослідження щодо впливу мікрогравітації на системи „патоген – хазяїн”. Так, було виявлено, що культивування в умовах мікрогравітації кишкової паличкоподібної бактерії *Salmonella enterica* значно посилювало її активність [235, 258]. Проте, іншими дослідженнями встановлено, що модельована мікрогравітація пригнічує розвиток корончатогалових пухлин при штучному інокулюванні експлантатів картоплі та топінамбуру культурою *Agrobacterium tumefaciens* [66].

Разом з тим, показано, що у грам-позитивних штамів бактерії *Bacillus thuringiensis* в умовах космічного польоту обмін плазмідами, які є мобільними генетичними елементами, відбувається значно активніше, ніж у наземних умовах. Було виявлено, що грам-негативні штами *Escherichia coli* та *Cupriavidus metallidurans* не змінюють активності в обміні генетичною інформацією під дією мікрогравітації [134]. Автори припускають, що умови космічного польоту можуть посилити у бактеріальних штамів поширення генетичних детермінант, пов'язаних із вірулентністю, стійкістю до антибіотиків та біодеградацією.

Виявлено, що при короткочасному космічному польоті у людини відбувається реактивація латентних вірусів герпесу, яка супроводжується імунною відповіддю організму, проте при тривалих космічних подорожах може відбуватися загострення перебігу латентної вірусної інфекції [255].

Таким чином, встановлена важлива роль мікрогравітації у процесах росту та розвитку рослин. Незалежно від тривалості космічного польоту, розвиток клітин і структур, відповідальних за клітинну диференціацію, ембріогенез та регенерацію рослин пригнічувався в умовах мікрогравітації [28]. Умови мікрогравітації є

стресовими для рослин, отже вони викликають у них адаптаційний синдром для захисту та збереження гомеостазу. Проте роль цього чинника у розвитку взаємин „вірус – рослина-хазяїн”, що є актуальною проблемою для біотехнологічного культивування рослин, майже не з’ясована, тому вона потребує подальшого дослідження.

1.3. Вплив абіотичних чинників у процесі введення експлантатів у культуру *in vitro*

Після підготовки вихідних материнських рослин наступним етапом культури *in vitro* є процес мікророзмноження [39, 49, 91]. Загальним принципом, який лежить в основі одержання регенерантів при мікроклональному розмноженні, є тотипотентність – здатність ізольованих клітин при послідовному поділі відновлювати цілу рослину з притаманними їй властивостями. Широке практичне застосування культури *in vitro* базується на низькій концентрації вірусних часток у меристемних клітинах та високій життєздатності виділених меристем порівняно з іншими тканинами рослин [10, 110]. Крім того, регенеранти з меристем з більшою імовірністю ідентичні рослинам вихідного сорту ніж ті, що походять з інших тканин, тому вважають, що поява мутантних форм в таких популяціях-клонах маловірогідна [242, 320, 266].

Використання як експлантата апекса стебла при мікроклональному розмноженні має важливе значення для подальшої регенерації рослинного організму. Вважають, що головну роль в регенераційних процесах на перших етапах відіграє компетенція клітин тканини до певного типу морфогенезу [8]. Відносно клітин апекса можна стверджувати, що вони є більш компетентними до стеблового морфогенезу, ніж клітини експлантатів з інших частин рослини та клітини калюсу [266]. Це пояснюється тим, що епідермальні та субепідермальні клітини таких експлантатів компетентні до дії екзогенних фітогормонів, що підвищує відсоток утворення адвентивних пагонів порівняно з іншими типами тканин рослини [48].

На етапі введення в культуру *in vitro* чільне місце відводиться складу живильного середовища [9, 39, 91, 250] та, зокрема, вмісту фітогормонів [91, 285, 329]. Проте, якісний та кількісний склад світла, температурний та водно-газовий режими культури *in vitro* також впливають на ефективність регенерації експлантатів [35, 112, 186, 290]. Надлишкова кількість світла може спричинити утворення токсичних сполук, наприклад, активних форм кисню, що викликає стрес. У культурі клітин іноді спостерігають явище потемніння калюсної маси, яке, як вважають, пов'язане з фотоокисненням вторинних сполук у тканинах, які культивують [112, 141, 264]. Рослини внаслідок еволюційної адаптації до зміни умов освітленості розвинули складну фотосенсорну мережу, спеціалізовану для максималізації процесу фотосинтезу та обмеження до мінімуму пошкоджувальної дії світла [17, 135].

Якість, інтенсивність та фотоперіодичність світла для експлантатів *in vitro* відіграє роль інформаційного середовища, оскільки фотосинтетична роль світла пригнічується введенням у живильне середовище цукрів [12, 14, 107, 124, 229, 138]. Потреба у певному спектральному складі світла та режимах освітлення залежить від генотипу рослин. Відомо, що регенеранти картоплі досить чутливі до дії цього чинника [158, 307, 224]. Таким чином, регенеранти адаптуються до специфічних світлових умов культури в системі *in vitro* і морфогенез тканин картоплі контролюється режимом освітлення, завдяки чому можна значно підвищити ефективність мікроклонального розмноження [307, 308]. Насьогодні активно розвиваються освітлювальні системи для біотехнологічних завдань, які реалізують принцип комбінованого освітлення, що включає сонячне та штучне випромінювання [140]. Вияснення ролі світлового чинника у фізіології рослин в умовах *in vitro* базується на загальних принципах фоторецепції світла рослинами у природному середовищі.

Оскільки рослини – прикріплені організми, які не можуть вибрати середовище, вони повинні пристосувати свій ріст і розвиток до навколишніх світлових умов. Моніторинг зміни кількості, якості і напрямку світла дозволяє рослинам оптимізувати вибір часу проростання [96, 102, 281, 284] та подальший

ріст і розвиток, що включає деетіоляцію проростків [204, 249, 267] і просторову орієнтацію органів [136, 168, 328]. Крім того, завдяки взаємодії світлових сигналів із центральним циркадним осцилятором, рослини можуть визначати довжину дня (фотоперіод) і пристосувати свій ріст і розвиток до сезонних змін навколишнього середовища, а також регулювати час переходу від вегетативного до репродуктивного розвитку [146, 169].

У природних умовах складові атмосфери, такі як озон, кисень, водяна пара і вуглекислий газ, вибірково поглинають вузькі смуги довжин хвиль сонячного світла, що призводить до типового розподілу випромінювання денного світла біля поверхні землі. Цей розподіл випромінювання є постійним, проте модулюється хмарами та іншими кліматичними умовами [316]. Екологічно найважливіші коливання у розподілі випромінювання зустрічаються тоді, коли випромінювання взаємодіє з рослинністю. Фотосинтетичні пігменти – хлорофіли і каротиноїди, поглинають випромінювання майже всього видимого спектра (тобто 400-700 нм). Невелика фракція "зеленого" випромінювання передається або відбивається. Проте рослини майже не поглинають будь-яке випромінювання між 700 і 800 нм, тобто ця ділянка спектра розсіюється через листки або відбивається від їх поверхні [314, 316, 317].

Після взаємодії сонячного випромінювання з листовим пологом рослинності відбувається багатократне розсіювання, що змушує випромінювання розповсюджуватись більш хаотично. Це означає, що світло, розсіяне більш-менш горизонтально в межах пологу, містить відносно мало проміння червоної ділянки спектра і більш збагачене променями дальньо-червоної області [316]. Екологічне значення сприйняття світлових сигналів такого зміненого спектра дозволяє рослинам виявляти присутність сусідів, оцінювати їх конкурентоздатну загрозу і реагувати відповідними ростовими реакціями на фактичне затінення або таке, що тільки починається [19, 166, 145].

Фотоморфогенез – регулювання рослинного росту і розвитку світловими сигналами, як відомо, залучає три головні групи фоторецепторів: фітохроми, які поглинають світло у червоній і дальньо-червоній області (600-800 нм) та

криптохроми і фототропіни, що забезпечують сприйняття УФ-А та синьої (400-500 нм) ділянки спектра [167, 246, 304]. Допоміжну роль у фотоморофогенезі відіграють фотосинтетичні пігменти – хлорофіли і каротиноїди [246]. Як свідчать дані численних досліджень, фітохроми виявлені в усіх таксономічних групах нижчих і вищих рослин [246, 353], а також у ціанобактерій [358]. Слід зазначити, що у нижчих рослин, зокрема, у папороті *Adiantum capillus-veneris* ідентифіковано ген, який має гомологію з фітохромами та фототропінами одночасно. Продуктом транскрипції цього гена є фоторецептор, названий суперхромом або phy3, який має властивості протеїнкінази. Оскільки не всі фотозалежні реакції можна пояснити регулюванням за участю трьох родин фоторецепторів, передбачають існування у рослин невідомих поки що фоторецепторів [117].

Фітохром – хромопротеїн, досить міцно приєднаний тіоефірними зв'язками до хромофору. Хромофор фітохрому представляє собою тетрапірол із незамкненим ланцюгом, у якого всі чотири пірольних кільця, зв'язані між собою трьома ненасиченими вуглеводневими зв'язками [13]. Субдиниці апопротеїнів фітохромів кодуються багаточисельною родиною генів, наприклад у рослин *Arabidopsis thaliana* виділено і секвеновано п'ять окремих генів, які кодують білкову частину фітохрому: *PHYA-PHYE* [130, 245]. За подібністю білка ці гени згруповані у три підродини: A/C, B/D і E [170, 243, 316]. У томата були виділені гени *PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* та *PHYF* і було продемонстровано існування ще восьми додаткових генів, які відповідають за синтез фітохромів [188]. У рослин картоплі встановлено наявність генів *PHYA* та *PHYB* [174, 190].

Існування різних фітохромів та їх різноманітних взаємодій відіграє адаптаційну роль у функціонуванні рослинного організму, оскільки це дозволяє йому досить точно корегувати свій розвиток відповідно до умов середовища, які складаються у відповідний момент часу. Це підтверджує і філогенетичний аналіз походження фітохромної системи у вищих рослин, який виявив, що фотосенсорна область фітохрому А піддалася ранній адаптації в еволюційній історії квіткових рослин [243, 244].

Фітохром синтезується у неактивній формі Фч, яка при опроміненні світлом з довжиною хвилі $\lambda=660$ нм переходить у форму Фдч. Фдч є активною і абсорбує світло з довжиною хвилі $\lambda=730$, що призводить до її фототрансформації знову у форму Фч. Форма Фдч досить лабільна і у темряві поступово переходить у Фч. У клітині форма Фч локалізована у цитоплазмі, а при опроміненні стимулюючим світлом та конформації у Фдч, переміщається у ядро, як це було виявлено для фітохромів А і В [177, 191, 194, 121, 217, 218, 318, 350, 352]. Проте, функціональне значення ядерної локалізації фітохромів все ще не з'ясовано [318].

Фітохром А синтезується у етіюльованих рослинах і при опроміненні світлом його вміст знижується, оскільки цей пігмент є фотолабільним. У рослин, що ростуть на світлі, фітохром В є домінантним фоторецептором, роль інших фітохромів у фотоморфогенезі допоміжна [147, 269, 273, 283]. Відповідно, у вищих рослин фітохроми А і В синтезуються у більшій кількості, а інші фітохроми є мінорними [292, 347].

Вплив фітохромів на ріст і розвиток клітин проявляється у регуляції руху хлоропластів, зміні проникності мембран, синтезі ферментів і фітогормонів – ауксинів, гіберелінів та цитокінінів [17, 234, 269]. Описано декілька сотень фітохромозалежних ефектів [13], що свідчить про широку поліфункціональність дії цього рецептора. Однак, одержано дані про те, що регулювання фітохромами реакцій росту і розвитку моделюється умовами навколишнього середовища. Наприклад, проростання насіння *Arabidopsis* регулювалось *phyB* при температурах вище 22 °С, незначну роль при цьому відігравали фітохроми *phyA* та *phyE*. При температурі, нижчій 16 °С, функціональна перевага належала фітохромові *phyE*, а *phyB* відігравав другорядну роль [96, 169].

Залежно від дози опромінення фітохромні реакції поділяють на наднизькоенергетичні (10^{-10} - 10^{-3} мкмоль квантів* m^{-2}), низькоенергетичні (1 - 10^3 мкмоль квантів* m^{-2}), високоенергетичні (10^3 мкмоль квантів* m^{-2}) [240, 269]. Низькоенергетичні реакції виникають при короткочасному опроміненні (3-5 хвилин) і можуть бути обернені опроміненням червоним світлом з довжиною хвилі 730 нм. Максимум спектра дії низькоенергетичних реакцій припадає на

область 660 нм. Для виникнення цього типу фотореакцій необхідно утворення достатньої кількості Φ_{730} [269].

Високоенергетичні реакції реалізуються при постійному освітленні, яке триває години. Максимум спектра дії цих реакцій проявляється при 710-730 нм. Відношення Φ_{730}/Φ_{660} у цьому випадку дуже низьке, тоді як для низькоенергетичних реакцій цей показник становить 0,01–1,0. Для індукції високоенергетичних реакцій необхідне опромінення синім світлом, тому припускають, що вони регулюються не тільки фітохромною системою, а й фоторецепторами синього світла [269]. Спектри дії, притаманні окремим класам фоторецепторів, можуть незалежно впливати на певні рослинні реакції, пов'язані з розвитком, хоча їх ефект може бути змодульований іншими системами фоторецептора.

До 90-х років ХХ століття пігмент, який поглинає світло у синій області спектра (400-500 нм), не був ідентифікований, існували лише гіпотези про його можливі властивості [117, 118]. Після його виділення встановлено, що криптохром рослин – це хромопротеїн, який має дві хромофорні групи: флавінаденіндинуклеотид (ФАД) і птерин [103]. Криптохроми мають значний ступінь гомології з ДНК-фотоліазами, що відносяться до родини білків, які каталізують відновлення пошкодженої УФ-світлом ДНК [129, 351]. Проте, апопротеїн криптохромів має відмінні С-термінальні домени ССТ1 (які відсутні у фотоліаз), а фотоліазна активність у них не виявлена. Є доказ, що криптохроми локалізовані у ядрі, але поки що не було ідентифіковано сайт, який би взаємодіяв з цими фоторецепторами [118].

У даний час у модельній рослині *Arabidopsis thaliana* ідентифіковано два види криптохромів: cry1 і cry2. Фоторецептором синього та УФ-А світла виступає cry1, він модулює ріст рослин при середньому і високоінтенсивному випромінюванні. Він відносно стабільний на світлі. Фоторецептор cry2 нестабільний і швидко деградує під впливом синього світла високої інтенсивності, а функціонує переважно при низькій інтенсивності випромінювання синього світла [117]. Цей фоторецептор також залучений у реакції інгібування видовження

гіпокотилія та регулювання цвітіння. На даний час обмежені дані щодо безпосередніх наслідків фотозбудження будь-якого з криптохромів, які, ймовірно, діють через систему окисно-відновних реакцій [17]. Вважають, що у реакціях фотоморфогенезу криптохроми взаємодіють із системою фітохрому.

Дослідження демонструють комплексну мережу взаємодій між двома класами фоторецепторів, включаючи домінуючий вплив одного з цих класів, антагонізм між ними та взаємодію по типу ефектор/модулятор [105, 344]. Тип взаємин ефектор/модулятор вказує на ситуацію, при якій фоторецептори не можуть незалежно контролювати відповідь реакції росту; цей процес здійснюється лише за умови, якщо один з рецепторів функціонує під контролем інших фоторецепторів [17]. Наприклад, фітохром модулює реакцію фототропізму, яка контролюється фототропіном – фоторецептором синього світла, асоційованого з мембранами клітини [106, 118]. Фототропін був уперше ідентифікований у мутантів *nph1* рослини *Arabidopsis*, гіпокотиль яких не мав фототропічного згину. Цей фоторецептор має дві хромофорні групи, які представляють собою флавінмононуклеотид [117]. У рослині фототропін регулює напрямок згину стебла, а фоторецепторні системи фітохромів та криптохромів визначають амплітуду фототропічної реакції.

Незважаючи на багаточисельні дані щодо фоторегулювання рослинного розвитку червоним/дальнім червоним, синім [127, 231] і УФ-світлом, обмежена кількість робіт, присвячених специфічному ефекту якості світла при регулюванні росту і розвитку рослин за умов культури *in vitro* [51, 157, 263, 307, 308]. Для регенерантів картоплі у культурі *in vitro* виявлено широкий спектр реакцій, які контролюються світлом. Встановлено, що регенеранти картоплі у відповідь на індуктивні короткі фотоперіоди утворюють мікробульби [275, 307]. Етіоляція у регенерантів залежить від рівня випромінювання при культивуванні в умовах *in vitro* [171], а якість світла викликає морфологічні зміни регенерованого організму [308, 348].

Виявлено, що при збільшенні частки червоної області спектра у світловому потоці збільшувалась площа листкової поверхні регенерантів картоплі [308]. Такі

світлові умови суттєво впливали на кількість листків, довжину стебла та вміст сухої речовини у рослинах сортів *Shepody* и *Caribe* в умовах *in vitro*. Синє і червоне світло, яким спільно опромінювали на початку фотоперіоду, призвело до збільшення накопичення сирої та сухої маси регенерантів у культурі *in vitro* [209]. За дії синього світла у регенерантів яблуні збільшилась кількість пазушних бруньок, при чому це явище залежало від щільності потоку, тоді як вплив червоного світла був незалежним від цього показника. Під впливом червоного світла у регенерантів зменшувалося апікальне домінування [263]. Оскільки встановлена участь фітохром у бульбоутворенні *in vivo* [282], припускають, що в умовах *in vitro* цей фоторецептор бере участь у фотоперіодичному регулюванні цього процесу [205].

При вилученні частини синього світла зі світлового потоку за допомогою жовтих плексигласових фільтрів збільшувалася висота регенерантів картоплі [308] та зменшувалась кількість небажаних калюсних утворень на листках і стеблах, які є ознаками втрати тотипотентності клітинами органів рослин [133]. Таким чином, світло може викликати і небажані реакції у культуральному середовищі, які негативно впливають на розвиток регенерантів. Встановлено, що фотохімічні реакції на світлі у живильному розчині викликали окиснення Fe-ЕДТА та появу нехелатованих сполук заліза, які важкодоступні для поглинання регенерантами [104].

На даний час відомо, що однією із ланок передачі сигналу, який сприймається фоторецепторною системою, виступають фітогормони [17]. При цьому плазматична мембрана рослин виступає як сенсор екологічних змін, а сприйнята інформація передається фітогормонами та вторинними меседжерами та реалізується у змінах метаболізму клітини [133]. Таким чином, фітогормони задіяні у сприйнятті як стресових сигналів, так і сигналів при нормальній життєдіяльності рослини.

Різний спектральний склад світла та різна інтенсивність випромінювання можуть мати протилежну дію на один і той же фізіологічний процес, наприклад, індукувати або інгібувати елонгацію стебла [126, 317]. Цей процес також

регулюється дією фітогормонів. У більшості випадків етилен, абсцизова кислота і цитокініни інгібують видовження клітин. Протилежну (тобто стимулюючу) дію мають ауксини, гібереліни і брасиностероїди [111, 215, 253].

Спільні ланки регуляції розвитку рослин спектральним складом світла та фітогормонами встановлені при аналізі різноманітних мутантів. Аналіз рослин, мутантних за генами, які приймають участь у фотоморфогенезі, виявив, що вони мають властивості мутантів, у яких або порушений біосинтез фітогормонів, або знижена чутливість до їх дії. Зокрема, мутанти *spindly* (дефектні за геном *SPY*, що кодує негативний регуляторний фактор біосинтезу гіберелінів) з конститутивною експресією ГК-регульованих генів нагадують *rhyB*-мутанти з подовженими стеблами, етіольованими блідими листками і раннім цвітінням (подібний фенотип спостерігається у рослин дикого типу, екзогенно оброблених ГК₃) [208]. Результати генетичного аналізу мутацій генів ГК і фітохромів свідчать про взаємодію між цими двома сигнальними системами за певних фізіологічних умов, хоча деякі онтогенетичні стадії розвитку, такі як цвітіння, ймовірно, контролюються незалежно обома системами [17]. Фітохроми можуть регулювати транскрипцію генів біосинтезу ГК [111]. Одним з прикладів взаємодії між цими двома сигнальними системами є сумісна регуляція фітохромом *rhyB* і гіберелінами утворення бульб живцями картоплі [206].

Про роль ауксину у фотоморфогенезі свідчать як фізіологічні, так і генетичні дослідження [111]. Експерименти показали, що транспорт ауксину корелює з рівнем освітленості. Наприклад, мутації гена *HY5*, який кодує bZIP фактор транскрипції і приймає участь у передачі сигналів ауксину, проявляються у процесі подовження гіпокотилів проростків за різних режимів освітлення [274]. Взаємозв'язок між сигнальними шляхами фітохромів і ауксину підтверджений у дослідженнях регулювання ДЧС (дальнім червоним світлом) експресії гена *ATNV-2* – негативного регулятора транскрипції. Гіперекспресія *ATNV-2* призводить до виникнення у рослин синдрому уникання тіні, який пов'язаний з порушенням транспорту ауксину [310]. Таким чином, шляхи трансдукції світлового та фітогормонального сигналів мають спільні пункти реалізації. Разом з тим, досить

мало даних, які свідчать про вплив спектрального складу світла на ендогенний баланс фітогормонів, зокрема, ауксинів та гіберелінів.

Отже, незважаючи на існуючий значний фактичний матеріал, який обґрунтовує сприйняття та передачу світлових сигналів при фотоморфогенезі, залишається нез'ясованою певна область щодо реалізації фотоморфогенетичних реакцій рослин у культурі *in vitro*, зокрема, при адаптації експлантатів та регенерантів до умов культивування. Дослідження фоторегуляторної дії світла розширить можливості контрольованого впливу на розвиток рослин у культурі *in vitro*, що дасть змогу ефективно реалізувати потенціал мікроклонального розмноження різних видів рослин.

1.4. Адаптація рослин *in vitro* до умов *ex vitro*

При перенесенні у природне середовище рослини-регенеранти найбільше потерпають від стресу, викликаного зміною середовища перебування [91, 112, 133, 250]. В умовах оранжереї регенеранти повинні перейти від гетеротрофного або фотоміксотрофного живлення до повністю фотоавтотрофного режиму життєдіяльності. Подальше виживання та ріст рослин гарантується нормалізацією фізіологічних порушень, які сформувалися в умовах *in vitro* [107, 268, 289, 357].

Оскільки адаптація до умов *ex vitro* може тривати від кількох тижнів до двох місяців, залежно від виду рослин [223, 254], на цьому етапі важливо створити умови, що сприяють швидкій адаптації. Для створення умов, що відповідають природному середовищу, з живильного середовища виключають цукри, знижують вміст мінеральних солей та збільшують рівень CO₂ [16, 143, 227]. За умов культивування регенерантів на проміжному живильному середовищі без цукрів відбувається відновлення функціонування фотосинтетичного апарату рослин. Ці регенеранти зазвичай потребують підвищеної концентрації CO₂ і більш високого освітлення, порівняно з тим, що традиційно використовується [119, 120, 143, 172, 225, 257, 262, 295]. Збагачення газового середовища культуральних посудин CO₂ досягається при використанні газопроникної плівки, якою закривають їх отвори, а також при збільшенні концентрації вуглекислого газу у приміщенні. Такий ефект

можна досягти і прямим постачанням CO₂ примусовою вентиляцією [120, 210]. У дослідженнях встановлено, що такі умови культивування сприяли виживанню і подальшому розвитку регенерантів *Asparagus officinalis*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Ficus benjamina*, *Fragaria ananassa* і *Rubus idaeus* у процесі їх адаптації до умов *ex vitro* [142, 156, 197, 330].

Проте, цей захід можна застосовувати не для всіх видів рослин. При культивуванні на середовищі без сахарози регенеранти *Uniola paniculata* L. та *Actidinia deliciosa* не могли розвиватися і гинули, оскільки були нездатні засвоювати CO₂ [171, 199]. Формування у рослин фотоавтофного режиму живлення в умовах культури *in vitro* не завжди забезпечує активний ріст рослин після пересадки їх в умови *ex vitro*. Так, в умовах *ex vitro* спостерігали пригнічення росту у регенерантів *Nicotiana tabacum* і *Gardenia jasminoides* після культивування їх на проміжному середовищі без сахарози [100, 219]. Таким чином, при адаптації регенерантів до умов *ex vitro* необхідно враховувати видові особливості рослин, що потребує подальших досліджень.

Відносну вологість у культиваційних посудинах звичайно зменшують шляхом зняття корків, проте це може призвести до швидкого висихання живильного середовища та погіршення росту регенерантів. Застосування підвищеної інтенсивності освітлення регенерантів та зміни температурного режиму культивування ускладнює технологію вирощування рослин в культурі *in vitro* і часто призводять до значних втрат рослинного матеріалу [99, 175, 195, 210, 225, 248].

Важливе значення для успішної акліматизації рослин має субстрат для пересадки регенерантів. Основними його характеристиками мають бути висока вологоємність та повітропроникність. Крім того, для запобігання вторинному інфікуванню, субстрат має бути звільнений від хвороботворних організмів. Зазвичай застосовують суміш перліту, піску та торфу, яку стерилізують прогріванням при 90-100 °C [39], а також широко використовують вермикуліт [144]. Проте, субстрат для пересадки відрізняється фізичними якостями від живильного середовища у пробірці. Коренева система, сформована в умовах

постійного затоплення (рідке живильне середовище) чи низького водного потенціалу (агаризоване живильне середовище) позбавлена корневих волосків, тому відновлення повноцінного кореневого живлення можливе лише після їх утворення. У зв'язку з цим, актуальним є пошук нових видів субстрату, здатних сприяти формуванню адаптованої до природних умов кореневої системи у рослин в умовах *ex vitro*.

Заходи, що їх пропонують проводити після пересадки регенерантів в умови *ex vitro* полягають в обробці кореневої системи рослин фунгіцидами та бактеріоцидними препаратами, забезпеченні підвищеної вологості та зниженні інтенсивності освітлення в умовах *ex vitro* [39, 303, 345, 355]. Адаптації рослин сприяє стимуляція розвитку кореневої системи у регенерантів [60, 151, 250, 337, 345]. Вважають, що для процесу адаптації регенерантів ефективним є застосування речовин, які мають антистресову дію [98]. Зокрема, застосування абсцизової кислоти відразу після перенесення рослин в умови *ex vitro* полегшило „шок трансплантації” у *Nicotiana tabacum*. При цьому знизилось випаровування вологи через продихи, хоча значного впливу на фотосинтетичні параметри рослин не було виявлено. Ведеться пошук заміників регуляторів росту, які вносяться в живильне середовище *in vitro* з метою підвищення адаптаційної здатності регенерантів. Зокрема, з листків тополі *Populus canadensis* Moench. виділено природний аналог бензиладеніну – мета-тополін, що покращував коренеутворення *in vitro* та виживання регенерантів *Spathiphyllum floribundum* [257] і *Uniola paniculata* L. В умовах *ex vitro* [335].

В останні роки активно проводяться дослідження щодо адаптивних властивостей брасиностероїдів – природних поліоксистероїдів, які є похідними 5-а-холестана (рис. 1.1) і характеризуються схожістю хімічної структури зі стероїдними гормонами тварин – естрогеном, тестостероном, екдизоном [92, 88, 114].

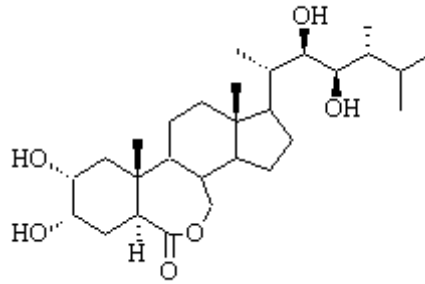


Рис.1.1. Структурна формула епібрасиноліду (Хрипач,1993)

Брасиностероїди підвищують стійкість рослин до низької і високої температури [89, 92], посухи, водного стресу, засолення, аноксії, ушкоджувальної дії гербіцидів і патогенів, регулюють надходження іонів в клітини рослин і запобігають, таким чином, накопиченню важких металів та радіоактивних елементів у рослинах, які ростуть в зонах забруднення полютантами [89, 114].

Як відомо [232, 234], брасиностероїди беруть участь у реакціях фотоморфогенезу. Аналіз *br*-мутантних форм арабідопсису виявив, що вони здатні проявляти фенотип деетіоляції за відсутності світла. У темряві *br*-мутанти формують короткі гіпокотилі з розвинутими сім'ядолями, подібно до рослин дикого типу при вирощуванні їх на світлі. Дослідження показали, що для етіюльованих рослин характерні високі рівні брасиностероїдів, у той час як світло інгібує активність генів біосинтезу цих фітогормонів або їх рецепторів. Показано, регулювання фітохромом А та криптохромом *cry1* експресії гена *BASI*, який кодує цитохром P450, що приймає участь у інактивації та деградації брасиностероїдів [111]. Механізм регулювання активності *BASI* поки що не в'яснений, проте ці дані свідчать про тісний зв'язок фоторецепторів фотоморфогенезу з брасиностероїдами.

Широкий спектр дії брасиностероїдів дозволяє розглядати цей клас фітогормонів як перспективний для підвищення адаптаційного потенціалу рослин за дії різних стресових чинників, у тому числі і в умовах *ex vitro*. Незважаючи на досить ґрунтовні дослідження щодо впливу брасиностероїдів на рослини картоплі [88], існує лише незначна кількість даних щодо впливу екзогенних брасиностероїдів на адаптацію рослин при перенесенні регенерантів в умови *ex*

vitro. З огляду на це, дослідження ролі нового класу фітогормонів – брасинстероїдів у підвищенні адаптаційного потенціалу рослин, та, зокрема, їх регенераційної здатності, надзвичайно актуальні.

Отже, широке застосування культури *in vitro* для вирішення багатьох прикладних та фундаментальних проблем свідчить про значні перспективи цього методу. Проте, важливою проблемою залишається оптимізація культури *in vitro*, яка повинна базуватися на об'єднанні знань фізіології цілої рослини з розумінням відповіді експлантатів, яка формується в цих умовах [112]. Необхідно розуміти, що умови *in vitro*, викликаючи стресові відповіді у регенерантів, можуть сприяти як зниженню їх регенераційної здатності, так і підвищувати їх адаптаційний потенціал. В природних умовах життєдіяльність цілої рослини – фази розмноження і онтогенетичного розвитку та дія стресових факторів досить детально вивчені, проте дослідження зазначених етапів в умовах культури *in vitro* потребують подальшого детального аналізу, зважаючи, що метод *in vitro* є одним із основних методів відновлення нових цінних сортів рослин та їх оздоровлення від патогенів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт досліджень

Об'єктом досліджень була регенераційна здатність картоплі (*Solanum tuberosum*) в культурі *in vitro* та *ex vitro* за дії абіотичних чинників – спектрального складу світла та модельованої мікрогравітації. В експериментах на різних етапах мікроклонального розмноження використовували як модельні об'єкти: апікальні меристеми та інтактні рослини картоплі – на етапі отримання стерильної культури; одновузлові живці регенерантів та регенеранти в культурі *in vitro* – на етапі утворення морфогенних структур; проростки мікробульб, регенеранти в культурі *in vitro* та *ex vitro* – на етапі адаптації до перенесення у природне середовище. Для виявлення діапазону пластичності культури картоплі до дії абіотичних чинників досліджували сорти з різним періодом вегетації.

2.2. Методика дослідження дії модельованої мікрогравітації на перебіг інфекції X-вірусу картоплі у рослинах картоплі

Елімінація вірусів при модельованій мікрогравітації виявлена для системи „фітовірус – рослина пшениці”, у якій досліджували перебіг інфекції вірусу смугастої мозаїки пшениці в інтактних рослинах пшениці при кліноостатуванні [47, 259].

Мікрогравітацію моделювали у кліноостатах КГ-8 та Цикл-2, з горизонтальною та вертикальною віссю обертання, які обертаються зі швидкістю 2 об/хв. Характеристика установок наведена у [47, 56]. Досліди проводили у 4-кратній повторності для кожного сорту. Тривалість кліноостатування складала для різних сортів 36-68 діб. У контролі рослини вирощували у нерухомих контейнерах за однакових умов освітлення і живлення.

Для культивування використовували штучний субстрат, підживлення проводили щоденно розчином мікро- та макросолей у розрахунку 20 мл розчину на контейнер. Досліди проводили в умовах штучного освітлення при освітленості 10-15 тис. лк. Тривалість світлового періоду становила 16 годин, відносна вологість – 70-80%, температура культивування підтримувалась у межах 20-23 °С за допомогою системи кондиціонування культиваційної кімнати.

Вміст вірусів визначали методом ELISA [131] з використанням реагентів Loewe (Німеччина) і Bioreba (Швейцарія). Для аналізів відбирали листки середнього ярусу рослин, проби аналізували у трьох кратній повторності. Оптичну густину продукту ферментативної реакції оцінювали на рідері фірми Tecno Labsystems Opsi MR з програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklik (США) при довжинах хвиль 405/630 нм. Довірчий інтервал для показників імуноферментної реакції вираховували за формулою

$$P = 2 * NC ,$$

де NC – середнє значення оптичної щільності негативного контролю [139].

Введення у культуру *in vitro* експлантатів та їх культивування проводили за загальноприйнятою методикою [5, 49].

Морфологію вірусів і їх наявність встановлювали за допомогою електронної мікроскопії з використанням електронного мікроскопа JEM 1230 (JEOL, Японія). Сік з рослин наносили методом флотації на сітки з плівкою-підкладкою, виготовленою з 0,2 % розчину формвара. Негативне контрастування препаратів проводили 2% розчином фосфорновольфрамової кислоти протягом 2 хв [47, 65].

Вірусну РНК визначали методом ЗТ-ПЛР. Сумарну РНК виділяли за стандартною методикою у модифікації [42]. Проби рослинного матеріалу масою 0,5 г гомогенізували у присутності буферу для екстракції (0,1М PBST-PVP: 2% PVP, 0,05% Tween-20, 0,15 М NaCl, 4 мМ KCl, рН 7,4). Після центрифугування 5 хв. при 2 тис. об./хв відбирали 100 мкл надосаду і переносили у пробірки з 750 мкл рибозоля (38% фенолу, 0,8 М гуанідин тіоціонату, 0,4 М амонію тіоціонату,

0,1 М ацетату натрію, 5% гліцеролу). Суміш перемішували на вортексі, після чого термостатували при +60 °С на протязі 5 хв. Суміш ще раз перемішували на вортексі. Додавали 110 мкл суміші хлороформ/ізоаміловий спирт (24:1). Після центрифугування 10 хв. при 12-14 тис.об./хв. вміст пробірок розділявся на дві фази – фенольну (нижню) та водну (верхню). Переносили 450 мкл водної фази у пробірки з 450 мкл ізопропанолу, перемішували на вортексі і поміщали на 20 хв у морозильну камеру при -20 °С. Пробірки з водною фазою центрифугували при 12-14 тис.об./хв. 10 хв, після чого відбирали надосад. Додавали до осаду 1 мл 70% етанолу, перемішували і центрифугували при 12-14 тис.об./хв 10 хв. Надосад відбирали, осад підсушували при +60 °С 5 хв, додавали 50 мкл РНК-елюенту (DEPS) і відразу використовували для одержання комплементарної ДНК (кДНК). Суміш для одержання кДНК містила 9,9 мкл RT-mix (50 мМ Tris-HCl (рН 8,3), 75 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT, 0,3 мМ dNTP суміші, 40U RNasin, 0,5 мкг Random-праймерів), 200 U M-MLV ревертази та 1 мкг РНК-проби. Вміст пробірок доводили до об'єму 20 мкл mQ H₂O, перемішували та інкубували при +37 °С протягом 60 хв. Після закінчення реакції зворотної транскрипції додавали 20 мкл ДНК-буферу (TE (рН 7,4): 10 мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA).

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили у термоциклері Applied Biosystems, GeneAmp2400. Використовували специфічні олігонуклеотидні праймери: PVM1 (5' taactgcagatgccgtcttg 3'), PVM2 (5' tgcgatgtctttgtcgtat 3'), PVX1- (5'acaggctgcttgggacttag 3'), PVX2 – (5'tcaggctggcaaagtcgtt3'), PVS1- (5'ggcgtcactgaaggtggt 3'), PVS2 (5'atccgaaggtggcctattct 3'). Суміш для реакції включала ПЛР-буфер з 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів, 0,5 U Taq-полімераза, 0,5 мкМ кожного з нуклеотидних праймерів, 10-50 нг матричної кДНК. Результати реакції аналізували методом електрофорезу в агарозному гелі з етидію бромідом. Результати розподілу ДНК-фрагментів візуалізували за допомогою УФ-трансілюмінатора [42].

2.3. Дослідження впливу монохроматичного світла на модельні об'єкти при мікроклональному розмноженні

2.3.1. Короткочасне опромінення монохроматичним світлом. При вирішенні питання про участь конкретних пігментів у фоторегуляторних реакціях використовується принцип відповідності між структурами спектрів дії світла і поглинання пігмента-рецептора [13, 22, 64]. Для форми фітохрому Φ_{660} максимума поглинання проявляються в ділянках спектра 280, 379 і 660 нм; для Φ_{730} - 280, 402 і 730 нм [13]. Вибрані нами довжини хвиль монохроматичного світла 657,6 нм і 720,1 нм співпадають з відповідними вищенаведеними максимумами поглинання фітохрому в червоній області спектра, що дає підстави розглядати зміни, обумовлені впливом вибраного світла як біологічний ефект дії цього рецептора.

Перед опроміненням об'єкти витримували 48-72 години без освітлення (в темряві), що забезпечує можливість зворотної фотоконверсії Φ_{730} в Φ_{660} [13]. Тривалість опромінення обумовлена тим, що 5-хвилинного освітлення червоним світлом достатньо для переходу фітохрому Φ_{660} в Φ_{730} . Також відомо, що кванти синього світла мають більшу енергію, ніж кванти червоного світла [22]. Тому для вирівнювання опромінення за енергетичними властивостями, зокрема за щільністю світлового потоку, тривалість опромінення синім світлом становила відповідно 4 хв.

Для опромінення об'єктів монохроматичним світлом червоної ділянки спектра з хвилями 657,6 нм і 720,1 нм використовували пристрій, джерелом світла у якому був діапроектор типу "Світязь". Монохроматизація світла лампи розжарювання, що пройшло коліматорний об'єктив, здійснювалась інтерференційним фільтром, за яким встановлювали світлосильний об'єктив, зібраний з лінзи і регульованого сферичного дзеркала. Конструкція об'єктиву полегшила наведення променя на вибрану ділянку поверхні зразка. В експериментах використані інтерференційні фільтри з максимумами смуг пропускання 657,6 нм і 720,1 нм. Ширина смуг пропускання на половині висоти становила відповідно 10,8 і 8,8 нм. Інфрачервоне випромінювання джерела

вилучав водяний фільтр. Величину рівня освітленості вимірювали за допомогою термостовпчика й задавали діафрагмою, розташованою між коліматорним об'єктивом і інтерференційним фільтром. Освітленість зразків складала 89 Вт/м^2 для хвилі 658 нм та 86 Вт/м^2 – для хвилі 720 нм . Для виявлення ефекту дози при опроміненні монохроматичним світлом досліджували вплив трьох різних рівнів освітленості: для хвилі 658 нм – $12,5$, $8,0$ і $3,0 \text{ Вт/м}^2$; для хвилі 720 нм – $82,5$, $51,2$ і $19,0 \text{ Вт/м}^2$. Зразки експонували протягом 5 хвилин.

Для одержання монохроматичного світла синьої ділянки спектра використовували прилад для опромінення лазером, який складався з блоку оптичних квантових генераторів, системи для формування променя і установки зразка, системи контролю-реєстрації стабільності й величини потужності променя. Використовували аргонний лазер ЛГН-503, генеруючий в одно- та двомодовому режимі, який налаштовується на одну з п'яти ліній, розташованих в області спектра від $205,9$ до 514 нм хвилі генерації $632,8 \text{ нм}$ і потужністю 12 МВт . Довжина хвилі становила 488 нм , освітленість зразків складала 150 Вт/м^2 . Експозиція зразків на синьому світлі становила відповідно 4 хв [82].

2.3.2. Тривале культивування регенерантів на монохроматичному світлі. Вирощування регенерантів проводили у факторостатних камерах при 16-годинному освітленні; рослини у варіантах освітлювали червоними та синіми люмінесцентними лампами, у контролі – білими ЛБ -40. Спектри випромінювання для люмінесцентних ламп червоного і синього світла становили відповідно $600\text{-}700 \text{ нм}$ з максимумом 660 нм та $400\text{-}500 \text{ нм}$ з максимумом 480 нм . Освітленість складала 40 Вт/м^2 . Контрольні об'єкти культивували при таких же періоді та інтенсивності освітлення.

2.4. Культивування експлантатів та регенерантів при мікроклональному розмноженні

2.4.1. Метод культури меристем. На етапі мікроклонального розмноження рекомендують застосовувати, як критерій успішності оптимізації

умов культивування кількісну оцінку визначеної морфогенетичної реакції експлантата, яка веде до подальшого формування цілої рослини [30]. У наших дослідженнях ми встановлювали залежність органогенезу меристем картоплі за умов *in vitro* від впливу світла червоної та синьої ділянок спектра при короткочасному опроміненні експлантів. Показником оптимальності умов була кількість меристем, які прижилися і сформували стебла, а також кількість регенерантів, які утворили кореневу систему.

Матеріалом для експериментальних досліджень були сорти картоплі з різним періодом вегетації: Бородянська рожева (ранній), Світанок київський (середньоранній), Луговська (середньостиглий), Зарево (середньопізній). Пророщування бульб проводили при вологості 90%, без освітлення. У досліді використовували меристеми з двома примордіями, виділені з проростків бульб.

Перед ізоляцією меристем проростки стерилізували діацидом. Меристеми виділяли у стерильному боксі під бінокуляром із збільшенням $\times 10$ і висаджували їх на живильне середовище за [5]. Експлантати витримували 3-4 дні в темряві і опромінювали монохроматичним світлом. Контрольними варіантами були об'єкти, що не опромінювались монохроматичним світлом. Крім того, для виявлення морфогенної дії світла додатково включали варіант з повною відсутністю світла.

Подальшу культивування меристем здійснювали при опроміненні білим світлом із використанням ламп ЛБ-40, рівень освітленості становив 4000 лк при фотоперіоді 16 год. Через кожні 10 діб визначали життєздатність меристем – кількість меристем, що прижилися, у процентах від кількості висаджених на середовище. Відмічали формативні зміни у експлантів: кількість листків, їх форму та забарвлення; висоту пагона; калюсоутворення тощо. Через 30 діб культивування меристеми пересаджували на свіже живильне середовище і культивували до одержання регенерантів висотою 5-10 мм.

2.4.2. Культура одновузлових живців. Мікроклональне розмноження картоплі проводять, в основному, живцюванням вихідних рослин. При цьому живці в умовах *in vitro* регенерують втрачену кореневу систему і можуть рости до

моменту, поки вичерпаються запаси штучного живильного середовища [86]. Критерієм оптимізації на цьому етапі виступає кількість живців, що їх можна одержати з регенованої рослини [30]. Висота регенеранта, сира маса надземної та підземної частин, розвиток кореневої системи є показниками розвитку в даних умовах.

Наступний етап досліджень полягав у вивченні післядії монохроматичного опромінювання меристем та впливу безпосереднього монохроматичного опромінювання регенерантів на їх ризогенез. Для з'ясування особливостей впливу післядії монохроматичного опромінювання меристем на ризогенез регенерантів, останні після 60 діб культивування розрізали в стерильних умовах на живці за кількістю міжвузлів і висаджували на живильне середовище для коренеутворення згідно з прописом УкрНДІКГ [5], яке містило 1 мг/л ІОК та 0,5 мг/л аденіну (фірма Sigma, ФРН) (табл.2.2.1). Через 10-20 діб культивування відмічали кількість регенерантів, які утворили корені.

Таблиця 2.2.1

Склад живильного середовища для культивування регенерантів, мг/л

Макроелементи		$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
NH_4NO_3	1250	KJ	0,83
KNO_3	1100	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	440	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	770	Органічні добавки	
KH_2PO_4	970	Тіамін-НСІ	0,1
Мікроелементи		Піридоксин-НСІ	0,5
H_3BO_3	6,2	Аскорбінова кислота	3,0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22,3	Сахароза	10000
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	Агар-агар	7000
$\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,025		
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6		

З метою вивчення впливу безпосереднього монохроматичного опромінювання регенерантів на ризогенез проводили світлову обробку регенерантів за такою схемою: 1 варіант – БС, контроль; 2 варіант - опромінення ЧС, експозиція 5 хв; 3 варіант – ДЧС, 10 хв; 4 варіант – СС, 4 хв.; 5 варіант - вирощування в темноті. Враховували кількість регенерантів, які утворили корені і калюс, визначали середню кількість утворених коренів на один регенерант. Досліди проводили у трьох повторах із використанням вибірки 30 меристем у кожному варіанті.

2.5. Вплив світла різного спектрального складу на морфогенез живців картоплі в культурі *in vitro*

З метою вивчення морфогенної дії довготривалого опромінення світлом різного спектрального складу одновузлові живці регенерантів *in vitro* сорту Бородянська рожева вирощували на живильному середовищі УкрНДІКГ [5]. Досліди проводили у трьох повторах по 30 рослин у кожному варіанті.

При живцюванні відбирали живці з різних зон рослини: апікальної, медіальної та базальної (рис.2.1). До апікальних живців відносили верхній живець, до базальної – два нижні живці від материнського листка, решту живців відносили до медіальної зони. Між варіантами рівномірно розподіляли однакову кількість живців з різних зон.



Рис. 2.1. Схема розміщення живців по зонах регенеранта: А-апикальна зона; М – медіальна зона; Б – базальна зона

2.5.1. Визначення балансу ендогенних фітогормонів. Оскільки дуже мало фактів, які свідчили б про вплив на ендогенний баланс ауксинів та гіберелінів такого важливого екзогенного чинника як червоне світло, вирішення цього питання розширить можливості контрольованого впливу на розвиток рослин в культурі *in vitro*. З цією метою ми вивчали вміст ендогенних фітогормонів у різних ділянках регенеранта: апікальній, медіальній та базальній – при вирощуванні рослин на білому (контроль) та червоному світлі. Вміст ендогенних фітогормонів визначали методом імуноферментного аналізу за методикою [27, 108, 306, 346].

2.5.1.1. Екстракція фітогормонів. Зразки рослинного матеріалу були заморожені рідким азотом, гомогенізовані і ліофілізовані протягом 48 год. Матеріал (100 мг) екстрагували спочатку з 70% льодяним водним розчином метанолу протягом 2 год у темноті, потім із додаванням 200 мкл диетилдитіокарбамінової кислоти (ДЕТК) з антиоксидантом; грубі частки видаляли фільтрацією, а екстракт розчиняли, додаючи 200 мг розчину полівінілпіролідону (ПВП) при кімнатній температурі для видалення фенольних сполук. Процедуру екстрагування повторювали тричі. Після того, як екстракт відфільтрували від ПВП, пробу розділяли на дві частини; 400 мкл проби наносили на пластину „Silufol UV-254” з шаром силікагелю на алюмінієвій підкладці. Ширина смуги – 2 см, довжина – 16 см. Проявляли в хлороформі. Пластину на 1 см вище стартової плями відрізали, повертали на 180° і хроматографували в 12,5% водному розчині аміаку до підйому розчинника на 3 см вище стартової плями. Відрізали нижню частину пластини на 1 см вище стартової плями. На край частини, що залишилась, наносили стандартний розчин ІОК (“Sigma”, США), після чого проявляли в розчині „етилацетат – оцтова кислота” (20:1). Зону, яка за хроматографічною рухливістю відповідала стандарту, знімали з пластини і елюювали етилацетатом. Елюати упарювали при температурі 45°C. Ідентифікацію ауксину проводили за допомогою реактиву Прохазки [27].

Для виділення гіберелінів фільтрат, одержаний після видалення фенольних сполук, випарювали до водного залишку, підкисляли 1 н соляною кислотою до рН

2,5 і екстрагували етилацетатом тричі рівними об'ємами. Осад розчиняли в 0,5 мл метанолу.

2.5.1.2. Імуноферментний аналіз вмісту фітогормонів (ІФА). У дослідженнях використовували антитіла і трейсери фітогормонів та методику проведення аналізів згідно з рекомендаціями Biologysche Bundesanstalt (Брауншвейг, ФРН).

Принцип аналізу. Фітогормон, помічений лужною фосфатазою (трейсер), додавали разом з рослинним екстрактом в покриті антитілами лунки полістирольної плати. При цьому відбувалася конкурентна реакція між постійною кількістю трейсера, що обмежена кількістю антитіл на внутрішній поверхні лунки, та невідомою кількістю фітогормону, що міститься в рослинному екстракті. Фітогормон в рослинному екстракті конкурує з трейсером за місце приєднання до антитіла. Неприєднані трейсери вимивали водою, після чого додавали субстрат для лужної фосфатази. Таким чином, інтенсивність отриманого жовтого забарвлення проби була обернено пропорційною до кількості гормону у рослинному екстракті. Відношення інтенсивності забарвлення до концентрації фітогормону представляють графічно у вигляді кривої.

Хід аналізу. Антитіла, специфічні проти відповідного фітогормону, розчиняли в 50 mM NaHCO_3 . В лунки полістирольних плат наносили по 0,2 мл розчину, що містив 12,5 мг/мл ліофілізованої сироватки, розчиненої в карбонатному буфері (0,05 моль/л, рН 9,6), й інкубували протягом 12 год при температурі 4°C. Плати тричі промивали з промивним буфером (5 ммоль/л трисгідроксиметиламінометан; 0,1 ммоль/л MgCl_2 ; 1 ммоль/л NaCl ; 0,05% Tween 20; рН 7,8) і блокували з 300 мкл 0,01% BSA в TBS буфері протягом 15 хв. Після промивки в лунки наносили по 200 мкл стандартних розчинів та зразків, розчинених в 1 мл TBS-буферу (50 ммоль/л TBS, 1 ммоль/л MgCl_2 , 10 ммоль/л NaCl , рН 7,8), й інкубували протягом 2 год при кімнатній температурі. Потім додавали 20 мкл розчину ензимного трейсера (1:1000) й інкубували ще протягом 45 хв. Після цього додавали 200 мкл р-нітрофенілфосфату, розчиненого в диетаноламіновому буфері (1 ммоль/л диетаноламіну; 1 ммоль/л MgCl_2 ; 0,1

ммоль/л $ZnCl_2$; рН 9,6), й інкубували протягом 1 год при $37^\circ C$. Адсорбанти ідентифікували на рідері MEQU (Німеччина) при 405 нм. Зразки двох незалежних екстракцій аналізували 12 разів в різних розведеннях. Для підвищення чутливості реакції проводили метилування фітогормонів. До екстрактів додавали 1 мл diazometanu. Надлишок нейтралізували 5 мкл льодяної оцтової кислоти.

Розрахунок процента зв'язування проводили за формулою:

$$B = \frac{ExO.D. - NSBO.D.}{B_0O.D. - NSBO.D.} \times 100, \quad (1)$$

де: B – зв'язування фітогормону з антитілами, %;

$ExO.D.$ – оптична щільність зразків та стандартів, опт.од;

$NSBO.D.$ – оптична щільність неспецифічної реакції (500 пмоль метилованого фітогормону + 100 мкл трейсера = відсутність зв'язування), опт.од;

$B_0O.D.$ – оптична щільність специфічної реакції (100 мкл буфера + 100 мкл трейсера = повне зв'язування), опт.од.

Для порівняння експериментальних і стандартних кривих розведення одержані дані логарифмували за формулою

$$\text{Logit } B/B_0 = \text{Ln} \frac{B/B_0}{100 - B/B_0}, \quad (2)$$

де: B , B_0 (див. формулу (1)).

Результати ІФА оцінювали шляхом визначення паралельності Log-трансформованих експериментальних кривих з кривими стандартних розчинів.

2.6. Методика досліджень бульбоутворення у картоплі у культурі *in vitro*

Для культури картоплі *in vitro* відсутні дані щодо дії короткочасного опромінення червоною ділянкою спектра на процес бульбоутворення. З метою вивчення дії додаткового опромінення світлом червоної ділянки спектра

проводили дослідження у факторостатних камерах, де регенеранти сорту Луговська вирощували на живильному середовищі за прописом [5] з додаванням 6% сахарози та введенням кінетину в концентрації 1 мг/л. Протягом 10 діб рослини культивували при фотоперіоді (16:8), температура середовища становила 25 °С, освітленість – 4000 лк, вологість - 70%. Після цього протягом 10 діб частину рослин перед початком темного періоду опромінювали протягом 5 хв ЧС, іншу частину – 10 хв ДЧС, контрольні рослини не опромінювали. Кількість рослин у варіанті – 30 шт, повторність досліду триразова.

2.7. Методика проведення досліджень при адаптації мікробульб та рослин до умов *ex vitro*

Відомо, що фотоактивація фітохрому у гетеротрофний період розвитку призводить до довготривалої стимулюючої післядії на ріст і розвиток рослин [64]. Експериментальні дані, які б підтвердили дану концепцію відносно проростків бульб картоплі відсутні, проте відомо, що у практиці картоплярства у Голландії передпосадкове озеленення бульб картоплі є обов'язковим прийомом підготовки посадкового матеріалу та підвищує урожайність культури на 20% [85].

Вплив опромінення монохроматичним світлом на адаптацію мікробульб до природних умов досліджували на мікробульбах сорту Луговська, які утворилися в умовах культури *in vitro*. Мікробульби пророщували за відсутності світла до появи проростків довжиною 1-2 мм, після чого опромінювали. Варіанти досліду включали: 1 – опромінення світлом з довжиною хвилі 720 нм (4 хв); 2 – опромінення світлом 720 нм (3 хв), 3 – опромінення світлом 720 нм (2 хв); 4 – опромінення світлом з довжиною хвилі 658 нм (4 хв); 5 – опромінення світлом 658 нм (2 хв); контроль - без опромінення. Після опромінення мікробульби висаджували у ґрунт стаціонарної теплиці. Кількість мікробульб у варіанті – 30 шт, повторність досліду триразова. Спостерігали за схожістю, розвитком сходів, обліковували кількість стебел, урожайність. Для встановлення можливого впливу післядії опромінення проводили спостереження за рослинами, одержаними від потомства мікробульб. Бульби, які пройшли період спокою, висаджували у ґрунт

стаціонарної теплиці без обробки світлом. Кількість бульб у варіанті становила 30 шт, повторність досліду триразова.

2.7.1. Дослідження змін вмісту білка при опроміненні проростків світлом червоної ділянки спектра. Відносно реакцій, які відбуваються у проростках бульб картоплі після опромінення світлом червоної області спектра відомості відсутні. Тому метою наших досліджень було визначення вмісту білка у бульбах та проростках за умов дії короткотривалого опромінення монохроматичним світлом.

Дослідження проводили на бульбах сорту Світанок київський. Бульби пророщували у темноті до висоти проростків 1,5-2 см. Опромінювали проростки за схемою: ЧС – 5 хв; ДЧС – 10 хв; СС – 4 хв; контрольні об'єкти не піддавали обробці світлом. Визначення вмісту сухої речовини та білка проводили через 48 год після опромінення, оскільки відомо, що саме за такий період відмічали максимальну різницю при дослідженнях з пшеницею [64]. Вміст сухої речовини в проростках та бульбах встановлювали загальноприйнятим методом [45].

Висушений матеріал розмелювали у електромлинку і використовували для визначення вмісту білка, яке проводили за методом Кьельдаля у модифікації [45].

2.7.2. Вплив абіотичних чинників на проростання бульб картоплі. Відсутні дані щодо впливу світла червоної області спектра на розвиток кореневої системи у проростків бульб картоплі. Оскільки температурний фактор у природних умовах є більш статичним, представляло інтерес виявлення сумісного впливу світла і вологи при різних рівнях цих факторів на розвиток проростків бульб картоплі. Вивчали вплив короткочасного опромінення світла червоної ділянки спектра на розвиток кореневої системи проростків бульб при двох рівнях відносної вологості середовища – 70% та 90%. Бульби картоплі сорту Світанок київський культивували при 24°C та відносній вологості 70% без освітлення до появи проростків. Після цього частину бульб розміщали у вологій камері, де забезпечували відносну вологість 90%. Протягом 10 діб проростки

опромінювали ЧС, $\lambda=658$ нм (5 хв), як описано вище, контрольні об'єкти не піддавали обробці світлом. Температура протягом всього часу досліду становила 24°C. Дослід проводили при 3-кратній повторності по 20 бульб у кожному варіанті.

2.7.3. Дослідження впливу субстрату на розвиток рослин в культурі *ex vitro*. Критерієм оптимізації на етапі *ex vitro* є розвиток кореневої системи, яка забезпечуватиме приживання рослини при пересаджуванні у ґрунт [30]. Оскільки винятково важливе значення для регенерації і розвитку кореневої системи має субстрат культивування були проведені відповідні експерименти по випробуванню і пристосуванню нового субстрату для вирощування картоплі в умовах *ex vitro*.

Нами вперше використано як субстрат для укорінення живців регенерантів картоплі оригінальний синтетичний субстрат з комерційною назвою „пластагар”, розроблений в лабораторії Національного медичного університету ім. О.О.Богомольця під керівництвом доцента В.В. Гашинського [37, 59]. Пластагар – це композитний полімер зі складною багаторівневою сітчастою структурою, отриманий шляхом радикальної сополімеризації синтетичних мономерів в присутності ініціатора. Залежно від цільового призначення його можна модифікувати в різних аналогових формах – диски, гранули тощо. Композит має досить високу прозорість, не чутливий до дії підвищених температур, радіаційного і ультрафіолетового випромінювання. Матеріал композиту біологічно інертний, проте добре насичується будь-якими поживними речовинами [37].

Пластагар початково був створений для цільового використання у медико-технічних сферах призначення, а у наших дослідженнях вперше був випробуваний в якості субстрату для вирощування рослин картоплі в культурі *ex vitro* та успішно застосований, насамперед для масового укорінення живців з регенерантів *in vitro*. Матеріал композиту відрізняється високою пористістю, добре утримує вологу і пропускає гази; завдяки цьому при пікіруванні укорінені живці легко видаляються з пластагару, не травмуючи кореневу систему, що забезпечує можливість для багаторазового використання цього субстрату.

Вибір культиваційних посудин є суттєво важливим елементом у розробленні й оптимізації технології *ex vitro*, оскільки вони повинні забезпечувати швидку регенерацію рослин, а також достатньо високу технологічність і керованість процесу. При цьому масовість регенерації рослин забезпечується шляхом вирощування розсади.

У своїй роботі по вирощуванню розсади картоплі ми використовували новий оригінальний, розроблений нами спосіб культивування рослин [54], одним з основних елементів якого є використання специфічних культиваційних пристроїв. З цією метою нами були успішно випробувані синтетичні багатосекційні плати, наприклад, полістирольні лункові касети № 126 (ПСК) виробництва фірми “Гібрид” (Україна). Розміри касети 50 см x 40 см; стандартна робоча поверхня (умовно – поверхня 1) має 9 каналів, розділених перегородками на 14 лунок розміром 30 мм x 30 мм кожна і завглибшки 25 мм. Слід зауважити, що ця конструкція забезпечує істотну особливість: завдяки такому рельєфному виконанню фактично створена не одна, а дві поверхні, придатні для роботи. Тому у ході досліджень ми використовували не лише стандартну робочу поверхню, але й зворотний, неробочий бік ПСК (у зв’язку з чим сторони ПСК нами були умовно позначені відповідно як поверхня 1 і поверхня 2). Поверхня 2 має 8 окремих каналів і один спільний, який з’єднує всі канали за принципом сполучених посудин. Ширина каналів 10 мм, глибина - 25 мм. Індивідуальна довжина кожного з робочих каналів – 42 см.

Для культивування живців *ex vitro* ми використовували поверхню 2 ПСК, а для вирощування розсади – поверхню 1. Живильний розчин готували за прописом УкрНДІКГ [5]. Культивування в ПСК проводили на світлових установках у лабораторії клонального мікророзмноження Інституту картоплярства НААН з такими режимними параметрами: 16-годинний світловий період, освітленість 4000 лк, температура 20-25°C. Догляд за живцями полягав у щоденному внесенні живильного розчину в робочі канали ПСК.

Укорінення живців здійснювали протягом 10-12 діб, подальшу культивацію з цією метою ми вважали недоцільною, оскільки збільшення довжини коренів, по-

перше, призводило до значного травмування кореневої системи при пікіруванні і, як наслідок, до збільшення тривалості періоду приживання, по-друге, не забезпечувало істотної інтенсивності розвитку регенерантів. Укорінені живці пікірували в ПСК (поверхня 1), наповнені субстратом із суміші тирси і піску, в який додавали макро- та мікроелементи. Культивування проводили у теплиці та у кімнатах із штучним освітленням лампами ДРЛ-400. Освітленість становила 10-15 тис.лк, світловий період – 16 год. В умовах *ex vitro* живці підживлювали розчинами мікро- та макросолей згідно з прописом [5].

Вплив умов культури *ex vitro* досліджували на рослинах картоплі сортів Світанок київський, Косень-95 та Поляна, одержаних у Інституті картоплярства НААН. Контрольні рослини вирощували в культурі *in vitro* згідно з рекомендаціями [5]. У культурі *ex vitro* живці регенерантів культивували до укорінення на синтетичному субстраті власної розробки [57]. Одержані рослини обох варіантів висаджували у теплицю або культивували в умовах культиваційної кімнати при штучному освітленні. Дослід проводили у 3-кратній повторності по 30 рослин у кожному варіанті. Враховували показники росту рослин, накопичення сирої маси окремими органами і цілою рослиною, вміст сухої речовини, площу листової поверхні, питому масу площі листової поверхні.

2.7.4. Дослідження впливу обробки брасинолідом епіном на розвиток рослин у культурі *ex vitro*. При вивченні впливу брасиностероїду об'єктом досліджень були рослини картоплі сорту Кримська роза, одержані у лабораторії «Екології вірусів і діагностики вірусних захворювань» ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Для введення в культуру *ex vitro* живці регенерантів укорінювали у торфо-перегнійних субстратних пігулках Jiffy-7 (Данія). Препарат епін одержаний з Інституту захисту рослин НАН Білорусі. Діюча речовина препарату епін – епібрасинолід, ідентичний природному рослинному гормону, концентрація – 0,25 % діючої речовини. У дослідженнях використовували водний розчин епіну у концентрації 0,1 мкг/л і 0,2 мкг/л. Контрольні варіанти обприскували водою. Для картоплі, як культури, у якої є певний потенціал розмноження у вигляді бічних бруньок, на етапі *ex vitro* доцільно використати ініціацію

їх росту для збільшення коефіцієнту розмноження. Тому, після укорінення та відростання надземної частини рослин, проводили живцювання і верхівкові живці висаджували в субстратні пігулки. Висаджені живці і декапітовані рослини оприскували епіном у вказаних концетраціях. Враховували швидкість регенерації втрачених частин рослин, кількість нових листків, що утворилися, висоту рослин. Досліди проводили в чотирикратній повторності по 8 рослин на варіант. Досліди проводили у факторостатній камері в контрольованих умовах з освітленістю 10 тис.лк. Тривалість світлового періоду складала 16 годин, відносна вологість повітря - 70-80%, температура культивування підтримувалася в межах 20-23 °С.

2.8. Статистична обробка даних

Пластохронний індекс рослини визначали за формулою [159]:

$$P.I. = n + \frac{\log L_n - \log \lambda}{\log L_n - \log L_{n+1}},$$

де n – номер листка, наступного за тим, який вибраний точкою відліку; L_n – його довжина; λ – довжина листка, вибраного точкою відліку (10 мм).

Як характеристику розвитку меристем використовували ентропію або невизначеність системи [11]. Організація системи означає реалізовану в об'єкті невизначеність, а обрахована різниця значень невизначеності є мірою організації об'єкта. Тобто, ентропія визначає кількісно складність системи. Більш упорядкована система характеризується меншим значенням ентропії або невизначеності. Ентропія визначається ймовірностями всіх елементарних подій даного явища. Величину ентропії розраховували за формулою [11]:

$$H(p_1, p_2, \dots, p_k) = - \sum_{i=1}^k p_i \ln p_i,$$

де p_1, p_2, \dots, p_k – всі ймовірності, які заміняли частотностями розподілу кількості живих меристем у варіантах, k – число значень, яке може набувати

система. Для цього показника використовували кількість обліків. Ентропію вимірювали у бітах.

Визначення оптимального обсягу вибірки та статистичну обробку даних проводили за [24]. Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням пакету ToolPac програми Microsoft Excel. У таблицях приведені стандартні похибки середніх.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Індукція морфогенезу експлантатів картоплі під впливом світла визначеного спектрального складу

За характером розвитку виділених меристем на живильному середовищі нами відмічено 3 типи морфогенетичних реакцій:

I. Збільшення кількості і розміру клітин експлантата через 10-15 діб після перенесення їх на живильне середовище, при цьому спостерігалось розростання примордіїв експлантатів у видовжені листки серповидної форми та формування стебла з парою справжніх листків (рис.3.1.1).

II. Наростання калюсу, який містив клітини різного типу (диференціація). Потемніння калюсу, яке зрідка відмічалось в процесі тривалого культивування, не ініціювало органогенез.

III. Потемніння експлантатів, яке відмічалось через 7-10 діб з початку культивування, приводило до їх загибелі.

Вказані вище типи змін спостерігали у кожному з варіантів, що дало підстави вважати їх типовими проявами реакції меристем на введення в культуру. Тому позитивною реакцією морфогенезу вважається розвиток меристем за типом I, оскільки прямий органогенез дозволяє швидко одержати із експлантатів регенеранти, тоді як негативною – за типом II та III. Такий розподіл давав можливість охарактеризувати умови культивування з точки зору їх адекватності для регенерації меристем у культурі *in vitro*.



Рис. 3.1.1. Регенерація рослин картоплі з меристем у культурі *in vitro*

Дослідження, проведені з меристемами різних сортів картоплі в культурі *in vitro*, показали, що світло справляє істотний формативний вплив на ці об'єкти [82]. Причому, як частота приживання, так і період регенерації меристем залежать від спектрального складу світла (табл. 3.1.1).

Таблиця 3.1.1

Вплив опромінення світлом червоної та синьої ділянок спектра на частоту приживання та період регенерації апікальних меристем з проростків картоплі

Варіант	Частота приживання, %			Період регенерації, доби		
	сорт Бородянська рожева	сорт Луговська	сорт Зарево	сорт Бородянська рожева	сорт Луговська	сорт Зарево
Контроль	43,7	43,2	51,5	30	40	40
ЧС	70,1	60,0	70,4	35	35	45
ЧС+ДЧС	44,4	40,0	40,3	30	35	40
ССЛ	42,4	45,1	43,7	30	40	45
Т	12,5	17,3	20,3	35	40	40
НІР ₀₅	6,2	5,7	5,6	3,8	4,6	4,7
$S\bar{X}$	1,7	1,9	1,8	1,3	1,6	1,6

Примітка: ЧС - короткочасне опромінення червоним світлом ($\lambda=658$ нм); ДЧС - короткочасне опромінення дальнім червоним світлом ($\lambda=720$ нм); ССЛ - короткочасне опромінення синім світлом лазера ($\lambda=488$ нм); Т - культивування експлантатів за відсутності освітлення.

Найбільш низькою життєздатністю характеризувалися меристеми, які культивували за повної відсутності освітлення (Т) і частота приживання таких меристем становила залежно від сорту 29-40% порівняно з контролем. Період регенерації у цьому варіанті у порівнянні з контролем подовжувався на 5 діб або не відрізнявся від контрольного варіанту.

Для приживання меристем найбільш ефективним виявилося червоне світло з довжиною хвилі 658 нм (ЧС). У цьому варіанті частота приживання меристем варіювала в межах 60,0 - 70,4 % залежно від сорту, що в 1,6-4,1 раза більше, ніж у інших варіантах. Виявлено антагонізм дії ДЧС і ЧС, оскільки опромінення монохроматичним світлом з довжиною хвилі 720 нм знімало позитивний ефект червоного світла, показник приживання меристем при цьому знижувався на 14,9 – 27,7% залежно від сорту. Різниця між сортами була статистично незначущою (табл. 3.1.1).

Проведений регресивний аналіз зв'язку між спектральним складом додаткового опромінення і приживанням меристем картоплі в культурі *in vitro* виявив тісний зв'язок, який був підтверджений на 5% рівні значущості (табл. 3.1.2).

Таблиця 3.1.2

Результати регресійного аналізу залежності приживання меристем картоплі від спектрального складу додаткового опромінення

Сорт	Рівняння регресії	η_{xy}	η^2_{xy}	S_{η}	t_{η}	$t_{0,05}$	$t_{0,01}$
Зарево	$y = 2,3x^3 - 25,19x^2 + 83,51x - 34,80$	0,926	0,858	0,218	4,25	3,18	5,84
Луговська	$y = 1,78x^3 - 19,5x^2 + 66,12x - 24,52$	0,948	0,899	0,183	5,17	3,18	5,84
Бородянська рожева	$y = 1,59x^3 - 19,63x^2 + 73,38x - 35,64$	0,947	0,896	0,186	5,08	3,18	5,84

Зв'язок між досліджуваними явищами суттєво відрізнявся від прямолінійного, про що свідчать рівняння регресії. Криволінійність зв'язку, очевидно, зумовлена певними внутрішніми факторами у клітинах меристеми, які можуть бути пов'язані з епігенетичними механізмами регулювання

розвитку. Відомо, що сучасні погляди на проблему розвитку апікальних меристем пагонів висувають на перший план обмін сигналами між клітинами, при цьому генетично зумовлена програма відіграє вторинну роль [230, 332, 311]. Таким чином, на сприйняття та трансдукцію світлових сигналів може впливати взаємодія між клітинами експлантата під час процесу регенерації.

Разом з тим, виявлений зв'язок між морфогенезом вичленованих меристем у культурі *in vitro* та дією додаткового опромінення досить сильний, оскільки значення кореляційного відношення r_{xy} для усіх досліджуваних сортів наближалось до 1,0. Слід зазначити, що зв'язок не був підтверджений на 1 %-рівні значущості. Очевидно, існують і інші індуктори морфогенезу експлантатів, проте додаткове опромінення світлом червоної та синьої ділянки спектра за даних умов має переважаючий вплив.

Про відсутність позитивного впливу ДЧС на життєздатність меристем свідчать і графічні дані, представлені на рисунку 3.1.2.

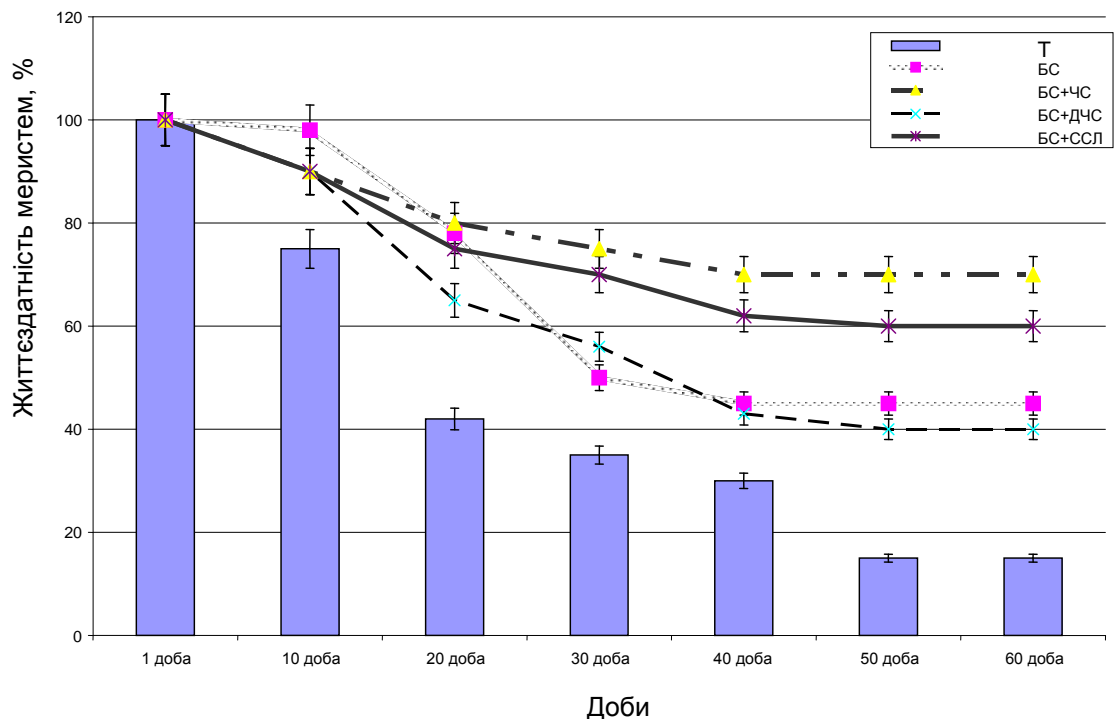


Рис.3.1.2. Динаміка життєздатності апікальних меристем рослин картоплі сорту Луговська під впливом різних режимів освітлення: Т – культивування експлантатів без освітлення; БС – культивування експлантатів на білому світлі

люмінесцентних ламп; БС+ЧС – додаткове короткочасне опромінення червоним світлом ($\lambda=658$ нм); БС+ДЧС – додаткове короткочасне опромінення дальньо-червоним світлом ($\lambda=720$ нм); БС+ССЛ – додаткове короткочасне опромінення синім світлом лазера ($\lambda=488$ нм)

Впродовж перших 20 діб культивування ДЧС спричиняло різке зниження кількості живих меристем, що не спостерігали в інших варіантах, за винятком експлантаів, які культивували за відсутності освітлення. Позитивний вплив виявили при опроміненні об'єктів синім світлом лазера (ССЛ). Життєздатність меристем у цьому варіанті була нижчою в 1,2 раза відносно варіанту з ЧС, проте в 1,4 раза переважала контрольний варіант. Такий вплив режимів опромінення був виявлений і при дослідженнях на інших сортах. Перші 30 діб культивування є найбільш критичними для життєздатності меристем, а при подальшому культивуванні значного зниження кількості живих меристем не спостерігали

Відомо, що для зернових культур вирішальну роль у регенераційних процесах *in vitro* відіграє генотип рослини [7, 86]. Для різних видів картоплі відмічена значна роль генотипу у регенераційних реакціях, однак, на думку дослідників, не менш важливе значення має технологія процесу мікроклонального розмноження, зокрема при культивуванні експлантатів різних сортів картоплі, які відрізняються тривалістю вегетаційного періоду [86]. У наших дослідженнях ми не виявили істотної різниці у здатності до регенерації апікальних меристем різних сортів картоплі в культурі *in vitro*.

Оборотність дії ДЧС відносно впливу ЧС спостерігали у дослідах з меристемами рослин сорту Світанок кийвський (рис. 3.1.3). Загальний біологічний ефект у варіанті з опроміненням синім світлом лазера (ССЛ) спостерігали на рівні варіанту з ЧС. ДЧС повністю не знімало ефекту ССЛ, але, очевидно, негативно впливало на динаміку приживання меристем, оскільки у цьому варіанті мало місце різке зниження життєздатності меристем при третьому обліку.

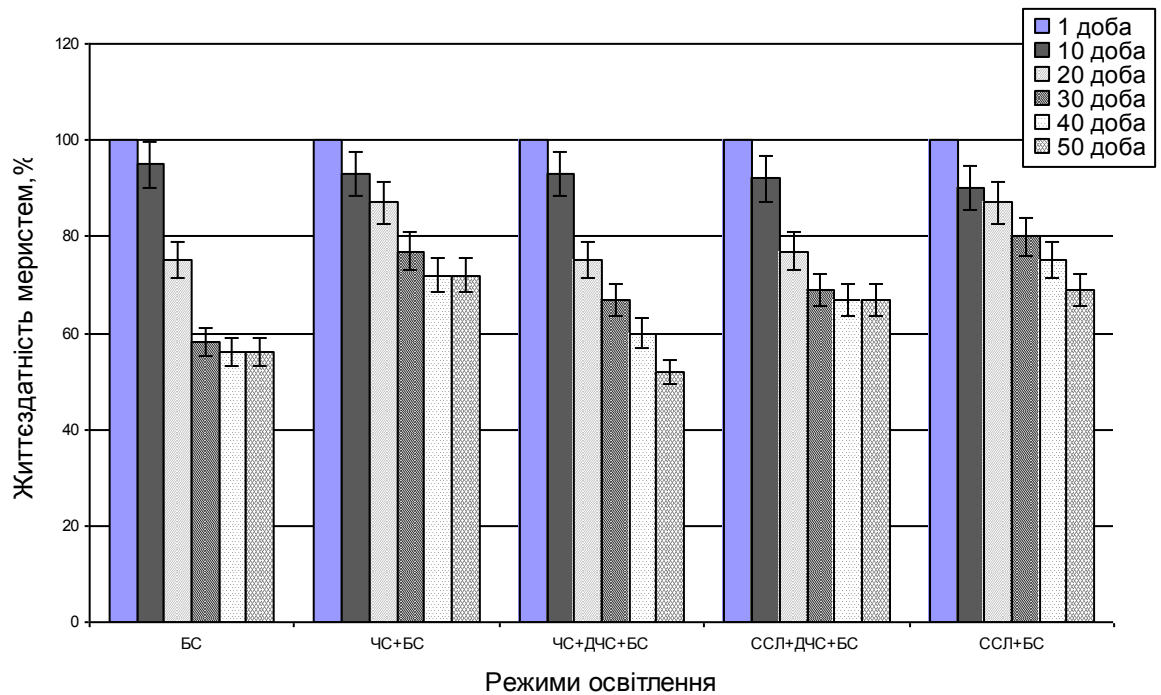


Рис. 3.1.3. Динаміка життєздатності меристем рослин картоплі сорту Світанок київський під впливом різних режимів освітлення

Крім того, опромінення дальнім червоним світлом знімало вплив червоного світла з довжиною хвилі 658 нм, що проявлялось у зниженні на 10% кількості меристем, які прижилися, порівняно з варіантом, у якому не використовували опромінення ДЧС. Встановлений ефект може свідчити на користь того, що в підвищенні життєздатності меристем картоплі в культурі *in vitro* бере участь фоторецепторна система фітохром, оскільки реакція оборотності дії червоного світла (ЧС) дальньо-червоним (ДЧС) характерна для тригерного механізму дії цього фоторецептора [13,62].

Позитивний вплив на приживання меристем виявили при опроміненні об'єктів синім світлом лазера, а післядія цього фактора на ризогенез регенерантів з меристем перевищувала контроль на 19,3 % (табл.3.2.3). Післядія умов темряви негативно впливала на процес ризогенезу, підвищуючи кількість регенерантів, у яких утворювався калус і регенерація кореневої системи пригнічувалась. Загалом вихід регенерантів може становити від 0,07 до 0,67 рослин на одну меристему [86]. У наших дослідженнях цей показник становив 0,12-0,70 рослин на одну меристему залежно від варіанту культивування.

Таблиця 3.2.3

Вплив опромінення світлом червоної та синьої ділянок спектра на ризогенез у регенерантів з меристем рослин картоплі сорту Луговська

Варіанти	Регенеранти, що утворили корені, %	Регенеранти, що утворили калюс, %	Загинуло регенерантів, %
БС (контроль)	75,0±3,5	25,0±1,2	0
ЧС +БС	78,3±3,2	21,7±0,9	0
ДЧС+БС	76,3±3,8	33,7±1,4	0
ССЛ+ БС	89,5±4,2	10,5±0,5	0
Т+БС	17,9±0,8	61,9±2,6	20,2±0,7

Узагальнюючий аналіз розвитку експлантатів в культурі *in vitro* показав, що для морфогенезу меристем опромінення ЧС та ССЛ має оптимізує вплив. Експлантати за дії цих чинників швидше регенерували нові органи, а калюсогенез був істотно пригнічений.

Для оцінки впливу різних режимів додаткового опромінення як характеристику використали невизначеність системи або ентропію [11] (табл. 3.1.3).

Таблиця 3.1.3

Показник ентропії культивованих експлантатів за дії світла різного спектрального складу у культурі *in vitro*, біт

Варіанти	Регенерація	Ризогенез	Калюсогенез
БС (контроль)	2,363	0,863	0,751
ЧС +БС	1,786*	0,767	0,721
ДЧС+БС	2,590	0,833	0,884
ССЛ+ БС	2,120	0,653*	0,589*
Т+БС	2,709	0,823	1,008

* найнижчий показник ентропії для відповідного процесу

Ентропія визначає міру упорядкованості системи, тому вважають що для більш упорядкованих систем цей показник буде низьким. Ентропію можна обчислити для будь-якої системи, що може приймати різні стани з визначеними ймовірностями. Найнижча ентропія при регенерації експлантатів за дії інтегрального та монохроматичного світла відмічена у варіанті з додатковим опроміненням червоним світлом ($\lambda=658$ нм). Процес ризогенезу більш активно відбувався у експлантатів, які додатково опромінювали синім світлом лазера ($\lambda=488$ нм), оскільки показник ентропії був найнижчий серед досліджуваних варіантів. Цей варіант режиму опромінення, а також додаткове опромінення ЧС ($\lambda=658$ нм) можна вважати найбільш оптимальними для індукції ризогенезу у експлантатів картоплі.

Таким чином, дослідження, проведені на меристемах картоплі в культурі *in vitro* показали, що їхня життєздатність, морфогенез та подальший розвиток тісно пов'язані з дією світла. Можна допустити, що позитивні ефекти дії світла визначеного спектрального складу на розвиток ізольованих меристем картоплі мали адаптаційний характер, оскільки в умовах *in vitro*, які відрізняються від умов розвитку меристем *in situ*, підвищувався морфогенетичний потенціал експлантатів.

Опромінення монохроматичним світлом стимулювало приживання і ризогенез об'єктів, а за відсутності дії цього чинника лише незначний процент меристем переходив до морфогенезу та значно знижувалася здатність регенерантів до ризогенезу. Оборотної дії ДЧС на дію ЧС може свідчити на користь того, що фоторецептором у виявлених реакціях виступає фітохром. Певна стимуляція процесів морфогенезу ізольованих меристем *in vitro* під впливом синього світла свідчить про участь у цих реакціях фоторецепторної системи синього світла.

3.2. Морфогенез рослин у культурі *in vitro*

Подальші етапи культивування введених в культуру *in vitro* регенерантів проводять за такою схемою:

- мікроклональне розмноження, у процесі якого створюються клони вегетативних нащадків даного регенеранта;
- одержання мікробульб з рослин клону в умовах культури *in vitro* та використання їх як насінневий матеріал у польових умовах.

Мікроклональне розмноження пагонів, регенерованих з меристем картоплі, при живцюванні на частини у вигляді одновузлових живців, дозволяє створити численні клони, які використовуються після їхньої адаптації *ex vitro* у насінництві культури. Регенерація рослин з одновузлових живців відбувається у процесі розвитку і росту пазушної бруньки та регенерації кореневої системи. Цей процес регулюється умовами культури *in vitro*, зокрема складом живильного середовища [39]. Проте не відомо, як змінюється регенераційна здатність одновузлових живців при зміні вмісту вуглеводів та вмісту і складу екзогенних фітогормонів. Такі дані необхідні для визначення адаптаційного потенціалу регенерантів, оскільки це дасть можливість змоделювати їхній розвиток при перенесенні в умови *ex vitro*.

3.2.1. Вплив вмісту вуглеводів та екзогенних регуляторів росту на адаптацію регенерантів

У дослідженнях з'ясували, що інтенсивність ризогенезу у живців у перший період культивування *in vitro* значною мірою визначається присутністю у живильному середовищі вуглеводів. У регенерантів, які культивували на живильному середовищі, що містило сахарозу, відмічали активну ініціацію коренеутворення. Виявлено, що на третю добу культивування присутність у живильному середовищі сахарози стимулювала ризогенез живців на 15,5-31,1%, залежно від варіанту (рис.3.2.1).

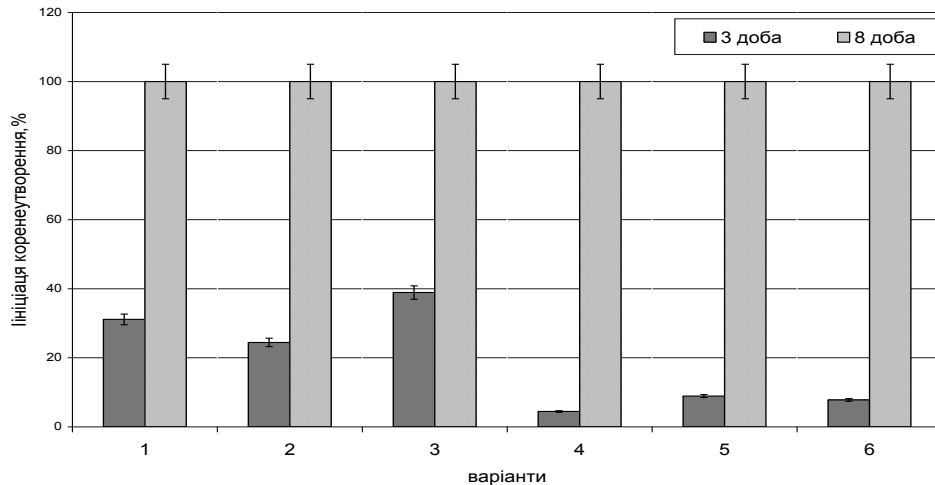


Рис. 3.2.1. Динаміка коренеутворення в одноузлових живцях картоплі сорту Повінь залежно від вмісту регуляторів росту та сахарози у живильному середовищі в культурі *in vitro*: 1 – (контроль) - 10 г/л сахарози+0,5 мг/л аденіну+1 мг/л ІОК; 2 – 10 г/л сахарози+0,5 мг/л аденіну; 3 – 10 г/л сахарози+1 мг/л ІОК; 4 – без сахарози+1 мг/л ІОК+0,5 мг/л аденіну; 5 – без сахарози+1 мг/л ІОК; 6 – без сахарози +0,5 мг/л аденіну, (НСР_{0,05}=3,5)

Таким чином, вміст сахарози у живильному середовищі відігравав домінуючу роль у стимулюванні ризогенезу. Це підтвердили результати регресивного аналізу, у якому було встановлено, що кореляційне відношення η для присутності сахарози у живильному середовищі було вищим, ніж для відповідних варіантів без сахарози. Значення цього показника змінювалось у межах 0,716-0,774, що свідчить про досить тісний зв'язок між присутністю вуглеводів у живильному середовищі та інтенсивністю утворення кореневої системи у регенерантів. Відповідно, індекс детермінації η^2 , який визначає частку варіювання одного чинника відносно іншого, був також найвищим у варіантах з цукрозою (табл.3.2.1).

Отже, індукція та стимуляція ризогенезу має тісний зв'язок із вмістом вуглеводів у живильному середовищі. Проте, слід зазначити, що відсутність сахарози не викликала абсолютного пригнічення цих процесів, оскільки на 8 добу культивування зафіксовано утворення кореневої системи у регенерантів

картоплі в усіх варіантах. Тобто, одновузлові живці мають достатній потенціал для регенерації адвентивних коренів в умовах зниженого вуглеводного живлення.

Таблиця 3.2.1

Результати регресійного аналізу залежності ризогенезу регенерантів із одновузлових живців картоплі сорту Повінь від вмісту в живильному середовищі сахарози та фітогормонів

Вміст сахарози	Проказники кореляції	Вміст фітогормонів		
		ІОК+аденін	аденін	ІОК
Сахароза, 10 г/л	η	0,716	0,752	0,774
	η^2	0,512	0,565	0,598
	S_η	0,101	0,094	0,090
	t_η	7,11	7,99	8,62
	$t_{0,01}$	2,76	2,76	2,76
Без сахарози	η	0,698	0,682	0,612
	η^2	0,488	0,466	0,375
	S_η	0,104	0,107	0,118
	t_η	4,70	4,37	5,19
	$t_{0,01}$	2,76	2,76	2,76

Виявлена стимуляція регенерації кореневої системи під впливом екзогенних регуляторів росту. Присутність у середовищі ауксину стимулювала ризогенез у 1,5 раз порівняно з варіантом, де застосовувався аденін. Сумісна дія фітогормонів на фоні вмісту сахарози знижувала інтенсивність коренеутворення на 7,8 % порівняно з варіантом, де застосовували лише ауксин. Інтенсивність коренеутворення також залежала від присутності сахарози та ауксину у середовищі. Рослини з варіантів, у яких у середовищі була присутня сахароза, формували однакову кількість коренів, а на середовищі без сахарози тільки у присутності ауксину рослини сформували таку ж їх кількість. У варіанті з використанням аденіну рослини сформували найменшу кількість коренів.

За відсутності сахарози вплив регуляторів росту на процес коренеутворення мав антагоністичний характер – ризогенез на третю добу спостерігали лише у 4 % рослин, тоді як за дії екзогенних фітогормонів стимулювали формування корневих зачатків на 7,4-8,5% більше, порівняно з цим варіантом.

Уміст вуглеводів активно впливав і на розвиток надземної частини рослини (табл.3.2.2).

Таблиця 3.2.2

Вплив умісту екзогенних фітогормонів та сахарози в живильному середовищі на розвиток регенерантів з одновузлових живців картоплі сорту Повінь (20-та доба культивування)

Варіант ¹	Довжина міжвузлів, мм	Кількість листків, шт.	Сира маса		
			листіків, г	коренів, г	стебла, г
1	11,3±0,7	9,7±0,4	0,125±0,002	0,353±0,003	0,195±0,003
2	10,3±0,7	10,0±0,4	0,122±0,002	0,344±0,013	0,209±0,002
3	11,3±1,1	9,6±0,4	0,125±0,002	0,326±0,010	0,190±0,002
4	7,8±0,5	9,0±0,5	0,078±0,001	0,055±0,007	0,103±0,002
5	5,6±0,6	8,6±0,4	0,074±0,001	0,063±0,006	0,107±0,004
6	6,1±0,9	7,9±0,5	0,073±0,002	0,058±0,002	0,114±0,005

¹Варіанти наведені у рисунку 3.2.1.

Як свідчать наведені дані, присутність сахарози однозначно стимулювала ріст стебла. Під дією цього фактора у рослин збільшувалось середня довжина міжвузля на 31-46% порівняно з варіантами, де цей вуглевод був відсутній. Сира маса листків була вищою у 1,6-1,7 раза, а сира маса кореневої системи – у 5,8-6,4 раза, порівняно цими варіантами. Коренева система складала 52% загальної маси рослини, стебло – близько 30%, листки – близько 18%. За масою коренів вирізнявся варіант із сумісним застосуванням регуляторів росту. Різниця у дії регуляторів росту на утворення нових листків не виявлено,

оскільки рослини формували однакову кількість цих органів. Різниця між варіантами без сахарози за висотою на 10 день була статистично не доведена.

У варіанті з сумісною дією регуляторів росту рослини утворили приблизно таку ж кількість листків, як у варіантах з цукрозою, однак їхня сира маса й висота міжвузля були значно нижчими (табл.3.2.2). Співвідношення між сирою масою органів переважало у бік стебла, коренева система мала найнижчу масу. Найбільша маса стебла була у регенерантів при пониженому вуглеводному живленні у присутності ауксину. Слід зазначити, що в умовах гетеротрофного вуглеводного живлення найвище значення маси стебла було у регенерантів, які культивувалися без ауксину у присутності аденіну. Сумісна дія регуляторів росту позитивно діяла на накопичення сирової маси коренів і листків, але не стебла.

На 20 день культивування за відсутності сахарози найбільшу висоту мали рослини, які сформувались у варіанті із сумісною дією регуляторів росту (рис. 3.2.2).

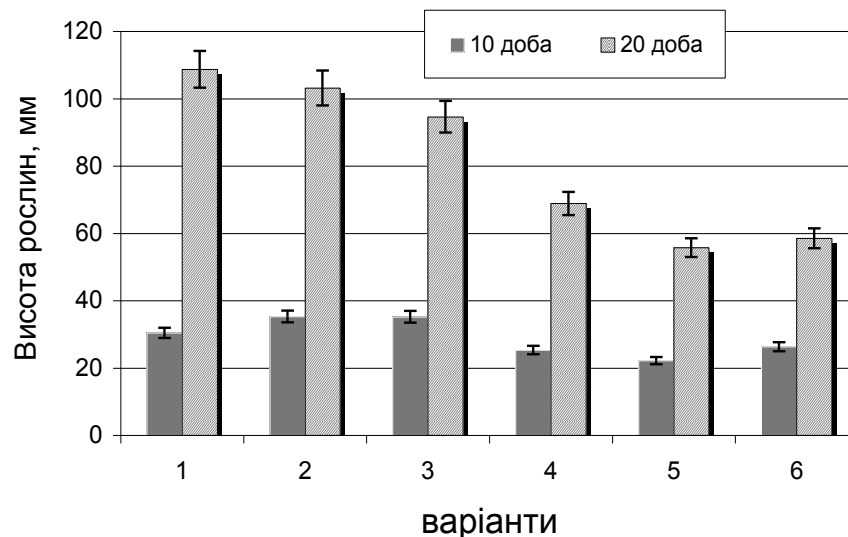


Рис. 3.2.2. Висота регенерантів з одновузлових живців картоплі сорту Повінь залежно від умісту екзогенних регуляторів росту та сахарози в живильному середовищі в культурі *in vitro*. Варіанти зазначені у рисунку 3.2.1. Для 10 доби культивування $HP_{0,05}=3,2$; для 20 доби культивування $HP_{0,05}=5,15$

В умовах гетеротрофного вуглеводного живлення регенеранти також мали найвищі показники лінійних розмірів за умови сумісної дії регуляторів росту. Кореляційну залежність розвитку надземної частини регенерантів від вмісту сахарози та регуляторів росту у живильному середовищі можна вважати середньою, про що свідчать дані регресійного аналізу (табл.3.2.3).

Таблиця 3.2.3

Результати регресійного аналізу залежності висоти надземної частини від вмісту сахарози та екзогенних регуляторів росту у живильному середовищі у регенерантів з одноузлових живців картоплі сорту Повінь

Вміст сахарози	Показники регресії	Вміст фітогормонів		
		ІОК+аденін	аденін	ІОК
Сахароза, 10 г/л	η	0,528	0,495	0,408
	η^2	0,279	0,245	0,166
	S_η	0,130	0,134	0,145
	t_η	4,07	3,69	2,80
	$t_{0,01}$	2,76	2,76	2,76
Без сахарози	η	0,472	0,505	0,592
	η^2	0,222	0,255	0,351
	S_η	0,137	0,133	0,121
	t_η	3,43	3,79	4,91
	$t_{0,01}$	2,76	2,76	2,76

Варіювання кореляційного відношення η для різних варіантів знаходилося у межах 0,408-0,592, що вважається середнім рівнем кореляційної залежності [24]. У присутності сахарози в живильному середовищі найвища активність розвитку регенерантів встановлена при сумісній дії екзогенних регуляторів росту. При зниженому вуглеводному живленні цей процес у значній мірі залежав від вмісту ауксину, а також стимулювався присутністю аденіну – регулятора росту з цитокініновою активністю.

Отже, на першому етапі регенерації живців у культурі *in vitro* характерно стимуляція ризогенезу в присутності вуглеводів та ауксину в живильному середовищі. Ці фактори скорочують фазу переходу живців до утворення корневих зачатків, позитивно впливають на кількісні показники коренеутворення. Розвиток пагонів за таких умов стимулюється сумісною дією регуляторів росту. Відсутність гетеротрофного живлення в умовах *in vitro* значно уповільнює розвиток регенерантів, проте не пригнічує його повністю, тобто, однузлові живці мають певний адаптаційний потенціал, який дозволяє їм регенерувати втрачені органи і забезпечити розвиток організму. Ризогенез у живців у цих умовах індукувався за сумісної дії регуляторів росту. Пагоноутворення регенерантів стимулювалося лише ІОК, тоді як за сумісної дії регуляторів росту не спостерігали суттєвого підвищення висоти регенерантів. Як відомо, фітогормони є однією з ланок передачі стресового сигналу від клітинних мембран до метаболічних шляхів клітини [133], тобто зміни ендogenousного фітогормонального балансу є складовою адаптаційних механізмів рослинного організму.

Оскільки спектральний склад світла може виступати оптимізуючим чинником для морфогенезу у культурі *in vitro* важливо виявити зміни у ендogenousному фітогормональному балансі під його впливом, тому подальші дослідження були зосереджені на вирішенні цього питання.

3.2.2. Вплив світла червоної ділянки спектра на розвиток регенерантів та ендogenousний баланс індолілоцтової кислоти (ІОК) та гібереліну (ГК₃)

Вплив монохроматичного світла у постійному режимі освітлення на морфогенез регенерантів картоплі досліджувався раніше [33, 34]. У цих експериментах встановлено, що червоне світло діє на регенеранти спряжено з екзогенним ауксином, а синє світло – з екзогенним цитокініном. Проте, ендogenousний баланс фітогормонів регенерантів, як важлива ланка у передачі сигналу при адаптації рослин до певних умов культивування, не досліджено. Тому було поставлене завдання виявити морфогенні зміни у регенерантів та

зміни їх ендogenous фітогормонального балансу за дії монохроматичного світла. У дослідженнях виявили, що у регенерантів за дії постійного червоного світла формувалась листкова пластинка, морфологічно подібна до тієї, яка спостерігалася у регенерантів в культурі *in vitro* за умов освітлення білим світлом, проте листки відрізнялися значно меншими розмірами [75].

У варіанті з синім світлом у рослин розвивались листкові пластинки світло-зеленого кольору серпоподібної форми. Такі листки утворювалися на початкових етапах розвитку в регенерантів з апікальних меристем у культурі *in vitro*, тому їх можна віднести до ювенільної форми листкової пластинки. Очевидно, освітлення синім світлом впливало на фітогормональний статус рослин, що призводило до виникнення ювенільних листків.

Постійне освітлення синім світлом стримувало ризогенез у культурі *in vitro* і рослини формували на 17 добу культивування у 3,0 раза меншу кількість коренів, ніж у контролі (табл. 3.2.4.).

Таблиця 3.2.4

Вплив постійного світла різного спектрального складу на розвиток регенерантів сорту Бородянська рожева

Варіант ¹	17 доба культивування			34 доба культивування		
	Кількість міжвузлів, шт.	Довжина міжвузлів, см	Кількість коренів, шт.	Кількість міжвузлів, шт.	Довжина міжвузлів, см	Кількість коренів, шт.
1.	4,8±0,4	1,6±0,2	6,3±0,5	6,5±0,3	1,9±0,2	6,9±0,4
2.	2,0±0,5	3,1±0,6	2,0±0,3	3,4±0,3	3,2±0,4	2,0±0,5
3.	3,0±0,2	1,0±0,4	2,0±0,2	3,1±0,4	1,1±0,2	1,9±0,4

¹ Варіанти: 1– контроль, освітлення білим світлом; 2 – освітлення червоним світлом; 3 – освітлення синім світлом.

Спостерігалася динаміка пригнічення ризогенезу, оскільки на 34 добу культивування кількість коренів у 3,6 раза була меншою, ніж у контролі. Менша кількість міжвузлів у рослин, що культивувались при постійному освітленні синім світлом, свідчить про пригнічення морфогенезу в апікальних меристемах

регенерантів. Очевидно, зміни, які спричиняла дія цього чинника пригнічували закладку нових та уповільнювали розвиток утворених фітомерів у меристемах пагонів регенерантів.

При культивуванні за освітлення 16 год червоним світлом спостерігали зміни у розподілі регенрантів за висотою порівняно з контрольним варіантом (рис. 3.2.3).

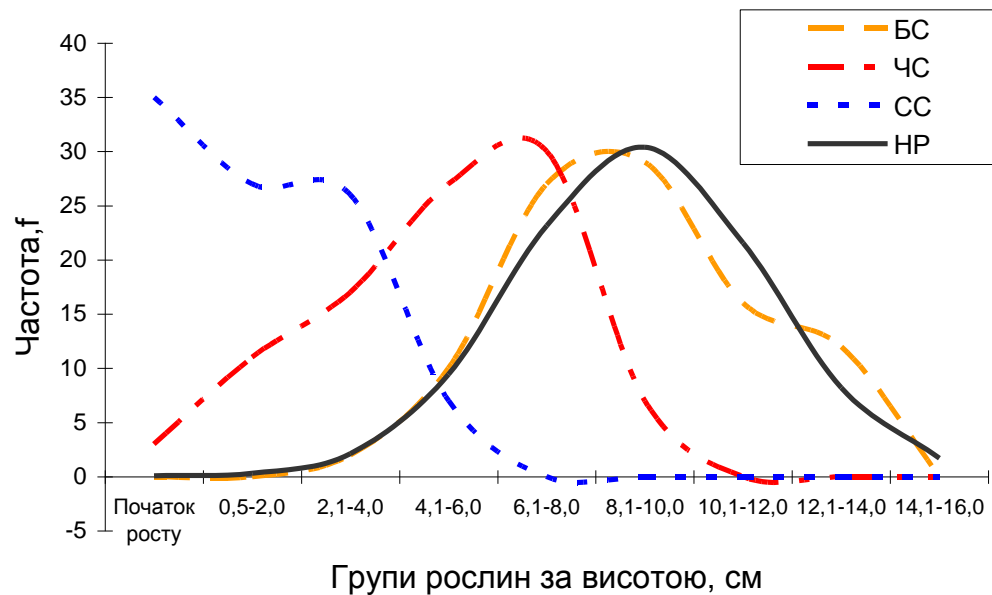


Рис.3.2.3. Емпіричний та теоретичний розподіл за висотою регенерантів картоплі сорту Бородянська рожева за дії монохроматичного та інтегрального світла (17 доба культивування): БС – інтегральне біле світло; ЧС – монохроматичне червоне світло; СС – монохроматичне синє світло; НР – крива нормального розподілу

Постійне червоне світло також стримувало утворення кореневої системи, при чому цей показник становив лише 27,5% відносно контролю. Рослини формували майже однакову кількість листкових вузлів порівняно із варіантом, де використовували синє світло. У рослин під дією цього фактора спостерігали збільшення довжини міжвузлів в 1,6-1,9 раза порівняно з контролем та у 2,9-3,1 раза порівняно з варіантом синього світла. Різниця збереглася і у динаміці

розвитку рослин. Таким чином, червоне світло стимулювало ріст стебла та пригнічувало морфогенез листкових пластинок.

Висота рослин клону, які культивувалися при освітленні білим світлом, у графічному відображенні мала вигляд гістограми, близької до полігону нормального розподілу. Як відомо, скошення кривої нормального розподілу або її асиметрія може бути результатом дії певних факторів, що зсувають частоту варіюючої ознаки у той чи інший бік [24]. За умов освітлення білим світлом у процесі онтогенезу вигляд кривої значно не мінявся, а її вершина зсувалася у бік груп рослин з висотою 10-12 см і 12-14 см. Стандартне відхилення s становило 2,34 і 3,59 відповідно для 17 і 34 доби культивування. Всередині області $\bar{x} \pm 2s$ знаходилося 96% значень усіх спостережень.

У процесі онтогенезу вплив освітлення ЧС призводив до зниження середньої висоти рослини на 36,7%, а вершина кривої розподілу зсувалася у бік груп рослин з висотою 4-6 см (рис. 3.2.4).

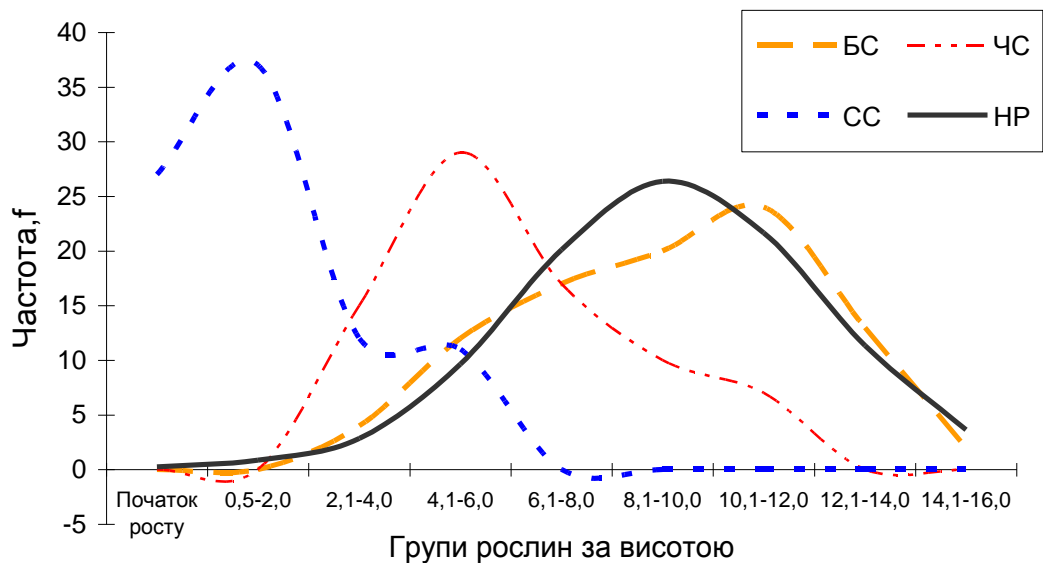


Рис. 3.2.4. Емпіричний та теоретичний розподіл за висотою регенерантів картоплі сорту Бородянська рожева за дії монохроматичного та інтегрального світла на 34 добу культивування: БС – інтегральне біле світло; ЧС – монохроматичне червоне світло; СС – монохроматичне синє світло; НР – крива нормального розподілу

Однак, в середньому, довжина міжвузля регенерантів у цьому варіанті перевищувала контроль у 1,9 раза (табл. 3.2.4). Таким чином, за дії червоного монохроматичного світла відмічене розтягнення міжвузлів і зменшення кількості листових пластинок у регенерантів картоплі.

Характерні зміни у розподілі рослин за висотою відмічали за дії синього світла, яке також стримувало ріст живців у висоту і для регенерантів у цьому варіанті була властива значна кількість рослин, які не перевищували 2-4 см. За дії цього чинника регенеранти формували укорочені міжвузля, а в процесі онтогенезу висота і кількість міжвузлів змінювались мало.

Порівнюючи криві розподілу трьох варіантів досліду, ми зробили висновок, що культивування регенерантів на світлі певного спектра має формативний вплив на їх розвиток у культурі *in vitro*. Таким чином, встановлено тісний зв'язок між спектральним складом світла та морфогенезом органів у картоплі в культурі *in vitro*. Роль світла у процесі новоутворення втрачених органів та подальшому розвитку регенерантів у культурі *in vitro* полягає в стимулюванні регенераційних процесів.

Порівняння кривих розподілу регенерантів за висотою із застосуванням критерію χ^2 виявило, що у варіантах з монохроматичним освітленням розподіл частот за цим показником суттєво відрізняється від нормального розподілу (табл. 3.2.5).

Таблиця 3.2.5

Критерій відповідності (χ^2) розподілу частот регенерантів за висотою нормальному розподілу за дії інтегрального та монохроматичного освітлення

Обліки	χ^2 теоретичний	χ^2 фактичний		
		БС	ЧС	СС
17 доба	16,81	8,97	91,22	8255,35
34 доба	16,81	5,38	58,38	14168,63

Фактичний критерій χ^2 перевищував його теоретично розраховану величину для варіантів ЧС і СС, отже, виявлені зміни морфогенезу регенерантів очевидно, викликані дією світла певної ділянки спектра.

Криві розподілу рослин за висотою в процесі онтогенезу приймали вигляд двовершинних кривих, що може свідчити про певну неоднорідність вибірки. Проте рослини клону походили з одного регенеранта, що забезпечувало їхню генетичну однорідність. Було встановлено, що рослини, висота яких на 30 добу культивування не перевищували 4 см, у 90% випадків регенерувалися з базальних живців вихідних рослин. З апікальних живців утворювалися рослини, що на цей період мали висоту більше 12 см. Апікальні живці швидше регенерували кореневу систему і активніше розвивались. Отже, неоднорідність рослин клону викликана їхнім фізіологічним станом, який визначається розміщенням живців на вихідній рослині. Така фізіологічна неоднорідність живців з різних зон рослини може бути пов'язана із фітогормональним статусом, зокрема із умістом ауксинів та гіберелінів, оскільки саме ці групи фітогормонів стимулюють ріст стебла [50].

Для з'ясування припущення про зміни у фітогормональному статусі під впливом спектрального складу світла, ми визначали вміст вільної ІОК та ГК₃ у рослині залежно від зони: апікальна зона, медіальна і базальна. Аналіз результатів продемонстрував існування у рослині градієнту ІОК, який пов'язаний із її зональним розподілом. Разом з тим, при культивуванні на ЧС цей градієнт зберігався і найвищий вміст фітогормону виявили у апікальній зоні стебла (рис. 3.2.5).

Вміст фітогормону у регенерантах знижувався при культивуванні на ЧС порівняно з контролем у апікальній зоні – на 12,5%, у медіальній зоні – на 41,3%, у базальній – на 32,5%. Очевидно, червоне світло впливало на синтез фітогормону, при цьому не істотно впливало на його транспорт.

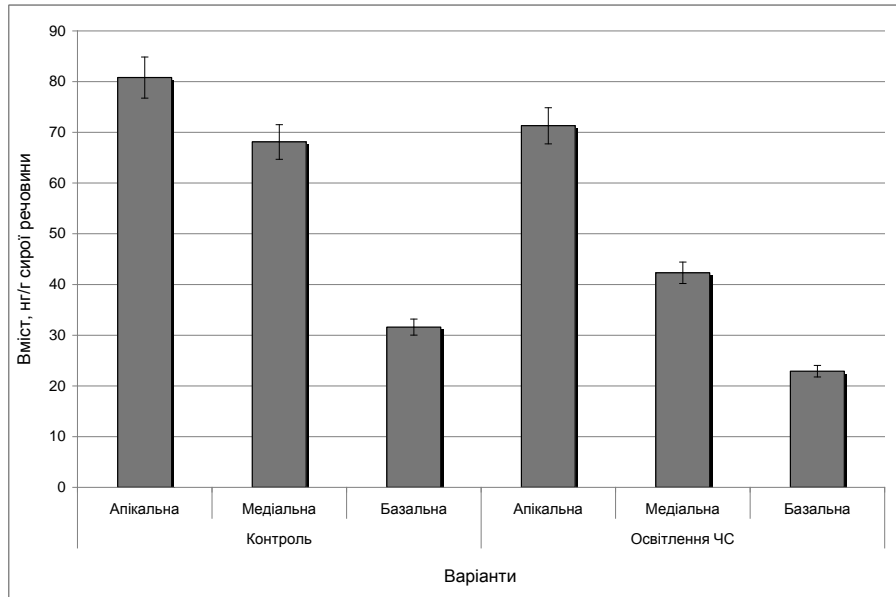


Рис. 3.2.5. Вміст ІОК у живцях регенерантів картоплі сорту Бородянська рожева залежно від зони рослини при тривалому культивуванні на ЧС

Під впливом освітлення ЧС підвищувався вміст ГК₃ у регенерантах картоплі. Характерно, що найвищий вміст фітогормону відмічено у середній частині рослини, як у контролі, так і в дослідному варіанті (рис.3.2.6.).

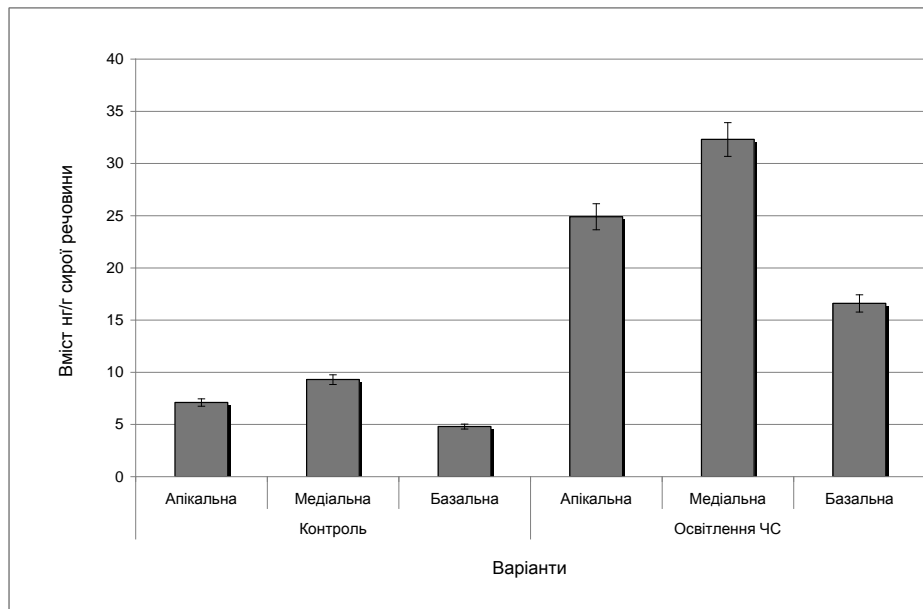


Рис.3.2.6. Вміст ГК₃ у живцях регенерантів залежно від зони рослини, сорт Бородянська рожева

Слід відмітити, що за дії ЧС змінюється і співвідношення між концентрацією фітогормонів. Так, у контролі співвідношення між ІОК і ГК у верхівковій зоні становить 1:11, у базальній – 1:7. При вирощуванні на постійному червоному світлі цей показник становить у апікальній зоні – 1:3, а у базальній – 1:2. Таким чином, базальні живці характеризуються найвищим співвідношенням фітогормонів і найнижчою їхньою концентрацією.

Затримка розвитку регенерантів з базальних живців, очевидно, викликана співвідношенням ендогенних фітогормонів, у всякому випадку цей фактор має вирішальне значення. Зниження вмісту фітогормонів у базальній частині рослини може бути пов'язане з процесом старіння. Відомо, що для молодих листків характерний високий вміст ауксинів, який знижується після призупинки їх росту. Старіння листків також супроводжується зниженням вмісту гіберелінів [136, 235]. При старінні рослинного організму також змінюється вміст і інших груп фітогормонів: цитокінінів, етилену та абсцизової кислоти. У цілому ж, у регуляції старіння органів приймає участь багатокomпонентна система, що складається з ендогенних стимуляторів та інгібіторів росту. До екзогенних факторів, які впливають на процеси старіння, відносять освітленість, температуру, забезпечення органів водою і елементами живлення.

Таким чином, зміна спектрального складу світла викликала певні зміни в інтенсивності основних процесів регенерації живців картоплі – відновлення втраченої кореневої системи і індукції розвитку стебла із пазушної бруньки. Ці інтегральні процеси чітко корелювали зі змінами фітогормонального статусу регенерантів.

3.2.3. Вплив світла червоної ділянки спектра на бульбоутворення *in vitro* у регенерантів картоплі

Одержання мікробульб картоплі *in vitro* для насінництва є важливим етапом клонального мікророзмноження культури [154, 52, 180, 239]. Однак, продуктивність регенерантів *in vitro* при бульбоутворенні все ще залишається досить низькою і становить 50-60 % рослин, що формують бульби в умовах

стерильної культури [52, 154]. Крім того, утворення мікробульб картоплі у культурі *in vitro* є важливою моделлю вегетативного розмноження, оскільки цей процес ще досконало не досліджено. Відомо, що процес бульбоутворення знаходиться під контролем фітохромної системи [206, 296]. Тому представляло інтерес дослідження впливу спектрального складу світла на бульбоутворення у рослин, які регенерували з одновузлових живців в умовах культури *in vitro*.

Вважається, що роль фітохромної системи рослин у природних умовах полягає у визначенні довжини дня або фотоперіоду, що разом з флуктуацією температури надає рослинам важливу сезонну інформацію. Сприйняття довжини дня вимагає інтеграції світлових сигналів з ендогенними осцилятором рослин – циркадним годинником [169, 207]. Здатність скоординувати фотосинтез та метаболізм з фотоперіодом надає рослинам значну конкурентноздатну перевагу, що збільшує їх шанси на виживання [216].

В умовах культури *in vitro*, де фотосинтетична функція рослин пригнічена, для індукції бульбоутворення використовують підвищені дози сахарози у живильному середовищі – до 8 % та скорочений світловий день [39]. Проте, відсутні дані про можливість стимулювання бульбоутворення за умов *in vitro* під впливом світла червоної ділянки спектра в режимі короткочасного опромінення в кінці світлового дня. Такий режим опромінення моделює сигнали зміни світлового періоду, які у природних умовах сприймаються фітохромною системою рослин [169].

Дослідження впливу додаткового опромінення червоним світлом із довжинами хвиль, які відповідають максимумам поглинання фітохромної системи, виявило, що у рослин, опромінених світлом з довжиною хвилі 720 нм, столоноутворення і ініціація бульбоутворення відмічене вже на 24 добу після початку культивування (на 16 день після опромінення), а у контрольних рослин це зафіксовано лише через 6 тижнів [81].

Таким чином, було зафіксована стимуляція ініціації бульбоутворення у регенерантів *in vitro* під дією короткочасного опромінення. Разом з тим, не

відмічено істотної різниці морфометричних показників розвитку регенерантів та утворених мікробульб (табл. 3.2.2).

Таблиця 3.2.2

Вплив опромінення світлом червоної ділянки спектра на бульбоутворення у регенерантів картоплі сорту Луговська у культурі *in vitro*

Варіант	Висота рослин, см		Маса бульб, г
	до опромінення, 10 доба культивування	після опромінення, 25 доба культивування	
контроль	3,4± 0,2	7,8 ± 0,6	1,3±0,2
658 нм	3,7± 0,4	8,2 ± 0,7	1,8±0,4
720 нм	3,3± 0,2	8,4 ± 0,8	1,7±0,4

Виявлено, що опромінення світлом червоної ділянки спектра мало відчутний вплив на бульбоутворення у регенерантів, особливо при опроміненні світлом з довжиною хвилі 720 нм (рис.3.2.7)

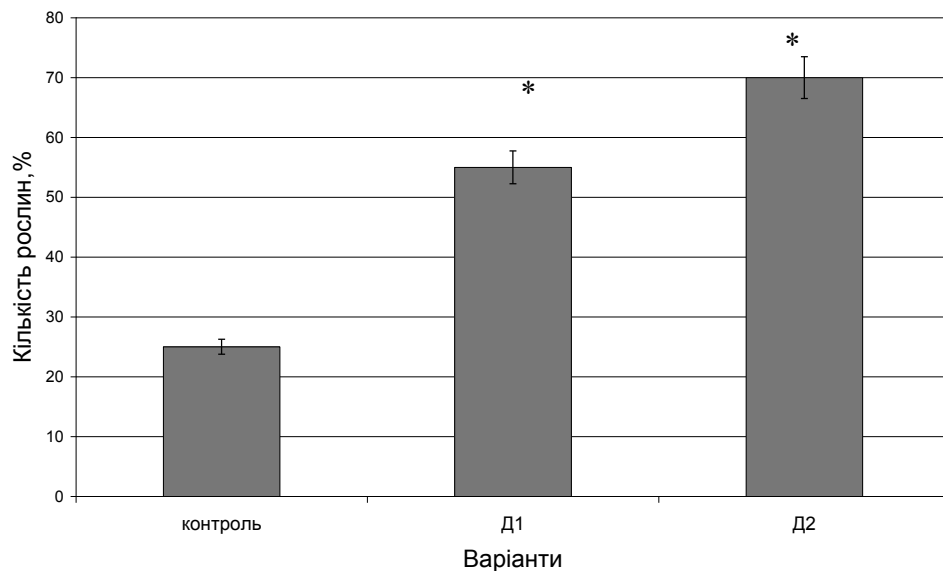


Рис. 3.2.7. Бульбоутворення у регенерантів сорту Луговська за дії світла червоної ділянки спектра: контроль – без додаткового опромінення; Д1 – додаткове опромінення світлом з довжиною хвилі 658 нм; Д2 – додаткове опромінення світлом з довжиною хвилі 720 нм. * – $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

У варіантах, де використовувалось додаткове опромінення, збільшення виходу мікробульб відмічене на рівні 20-50% на 40 добу культивування. Зазвичай, у регенерантів максимум утворення мікробульб в умовах *in vitro* відбувається на 50-55 добу культивування [86]. Таким чином, залежність бульбоутворення *in vitro* від додаткового опромінення мала якісний характер (рис. 3.2.8.)



Рис. 3.2.8. Регенеранти картоплі сорту Луговська, які утворили мікробульби: А – регенеранти на 35 день культивування; Б – регенерант, 70 доба культивування

Таким чином, під впливом опромінення світлом змінювався фізіологічний статус регенерантів, що стимулювало перехід до репродуктивного розвитку. Також слід урахувати, що регенеранти *in vitro* культивувалися на живильному середовищі, яке містило підвищену концентрацію сахарози (4%), та збільшений вміст кінетину (4 мг/л). Такі умови зазвичай, стимулюють перехід до репродуктивного розвитку у картоплі, проте високий вміст кінетину не є однозначною умовою успішного столоно- та бульбоутворення [12].

Вважається [161], що культурні сорти не чутливі до впливу довжини дня або мають слабку кількісну залежність від цього чинника. Тому можна припускати, що стимуляція бульбоутворення у регенерантів під впливом опромінення червоним світлом, можливо, викликана активацією фітохромної системи. Як відомо, сучасні системи освітлення для біотехнологічних установок не забезпечені джерелами, які б генерували світло дальньо-червоної області спектра, а червона область спектра має низький відсоток у загальному світловому потоці при штучному освітленні [315]. Отже, у наших дослідженнях продемонстрована можливість зміни вегетативного статусу регенерантів на репродуктивний при моделюванні короткого дня короткочасним опроміненням ЧС та ДЧС, що визначається системою фітохрому.

3.3. Адаптація мікробульб та регенерантів до умов *ex vitro*

3.3.1. Вплив світла на розвиток проростків мікробульб

Мікробульби, одержані в умовах культури *in vitro* потребують підготовки для висаджування їх у відкритий ґрунт, що пов'язано, у першу чергу, з їхньою низькою масою, яка не перевищує 0,5-1,0 г (рис.3.4.1).



Рис. 3.3.1. Мікробульби картоплі, одержані в умовах культури *in vitro*

У розроблених методиках, які рекомендують застосування мікробульб у насінництві [5], їхня підготовка зводиться до обробки стимуляторами росту для переривання періоду спокою. Така обробка дозволяє одержати пророщені мікробульби, проте, ефективність проростання такого насінневого матеріалу у польових умовах залишається низькою. Разом з тим відомо, що передпосадкове озеленення проростків бульб сприяє кращому розвитку рослин [85].

Дослідження впливу монохроматичного опромінення червоної та синьої ділянок спектра показали, що за дії цього чинника лінійні розміри проростків знижувались порівняно з контролем, що свідчить про пригнічення росту розтягненням у проростків (рис. 3.3.2).

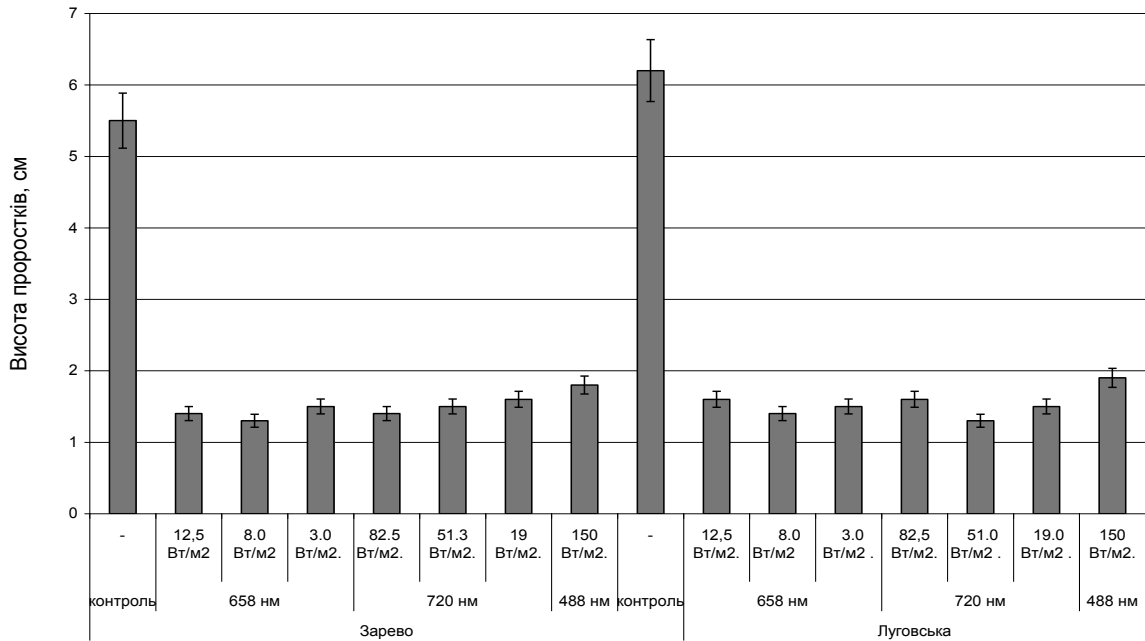


Рис.3.3.2. Вплив різної інтенсивності опромінення світлом червоної та синьої ділянки спектра на розвиток проростків мікробульб картоплі сорту Луговська

При опроміненні бульб картоплі двох сортів світлом з довжиною хвилі 658 і 720 нм з вічок розвивались вкорочені проростки висотою 1-1,5 см. Неопромінені вічка дослідних і контрольних бульб проростали ростками, які швидко видовжувались і мали етіольований вигляд. Проростки з опромінених вічок припиняли ріст після 7-10 днів дослідження. Різниця між дією ДЧС, ЧС та СС, а також різною інтенсивністю опромінення не встановлено. Відсутність різниці між дією різних рівнів освітленості, очевидно, обумовлена низьким рівнем насичення реакцій.

Одержані результати свідчать, що світло червоної ділянки спектра є стримуючим фактором стосовно росту проростків бульб. Відомо, що світло на ріст стебла діє політропно [64]. Так, у верхньому міжвузлі, яке починає розвиватись і тканини якого мають високу проліферативну активність, світло прискорює перехід клітин у фазу росту розтягом, у результаті чого спостерігають фотопідсилення швидкості росту наймолодшого міжвузля. В

нижньому міжвузлі, яке росте за рахунок клітинного розтягування, світло прискорює диференціацію клітин, що сприяє призупиненню росту.

Очевидно, вплив світла на проростки є оптимізуючим фактором їхнього подальшого розвитку, оскільки озеленені проростки адаптовані до нових умов. В процесі етіоляції запасні речовини рослинного організму витрачаються на швидкий ріст стебла для виходу проростка на світло. Перші етапи деетіоляції рослин характеризуються активацією розвитку внутрішньої структури хлоропластів, синтезом хлорофілу, прискоренням розвитку клітин, тобто рослинний організм переходить до фізіологічно оптимізованого стану, необхідного для автотрофного живлення. Таким чином, світло виступає як сигнал для переключення програми розвитку рослинного організму.

Дані про розподіл сухої речовини між органами під час проростання та вплив монохроматичного опромінення на цей процес представлені на рис. 3.3.3.

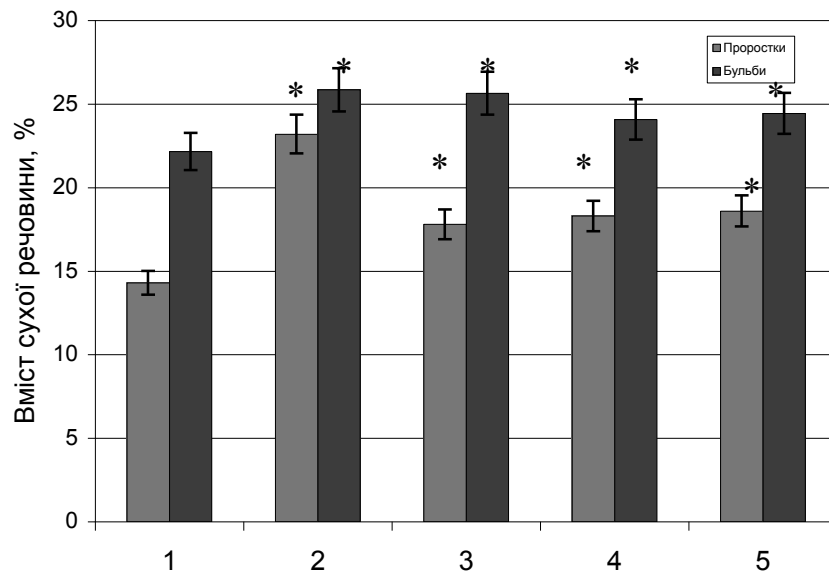


Рис.3.3.3. Вміст сухої речовини у проростках та бульбах картоплі сорту Світанок Київський: 1 – контроль, без освітлення; 2 – опромінення білим світлом 14 діб (озеленення); 3 – опромінення СС; 4 – опромінення ЧС; 5 – опромінення ДЧС; * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

Аналіз даних показує, що при опроміненні зростає вміст сухої речовини в проростках порівняно з контролем. Найвищим цей показник був у варіанті з озеленими проростками – 23,2%, що на 9,1% більше, ніж у контролі. Опромінення монохроматичним світлом підвищувало вміст сухої речовини на 3,1 – 4,4%, залежно від довжини хвилі. Вміст сухої речовини в бульбах також був вищий у варіантах з опроміненням. Різниця між контролем і варіантами була в межах 3,1 – 3,6% і була суттєвою на 95% рівні значимості.

У контролі вміст сухої речовини розподілявся наступним чином: у бульбах – 60,7%, у проростках – 39,3%, при монохроматичному опроміненні: опромінення СС – у бульбах – 59,0%, у проростках – 40,9%; опромінення ЧС і ДЧС – 56,8% і 43,2%. При озелененні проростків вміст сухої речовини перерозподілявся наступним чином: 52,7% – у бульбах і 47,3% – у проростках. Таким чином, опромінення однозначно збільшувало вміст сухої речовини у проростках.

Ефект опромінення залежав від його дози, оскільки за тривалого опромінення накопичувалось більше сухої речовини, ніж за одноразового. Початок росту рослини картоплі за умов вегетативного розмноження відбувається за рахунок пластичних речовин бульб. Центральною ланкою метаболізму є тотальний синтез білка, який розглядають як маркер активності метаболізму клітин в цілому, оскільки він дуже чутливий до змін в умовах культивування рослин [92]. Встановлена пряма кореляція між вмістом білка у насінні та його енергією проростання, швидкістю росту проростків і польовою схожістю.

Одержані нами дані дозволяють стверджувати, що високий вміст білка у проростках бульб також є фактором високої життєздатності рослин картоплі (рис 3.4.4).

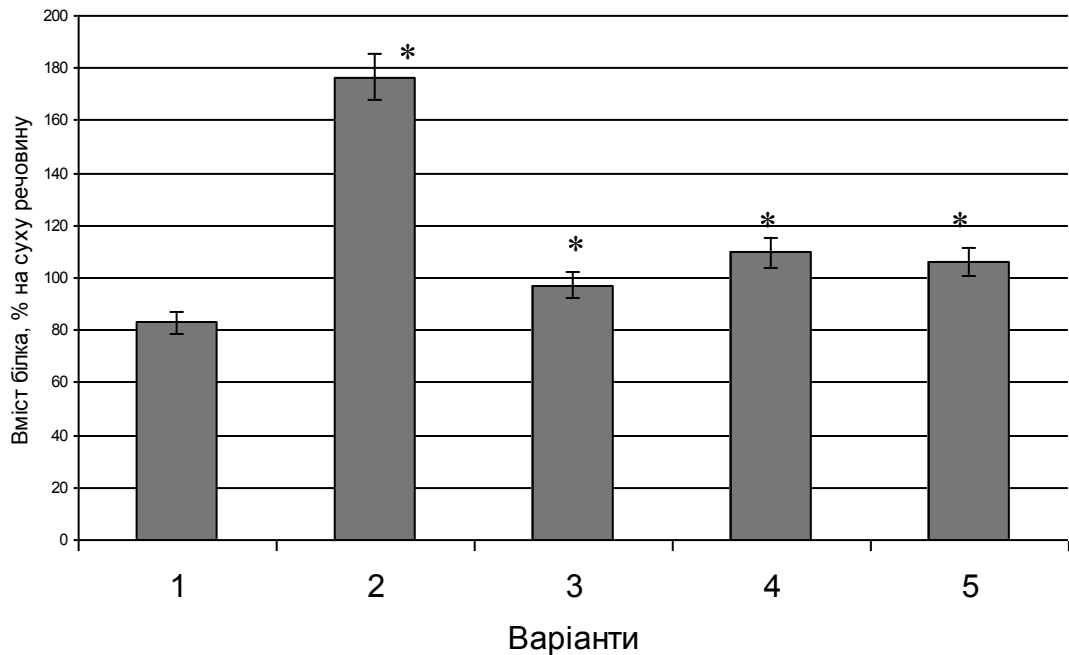


Рис. 3.3.4. Вміст білка у проростках бульб картоплі сорту Світанок Київський: 1– контроль, без освітлення; 2 – опромінення білим світлом 14 діб (озеленення); 3 – опромінення СС; 4 – опромінення ЧС; 5 – опромінення ДЧС; * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

Монохроматичне опромінення збільшувало вміст білка в сухій речовині проростків: СС - на 17,2%; ЧС – на 32,2% і ДЧС – на 28,1%. Таким чином, світло з довжиною хвилі 660 нм є більш активним фактором синтезу білка, ніж світло дальнього - червоної, а особливо синьої областей спектра. Враховуючи, що ця частина спектра є максимумом поглинання фітохрому, ми припускаємо участь цього пігменту в активації накопичення білка у проростках картоплі. Слід відмітити, що фоторецептор синього світла також, можливо, бере участь у даному процесі, оскільки має місце накопичення загального білка під дією СС. Тривале опромінення БС підвищує вміст білка у сухій речовині проростків у 2,1 раза порівняно з контролем, що свідчить також про ефект дози фактора.

Отже, показано, що у формуванні адаптованого до нових умов стану проростків бульб картоплі активну роль відіграє світло червоної ділянки

спектра, що, очевидно, свідчить про участь у адаптаційних процесах фітохромної системи рослин.

3.3.2. Взаємний вплив світла і вологи на розвиток проростків бульб картоплі

Оскільки абіотичні чинники у природних умовах часто справляють синергічний або антагоністичний вплив на розвиток рослинного організму, представляло інтерес дослідження сумісного впливу світла червоної ділянки спектра та вологи, як одного з найбільш вагомих чинників розвитку рослин.

У дослідженнях виявили, що ріст проростків активніше пригнічувався за низького рівня вологості і освітлення ЧС (рис 3.3.5).

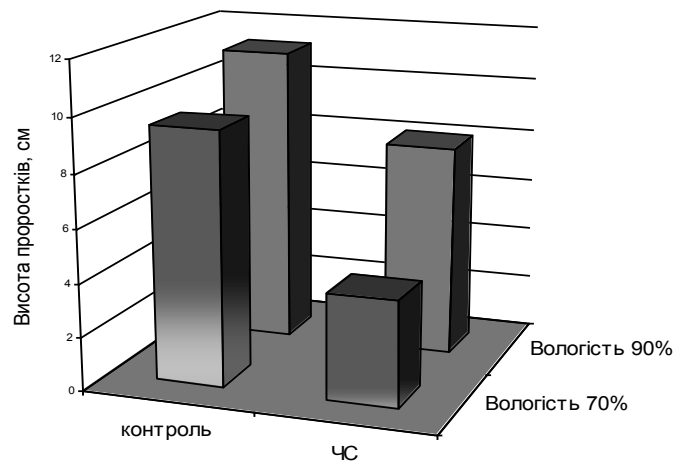


Рис. 3.3.5. Взаємний вплив вологості і режиму освітлення на висоту проростків бульб картоплі сорту Світанок Київський

За дії опромінення ЧС при підвищеній вологості (90%) висота проростків бульб збільшувалась в 2,0 раза, порівняно з варіантом, у якому вологість підтримували на рівні 70%. Без освітлення і при високому рівні вологості спостерігали максимальний ріст проростків. При низькій вологості (70%) без освітлення висота проростків в 1,2 раза знижувалась, порівняно з варіантом з високою вологістю.

При низькому рівні вологості, не залежно від дії світла, розвиток коренів не відбувався. У даному випадку, цей фактор був домінуючим для розвитку органа. Сумісна дія високої вологості та опромінення ЧС сприяло збільшенню сирової маси коренів у середньому на 130% порівняно з контролем (рис. 3.3.6).

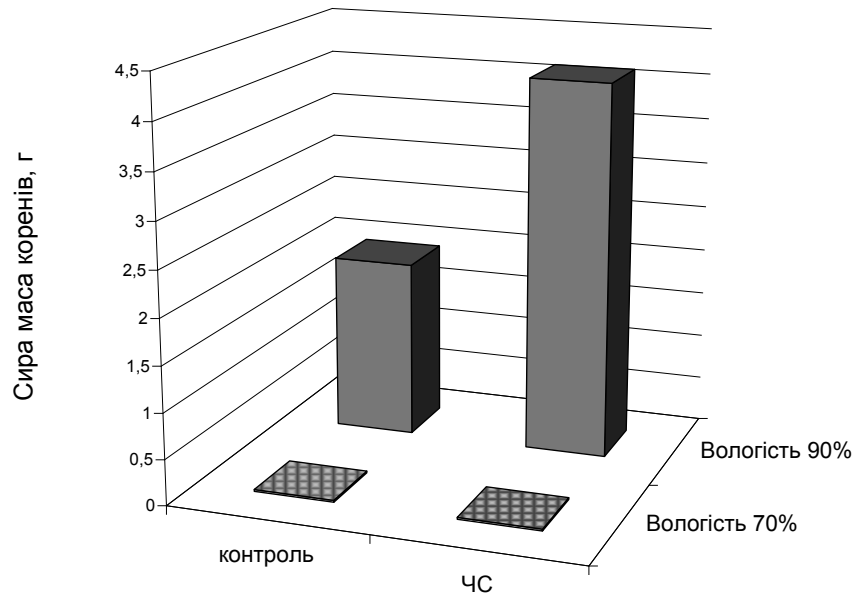


Рис. 3.3.6. Взаємний вплив вологості і режиму освітлення на сирову масу коренів проростків бульб картоплі сорту Світанок Київський

Проведені нами дослідження показали, що вологість є модулюючим фактором щодо дії світла в процесах росту проростка, а світло модулює вплив вологості на розвиток кореневої системи. Таким чином, для досягнення оптимізованого стану проростків бульб картоплі необхідно враховувати вплив обох цих чинників.

3.3.3. Розвиток рослин картоплі з мікробульб, які опромінювали монохроматичним світлом

Проведені нами експерименти виявили, що короткочасна одноразова передпосадкова обробка світлом проростків мікробульб, незалежно від довжини хвилі, прискорює початок фази сходів і сприяє їхній вирівняності. В

середньому, при застосуванні опромінення сходи з'явилися на 15 днів раніше, ніж у контролі. Різниця в динаміці росту зберігалась до початку фази бутонізації (дата 5) (рис.3.3.7).

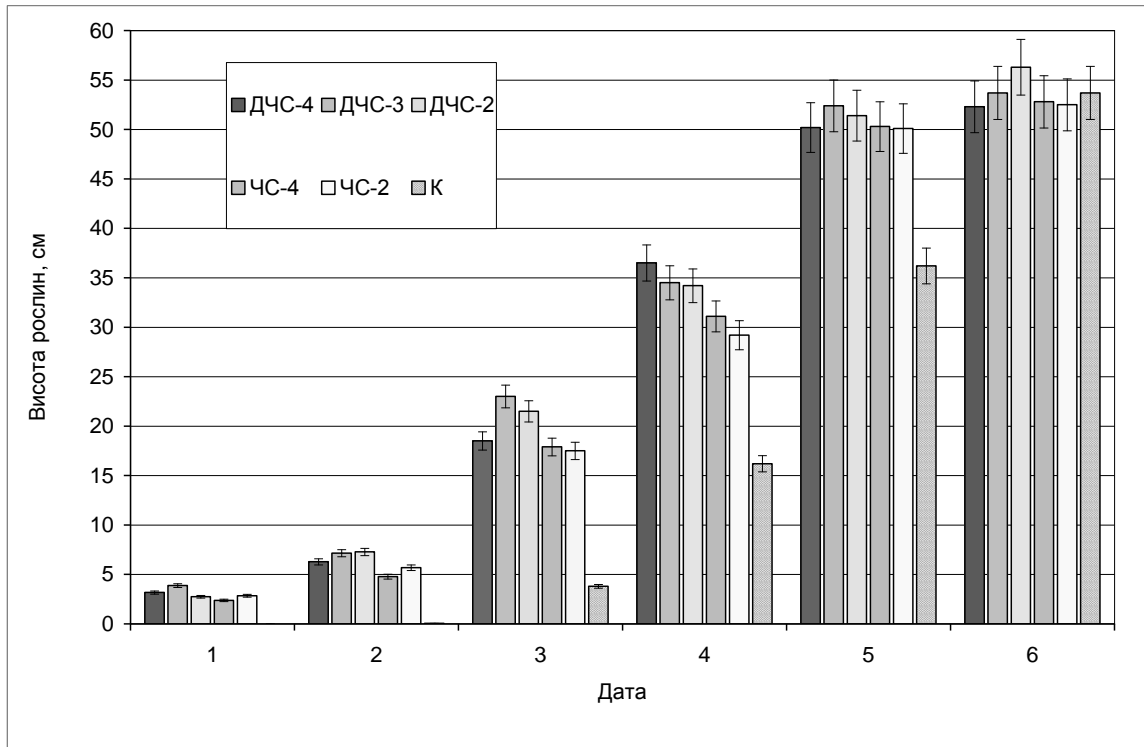


Рис. 3.3.7. Динаміка росту рослин з опромінених мікробульб сорту Луговська: ДЧС-4 – опромінення дальнім червоним світлом (4 хв.); ДЧС-3 – опромінення дальнім червоним світлом (3 хв.); ДЧС-2 – опромінення дальнім червоним світлом (2 хв.); ЧС-4 – опромінення дальнім червоним світлом (4 хв.); ЧС-4 – опромінення червоним світлом (2 хв.); контроль - без опромінення

Післядія опромінення світлом червоної ділянки спектра позитивно впливала на морфогенез апексів стебла, тому, очевидно, фаза цвітіння наступала на 3-4 дні раніше у рослин, які вирощували з опромінених мікробульб, ніж у контролі. Не виявлено суттєвої різниці між впливом дальнього червоного і червоного світла на проходження рослинами фенофаз.

Аналіз продуктивності показав, що опромінення проростків мікробульб не впливає на морфологію рослин, оскільки як у контролі, так і в усіх варіантах дослідження рослини формували приблизно однакову кількість

стебел та бульб. Однак, виявлено позитивну дію фактора опромінення на накопичення рослинами запасних пластичних речовин і, відтак, на величину урожаю, про що свідчить збільшення маси бульб з однієї рослини (табл. 3.3.1).

Таблиця 3.3.1

Продуктивність рослин картоплі сорту Луговська, отриманих з мікробульб *in vitro*, опромінених ЧС і ДЧС

Варіант	Кількість стебел, шт.	Продуктивність	
		кількість бульб на 1 рослину, шт.	маса бульб з 1 рослини, г
контроль	8,3±0,7	5,2±0,3	146,6±6,4
ДЧС-4	9,1±0,8	11,6±0,8	243,3±12,6
ДЧС-3	10,5±0,9	11,5±0,9	245,0±10,7
ДЧС -2	9,5±0,7	11,7±0,9	254,5±11,2
ЧС -4	8,5±0,6	14,2±0,8	278,0±13,6
ЧС-2	9,3±0,7	13,5±0,7	263,3±11,0

Опромінення ЧС підвищувало урожай бульб на 79,9 – 89,6% порівняно з контролем, для варіантів з опроміненням ДЧС різниця була дещо меншою і була в межах 65,9 – 73,6%. Одержані бульби після проходження періоду спокою були висаджені у закритий ґрунт для дослідження післядії фотоактивації. Спостереження виявили, що посадки, не залежно від варіанту опромінення, були однорідними та вирівняними. Між варіантами не встановлено значущої різниці за контрольованими показниками (табл. 3.3.2).

Таблиця 3.3.2

Розвиток і продуктивність потомства рослин картоплі сорту Луговська, які походили з мікробульб, опромінених ЧС і ДЧС

Варіант (післядія)	Висота рослин, см (фаза сходів)	Висота рослин, см (фаза бутоні- зації)	Кількість стебел, шт.	Продуктивність	
				кількість бульб на 1 рослину, шт.	маса бульб з 1 рослини, г
контроль	9,6±0,6	34,8±1,2	7,1±0,6	16,0±1,8	307,1±13,6
ДЧС-4	9,3±0,4	38,7±1,4	8,3±0,7	13,7±1,7	293,8±12,9
ДЧС-3	9,8±0,3	36,2±1,8	7,4±0,6	14±1,9	301,7±11,9
ДЧС -2	8,5±0,5	35,2±1,4	7,6±0,7	12,4±1,6	272,7±12,6
ЧС -4	8,3±0,4	36,7±1,5	7,3±0,5	14,5±1,8	280,9±11,5
ЧС-2	8,4±0,4	35,9±1,7	6,8±0,5	16,0±1,7	297,4±12,0

Не виявлено різниці між варіантами у проходженні рослинами фаз онтогенезу. Таким чином, зміни, які були виявлені у материнських рослин, не наслідувались потомством і носили модифікаційний характер. Модифікаційна мінливість у даному випадку мала господарське значення. Відсутність різниці у дії ДЧС і ЧС, можливо, пов'язана з тим, що фотоактивація процесів деетіоляції на початкових етапах розвитку рослин контролюється кількома фоторецепторними системами. Проведені дослідження дозволили обґрунтувати і розробити метод передпосадкової адаптації мікробульб для вирощування їх у польових умовах із застосуванням опромінення червоною ділянкою спектра [55].

3.3.4. Адаптація регенерантів культури *in vitro* до умов *ex vitro*

Принципова можливість культивування живців з рослин, регенерованих *in vitro* в умовах *ex vitro* розглянута у роботах [193, 251, 252]. Однак, прийнятні фізіологічні та технологічні параметри, у тому числі період укорінення і повної регенерації рослини, субстрат для культивування, можливість живцювання

рослин, одержаних *ex vitro*, однозначно не визначені. Тому важливо було розглянути шляхи оптимізації вищезазначених та інших суттєвих параметрів культури *ex vitro*, а також оцінити можливості їх цілеспрямованого використання з метою підвищення ефективності технології *ex vitro*.

Оскільки в процесі культивування живців в умовах *ex vitro* основна ціль полягає, насамперед, в одержанні адаптованих регенерантів, то незначним тимчасовим зниженням інтенсивності розвитку *ex vitro* можна знехтувати за умови, що період регенерації рослини буде мінімальним. У дослідженнях, які включали випробування і пристосування нового субстрату – пластагару для вирощування регенерантів в умовах *ex vitro* виявили позитивний ефект культивування рослин (рис. 3.3.8).



Рис.3.3.8. Культивування живців з регенерантів у культурі *ex vitro* на пластагарі на робочій поверхні № 2 касети

Рослини, вирощені в культурі *ex vitro*, мали істотні переваги над регенерантами *in vitro* за товщиною стебла та кількістю листків (рис.3.3.9).

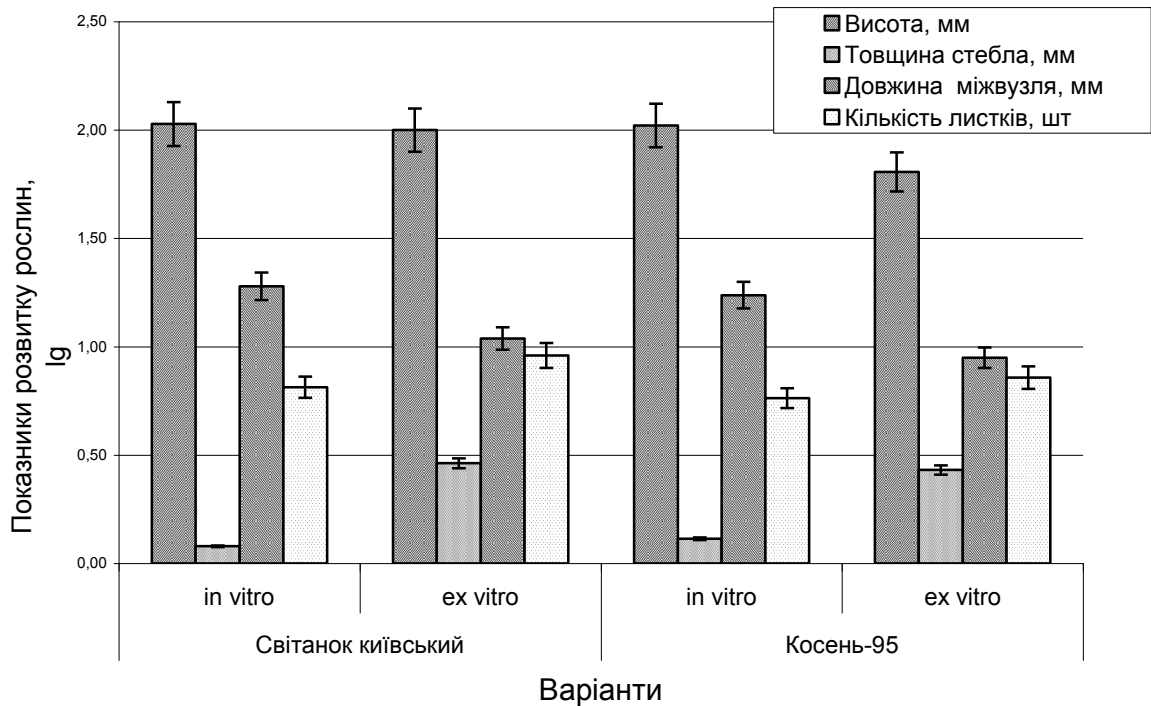


Рис. 3.3.9. Розвиток рослин-регенерантів картоплі у культурі *in vitro* та *ex vitro*

Підвищення цих показників свідчить про адаптаційні зміни у морфогенезі регенерантів у культурі *ex vitro*. Через однаковий проміжок часу після живцювання адаптовані регенеранти та регенеранти *in vitro* мали різну кількість листків, що свідчить про стимулюючий вплив умов культури *ex vitro* на розвиток пагонів. Отже, в умовах *ex vitro* з одновузлових живців розвиваються пагони, адаптовані до нових умов, що позитивно впливає на подальший розвиток рослин.

Особливістю морфологічної будови регенерантів у культурі *in vitro* були видовжені міжвузля, за рахунок чого рослини були вищими, ніж у варіанті *ex vitro*. Проте товщина їх стебла була у 2,5 раза нижчою, ніж у рослин у культурі *ex vitro*. За розмірами листової пластинки та розвитком кореневої системи рослини *ex vitro* значно переважали рослини *in vitro* (рис. 3.3.10).

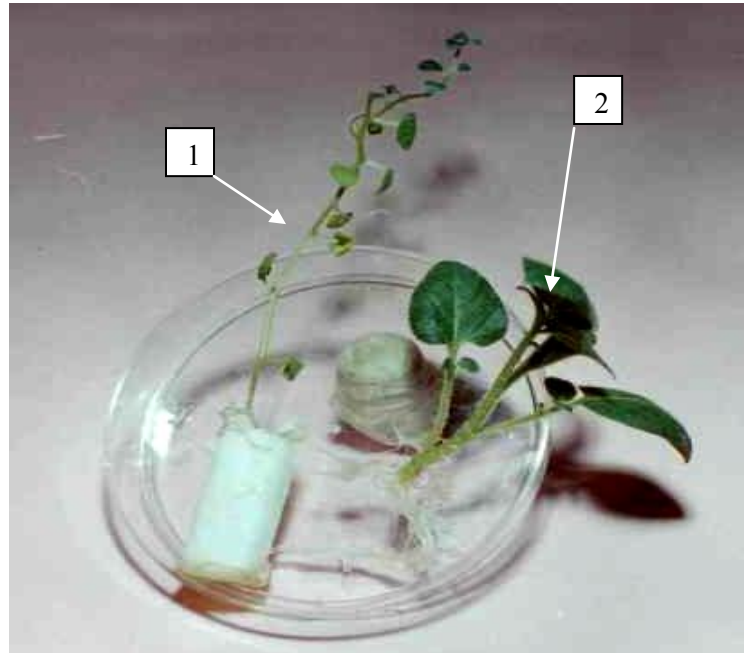


Рис. 3.3.10. Регенерант картоплі в культурі *in vitro* (1) та живець регенеранта, укорінений в культурі *ex vitro* на субстраті пластагар (2)

Рослини в культурі *ex vitro* накопичували в 3,7-4,4 раза більшу масу надземної частини, а вміст сухої речовини був вищим в 1,4 раза, ніж у рослин в культурі *in vitro*.

Співвідношення мас надземної частин і кореневої системи рослинного організму також було вищим – 3,3:1, тоді як у варіанті *in vitro* цей показник складав тільки 1,8:1. У результаті проведених нами досліджень встановлено, що у регенерантів в культурі *in vitro* маса 1 см² листкової поверхні складає тільки 76% від маси одиниці листкової поверхні рослин, які культивувалися в умовах *ex vitro* (табл.3.3.3).

Підвищення питомої маси листкової поверхні рослин свідчить, що в умовах *ex vitro* формуються більш щільні тканини листка, ніж це відбувається в умовах *in vitro*. У культурі *ex vitro* рослини також формували в 6,6-8,2 раза більшу площу листкової поверхні, таким чином, ці умови сприяли більш інтенсивному росту і розвитку рослин картоплі.

Таблиця 3.3.3

Морфологічна характеристика рослин картоплі, вирощених в культурі *ex vitro* та *in vitro*

Сорт	Варіант	Маса				Площа листкової поверхні, см ²	Вміст сухої речовини, %
		надземної частини, г	коренів, г	листіків, г	1 см ² листкової поверхні, г		
Світанок київський	<i>in vitro</i>	0,687	0,247	0,160	0,019	8,54	5,96
	<i>ex vitro</i>	3,015	0,687	1,759	0,025	70,16	8,46
НСР _{0,05}		0,051	0,041	0,063	0,05	1,15	0,54
Sx		0,012	0,011	0,011	0,022	0,32	0,17
Косень-95	<i>in vitro</i>	0,678	0,243	0,158	0,019	8,43	5,89
	<i>ex vitro</i>	2,490	0,587	1,391	0,025	55,73	8,07
НСР _{0,05}		0,063	0,052	0,051	0,005	1,51	0,59
Sx		0,012	0,011	0,010	0,001	0,23	0,15

Рослини, регенеровані *ex vitro*, легко переносили пересаджування у субстрат для розсади (рис.3.3.11) та в умови закритого ґрунту.



Рис. 3.3.11. Культивування регенерантів *ex vitro* на субстраті для розсади

Добре розвинена коренева система сприяла швидкій адаптації до умов нового субстрату, що забезпечувало високий рівень приживання і виживання розсади. Показник приживання розсади з рослин культури *ex vitro* складав 95% для сорту Світанок київський і для сорту Косень – 90%, що в 1,6 раза вище, ніж у контрольному варіанті (табл.3.3.4). Відповідно, затрати на вирощування розсади за оптимізованою технологією були також нижчими.

Таблиця 3.3.4

Вихід розсади з регенерантів культури *in vitro* та *ex vitro* і затрати на її вирощування (середнє по сортах Світанок київський і Косень-95)

Варіант	Приживання розсади, %	Затрати на вирощування 1000 рослин	
		люд/год	кВт/год
Регенеранти культури <i>in vitro</i>	61,5	56	434.2
Регенеранти культури <i>ex vitro</i>	92,5	63	151.7* (45)

*- вирощування рослин при штучному освітленні лампами ДРЛ-400 в культивацийних кімнатах; у дужках – затрати на вирощування при використанні закритого ґрунту.

Таким чином, у культурі *ex vitro*, разом з регенерацією втрачених органів, відбувається адаптація регенерантів до нових умов. Оскільки органи рослини перебувають у новому середовищі від початку свого утворення, їхнє функціонування корегується його параметрами, отже відновлені органи рослини адаптовані до умов, у яких вони сформувалися.

Технологію культури *ex vitro* можна використовувати не лише для культивування і адаптації живців з регенерантів культури *in vitro*. Наші дослідження показали, що використання апікальних живців з рослин, регенерованих у культурі *ex vitro*, дозволяє збільшити коефіцієнт розмноження порівняно з культурою *in vitro* удвічі, одержуючи при цьому повноцінну розсаду (рис.3.3.12).



Рис.3.3.12. Регенерація кореневої системи у апікальних живців в культурі *ex vitro*: а – ініціація ризогенезу у живців; б – регенеранти з апікальних живців, які регенерували кореневу систему

У дослідженнях виявили, що апікальні живці з адаптованих рослин добре приживаються на штучних субстратах і, у середньому, приживання становило 91-97%, залежно від варіанту [79]. Таким чином, апікальні живці мають високий адаптаційний потенціал, що дозволяє їм швидко відновлювати втрачені органи та добре розвиватися.

Разом з тим, тип субстрату мав важливе значення для накопичення рослиною сирової маси та маси сухої речовини. На пластагарі рослини формували більшу масу кореневої системи, що вплинуло, у свою чергу, на загальну масу рослин, яка у цьому варіанті була в 1,2-1,3 раза вищою ніж у інших варіантах (табл.3.3.5).

Таблиця 3.3.5

Вплив штучного субстрату на морфологічні показники рослин картоплі сорту Поляна з апікальних живців

Варіант	Приживання живців, %	Маса				Площа листової поверхні, см ²	Вміст сухої речовини, %
		рослини, г	коренів, г	листіків, г	1 см ² поверхні листків, г		
Перліт (контроль)	93,1	2,322	0,577	1,382	0,023	51,966	6,5
Пластагар	97,0	2,830	0,696	1,419	0,023	52,017	7,9
Мінеральна вата	91,0	2,087	0,575	1,341	0,023	51,469	6,4
HP _{0,05}		0,133	0,035	-	-	-	0,012
Sx		0,046	0,01	0,26	0,002	0,82	0,004

Відповідно, вміст сухої речовини у рослин цього варіанту був вищий на 20%, порівняно з контролем. Також виявили різний вплив типу субстрату культивування на розвиток регенерантів з апікальних живців, зокрема на висоту стебла (рис.3.3.13).

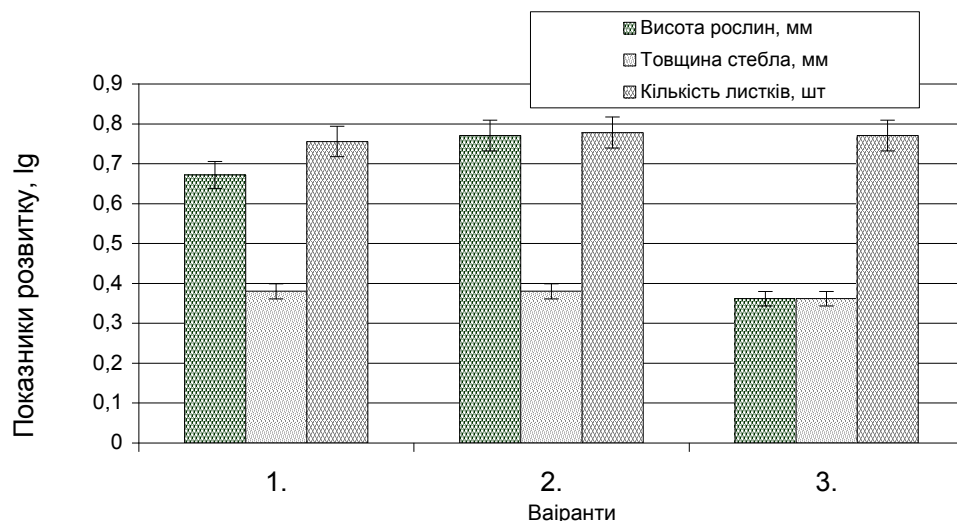


Рис.3.3.13. Розвиток рослин з апікальних живців регенерантів картоплі сорту Поляна у культурі *ex vitro* на різних типах субстрату: 1 – перліт (контроль); 2 – пластагар; 3 – мінеральна вата

Вищі показники лінійних розмірів стебла були притаманні регенерантам у варіанті, де використовували пластагар. Це свідчить про стимуляцію розвитку рослин на даному типі субстрату, що, очевидно, пов'язано з його фізичними властивостями.

3.3.5. Дослідження впливу брасиностероїду на адаптаційний потенціал рослин картоплі у культурі *ex vitro*

Перенесення в умови *ex vitro* для живців з рослин, регенерованих в умовах *in vitro* є стресом, і для того, щоб рослина змогла швидше його подолати, доцільно використовувати речовини, які індукують неспецифічну стійкість до несприятливих чинників [92]. Попередні дослідження виявили, що в умовах зниженого вуглеводного живлення розвиток регенерантів індукується екзогенними фітогормонами (розділ 3.2.1). Відомо, що брасиностероїди можуть модифікувати дію ендогенних фітогормонів рослини і, таким чином, формують у неї адаптаційні реакції [109, 114, 232]. Тому були проведені дослідження дії синтетичного брасиностероїду епіну на адаптацію регенерантів у культурі *ex vitro*.

У дослідженнях впливу епіну була виявлена його позитивна дія на ріст і розвиток рослин у культурі *ex vitro* [80,84]. Так, на четверту добу досліду у варіантах з обробкою епіном спостерігали початок росту пагона з бруньки. У контрольних рослин початок росту відмічали тільки на 7 добу досліду.

Епін ефективно підвищував життєздатність одновузлових живців у культурі *ex vitro*, оскільки при обробці препаратом на 40 добу культивування життєздатність регенерантів становила 82,4-88,2% залежно від дози препарату. Стресовий вплив умов культивування спостерігали у контролі, оскільки життєздатність живців знизилась на 50% відносно дати першого обліку (рис.3.4.14).

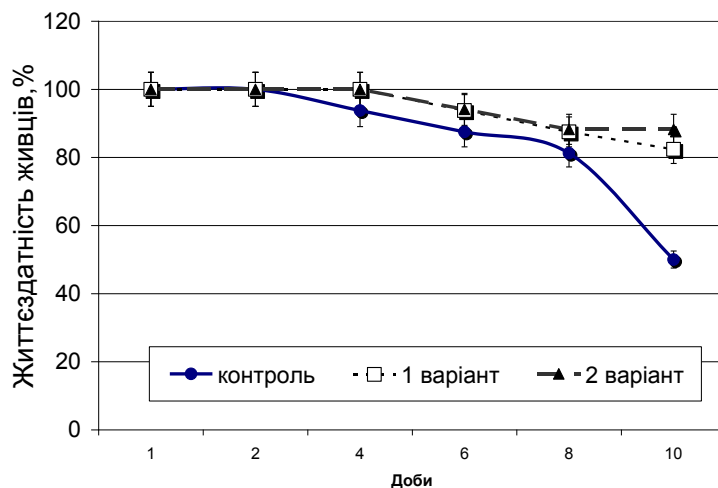


Рис. 3.3.14. Динаміка життєздатності живців з регенерантів картоплі сорту Кримська роза у культурі *ex vitro*: контроль – без обробки; 1 варіант – обробка епіном (0,2 мкг/л); 2 варіант – обробка епіном (0,1 мкг/л)

При обробці епіном у дозі 0,1 мкг/л спостерігали підвищення життєздатності регенерантів, тоді як збільшення концентрації препарату призводило до її зниження. Під впливом епіну досить інтенсивно відбувався ріст надземної частини рослин і на 10 добу дослідження рослини перевищували контроль у 6-11 разів (рис.3.3.15).

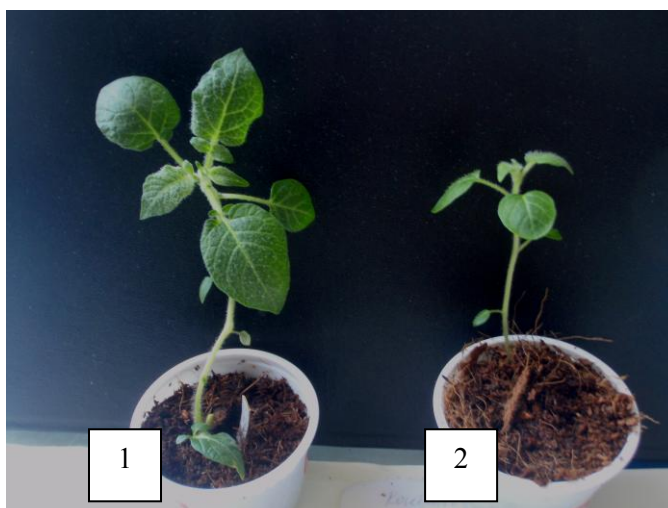


Рис. 3.3.15. Розвиток рослин з живців регенерантів у культурі *ex vitro* під впливом обробки епіном: 1 – обробка живців епіном у дозі 0,1 мкг/л; 2 – контроль, без обробки

У процесі онтогенезу різниця між варіантами дещо зменшилася, проте збереглася до кінця досліду, при цьому середня висота рослини у дослідних варіантах досягала 60-67 мм, у контролі – 50-55 мм. Встановлено, що середня кількість листків становила 4,3 шт./рослину при обробці фітогормоном та 1,6 шт./рослину у контролі.

Виявлено різницю у дії епіну залежно від концентрації водного розчину. На першому етапі до 10 доби вищі показники росту рослин одержані для варіанту з використанням концентрації епіну 0,2 мкг/л, проте в кінці дослідження вищим показникам росту рослин сприяла нижча концентрація фітогормону (0,1 мкг/л) (рис.3.3.16). Можна допустити, що дія фітогормону на живці корегується залежно від відновлення та функціонування новоутворених органів – пагонів і коренів.

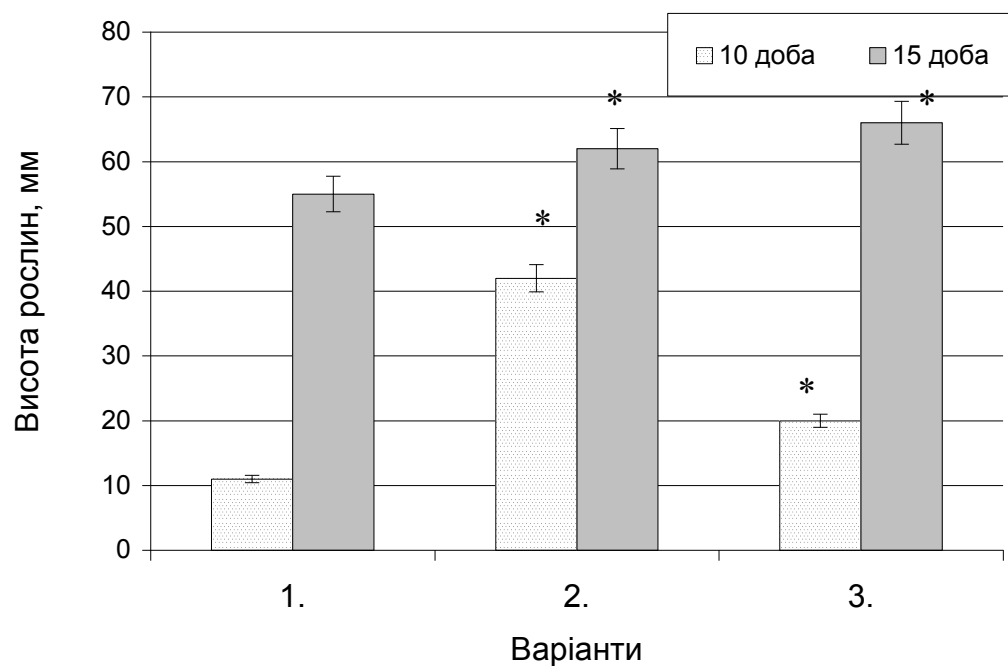


Рис.3.3.16. Динаміка розвитку рослин картоплі з живців *in vitro* сорту Кримська роза під впливом епіну в умовах *ex vitro*: 1- контроль; 2 - обробка епіном у дозі 0,2 мкг/л; 3 – обробка епіном у дозі 0,1 мкг/л; * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

Використовуючи як показники розвитку пластохронний індекс (P.I.) та питому масу одиниці листової поверхні було встановлено, що контрольні

рослини значно відставали у розвитку від рослин з дослідних варіантів (рис. 3.3.17).

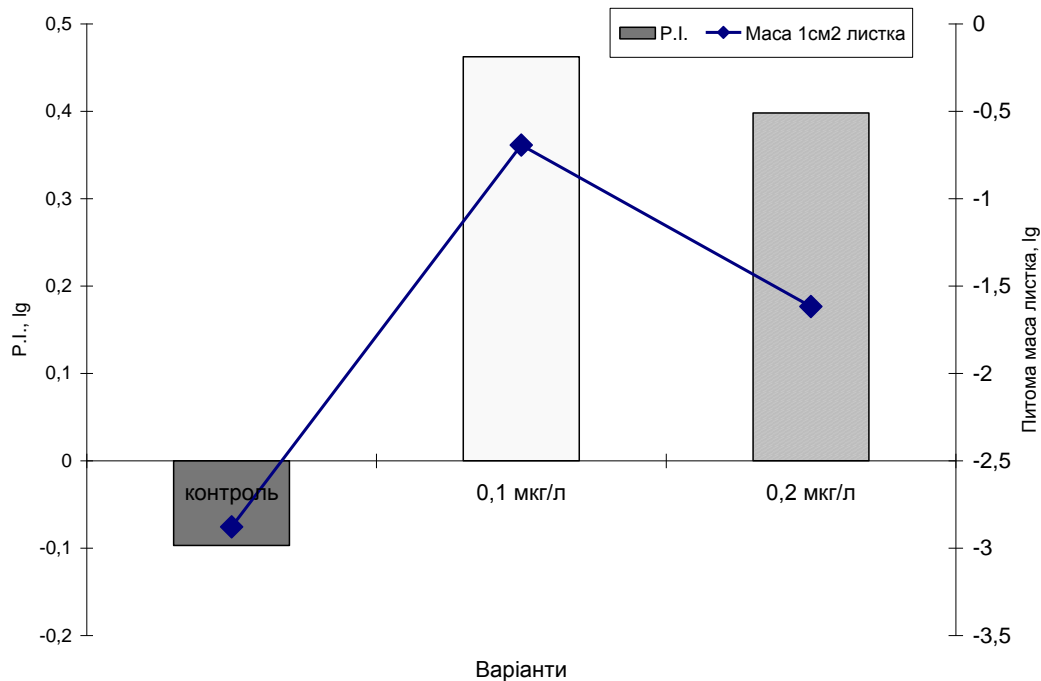


Рис. 3.3.17. Пластохронний індекс та питома маса листків регенерантів картоплі сорту Кримська роза у культурі *ex vitro* за обробки епіном

Пластохронний індекс рослини дозволяє зв'язати розвиток рослин з хронологічним віком через поняття пластохрону, яке пов'язане із тривалістю часового проміжку між закладкою фітомерів у меристемі [230]. При цьому вищий пластохронний індекс відображає більш інтенсивний розвиток рослини. Таким чином, під впливом брасиностероїду у рослини, очевидно, активніше відбувався розвиток апікальних меристем, що впливало і на розвиток всього регенеранта.

При спостереженнях за розвитком регенерантів в умовах *ex vitro* виявили загибель листків материнських живців у контрольних рослин, яка наставала дуже швидко – за 3-4 доби культивування, тоді як у оброблених рослин ці листки залишалися живим тривалий час і, очевидно, нормально функціонували (рис.3.3.18).

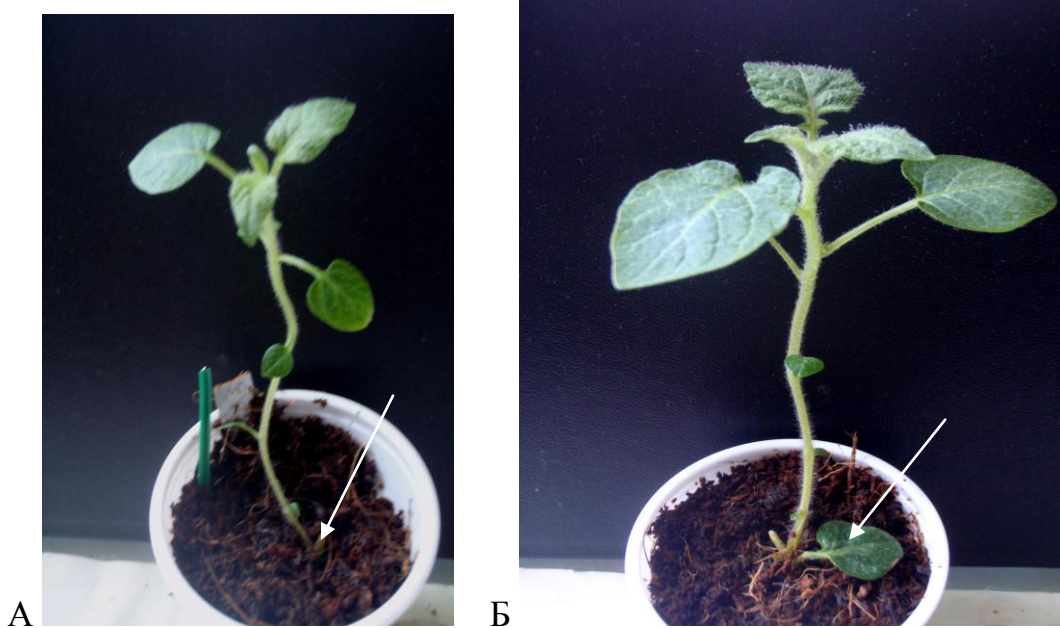


Рис.3.3.18. Вплив епіну на стан листка материнського живця регенерантів картоплі сорту Кримська роза в умовах *ex vitro*: А-контроль (без обробки); Б-обробка епіном у дозі 0,1 мкг/л. Стрілками показана присутність та відсутність листка материнського живця

Це спостереження дозволяє припустити, що брасиностероїд не тільки впливав на розвиток апікальної меристеми, але певним чином стимулював адаптацію до умов *ex vitro* листка материнського живця. При перенесенні регенерантів в умови *ex vitro* листки рослини потерпають від швидкого зневоднення через аномалії продихового апарату, що призводить, у більшості випадків, до їх загибелі. Можливо, брасиностероїд сприяв адаптації до нових умов продихового апарату материнського листка.

Таким чином, рослини з живців *in vitro* за дії епіну в культурі *ex vitro* розвивалися значно інтенсивніше, ніж контрольні рослини. Це свідчить на користь того, що під впливом брасиностероїду у рослин підвищується адаптаційний потенціал, оскільки вони швидше переборюють стрес, що виникає при перенесенні в умови *ex vitro* та відновлюють свій ріст і розвиток.

Позитивний вплив епіну на ріст і розвиток рослин картоплі також спостерігали в досліді з рослинами картоплі, адаптованими до умов *ex vitro* (мал. 3.3.19).

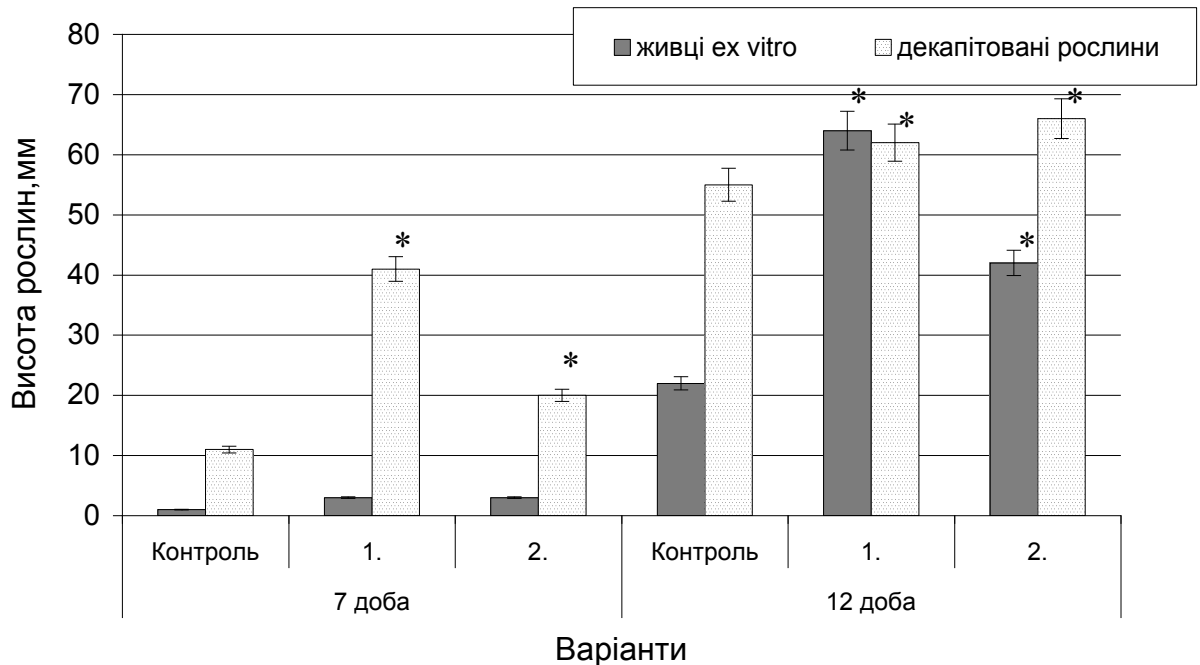


Рис.3.3.19. Динаміка росту декапітованих рослин картоплі та апікальних живців сорту Кримська роза під впливом епіну в умовах *ex vitro*: контроль – без обробки; 1 – обробка епіном у дозі 0,2 мкг/л; 2 – обробка епіном у дозі 0,1 мкг/л; * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

До кінця досліді при обробці епіном надземна частина рослин з живців *ex vitro* досягла висоти 44-65 мм і у 1,9-2,8 раза перевищувала контрольні об'єкти. Слід зазначити, що на відміну від показників, одержаних для живців *in vitro*, кращі показники росту та розвитку надземної частини рослин були отримані при використанні вищої концентрації фітогормону. Через 12 діб культивування висота рослин оброблених епіном у концентрації 0,2 мкг/л перевищувала в 1,6 раз висоту рослин, які обробляли удвічі нижчою концентрацією.

Епін також сприяв інтенсивнішому росту рослин при декапітації, порівняно з контролем, особливо у перший період після обробки фітогормоном.

Різниця в розвитку надземної частини рослин між дослідними і контрольними варіантами упродовж періоду культивування значно зменшилася, проте залишилася досить істотною. Слід відмітити, що для росту і розвитку декапітованих рослин не виявили різниці у дії концентрацій епіну в кінці дослідження, проте на першому етапі вища концентрація фітогормону сприяла більш швидкому росту пагонів рослин.

Оскільки розвиток надземної частини рослин відбувається під контролем фітогормонів, можна припустити, що епін впливає на їхній ендогенний баланс у регенерантів при адаптації до умов *ex vitro*. Можливо, у декапітованих рослин, у яких функціонує коренева система, відновлення нормального балансу фітогормонів відбувається швидше, ніж у живців.

Таким чином, на етапі *ex vitro* відбувається перебудова функціонування рослин, що пов'язана з їхніми адаптаційними можливостями. Брасиностероїд позитивно впливає на ріст живців картоплі з рослин *in vitro* в умовах культури *ex vitro*. Під впливом цього фітогормону в умовах культури *ex vitro* відбувається прискорення процесів росту і розвитку, що підвищує адаптаційний потенціал регенерантів при мікроклональному розмноженні.

3.4. Адаптаційні реакції рослин картоплі за дії модельованої мікрогравітації

Актуальність проблеми вивчення впливу мікрогравітації на взаємини в системі «вірус – рослина-хазяїн» полягає у розширенні методів оздоровлення рослин від вірусних інфекцій. Можливість елімінування вірусу смугастої мозаїки пшениці у рослинах пшениці під впливом модельованої мікрогравітації продемонстрована в роботах [47, 259]. Суть цього явища залишається нез'ясованою, тому була поставлена задача дослідження патогенезу вірусу у рослинах при системній інфекції за дії мікрогравітації, експериментальною моделлю якої слугувало кліноостатування (рис.3.4.1).



Рис. 3.4.1. Вирощування рослин картоплі у кліноостаті «Цикл-2» за умов модельованої мікрогравітації

Нерухомі автотрофні організми надзвичайно структуровані, вони характеризуються добре організованим тілом, що сформувалося на основі регульованого механізму орієнтації у просторі, який розвивався під загальною “інспекцією” гравітації. У процесі еволюції для сприйняття сигналу цього абіотичного чинника у рослин розвинулась відповідна система реакції на стимул у такій послідовності: гравітаційне сприйняття - сигнальна гравітаційна

трансдукція – гравітаційна відповідь, завдяки чому рослини набули здатності розрізняти «верх» і «низ», використовуючи гравітацію для орієнтації [125,69,305]. Таким чином, гравітація є необхідною умовою росту і просторової орієнтації рослин, а при змінах g -вектора змінюються структура та фізіологія рослинного організму.

3.4.1. Дослідження перебігу вірусної інфекції у материнських рослинах картоплі за дії модельованої мікрогравітації

Оскільки при оздоровленні культури важливим є низький вміст вірусної інфекції у материнських рослинах [39, 87] ми досліджували рівень інфікованості рослинних зразків, які культивувалися за умов модельованої мікрогравітації та у нерухомих умовах. Як модель була використана система „ХВК – рослина-хазяїн”, також досліджували перебіг вірусної інфекції у системах „МВК–рослина-хазяїн” та „SBK– рослина-хазяїн”.

Інфікування рослин ХВК у більшості випадків не має симптомів або викликає м’яку мозаїку. Окремі сорти можуть реагувати на вірус некротичними штрихами, кучерявістю та зморшкуватістю листків (рис.3.4.2), а також суворим верхівковим некрозом [40, 46, 302].



Рис.3.4.2. Здорова (зліва) та уражена вірусними інфекціями (справа) рослини картоплі

Вірус має сильні імуногенні властивості, що дозволяє виявляти його імунологічними методами. Дослідження з оздоровлення рослин методом термотерапії розпочалися саме з одержання вільних від ХВК рослин картоплі [260]. Проте багато ланок перебігу патогенезу Х-вірусу картоплі у рослинах досі нез'ясовані [211, 339, 340].

Відомо, що накопичування вірусів у тканинах рослин є нерівномірним і значно залежить від віку тканини [63]. У апікальних меристемах рослин віруси не накопичуються або накопичуються у малій кількості [26, 87]. Це є передумовою для одержання тканин рослини, вільних від вірусної інфекції на певний момент часу. Також встановлено, що вміст вірусів у проростках бульб розподіляється нерівномірно і різні проростки містять неоднакову концентрацію вірусу [26]. Проте, немає даних щодо впливу модельованої мікрогравітації на накопичення вірусної інфекції, тому ми встановлювали вміст антигенів вірусів у проростках бульби, які культивували у різних гравітаційних умовах. При дослідженні впливу модельованої мікрогравітації на розподіл вірусної інфекції у проростках, які походили з однієї бульби, залежно від умов культивування, було виявлено різну концентрацію антигенів (рис.3.4.3).

Вміст антигенів Х-вірусу картоплі був нижчим у 5-15 раз у проростках, які вирощували у нерухомих умовах, порівняно з об'єктами, які культивували за дії кліноостатування [70, 71]. Ймовірно, що умови модельованої мікрогравітації сприяли активному накопиченню антигенів вірусу у проростках під час проростання бульб.

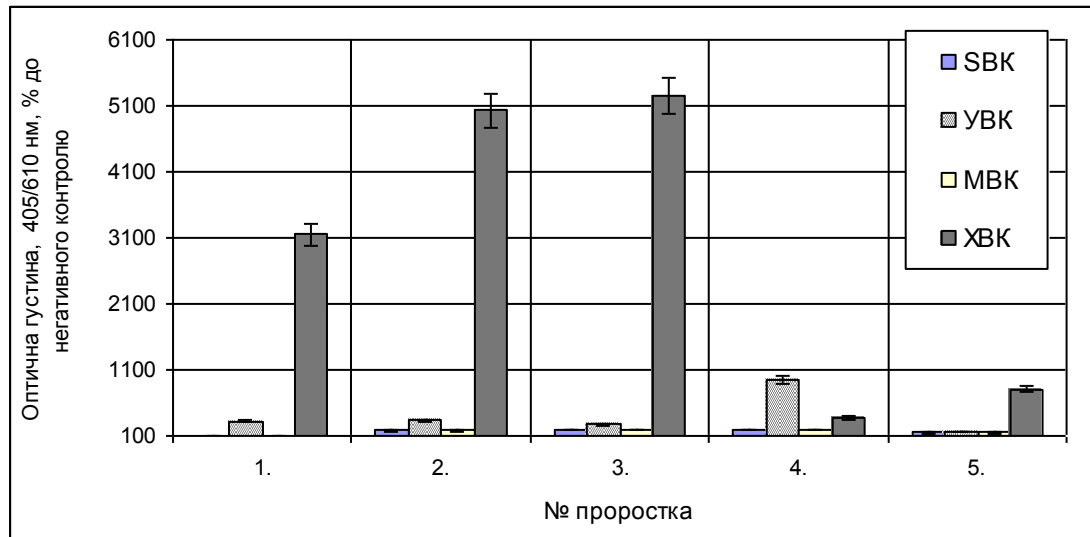


Рис.3.4.3. Вміст антигенів вірусів у проростках картоплі сорту Кримська роза залежно від умов культивування: 1,2 – проростки у кліностаці з горизонтальною віссю обертання; 3 – проросток у кліностаці з вертикальною віссю обертання, 4,5 – проростки у нерухомих умовах

Відмічено, що вміст антигенів був різний і у ростках, які культивувалися в однакових умовах, що можливо пов'язано з їхнім різним онтогенетичним віком. Так, при культивуванні у кліностаці вміст антигенів Х-вірусу картоплі у проростку № 4 перевищував цей показник у проростку № 5 в 1,6 раз. Вірусні частки також виявили у соку рослин картоплі методом електронної мікроскопії (рис.3.4.4).

Таким чином, була встановлена інфікованість вірусами рослин картоплі сорту Кримська роза, які використовували як донорний матеріал для введення у культуру *in vitro*. Здебільшого, вірусна інфекція у зразках була представлена ХБК, MBK та SBK.

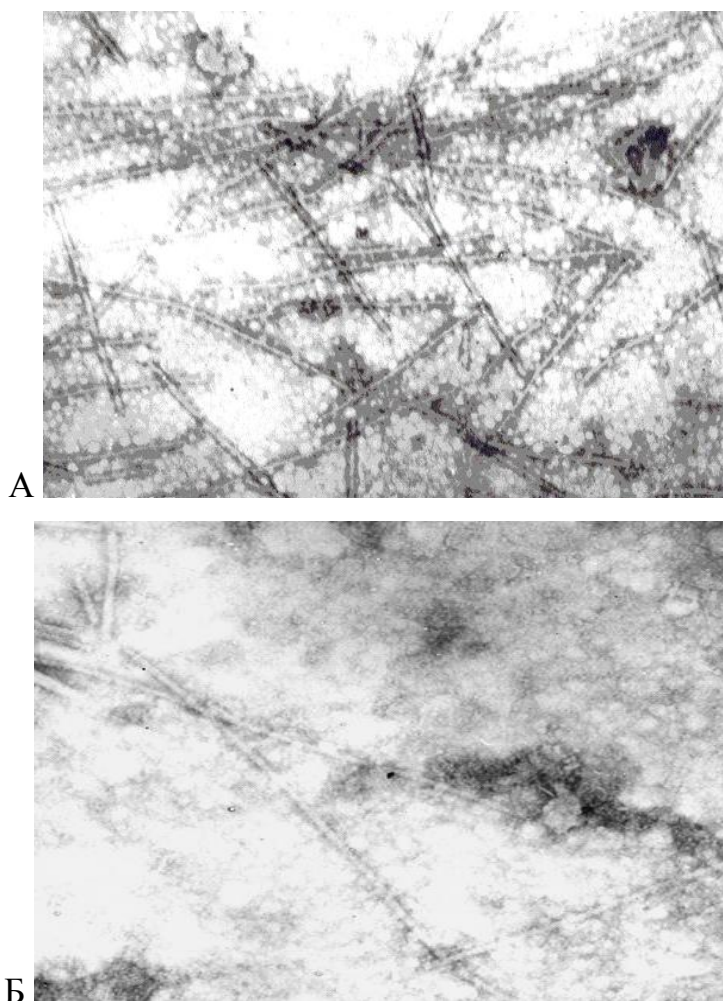


Рис. 3.4.4. Електронограма вірусів, виявлених в листках картоплі сорту Кримська роза: А - нерухомий контроль, Б - кліноостатовані материнські рослини. Інструментальне збільшення 30000

Дослідження перебігу вірусної інфекції продовжили, застосувавши тривале кліноостатування рослин. При аналізі вмісту антигенів на 18 добу культивування у рослинах картоплі виявили високий вміст антигенів *X*-вірусу картоплі, які були присутні як у нерухомих, так і кліноостатованих об'єктах [70, 77]. В окремих рослинних зразках відмічено наявність змішаної інфекції *X*-вірусу картоплі та *M* – вірусу картоплі, а також вміст антигенів *S*-вірусу картоплі (рис. 3.4.5).

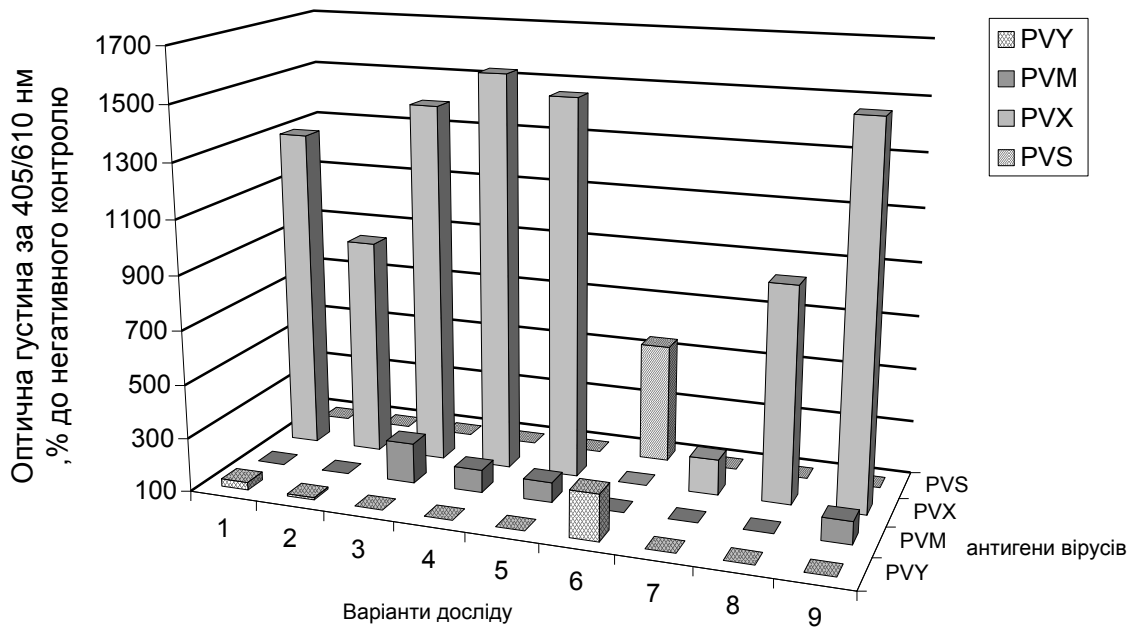


Рис.3.4.5. Оптична густина зразків при визначенні вмісту антигенів вірусів у рослинах картоплі сорту Кримська роза залежно від умов культивування, 18-а доба кліностакування: 1-4 – горизонтальне кліностакування; 5 – вертикальне кліностакування; 6-9 – нерухомий контроль

Таким чином, перебіг інфекції у рослинах картоплі на першому етапі культивування характеризувався високим вмістом антигенів, що свідчить про швидке накопичення окремих вірусів як у нерухомих, так і у кліностакованих варіантах у цей період.

При дослідженні динаміки перебігу вірусної інфекції виявили, що у нерухомих рослинах вміст антигенів Х-вірусу картоплі залишився досить високим до моменту другого обліку на 36 добу культивування, тоді як у кліностакованих об'єктах відмітили його зниження, що може свідчити про пригнічення репродукції цього вірусу (рис. 3.4.6).

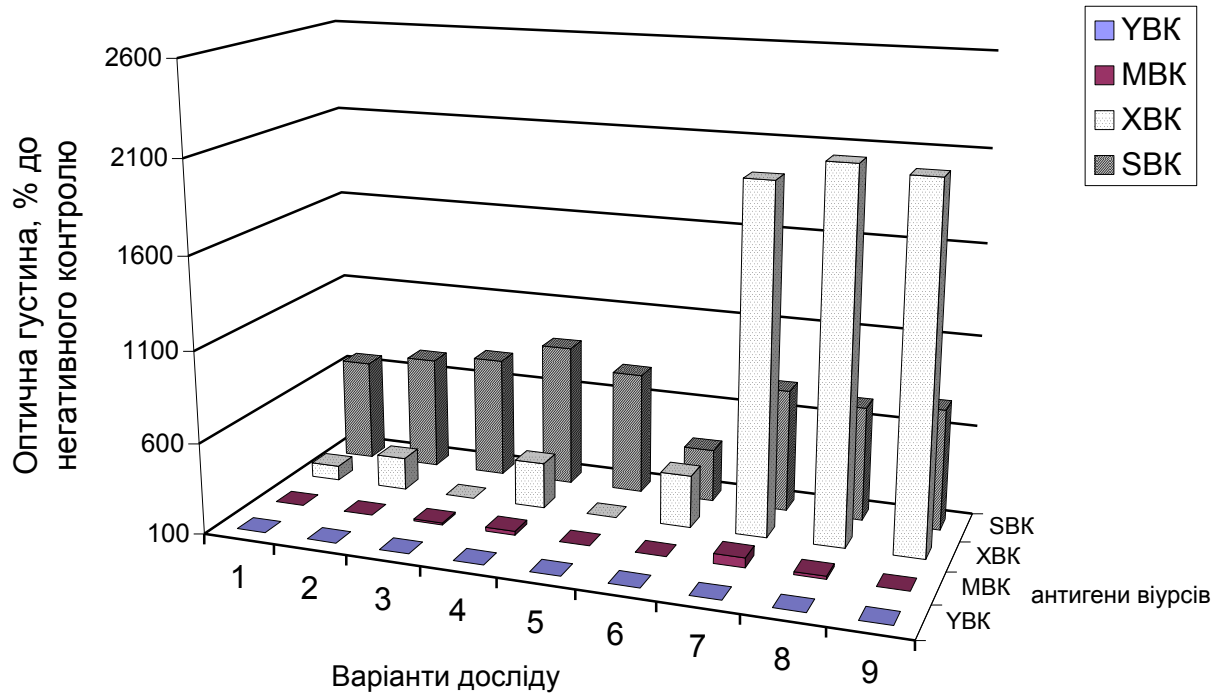


Рис.3.4.6. Оптична густина зразків при визначенні вмісту антигенів вірусів у рослинах картоплі сорту Кримська роза залежно від умов культивування, 36-а доба кліноостатування: 1-4 – горизонтальне кліноостатування; 5 – вертикальне кліноостатування; 6-9 – нерухомий контроль

Отже, на 36 добу під впливом кліноостатування у рослинах картоплі сорту Кримська роза було зафіксоване зниження вмісту антигенів XBK, у деяких зразках – до рівня негативного контролю. Разом з тим, були виявлені певні тенденції розвитку вірусної інфекції для систем «SBK-рослина картоплі» та «MBK – рослина картоплі» під впливом цього чинника, що слугувало передумовою для подальших досліджень на інших сортах картоплі.

Нами було встановлено, що під впливом модельованої мікрогравітації зниження концентрації антигенів XBK проходило більш інтенсивно у рослинах сорту Журавушка [83]. На 47 добу дослідів кількісні показники концентрації антигенів у кліноостатованих рослинах були значно нижчі, ніж у контролі (рис.3.4.7).

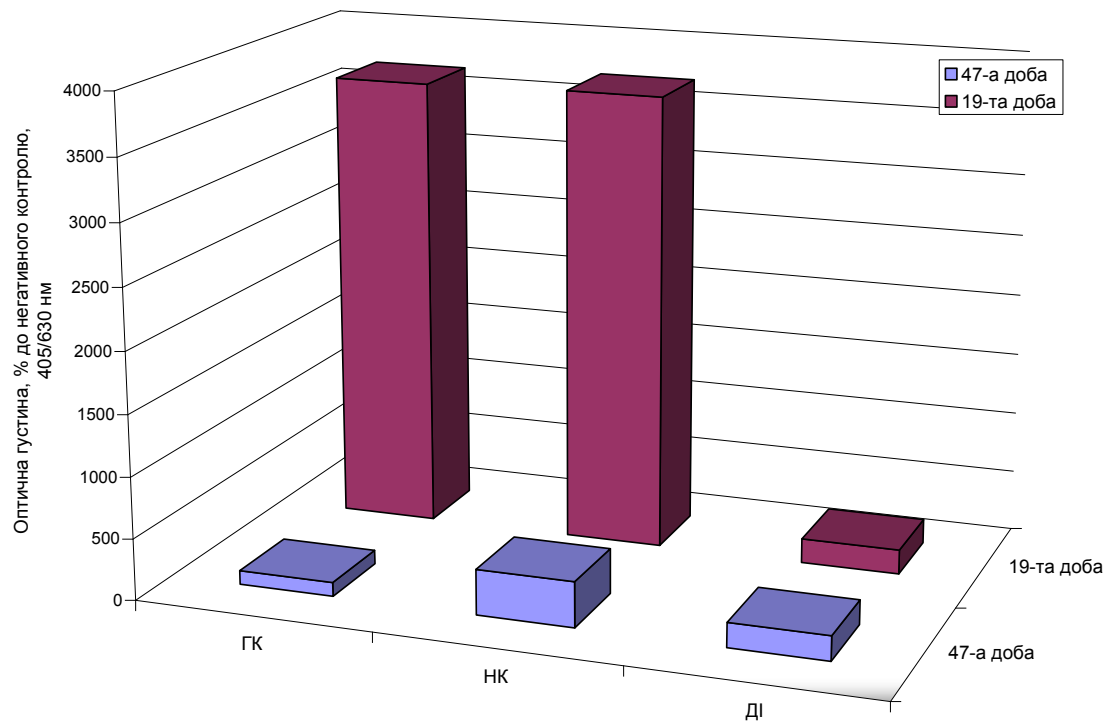


Рис. 3.4.7. Оптична густина зразків при визначенні вмісту антигенів ХВК в рослинах картоплі сорту Журавушка під впливом кліностагування: НК – контроль; ГК– горизонтальне кліностагування; ДІ – довірчий інтервал (показники оптичної густини соку здорової рослини)

У варіанті з горизонтальним кліностагуванням показники оптичної густини імуноферментної реакції знизились до рівня негативного контролю, тоді як у нерухомих рослинах перевищували негативний контроль у 3,5 раз.

На 47 добу культивування оптичні показники реакції у нерухомому контролі знизились, проте все ще перевищували негативний контроль у 5,7 разів. Таким чином, вплив мікрогравітації на систему „ХВК– рослина-хазяїн” проявлявся у зниженні вмісту антигенів вірусу, що може свідчити про пригнічення його репродукції у рослині.

Зниження вмісту антигенів Х-вірусу картоплі у нерухомому контролі також може свідчити про певну генетичну стійкість рослин цього сорту до патогену. Відомо, що у надчутливих та стійких рослин захисні механізми проявляються в обмеженні транспорту, пригніченні розмноження та елімінації

вірусів. У системних хазяїв захисні реакції направлені на послаблення симптомів ураження та пригнічення репродукування вірусної інфекції [61].

Крім ХВК, у рослинах сорту Журавушка за результатами ЗТ-ПЛР була виявлена РНК *М*-вірусу картоплі (рис.3.4.8).

МВК (276 пн)

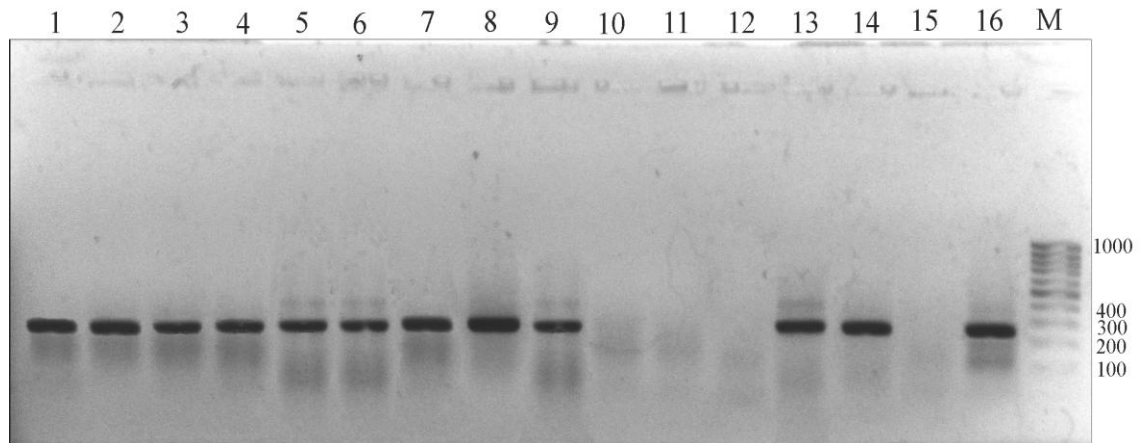


Рис.3.4.8. Дослідження продукту ампліфікації: 1-3 – кліноостатовані зразки, сорт Журавушка; 4-9 - нерухомі зразки, сорт Журавушка; 10-12,15 – негативний контроль (здорові регенеранти сорту Кримська роза); 13,14,16 – зразки польових рослин з візуальними симптомами вірусного захворювання; М - маркер

Вірус був присутній як у кліноостатованих, так і у контрольних рослинах. Таким чином, для цього вірусу можна сподіватися на низьку гравічутливість системи „вірус – рослина-хазяїн”, що очевидно пов’язано з генетичними особливостями патогену.

Дійсно, дослідження динаміки накопичення антигенів МВК у рослинах картоплі під впливом мікрогравітації виявили інший характер перебігу вірусної інфекції, ніж у ХВК (рис.3.4.9.).

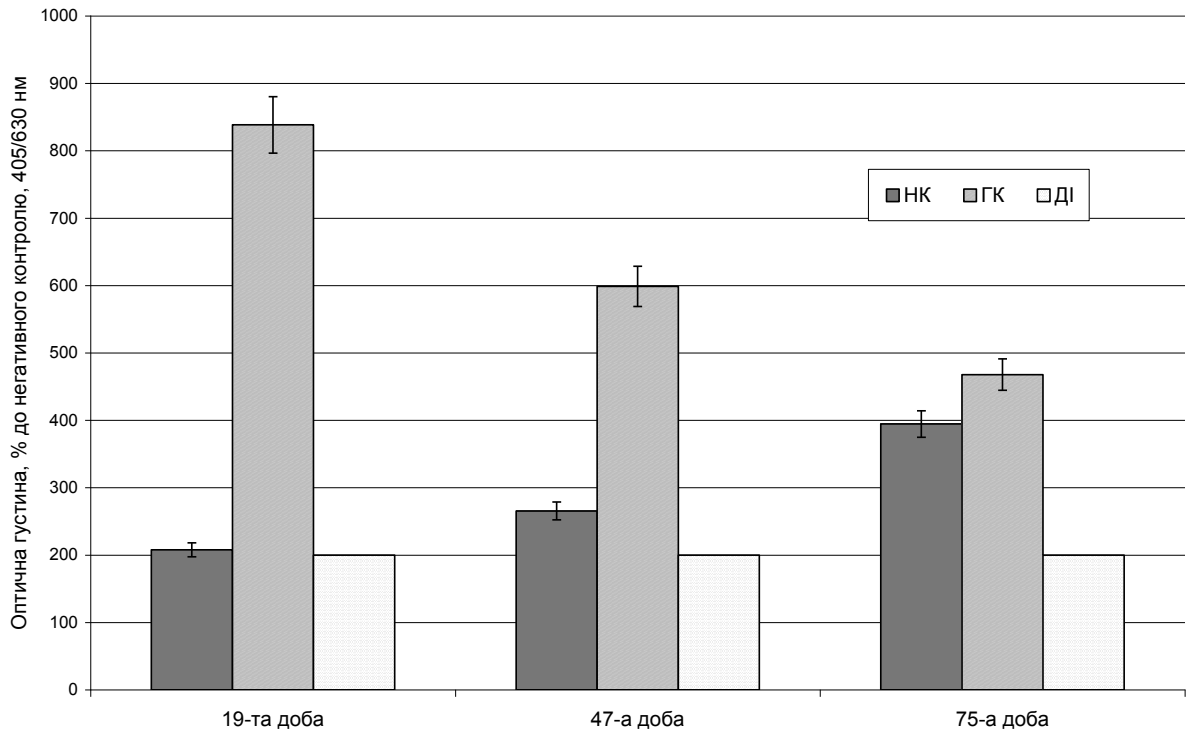


Рис.3.4.9. Оптична густина зразків при визначенні динаміки вмісту антигенів МВК у рослинах картоплі сорту Журавушка під впливом горизонтального кліноостатування: НК – контроль; ГК – горизонтальне кліноостатування; ДІ – довірчий інтервал (показники оптичної густини соку здорової рослини)

У варіанті з горизонтальним кліноостатуванням спостерігали тенденцію до зниження концентрації вірусу протягом дослідження, проте вміст антигенів МВК був значно вищим, ніж у нерухомому контролі. На 75 добу перевищував контроль в 1,2 раз. У контролі спостерігали зростання вмісту антигенів МВК впродовж онтогенезу рослин.

При вертикальному кліноостатуванні на початку спостережень рівень концентрації МВК був нижчим ніж у нерухомому контролі, проте до кінця дослідження вміст вірусу в обох варіантах був майже однаковим і перевищував негативний контроль у 4-4,5 раз. Зниження вмісту антигенів спостерігали як у кліноостатованих рослинах, так і у нерухомому контролі (рис.3.4.10). Таким чином, було виявлено різні адаптивні реакції, що формуються навіть у рослин одного генотипу.

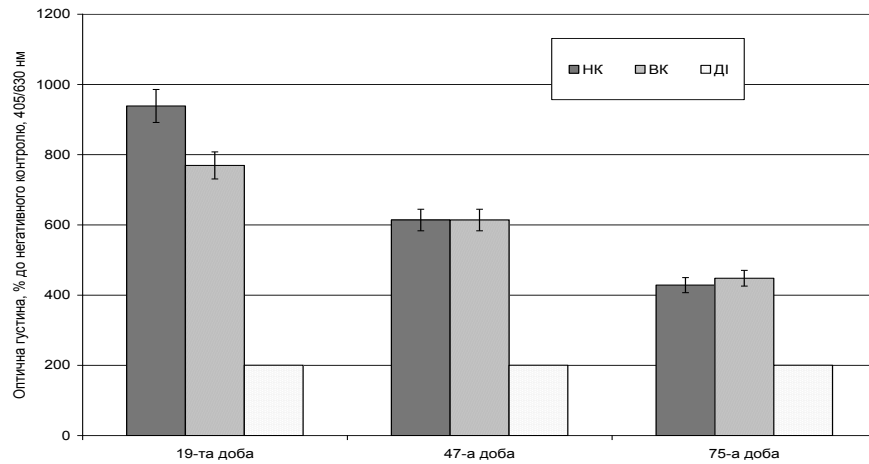


Рис.3.4.10. Оптична густина зразків при визначенні динаміки вмісту антигенів МВК у рослинах картоплі сорту Журавушка під впливом вертикального кліностатування: ВК – вертикальне кліностатування; НК – нерухомий контроль; 2NC - довірчий інтервал негативного контролю

Між чутливими та сприйнятливими до біотичного стрес-впливу рослинами існує різниця, яка полягає у швидкості реагування на розвиток інфекції, тобто вона має тільки кількісний характер [4]. Стійкі рослини можуть швидше розгортати весь спектр реакцій, які перешкоджають поширенню патогена у їхніх тканинах, а сприйнятливі рослини реагують повільніше, що сприяє розвитку захворювання.

Вплив абіотичних чинників, зокрема, кліностатування, яке є стресором для рослин, індукує розвиток захисних реакцій, що супроводжуються посиленням вільно-радикального окиснення та перекисного окиснення ліпідів. Це посилення викликає реактивну мобілізацію антиоксидантних резервів тканини, яка направлена на нормалізацію редокс-статусу та забезпечення гомеостазу. При компенсації стресорного окиснювального вибуху рослинний організм переходить у стадію резистентності, яка забезпечує його стійкість у стресорному середовищі [4]. На фоні цих реакцій, які відбуваються у клітинах хазяїна, репродукція вірусу може зазнавати активного впливу з боку компонентів захисної системи рослини.

Зниження вмісту антигенів вірусу у рослинах також може бути пов'язане з проявом у них так званої «вікової стійкості», при якій спостерігається зниження інтенсивності зараження старіших рослин [26, 63].

Інфікування рослин картоплі МВК часто може протікати безсимптомно. В рослинах МВК часто присутній разом з іншими вірусами картоплі і дуже часто відмічають його сумісну інфекцію з іншим представником роду *Carlavirus* - *S* – вірусом картоплі (SBK) [302]. Ізоляти SBK при моноінфекції не викликають помітних симптомів на багатьох сортах картоплі. Як правило, суворі симптоми захворювання розвиваються у рослин при сумісній інфекції SBK з іншими вірусами. *S*–вірус картоплі легко передається механічним шляхом від інфікованих рослин до здорових, що, безумовно, становить небезпеку при культивуванні картоплі у штучних екосистемах. Тому на рослинах сорту Здабиток провели дослідження перебігу інфекції двох споріднених вірусів при змішаній інфекції в умовах модельованої мікрогравітації [74, 76].

Для перебігу інфекції МВК у рослинах картоплі сорту Здабиток, які перебували у нерухомих умовах, була характерна постійна тенденція до зниження концентрації антигенів впродовж вегетації (рис.3.4.11).

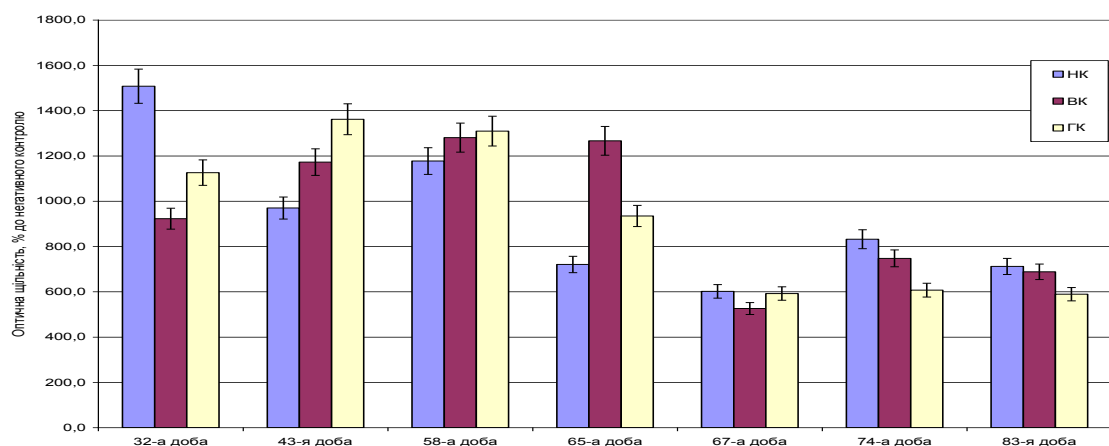


Рис.3.4.11. Динаміка накопичення антигенів МВК у рослинах картоплі сорту Здабиток: НК – контроль, ВК – вертикальне кліностакування; ГК – горизонтальне кліностакування

Проте на 65 добу експерименту виявили дуже значне зниження вмісту антигенів, яке спостерігали до 67 доби. У подальшому вміст антигенів МВК перебував на низькому рівні порівняно з першим обліком (32 доба культивування).

У зразках, які перебували під дією модельованої мікрогравітації спостерігали зростання концентрації антигенів до 65 доби експерименту як за вертикального, так і за горизонтального кліноостатування. У цей період концентрація антигенів у кліноостатованих зразках була вищою, ніж у нерухомих об'єктах. В подальшому відмічали різке зниження вмісту вірусних часток у зразках, що перебували в умовах модельованої мікрогравітації, і до кінця експерименту вміст антигенів перебував на відносно низькому рівні в порівнянні з першими обліками.

З 67 доби експерименту у зразках рослин, які перебували в умовах модельованої мікрогравітації, відмічали нижчий вміст антигенів у порівнянні з нерухомими зразками. Для рослин, які перебували в умовах горизонтального кліноостатування, були притаманні нижчі показники продукту імуноферментної реакції, ніж для рослинних зразків, які перебували в умовах вертикального кліноостатування. На 83 добу культивування у зразках рослин, які перебували в умовах горизонтального кліноостатування, відмітили найнижчий вміст антигенів МВК.

Таким чином, для перебігу інфекції МВК у рослинах картоплі було характерне зниження вмісту антигенів вірусу впродовж культивування. «Критичною точкою» у репродукуванні вірусу в наземних умовах була 65 доба культивування, а для рослин, які перебували в умовах модельованої мікрогравітації – 67 доба. У цей період зафіксоване різке зниження вмісту антигенів вірусу у тканинах рослин.

Перебіг інфекції СВК мав обернену тенденцію у порівнянні з процесом накопичення антигенів МВК у тканинах рослин картоплі. До 67 доби експерименту спостерігали відносно низьку концентрацію антигенів СВК як

у нерухомих зразках, так і у зразках, які перебували в умовах модельованої мікрогравітації (рис.3.4.12).

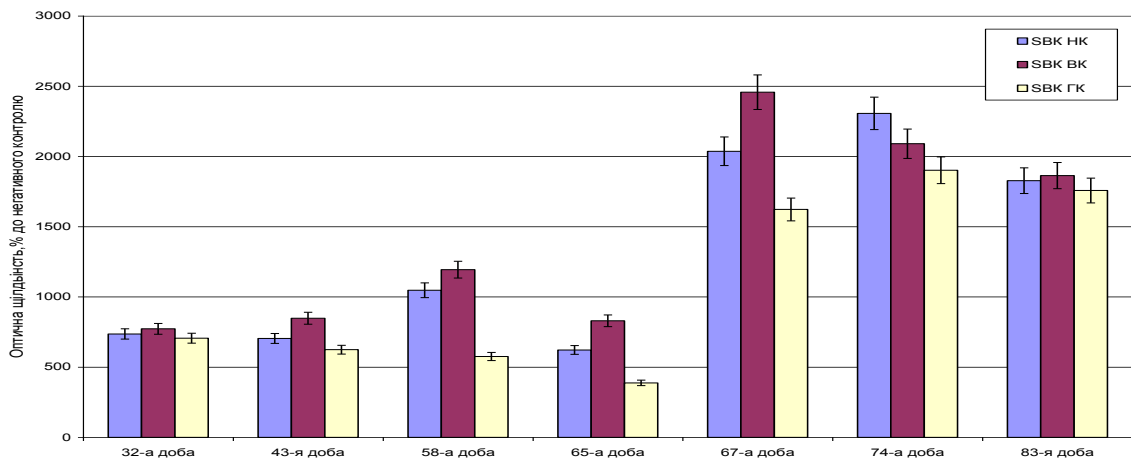


Рис.3.4.12. Динаміка накопичення антигенів SBK в рослинах картоплі сорту Здабиток: НК – нерухомий контроль; ВК –вертикальне кліноостатування; ГК – горизонтальне кліноостатування

Слід відмітити, що у рослин, які перебували в умовах горизонтального кліноостатування, вміст антигенів до 67 доби культивування мав тенденцію до зниження. На 65 добу культивування вміст антигенів SBK у рослинах цього варіанту був у 2 рази нижчим, ніж при вертикальному кліноостатуванні та в 1,5 рази нижчим, ніж у рослин, які культивували в наземних умовах. У подальшому концентрація антигенів зростала як у нерухомих рослинних об'єктах, так і у кліноостатованих рослинах. На 67 добу експерименту відмічали збільшення концентрації антигенів втричі, порівняно з попереднім обліком для усіх варіантів досліду. В умовах вертикального кліноостатування вміст антигенів SBK був найвищим, а при горизонтальному кліноостатуванні – найнижчим.

У період з 67 по 83 добу при вертикальному кліноостатуванні спостерігали зниження вмісту антигенів. У тканинах рослин при горизонтальному кліноостатуванні вміст антигенів у цей період зростав. Критичним періодом патогенезу SBK у рослинах картоплі був період з 65 по 67 добу культивування, впродовж якого відбулось різке збільшення вмісту

антигенів вірусу. Умови кліноостатування сприяли як зниженню вмісту антигенів вірусів у певний період культивування, так і його підвищенню.

Таким чином, у дослідженнях перебігу вірусної інфекції в материнських рослинах картоплі за умов модельованої мікрогравітації виявили характерні риси цього процесу, що свідчать про формування у рослин неспецифічної стійкості до патогенів. Гравічутливість системи „вірус–рослина-хазяїн” залежала від генетичних особливостей рослин та вірусів.

3.4.2. Регенерація рослин *in vitro* з експлантатів кліноостатованих рослин картоплі

Оскільки вірусні частки мають низьку здатність до проникнення у клітини меристем, ми допускали, що деякі з цих тканин можуть бути вільні від вірусів, зокрема від X-вірусу картоплі, в результаті пригнічення його репродукції в умовах модельованої мікрогравітації. Одержані регенеранти були протестовані на вміст вірусної інфекції методом ІФА. Регенеранти з експлантатів кліноостатованих вихідних материнських рослин, одержані в культурі *in vitro* методом апікальних меристем, не містили антигенів X-вірусу картоплі за даними імуноферментного аналізу [70]. Антигенів X-вірусу картоплі в рослинах, регенерованих *in vitro* не виявлено у 9-ти лініях з 12 ліній регенерантів (рис. 3.1.13).

Відмічені певні коливання вмісту антигенів різних вірусів, разом з тим, антигени S-вірусу картоплі також не виявлені імуноферментним тестуванням у 3-х лініях регенерантів. Таким чином, одержано ряд регенерантів, що не містили вірусної інфекції, яка була характерна для вихідних материнських рослин.

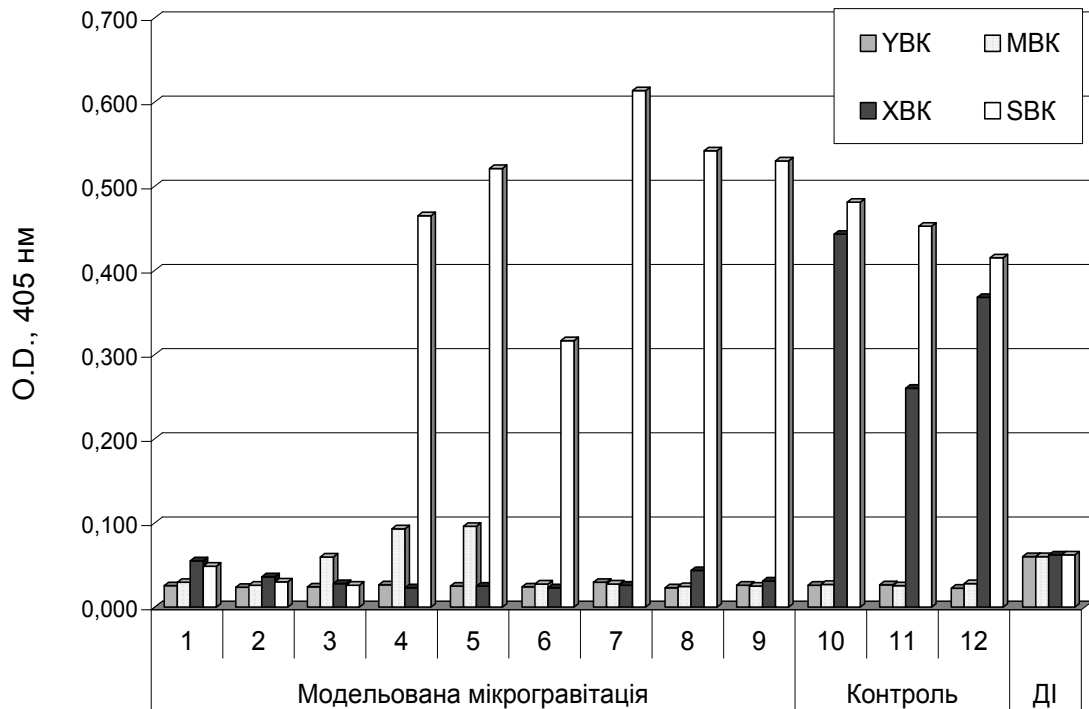


Рис. 3.4.13. Оптична густина зразків при визначенні вмісту антигенів вірусів у регенерантах картоплі сорту Кримська роза: MBK– M-вірус картоплі; SBK – S-вірус картоплі; XBK – X-вірус картоплі; YBK – Y-вірус картоплі; ДІ – довірчий інтервал (показник оптичної густини соку здорової рослини)

Вірогідно, що умови кліноостатування перешкоджали прониканню вірусних часток у клітини деяких меристем вихідних материнських рослин. Згідно з сучасними гіпотезами оздоровлення рослин від вірусів, на взаємозв'язок „вірус – клітина-хазяїн” впливає цілий ряд факторів, одним з яких можуть виступати інтенсивні окисно-відновні процеси, що відбуваються в клітинах апікальних меристем і пригнічують реплікацію вірусів [163].

Регенеранти, які тривалий час культивували в умовах *in vitro* та піддавали дії модельованої мікрогравітації, не містили X-вірусу картоплі, оскільки у них методом ЗТ-ПЛР не виявлено кДНК до РНК цього вірусу (рис.3.4.14).

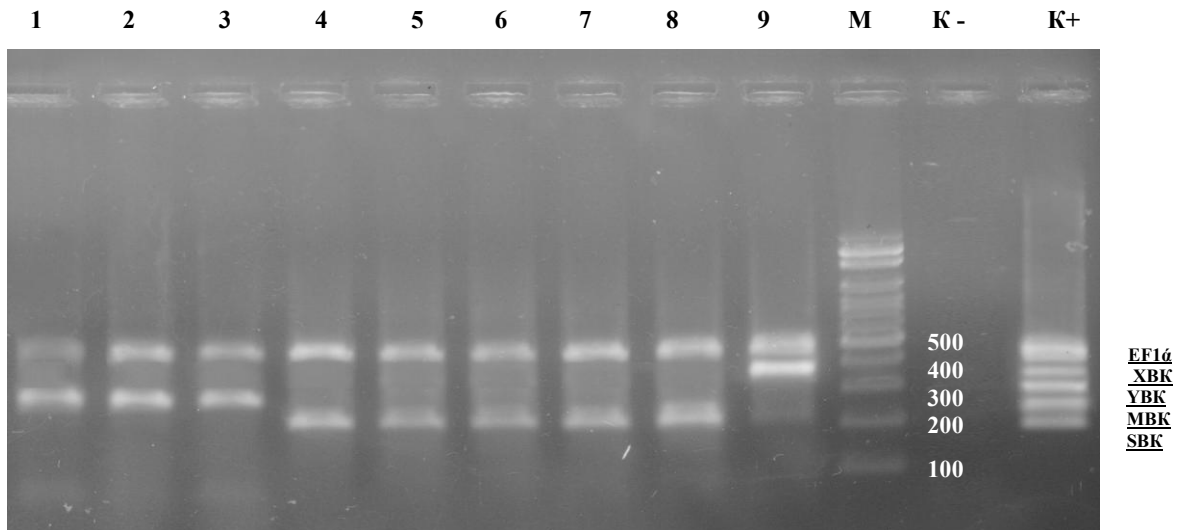


Рис.3.4.14. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР визначення *M*, *X*, *S* – вірусів картоплі у регенерантах сорту Кримська роза; треки 1-3 – *M*-вірус картоплі (276 п.н.); треки 4-8 – *S*-вірус картоплі (213 п.н.); 9 трек – *Y*-вірус картоплі (365 п.н.); EF1 α – клітинний фактор елонгації (внутрішній контроль ПЛР) (468 п.н.); М – маркер ДНК 100, 200, 300, 400, 500 (кб); К+ – позитивний контроль; К- – негативний контроль

У позитивному контролі виявлено продукт ампліфікації кДНК до РНК *X*-вірусу картоплі розміром 411 п.н. Виявлення у зразках 1-3 продуктів ампліфікації комплементарної ДНК до РНК *M*-вірусу картоплі свідчить про відсутність відчутного впливу тривалого культивування в умовах *in vitro* на репродукцію цього вірусу в регенерантах. Відповідно, була виявлена і кДНК до РНК *S*-вірусу картоплі (треки 4-8). Таким чином, ці патосистеми мають низьку гравічутливість, тоді як патосистему „ХВК – рослина-хазяїн” можна віднести до гравічутливих систем. Такий розподіл дозволяє більш коректно підбирати методи оздоровлення рослин відповідно до стану їх інфікованості різними вірусами.

Сучасні гіпотези оздоровлення від вірусів у процесі культури верхівкових меристем указують на те, що на взаємозв'язок „вірус – клітина-хазяїн” впливає багато факторів, проте у меристемах відбуваються інтенсивні окисно-відновні процеси, що пригнічують вірусну реплікацію [87].

Віруси, які передаються механічно, повинні використовувати судинну систему для руху по всій рослині і кінцевого переміщення у бульби. Таким чином, первинна інфекція і вторинна системна інфекція, пов'язана з рухом вірусу від заражених бульб до пагонів рослини, що розвивається, залежить від можливості вірусу здійснювати вхід і вихід з судинної системи хазяїна. Слід зазначити, що чинники, які лімітуватимуть ці переходи, сприяють тому, що в певні моменти часу деякі частини рослини будуть вільними від вірусу. Введення в культуру *in vitro* тканин таких ділянок дозволяє регенерувати вільні від вірусів рослини.

У даний час сформульовано гіпотезу про те, що механізм сприйняття і реалізації гравітаційного стимулу в клітинах відповідно до їхнього еколого-фізіологічного статусу і характеристиками поведінки передбачає реорганізацію цитоскелета і просторовий перерозподіл основних клітинних органел [36,62,69]. Доказом цієї гіпотези є те, що чинники космічного польоту дестабілізували макро- і мікроструктури клітинних органел вищих рослин, що є однозначною відповіддю клітин на зміну умов їхнього існування [242]. Можливо, така дестабілізація і призводила до зниження здатності вірусів проникати та інфікувати клітини, що і викликало ефект елімінування.

Оскільки перебіг вірусної інфекції у регенерантах картоплі під впливом модельованої мікрогравітації раніше не досліджували, рослини-регенеранти *in vitro*, у яких виявили вірусну інфекцію, піддавали дії кліностагування (рис.3.4.15, а).

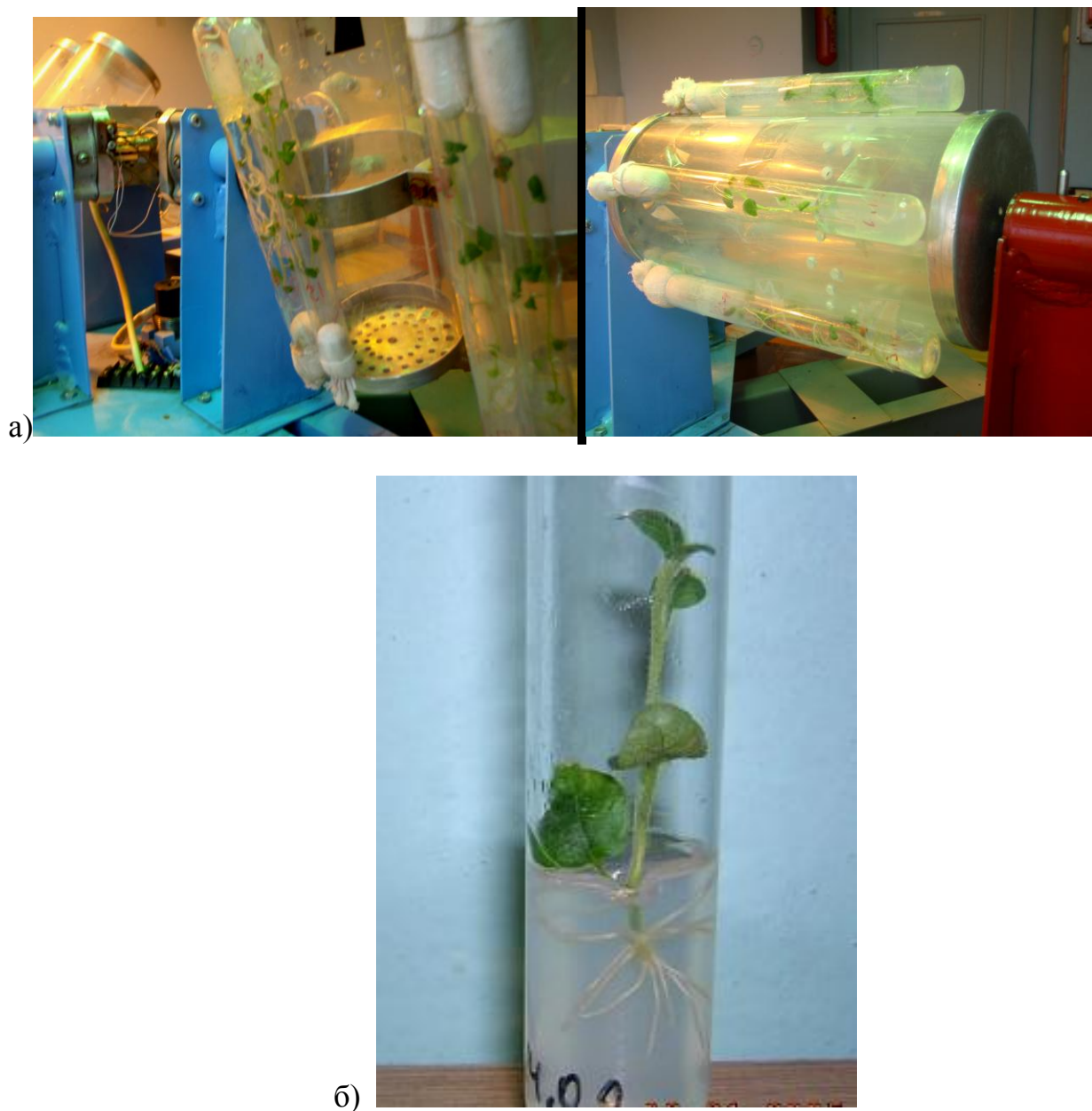


Рис. 3.4.15. Розвиток регенерантів картоплі сорту Кримська роза в кліностації «Цикл-2» за умов модельованої мікрогравітації (а) та у нерухомому контролі (б)

У ході цих досліджень виявлені певні закономірності розвитку регенерантів за умов модельованої мікрогравітації. Під впливом кліностакування маса надземної частини регенерантів зростала в 1,9 раз порівняно з негативним контролем (табл.3.4.1). Відповідно збільшувалась і довжина пагонів регенерантів – в 1,4 раза.

Таблиця 3.4.1

Показники росту та розвитку регенерантів картоплі сорту Кримська роза за дії модельованої мікрогравітації

Варіанти	Надземна частина			Коренева система		
	маса, г	довжина, мм		кількість листків, шт.	маса, г	довжина, мм
		стебла	міжвузля			
нерухомий контроль	0,33±0,02	115,0±5,0	8,0±0,4	3,0±0,1	0,210±0,04	116,5±3,5
кліностат	0,64±0,08	159,5±7,5	11,4±0,3	3,3±0,2	0,205±0,02	192,5±47,5

Висота регенерантів зростала за рахунок збільшення довжини міжвузля, оскільки рослини формували приблизно однакову кількість листків. Можна припустити, що ріст осьових органів регенерантів, зокрема пагонів, в умовах модельованої мікрогравітації відбувається за рахунок розтягнення клітин, оскільки у нерухомих рослинах ріст розтягненням гальмується під дією вектора земного тяжіння [62]. Не виявили достовірної різниці між варіантами при порівнянні показників маси коренів та довжини кореневої системи регенерантів. Однак, мікрогравітація впливала на орієнтацію коренів відносно осі росту. Так, при кліностатуванні корені спрямовано росли у напрямку верхівки рослини, що є відповідним доказом дії мікрогравітації на рослини (рис. 3.4.16).



Рис. 3.4.16. Розвиток кореневої системи регенерантів за умов модельованої мікрогравітації

Уміст антигенів X-вірусу картоплі та S-вірусу картоплі у регенерантах після клінонотування протягом 30 діб представлено на рис. 3.4.17.

Не виявлено достовірної різниці між варіантами, оскільки зменшення вмісту ХВК у рослин за дії горизонтального клінонотування, порівняно з нерухомим контролем, становило 11%, а за дії вертикального клінонотування – 4%. Для S-вірусу картоплі відмічене зростання вмісту антигенів на 16% при горизонтальному та на 24% при вертикальному клінонотуванні.

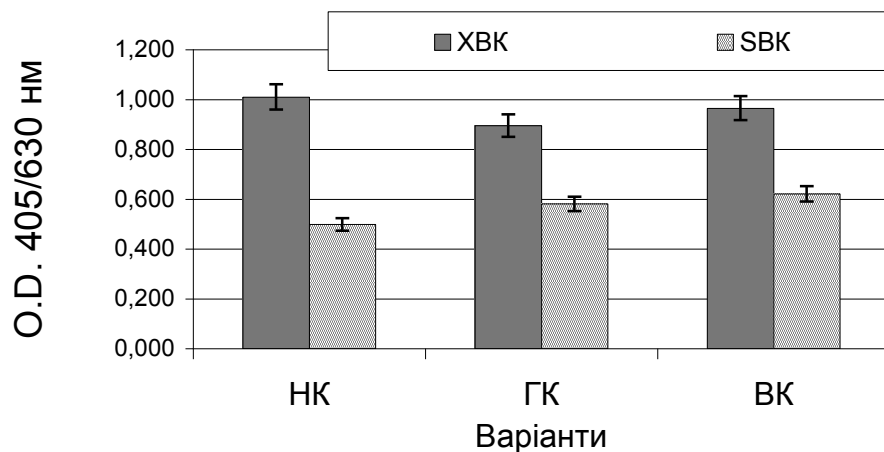


Рис. 3.4.17. Вміст антигенів ХВК та SBK у регенерантах сорту Кримська роза за дії модельованої мікрогравітації: НК – нерухомий контроль, ГК – горизонтальне клінонотування; ВК – вертикальне клінонотування

Слід зазначити, що, у зв'язку зі специфічністю культивування рослин в умовах *in vitro*, тривалість дії модельованої мікрогравітації не перевищувала 30 діб. Можливо, тому не було виявлено суттєвого впливу клінонотування на перебіг інфекції ХВК. Разом з тим, можна припустити, що певний вплив на цей процес мали умови культури *in vitro*, які відрізняються від умов перебування рослин у природі.

Отже, в умовах модельованої мікрогравітації пригнічувалось накопичення антигенів X-вірусу картоплі у вихідних материнських рослинах, що дозволило

одержати вільні від вірусу експлантати та регенерувати рослини в культурі *in vitro*. Дослідження впливу кліноостатування на рослини картоплі виявили різні за чутливістю до модельованої мікрогравітації комбінації „вірус – рослина-хазяїн”, у яких перебіг вірусної інфекції характеризувався як збільшенням вмісту антигенів вірусу, так і його зниженням. Слід зазначити, що оскільки під впливом модельованої мікрогравітації у рослин відбувається формування неспецифічної стійкості [4], механізм встановлених реакцій може мати спільні ланки з цим процесом.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Культивування рослин є найдавнішою сферою діяльності, у якій відбуваються взаємовідносини людини з природою. Оскільки „культура є нашим внеском в історію природи [41]”, саме у цій сфері повинні відбутися зрушення, які можуть повернути людині втрачені взаємозв'язки з природним світобудовою. Тому первинною умовою наукових розробок у галузі біології має бути їхня відповідність засадам біоетики та біобезпеки [72,73]. Особливо це актуально для створення нових та оптимізації існуючих біотехнологій.

Альтернативним вирішення проблеми оздоровлення від вірусної інфекції є шлях підвищення стійкості рослинних організмів під дією абіотичних чинників різної природи. Модельована мікрогравітація як індуктор неспецифічної стійкості мало досліджена, разом з тим, у наших дослідженнях виявлено різний характер протікання вірусної інфекції за умов дії цього чинника. Залежно від виду вірусу спостерігали елімінацію, пригнічення і стимуляцію накопичення антигенів у рослинах-хазяях в умовах клінонатуровання. Виявлене зниження та елімінавання X-вірусу картоплі у різних сортах картоплі дозволяє зробити висновок, що система „ХВК-рослина картоплі” має високу гравічутливість.

У результаті досліджень доведено, що використання горизонтальних клінонатуровань моделює вплив невагомості на розвиток рослин, а дослідження на вищих рослинах показали, що при правильному підборі швидкості обертання результати клінонатуровання схожі з результатами, одержаними на космічних апаратах [43,44]. При вирощуванні рослин на горизонтальному клінонатурованні зі швидкістю обертання 2 об./хв. створюється прискорення (10^{-5} - $10^{-4}g$), при якому рослина не сприймає гравітаційного подразнення [62].

На клітинному рівні застосування кліностагування викликає такі реакції рослинних клітин, як зміни у складі клітинної стінки, посилення біосинтезу білків теплового шоку, зміни у клітинному енергетичному метаболізмі [97, 338]. Інші зміни включають більш випадковий розподіл пластид (амілопластів) і збільшення числа та об'єму ядерць [312]. На протопластах *Brassica napus*, які піддавалися і мікрогравітації, і обертанню у кліностації, виявили зниження швидкості поділу клітин і зміни розміщення мікротрубочок [313]. Для дії модельованої мікрогравітації виявлена фазність змін про-/антиоксидантної рівноваги, що свідчить про формування у рослинних клітинах під дією цього чинника адаптаційного синдрому [4]. Таким чином, реакції систем „фітовірус – рослина-хазяїн” в умовах мікрогравітації мають адаптаційний характер.

Виявлена нами диференціація гравічутливості системи „фітовірус – рослина-хазяїн” дозволяє обґрунтувати явище оздоровлення від вірусної інфекції як адаптаційну реакцію. Фізіологічний стрес, викликаний модельованою мікрогравітацією, індукує зміщення гомеостатичної рівноваги метаболічних процесів, що посилює адаптаційні механізми рослинного організму, сприяє його переадаптації до інших стресових дій та підвищує його неспецифічну стійкість [92]. Механізми протікання цього процесу все ще не з'ясовані, проте, розглядаючи перебіг реакцій у системі „фітовірус–рослина-хазяїн”, ключовим моментом можна розглядати зміни у пересуванні вірусу у рослині.

Розвиток інфекційного процесу при системній вірусній інфекції здійснюється у результаті репродукції вірусу в первинно заражених клітинах і розповсюдження його з клітини у клітину по плазмодесмах та на великі відстані – по провідній тканині. Слід зазначити, що структура конкретного вірусу добре пристосована до умов, які існують у його екологічній ніші, оскільки природа не тільки забезпечила віруси засобами, які підтримують їхню життєздатність за стандартних умов, але також і передбачила

можливість індивідуального пристосування до несподівано виникаючих обставин [63].

Для вірусів можливе відтворення і у широкому колі рослин-нехазяїв, при цьому стійкість рослин до вірусів визначатиметься нездатністю вірусу до пересування від первинного місця зараження. У клітинах рослин-хазяїв пересування вірусу здійснюється за допомогою специфічних вірусних білків - «білків руху», наприклад, такий білок був ідентифікований для X-вірусу картоплі. При сумісній реакції хазяїна, білок взаємодіє з плазмодесмами і просуває вірус з клітини у клітину. Зараження рослини відбувається відносно повільно, поки вірус не потрапляє у провідну тканину [237]. Таким чином, пригнічення перебігу вірусної інфекції у рослинах може бути пов'язане зі змінами у плазмодесмах, які викликані дією модельованої мікрогравітації. Також можлива участь у цьому процесі біополімерів, катаболізм яких індукується стресором і які беруть участь в утворенні активних антистресових механізмів. Відомо, що такі сполуки сприяють протистоянню несприятливій дії різних чинників та формуванню реакцій адаптації [92].

Поєднання методу клінонотатування та культури меристеми дозволило одержати регенеранти, вільні від вірусної інфекції і, таким чином, оптимізувати етап введення експлантатів у культуру *in vitro* [321-323].

Для прогнозованого розвитку в умовах *in vitro* модельна тканина повинна мати відповідну компетенцію, що не завжди може бути здійснене практично. Під компетентністю клітини звичайно розуміють потрібну для індукції даного напрямку розвитку ступінь її диференціації, тобто відповідний стан хроматину, розподіл у ньому транскрипційної активності. Іноді всі ці параметри умовно об'єднують в поняття "пам'ять клітини" [25, 137]. Компетентність клітин є епігенетичною характеристикою, тому не вимагає зміни генетичної бази розвитку клітин і може бути модифікована, що дозволяє індукувати морфогенез. Вибрана нами модельна тканина – меристема, вважається досить компетентною для морфогенезу, адже *in vivo* її

функціонування визначає розвиток усієї рослини. Проте низька регенераційна здатність ізольованих меристем при технології введення у культуру *in vitro* піднімає проблему інших необхідних умов індукції морфогенезу.

Відомо, що для рослинних клітин індуктором морфогенезу можуть виступати, крім ендогенних чинників, як абіотичні, так і біотичні фактори навколишнього середовища. Разом з тим, специфічність дії цих чинників дуже низька, що призводить до непередбачуваності морфогенетичних перетворень при введенні експлантатів у культуру *in vitro*. Очевидно, що відсутність ґрунтової інформації у цьому питанні також призводить до виникнення таких небажаних явищ як зниження регенераційної здатності тканин при культивуванні *in vitro*. Наші дослідження морфогенезу ізольованих меристем продемонстрували можливість індукування їхнього розвитку у культурі *in vitro* за дії червоного та синього світла.

Початкові морфогенетичні реакції меристеми на введення у культуру *in vitro* можна віднести до дедиференціації, оскільки шари клітин, які безпосередньо контактують з живильним середовищем, звільнені від позиційного впливу інших клітин. Тому, очевидно, калусоутворення матиме місце як типова реакція за даних умов. Проте послідувачі морфогенетичні реакції, а саме формування у наслідок диференціації клітин меристеми органів регенеранта, однозначно не детерміновані. Оскільки апікальна меристема на протязі усього циклу життя рослини визначає утворення і розвиток її організму, очевидно, що сигнали, які сприймають і передають вплив екзогенних чинників повинні транслюватися у цей центр органогенезу. Таким чином, індукція морфогенезу експлантатів під впливом опромінення додатковим монохроматичним світлом, реалізується в ізольованих меристемах, очевидно, через певні фоторецепторні системи, наприклад, через фітохромну фотосистему. Здатність фітохромів сприймати світло у низькій кількості та трансформувати сигнал у клітині через субклітинну локалізацію

і взаємодію з ендогенними клітинними структурами [327], свідчить про їхню відповідну роль у адаптаційних реакціях рослинного організму.

Разом з тим, у цьому процесі беруть участь і інші фотосистеми, які сприймають світло різних ділянок спектра. Так, показана участь у морфогенезі рослин зеленого та синього світла, які сприймаються криптохромами та фототропінами [19, 20, 29]. Пігмент синього світла маловивчений і його спектральні характеристики неповні. Довжина хвилі синьої області спектра 488 нм може збуджувати фоторецептор, відмінний від фітохрому, оскільки не співпадає з жодним із максимумів поглинання фітохрому. Очевидно, морфогенез ізольованих меристем у культурі *in vitro* залежить від інтегрального сигналу, який формується під впливом різних ділянок спектра.

Таким чином, дослідження, проведені на ізольованих меристемах картоплі в культурі *in vitro* показали, що їхні життєздатність, морфогенез та подальший розвиток тісно пов'язані з дією світла. Можна вважати, що позитивні ефекти дії світла визначеного спектрального складу на розвиток ізольованих меристем картоплі мали адаптаційний характер, оскільки в умовах *in vitro*, які відрізняються від умов розвитку меристем *in situ*, підвищувався морфогенетичний потенціал експлантів.

При культивуванні одновузлових живців в культурі *in vitro* принаймні два процеси морфогенезу є найбільш значущими для подальшого розвитку рослини: регенерація кореневої системи та ріст пагона з пазушної бруньки. Кореляційні та інтеграційні відносини між цими процесами залежать від умов культивування та стану живця. При цьому стан живця буде визначатися, зокрема, його положенням на материнській рослині, яке відображає його онтогенетичний вік. Живці регенерантів *in vitro* можна вважати генетично однорідними об'єктами, оскільки донорні рослини походять з однієї меристеми [9, 110]. З літературних джерел відомо, що світло одного й того ж визначеного спектрального складу, залежно від

тривалості його дії, може викликати неоднакові ефекти у одних і тих же об'єктів [13, 64, 269]. У зв'язку з цим, для розуміння закономірностей розвитку генетично однорідних біологічних об'єктів та їхніх груп, таких, як клони регенерантів, виключно важливе значення може мати вивчення впливу довготривалого опромінення.

Разом з тим, фізіологічний стан таких живців може бути різним через різний онтогенетичний вік, що впливає на вміст у них фітогормонів. Очевидно, цей ефект проявляється при мікроклональному розмноженні і був виявлений нами у дослідженнях розподілу регенерантів клону за висотою. Зміни вмісту та співвідношення ІОК та ГК₃ при тривалому культивуванні на ЧС викликали адаптаційні зміни у морфогенезі рослин. Однією із реакцій рослин на зміни у спектральному складі світла є так званий синдром запобігання тіні. Відомо, що при вирощуванні рослин на білому світлі з додаванням певної частки ДЧС у них розвивається синдром «запобігання тіні», який реалізується у прискоренні росту за рахунок інгібування розвитку листків [310, 316, 317]. Враховуючи, що умови тривалого опромінення ЧС можуть викликати зсув у співвідношенні форм фітохромів Φ_{730}/Φ_{660} , ми припускаємо, що морфогенетичні зміни у регенерантів картоплі, а саме видовження міжвузлів та мала площа листків, є проявами синдрому «запобігання тіні», який реалізується за участю фітохромної рецепторної системи. Однією із ланок передачі сигналу є фітогормони – ауксини та гібереліни. Їх співвідношення визначає морфогенез рослини у специфічних умовах культивування. Таким чином, реалізація відповіді рослини на світловий сигнал є адаптаційною відповіддю, у якій задіяні її основні регуляторні системи.

Зміни напрямку розвитку регенерантів з вегетативного на репродуктивний (бульбоутворення) під впливом стимулюючого опромінення свідчить про наявність і функціонування у них осцилятора, який запускається та корегується фітохромною системою [326, 347, 348]. Проте, очевидно, на

цей процес впливають і інші абіотичні чинники, зокрема температура, оскільки цей фактор у природних умовах діє спряжено зі світлом: при зміні якості освітлення змінюється температура оточуючого середовища, що також сприймається рецепторними системами рослини [324]. Крім того, відомо що зниження температури стимулює бульбоутворення у рослин картоплі. Таким чином, зміна спектрального складу світла при бульбоутворенні у регенерантів картоплі виступає як інформативний сигнал, який, при наявності інших ендогенних та екзогенних чинників, призводить до зміни статусу рослин, а, отже, також сприяє реалізації адаптаційного потенціалу.

Вплив інформаційного світлового сигналу має пролонговану дію, оскільки при опроміненні етіюльованих проростків бульб ефект спостерігається до кінця вегетації рослин. Таким чином, нами запропонований спосіб адаптації мікробульб картоплі до польових умов, який базується на підвищенні адаптаційного потенціалу при короткочасному стимулюючому опроміненні світлом червоної ділянки спектра [55]. Разом з тим, очевидно у процесі адаптації проростків до польових умов беруть участь і інші сигнальні системи рослини, що дозволяє їй реалізувати свій потенціал розвитку за дії різних комбінацій абіотичних чинників.

Фізіологічний зміст процесів, які відбуваються у рослині на етапі перенесенні з культури *in vitro* в умови *ex vitro* пов'язаний із адаптацією рослинного організму. Пересадка інтактних регенерантів в умови *ex vitro* призводить до виникнення стресу, оскільки їхні органи, сформовані за високої вологості повітря та низької інтенсивності освітлення, не можуть адекватно функціонувати у нових умовах. Показано, що поглинання $^{14}\text{CO}_2$ після трансплантації рослин в умови *ex vitro* посилюється тільки в новоутворених листках, тоді як у листках, сформованих рослиною в умовах *in vitro*, інтенсивність поглинання майже не змінюється [98, 287]. В умовах культивативних споруд регенеранти швидко втрачають вологу через аномалію продихового апарату, яка викликана культивуванням у закритих

посудинах [112, 278, 279]. Очевидно, що для виживання на етапі *ex vitro* рослина повинна проявити свій адаптаційний потенціал, а тому важливо відповідно оптимізувати умови культивування регенерантів. Такими оптимізуючими чинниками є використання відповідного субстрату для культивування одновузлових живців та обробка їх речовинами, які посилюють адаптаційні реакції. Регенерація рослин з живців в умовах *ex vitro* дозволяє одержати організми, адаптовані до нових умов існування, оскільки вони формуються за інших параметрів середовища, ніж вихідні регенеранти. Таким чином, нами запропоновано спосіб адаптації регенерантів, який посилює їхній адаптаційний потенціал природним шляхом – через утворення нових органів у відповідних умовах [53]. Роль субстрату культивування на цьому етапі полягає у забезпеченні формування достатньої маси кореневої системи та збереження на перших стадіях культивування активного росту пагона. Одержана таким способом розсада має високий потенціал розвитку і легко переносить трансплантацію у польові умови.

Разом з тим, підвищення адаптаційного потенціалу у рослин стимулюється речовинами, які мають адаптогенні властивості [23]. При застосуванні епібрасиноліду було виявлено підвищення швидкості росту та розвитку регенерантів, що очевидно пов'язано зі змінами, які відбуваються на перших стадіях регенерації у листку донорного живця. Відомо, що брасиностероїди змінюють ендогенний фітогормональний баланс рослин [23]. Напрямок взаємодії між фітогормонами (позитивний чи негативний) залежить від біологічного процесу, тканини, стадії розвитку рослини та умов оточуючого середовища [359].

Таким чином, взаємодія між ендогенними та екзогенними чинниками складає складну сітку регулюючих реакцій, яка веде до значної кількості можливих комбінацій, що дозволяє рослинам з високою гнучкістю справлятися з нестабільними умовами навколишнього середовища.

Дослідження деяких цих комбінацій в умовах культури *in vitro* та *ex vitro* дозволило розробити принципову схему оптимізації процесу мікроклонального розмноження картоплі (табл.4.1).

Таблиця 4.1

Схема оптимізації мікроклонального розмноження з використанням впливу абіотичних чинників на адаптаційний потенціал та регенераційну здатність рослин картоплі

№ етапу	Етап	Процеси культури картоплі <i>in vitro</i> та <i>ex vitro</i>	Біотехнологічний процес	
			Традиційний	Оптимізований
1	2	3	4	5
1	Відбір і підготовка вихідних рослин до введення в культуру <i>in vitro</i>	Елімінація хвороботворних організмів (бактерії, гриби, віруси та ін.)	Термотерапія, хіміотерапія, електротерапія	Використання модельованої мікрогравітації (метод кліностакування)
2	Введення експлантатів в культуру <i>in vitro</i>	Стимулювання поділу клітин, регенерації органів та цілих рослин	Склад живильного середовища	Використання монохроматичного освітлення (ЧС, ДЧС та ССЛ) у режимі короткочасного опромінення
3	Культивування регенерантів за умов культури <i>in vitro</i>	Індукція бульбоутворення <i>in vitro</i>	Склад живильного середовища	Використання монохроматичного освітлення (ЧС, ДЧС) у режимі короткочасного опромінення
4	Адаптація регенерантів до умов <i>ex vitro</i>	Адаптація проростків мікробульб	-	Використання монохроматичного освітлення (ЧС, ДЧС, ССЛ) у режимі короткочасного опромінення
		Адаптація рослин, регенованих у культурі <i>in vitro</i> до умов <i>ex vitro</i>	1) Зменшення вологості в культурі <i>in vitro</i> ; 2) Зменшення вмісту сахарози у живильному; середовищі <i>in vitro</i> ; 3) Використання субстрату з природних матеріалів для укорінення регенерантів	Використання синтетичного полімерного субстрату пластагару з покращеними вологоутримуючими та повітропроникними властивостями для культивування живців з регенерантів <i>in vitro</i>
		Ріст, розвиток і розмноження рослин за умов <i>ex vitro</i>	-	Використання речовин з адаптогенними властивостями (брасиностероїди)

ВИСНОВКИ

1. Показано, що при комплексному застосуванні модельованої мікрогравітації та культури апікальних меристем одержані окремі регенеранти картоплі, позбавлені вірусної інфекції, при цьому коефіцієнт оздоровлення становив не нижче 30%, а вміст антигенів X-вірусу картоплі знижувався в 5,0-15,1 раза порівняно з контролем. Виявлені різні за чутливістю до модельованої мікрогравітації комбінації „вірус – рослина-хазяїн”.
2. Встановлено стимулювання регенерації апікальних меристем в культурі *in vitro* під впливом короткочасного опромінення монохроматичним червоним та синім світлом, що приводило до підвищення частоти приживання меристем на 18,9 – 26,4% у порівнянні з контролем.
3. Виявлено зростання ризогенезу у регенерантів картоплі в культурі *in vitro* під впливом короткочасного опромінення монохроматичним червоним та синім світлом, що корелює з виходом регенерантів 0,12–0,70 рослин на один експлантат залежно від варіанту культивування.
4. Відмічено зниження вмісту вільної індолілоцтової кислоти в різних зонах регенерантів (у апікальній – на 12,5%, медіальній – на 41,3 %, базальній – на 32,5%) при культивуванні їх на червоному світлі у культурі *in vitro* та підвищення вмісту гібереліну в 3,1-3,5 раза залежно від зони рослини. При цьому різне співвідношення фітогормонів залежало від зони регенеранта і впливало на здатність живців до приживання.
5. Встановлено підвищення інтенсивності столоно- та бульбоутворення за умов опромінення регенерантів картоплі у культурі *in vitro* червоним світлом на 50 % порівняно з контролем.
6. Виявлено підвищений вміст білка у проростків та мікробульб картоплі на 17,2%-32,2% порівняно з контролем за умов короткочасного опромінення зразків червоним та синім світлом, що свідчить про посилення їх адаптаційної здатності.

7. Застосування синтетичного субстрату пластагару в культурі *ex vitro* сприяло збільшенню питомої маси листкової поверхні у регенерантів на 31,6 %, маси надземної частини у 3,7- 4,4 раза та вмісту сухої речовини в 1,4 раза порівняно з регенерантами в культурі *in vitro*.
8. Встановлено підвищення життєздатності живців регенерантів *in vitro* за екзогенної обробки епіном (0,1-0,2 мкг/л) в умовах культури *ex vitro* на 32,4–38,2 % залежно від дози препарату, зокрема у 2,7 раза збільшувалась кількість листків, в 1,2 раза – висота регенерантів, а також підвищувався пластохронний індекс.

ПРОПОЗИЦІЇ ДЛЯ ПРАКТИКИ

1. Для оздоровлення зразків картоплі від вірусної інфекції доцільно використовувати модельовану мікрогравітацію перед введенням експлантатів у культуру *in vitro*.
2. З метою підвищення морфогенного потенціалу експлантатів у культурі *in vitro* рекомендується застосовувати опромінення їх монохроматичним світлом червоної ділянки спектра.
3. Для адаптації мікробульб, одержаних у культурі *in vitro*, до польових умов доцільно проводити короткочасне опромінення їх проростків монохроматичним червоним світлом.
4. З метою підвищення ефективності мікроклонального розмноження доцільно використовувати однузлові живці для регенерації в умовах *ex vitro* за обробки їх епіном. В умовах культури *ex vitro* для культивування рослин рекомендується застосування синтетичного субстрату пластагару.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Адамчук–Чала Н.І. Вплив кліноостатування на трансформацію етіопластів в хлоропласти паростків ячменю / Н.І. Адамчук–Чала / Космічна наука і технологія, 2004. – Т.10, № 5-6. – С. 208 – 211.
2. Адамчук–Чала Н.І. Вплив кліноостатування на структурно–функціональну організацію хлоропластів проростків ячменю / Н.І.Адамчук–Чала, М.Ф. Повхан // Физиология и биохимия культурных растений.– 2006. – Т. 38, № 3. – С. 235–242.
3. Артеменко О.А. Вплив кліноостатування на конформаційний стан хроматину та кінетику першого клітинного циклу під час проростання гороху/ О.А.Артеменко, В.М.Троян, М.В. Азаркова // Укр.бот.журн. – 2005. – Т. 62, № 1. – С.122–130
4. Барабой В.А. Стресс: природа, биологическая роль, механизмы, исходы/ В.А. Барабой. – Киев: Фитосоциоцентр, 2006. – 424 с.
5. Биотехнологические методы получения и оценки оздоровленного картофеля (рекомендации)/ Трофимец Л.Н., Бойко В.В., Зейрук Т.В. [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1988. – 36 с.
6. Біологічна дія комбінованого магнітного поля на гравітропічну реакцію кореня *Lepidium sativum* L./ Кордюм Є.Л., Соболев М.А., Калініна Я.М. [та ін.] //Укр.ботан.журн. – 2008. – Т.65, №1. – С.141–157.
7. Бурень В.М. Биотехнологические аспекты разработки процессов развития картофеля и формирования его продуктивности: Селекция и семеноводство картофеля на основе биотехнологии / В.М. Бурень. – Л.: Изд-во ЛСХИ, 1990. – С. 4 – 12.
8. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений и биотехнология на их основе/ Раиса Георгиевна Бутенко. –М.: УБК–Пресс,1999. –160 с.
9. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений/ Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
10. Бутенко Р.Г. Некоторые физиологические проблемы при культивировании *in vitro* картофеля : Регуляция роста и развития картофеля / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1990. – С. 88–98.
11. Вергунова І.М. Основи математичного моделювання в захисті рослин/Ірина Миколаївна Миколаївна Вергунова.–К.: Нора–прінт, 2006. –231 с.
12. Влияние длины дня и фитогормонов на клубнеобразование у картофеля в культуре *in vitro*/ Н. П.Аксенова, Т. Н.Константинова, В.Н.Ложникова [и др.] // Физиология растений. – 2009. – Т.56, № 4. – С.500 – 508.
13. Волоотовский И.Д. Фитохром – регуляторный фоторецептор растений/ Игорь Дмитриевич Волоотовский – Минск: Наука и техника, 1993. – 168 с.
14. Воскресенская Н.П.Влияние качества света и фитогормонов на фотосинтез, рост и развитие картофеля сорта Миранда / Н.П.Воскресенская, И.С.Дроздова, Н.П. Аксенова // Регуляция роста и развития картофеля. – М.: Наука, 1990. – С. 20–29.
15. Вторинний оксидативний стрес як елемент загальної адаптивної відповіді рослин на дію несприятливих факторів довкілля / Н.Ю.Таран, О.А.Оканенко, Л.М.Бацманова [та ін.]//Физиология и биохимия культ.растений. – 2004. – Т. 36, № 1. – С.3 – 14.
16. Газообмен и фотосинтез растений картофеля в условиях *in vitro*/ Л.Н.Цоглин, О.С.Мелик- Саркисов, Т.М.Андреенко [и др.] // Доклады АН СССР. – 1991. – Т. 31, №4. – С.1020.
17. Генетический и эпигенетический контроль роста и развития растений. Гены фотоморфогенеза и регуляция их экспрессии светом/ В. А. Цыганкова, Л. А. Галкина, Л. И. Мусатенко [и др.] // Біополімери і клітина. – 2004. – Т. 20, № 6. – С. 451 – 471.
18. Гёринг Х. Преодоление витрификации и улучшение акклиматизации растений при клональном микроразмножении: Биология культивируемых клеток и биотехнология

- растений / Х.Гёринг. – М.: Наука, 1991. – С. 197 – 200.
19. Головацкая И.Ф. Регуляция гиббереллинами роста, развития и гормонального баланса растений *Arabidopsis* на зеленом и синем свете / И.Ф. Головацкая // Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 3. – С. 348 – 354.
 20. Головацкая И.Ф. Роль криптохрома 1 и фитохромов в регуляции фотоморфогенетических реакций растений на зеленом свете // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 6. – С. 822 – 829.
 21. Григорьев А.И. Здоровье и космос. Концепция здоровья и проблема нормы в космической медицине / А.И.Григорьев, Р.М. Баевский М. – 2001. – 89 с.
 22. Гродзинский Д.М. Биофизика растений / Дмитрий Гродзинский. – К.: Наукова думка, 1972. – С.79 – 110.
 23. Действие эпибрассинолида на морфогенез и гормональный баланс проростков арабидопсиса на зеленом свете / Р.А.Карначук, И.Ф.Головацкая, М.В.Ефимов [и др.] // Физиология растений. – 2002. – Т. 49, № 4. – С. 591–595.
 24. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / Борис Александрович Доспехов.–М.: Агрпромпиздат,1985.–351 с
 25. Журавлев Ю.Н. Морфогенез у растений *in vitro*/ Ю. Н. Журавлев, А. М. Омелько // Физиология растений. – 2008. – Т.5 5, № 5. – С. 643 – 664.
 26. Журавлев Ю.Н. Фитовирусы в целом растении и модельных системах / Юрий Николаевич Журавлев. – М.: Наука,1979. – 248 с.
 27. Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител / Г.Р.Кудоярова, С.Ю.Веселов, М.И.Еркеев [и др.] // Физиология растений. – 1986. – Т.33, № 6. – С. 1221–1226.
 28. Карабаев М. Культивируемые клетки пшеницы и кукурузы: физиологические и биотехнологические аспекты : автореф. дисс... д.б.н. – М., 1994. – 49 с.
 29. Карначук Р.А. Световая регуляция морфогенеза растений табака, трансформированных геном интерлейкина–18 человека / Р. А. Карначук, Е. С. Гвоздева, М. В. Ефимова // Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 4. – С. 560 – 564.
 30. Катаева Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н. Катаева, Р.Бутенко. – М.: Наука, 1983. – 96 с.
 31. Калинин Ф.Л. Химическая регуляция метаболизма, роста и продуктивности/ Ф.Л.Калинин // Физиология и биохимия культ.растений. – 1996. – Т. 28, № 3. – С.123 – 140.
 32. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях / [Е.Л. Кордюм, К.М. Сытник, В.В. Бараненко и др.] ; под ред. Е.Л. Кордюм – К: Наукова думка, 2003. – 225 с.
 33. Клубнеобразование и рост в культуре *in vitro* трансгенного картофеля с суперпродукцией фитохрома В / Н.П.Аксенова, Н.П.Константинова, С.А.Голяновская [и др.] // Физиология растений. – 2002.– Т. 49. – С. 535–540.
 34. Константинова Т.Н. Взаимодействие фото– и гормональной регуляции роста и репродуктивного развития *in vitro* / Т.Н.Константинова, Н.П.Аксенова, М.Х. Чайлахян // Регуляторы роста и развития растений. – К. – 1989. – С. 238.
 35. Коппель Л.А. Развитие апикальных меристем томата *in vitro* в условиях воздействия светом разного спектрального состава / Лариса Коппель, Раиса Бутенко // Физиология растений. – 1992. – Т.39, № 2. – С. 353–364.
 36. Кордюм Е.Л. Рост и структурно–функциональная организация растительных организмов в условиях микрогравитации: Современные проблемы космической клеточной фитобиологии / Елизавета Львовна Кордюм. – М.: Наука,1994. – С.11–31.

37. Крайнюкова Т.И. Микробиологические аспекты применения пластагара: Материалы межведомственного симпозиума, посвященного 150-летию медицинского института им. А.А. Богомольца / Т.И. Крайнюкова. – К.: 1992. – С.8–9.
38. Кузнецов Вл.В. Пролин при стрессе; биологическая роль, метаболизм, регуляція / Вл.В.Кузнецов, Н.И. Шевякова // Физиология растений. – 1999. – Т.46, № 2. – С. 321–336.
39. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин / Г.П.Кушнір, В.В. Сарнацька. – К.: Наук.думка. – 2005. – 300 с.
40. Лобенштейн Г. X-вирус картофеля (ХВК, род *Potexvirus*): Вирусные и вирусоподобные болезни и семеноводство картофеля : пер.под ред. Э.В. Трускинова / Г.Лобенштейн.–Дордрехт–Бостон–Лондон: Kluwer Academic Publishers, 2005. – С.25–30.
41. Маєр–Абіх К.М. Повстання на захист природи.Від доквілля до спільносвіту/Клаус Міхаель Маєр–Абіх. – К.: Ліра. – 2004. – 192 с.
42. Мельничук М.Д. Молекулярна діагностика та ідентифікація X – , Y–, M–, S–, L– вірусів картоплі (*Solanum tuberosum* L.) методом полімеразної ланцюгової реакції: Методичні рекомендації / Мельничук М.Д., Антіпов І.О., Спиридонов В.Г. – К., 2008. – 22 с.
43. Меркис А. И. Геотропическая реакция растений/ А. И. Меркис .– Вильнюс, 1973.– 264 с.
44. Меркис А. И. Полный цикл индивидуального развития растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунг. на борту орбитальной станции «Салют–7» / А. И.Меркис, Р. С. Лауринавичюс / Докл. АН СССР. – 1983. – Т. 271. – С. 509 – 512.
45. Методы биохимического исследования растений / [Ермаков А.И., Арасимович, Смирнова–Иконникова М.И. и др.] ; под ред. А.И.Ермакова. – [2–е изд.]. – Л.: Колос,1972. – 456 с.
46. Микроорганизмы – возбудители болезней растений / [Билай. В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г. и др.] ; под ред. Билай В.И. – К.: Наук.думка, 1988. – 552 с.
47. Міщенко Л.Т. Смугаста мозаїка пшениці (*Wheat Streak Mosaic Virus*) в природних умовах і в трансформованому середовищі : автореф. дис... докт. біол. наук: 03.00.06 "Вірусологія"/ Л.Т.Міщенко. – К. – 2004. – 40 с..
48. Моисеева Н.А. Молекулярные и клеточные механизмы морфогенеза в культуре клеток растений / Н.А.Моисеева / Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука. – 1990. – С.166 – 183.
49. Мусієнко М.М. Біотехнологія рослин: навчальний посібник / Микола Миколайович Мусієнко, Ольга Олександрівна Панюта. – К.: Видавничо–поліграфічний центр „Київський університет”, 2005. – 114 с.
50. Мусієнко М.М. Культура ізольованих клітин і органів рослин / Микола Миколайович Мусієнко, Ольга Олександрівна Панюта. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 47 с.
51. Немойкина А.А. Морфогенез и гормональный баланс юкки слоновой в культуре *in vitro* на свету разного спектрального состава / А.А.Немойкина, З.А. Карначук // Матеріалі Міжнародн.науч.конф. – Черновцы, 2002. – С.70–80.
52. Остапенко Д.П. Бульбоутворення *in vitro* залежно від живцювання рослин / Дмитро Остапенко, Віктор Різник // Картоплярство. – Вип.25. – К.: Урожай. – 1994. – С.26–28.
53. Пат. 17672 Україна, МПК А01G 1/00/ Таран О.П., Таран С.В., Чернецький П.М., Чернецький П.М. (Україна) [Спосіб вирощування рослин](#).–№ u200602779; Заявл. 15.03.2006; Опубл. 16.10.2006, Бюл. № 10.–4 с.

54. Пат. А 47178 Україна, МПК А01G 1/00, А01G 31/00. Спосіб вирощування посадкового матеріалу з рослин *in vitro* / Таран О.П., Таран С.В. – № 2001085813 ; заявл. 17.08.2001 ; опубл. 17.06.2002, Бюл. № 6. – 2 с.
55. Пат. А 66626 Україна, МПК А01С 9/00, А01G 1/00. Спосіб підготовки садивного матеріалу / Самохвал Є.Г., Таран О.П., Таран С.В. – № 2003087592 ; заявл. 11.08.2003 ; опубл. 17.05.2004. Бюл. № 5. – 4 с.
56. Пат. на корисну модель № 19360, МПК... Україна Спосіб культивування біологічних об'єктів/ Міщенко Л.Т., Остапченко Л.І., Міщенко І.А., Янішевська Г.С., Таран С.В., Коренева А.А., Бойко А.Л. ; заявник і патентовласник Київск.нац. ун-т ім. Т.Шевченко, заявл.04.06.2006. ; опубл. 15.12.2006, Бюл. № 12.
57. Пат. 8393 Україна, МПК В01D 15/00. Гідрофільний композитний матеріал / Замахаяєв Л.М., Майгур В.Г., Пімченко В.П. Таран О.П., Таран С.В. – № 20040806804 ; заявл.13.08.2004 ; опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8.– 4 с.
58. Перекисное окисление липидов растений различного уровня организации при микрогравитационном стрессе / В.А.Барабой, С.И.Жадько, Е.Л.Кордюм [и др.], // Изв. АН СССР.сер. биол. – 1991. – №3. – С. 368 – 375.
59. Пластагар, проблемы, перспективы использования в медицине и биологии : Материалы межведомственного симпозиума, посвященного 150–летию медицинского института им. А.А. Богомольца / відп.ред В.В.Гашинський. – К.,1992. – 24 с.
60. Плисис Я. Некоторые особенности укоренения пробирочных растений фрезии в субстрат / Ян Плисис // Вирусы растений и насекомых. – Елгава,1985. – С.3–9.
61. Распределение вируса мозаики сои в листьях растений сои с разной реакцией на вирусное поражение / М.В.Сапоцкий, И.В.Андреева, Н.Н.Какарека [и др.] / Микробиол. журн. – 2002. – Т. 64, № 3. – С.32–38.
62. Растительная клетка при изменении геофизических факторов/ [К.М.Сытник, Е. Л.Кордюм, Е.М. Недуха и др.]. – К.: Наукова думка,1984.–135 с.
63. Реунов А.В. Вирусный патогенез и защитные механизмы растений / Анатолий Васильевич Реунов.– Владивосток.: Дальнаука, 1999.–135 с.
64. Роль фитохрома в растениях / Е.Д. Кузнецов, Л.К. Сечняк, Н.А. Киндрук, О.К. Слюсаренко. – М.: Агропромиздат, 1986. – 286 с.
65. Салига Ю.Т. Електронна мікроскопія біологічних об'єктів / Ю.Т.Салига, В.В.Снітинський. – Львів,1999. – 152 с.
66. Сарнацька В.В.Трансформація рослинних клітин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* в умовах кліностагування/ В.В.Сарнацька, Г.О.Гладун, С.Ф. Падалко // Космічна наука і технологія. – 2005. – Т.11, № 5/6. – С. 115–121.
67. Селье Г. Стресс без дистресса / Ганс Селье. – М. : Наука,1978. – 168 с.
68. Соболев М.А. Изменения локализации внутриядрышковой ДНК, вызванные симулированной микрогравитацией / М.А.Соболь, Е.Л.Кордюм, Ф.Х. Медина // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40, № 1. – С. 43–48.
69. Таирбеков М.Г. Позиционный гомеостаз клетки и проблема морфогенеза в гравитационном поле / М.Г.Таирбеков // Успехи соврем.биологии. – 1990. – Т. 109, № 1. – С47–64.
70. Таран О. Вплив модельованої мікрогравітації на вміст вірусів у рослинах картоплі сорту Кримська роза/ О.Гордейчик, О.Таран, Л.Міщенко // Екологія: Проблеми адаптивно–ландшафтного землеробства. – Івано–Франківськ, 2006. – С.81–84.

71. Таран О. Вплив трансформованого середовища на розвиток рослин, інфікованих вірусами / А.Коренєва, О. Гордейчик, О. Таран [та ін.] // Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого–біологічні аспекти. – Зб.тез III Міжнародної конференції, Львів, 4–6 жовтня 2007. – Львів, 2007. – С.209.
72. Таран О.П. Біоетика та біобезпека в рослинництві/ Л.Т.Міщенко, О.П.Таран, А.А.Коренєва [та ін.] // Третій національний конгрес з біоетики, 8–11 жовтня 2007 р. – К. – 2007. – С154 – 155.
73. Таран О.П. Біоетика та біобезпечні технології в рослинництві: Сучасна біоетика в Україні/ [Л.Т.Міщенко, Г. В.Решетник, А.А. Коренєва та ін.]. – Київ: Академперіодика, 2009. – С. 113 – 118.
74. Таран О.П. Влияние моделированной микрогравитации на патогенез вирусов картофеля – представителей рода *Carlavirus* / М.И.Жукова, О.Н.Зубкевич, О.П.Таран [та ін.] // Защита растений: сборник научных трудов/РУП «Институт защиты растений». – Несвиж, 2008.– Вып. 32. – С.171–180.
75. Таран О.П. Вплив опромінення світлом різних ділянок спектра на розвиток рослин картоплі *in vitro* / Оксана Петрівна Таран //Вісник Білоцерківського держ.аграр.ун–ту. – Біла Церква, 2001. – Вип.20. – С. 97–103.
76. Таран О.П. Динамика репродукции вирусов картофеля в условиях моделированной микрогравитации/ Л.Т.Мищенко, О.П. Таран //13th International Scientific–practice Conference „Human and nature safety”. 16 – 19 May, Lithuanian University of Agriculture, Akademija (Kauno r.), Republic of Lithuania, 2007. – P. 93–95.
77. Таран О.П. Дослідження репродукції вірусів у клітинах рослин за умов модельованої мікрогравітації/ Л.Т.Міщенко, Г.В.Решетник, О.П. Таран //2–й з’їзд Українського товариства клітинної біології, 23–36 жовтня 2007 р. – С. 226.
78. Таран О.П. Исследования веществ с антистрессовым действием в условиях моделированной микрогравитации/ Л.Т.Міщенко, М.И.Жукова, В.Г.Наумова [та ін.] // Шестая Украинская конференция по космическим исследованиям / Сб.тезисов 3–10 сентября 2006 г.
79. Таран О.П. Клональное микроразмножение картофеля: проблемы и перспективы/ Оксана Петровна Таран // Вопросы картофелеводства. Материалы конференции „Научное обеспечение картофелеводства России: состояние, проблемы”. ВНИИКХ, 8–10 октября 2001 г. / Научные труды ВНИИКХ. – М., 2001. – С.292 – 299.
80. Таран О.П. Культура *ex vitro* та вплив брасиностероїду епіну на адаптаційний потенціал рослин *in vitro*/ О.П.Таран, Л.Т. Міщенко // Вісник Білоцерківського держ.аграр.ун–ту. – Біла Церква, 2007. – Вип.50. – С.102–106.

81. Таран О.П. Морфогенез рослин картоплі *in vitro* при освітленні різного спектрального складу / Оксана Петрівна Таран / Картоплярство.–К.: Урожай. – 1995. – Вип.26. – С.128–131.
82. Таран О.П. Особливості морфогенезу картоплі під впливом короткочасної обробки світлом червоної ділянки спектра (658, 720 нм) / О.П.Таран, Є.Г.Самохвал, А.А. Булах // Фізіологія і біохімія культ. росл. – 1998. –Т. 30, №4. – С.253–258.
83. Таран О.П. Перебіг вірусної інфекції в рослинах картоплі за дії модельованої мікрогравітації/ І.О.Антіпов, О.І.Гордейчик, М.Д.Мельничук Л.Т. Міщенко, В.Г.Спиридонов, О.П.Таран // Мікробіол. журн. – 2007. – Т.69, № 4. – С.63–68.
84. Таран О.П. Підвищення адаптаційного потенціалу рослин картоплі *in vitro* під впливом брасиностероїду / О.П.Таран, Л.Т. Міщенко // Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого–біологічні аспекти.–Зб.тез III Міжнародної конференції, Львів, 4–6 жовтня 2007.–Зб.тез.–Львів,2007. – С.179.
85. Трофимец Л.Н. Картофелеводство Голландии / Л.Н.Трофимец / Селекция,семеноводство и биотехнология картофеля. – Сб.п. – 1991. – С.63–66.
86. Трускинов Э.В.Регенерация коллекционных образцов картофеля в культуре ткани / Э.В.Трускинов, Л.И.Алексеева // Регуляция роста и развития картофеля . – М.: Наука, 1990. – С. 98–105.
87. Фачиоли Г. Контроль вирусов картофеля с использованием культуры меристем и стеблевых черенков, термотерапии и хемотерапии: Вирусные и вирусоподобные болезни и семеноводство картофеля (под ред. Э.В.Трускинова)/ Г.Фачиоли.– Дордрехт–Бостон–Лондон: Klumer Academic Publishers,2005. – С.210–228
88. Хрипач В.А. Брасиностероиды/ Хрипач В.А., Лахвич Ф.А., Жабинский В.Н.– Минск: Наука и техника, 1993. – 215 с.
89. Хрипач В.А. Перспективы применения брасиностероидов – нового класса фитогормонов/ В.А.Хрипач , В.Н. Жабинский , Ф.А.Лахвич // С.–х. биология.–1995. – №1. – С.3–11.
90. Цоглин Л.Н. Автоселективные процессы при микроклонировании растений. Фототорофное размножение растений *in vitro* / Л.Н.Цоглин, Б.В. Габбель // Физиология растений. – 1992. – Т. 41, № 3. – С. 436–439
91. Черевченко Т.М. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro* / Т.М.Черевченко, А.Н.Лаврентьева, Р.В. Иванников.– К.: Наукова думка, 2008. – 559 с.
92. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция/ Фарида Миннихановна Шакирова – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
93. Шляпочные грибы и водоросли — объекты космической биологии / [Горовой Л. Ф., Касаткина Т. Б., Попова А. Ф., Кордюм Е. Л.]. – Л.: Наука, 1991. – 232 с. – (Проблемы косм, биологии; Т. 69).
94. Шнюкова Є.І. Вплив імітованої мікрогравітації на формування запасних полісахаридів мінібульб картоплі / Є.І.Шнюкова, О.М. Недуха // Космічна наука і технологія. – 2004. – Т. 10, № 5–6. – С. 229–232.
95. Эффекты клиностатирования на образование и структуру миниклубней картофеля / Е.М.Недуха, Е.И.Шнюкова, И.И.Овруцкая [и др.] // [Вестник Башкирского университета. – 2001. – № 2.](#) – С. 108–110.
96. A new role for phytochromes in temperature–dependent germination/ M.S.Heschel,

- J.Selby, C.Butler [et al.] //New Phytologist. – 2007. – V.174. – P.735–741.
97. A proteomic approach to analysing responses of *Arabidopsis thaliana* callus cells to clinostat rotation/ Hui Wang, Hui Qiong Zheng, Wei Sha, [et al.] // J. Exp.Bot. – 2006. – № 57. – P.827–835
 98. Acclimation of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions as affected by application of abscisic acid / J.Pospíšilová, N.Wilhelmová, H. Synková [et al.] // J. exp. Bot. – 1998. – V. 49. – P. 863–869.
 99. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions / J.Pospíšilová, I.Tichá, P.Kadleček, D.Haisel [et al.] // Biologia Plantarum. – 1999. – № 42. – P. 481–497.
 100. Acclimatization of micropropagated tobacco plantlets : Photosynthesis: Mechanisms and Effects: Garab, G. (ed.)/ [P.Kadleček, I.Tichá, V.Čapkov et al.]– Dordrecht – Boston – London: Kluwer Academic Publishers,1998. – P. 3853–3856.
 101. Actin organization and gene expression in *Beta vulgaris* seedlings under clinorotation/ L.Y.Kozeko, G.V.Shevchenko, O.A.Artemenko [et al.] // Journal of Gravitational Physiology. – 2005. – V.12, N.1. – P. 187–188.
 102. Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*/ T.Shinomura, A.Nagatani, H.Hanzawa [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. – 1996. – V. 93. – P. 8129–8133.
 103. Ahmad M. *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue–light photoreceptor / M.Ahmad, A.R. Cashmore // Nature.– 1993.–V. 366. – P.162–166.
 104. Albano J.P. Photodegradation of FeDTPA in nutrient solutions. I. Effects of irradiance, wavelength, and temperature /J.P.Albano,W.B.Miller // HortScience. – 2001. – V. 36. – P. 313–316.
 105. Antagonistic actions of Arabidopsis cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction / T.C. Mockler, H. Guo, H. Yang [et.al.]// Development. – 1999. – V.126. – P. 2073 – 2082.
 106. Arabidopsis *NPH1*: a flavoprotein with the properties of photoreceptor for phototropism / J. M.Christie, P.Reymond, G. Kt. Powell [et al.] // Science. – 1998. – V. 282. – P. 1698–1701.
 107. *Arigita L.* Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured in vitro/ L.Arigita, A.González, R. Sánchez/ Physiol. Plant. – 2002. – V. 115. – P. 166–173.
 108. Atzorn R.The immunoassay of gibberellins/ R.Atzorn, E.W. Weiler / Planta. – 1983. –V. 156. – P. 1–6.
 109. Auxin, ethylene and brassinosteroids: Tripartite control of growth in the Arabidopsis hypocoty/ L.De Grauwe, F.Vandenbussche, Tiet O., K.Palme, and D.van der Straeten //Plant Cell Physiol. – 2005. – V. 46. – P. 827–836.
 110. Bajaj Y.B.S. Biotechnology and 21–st Century Potato: Biotechnology in Agriculture and Forestry. – 3: Potato / Y.B.S. Bajaj. – Berlin: Springer–Verlag, 1987. – P. 3–19.
 111. *BASI*: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in Arabidopsis II / M.M.Neff, S. M.Nguyen, E.J. Malancharuvil [et al.] / Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1999.– V.96. – P. 15316 – 15323.
 112. Benson E. E. *In vitro* plant recalcitrance: an introduction / Erica E. Benson // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2000. – V. 36. – P.141–148.
 113. Beruto M. Influence of agar on *in vitro* cultures. I. Physicochemical properties of agar and agar gelled media / M.Beruto, D.Beruto, P.Debergh / In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 1999. – V.35. – P.86–93.
 114. Bishop G.J. Plants steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response/ Gerard J. Bishop, Takao Yokota / Plant Cell Physiol. – 2001. – V.42, № 2. – P. 114–120.

115. Blancaflor E.B. Plant Gravitropism. unraveling the ups and downs of a complex process/ E.B.Blancaflor, H. P. Masson // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 133. – P.1677–1690.
116. Blancaflor E.B. The cytoskeleton and gravitropism in higher plants/ Elisabet .B. Blancaflor // *J. Plant Growth Regul.* – 2002. – V.21. – P.120 – 136.
117. Briggs R.W. Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome/ Winslow R. Briggs, Margaret A. Olney// *Plant Physiology.* – 2001. – V.125. – P. 85–88.
118. Briggs W.R. Blue–light photoreceptors in higher plants/Winslow R. Briggs, Eva Huala // *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* – 1999. – V. 15. – P. 33–62.
119. Buddendorf–Joosten J.M.C. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development in vitro/ J.M.C.Buddendorf–Joosten, E.J. Woltering, // *Plant Growth Regul.* – 1994. – № 15. – P. 1–16.
120. Buddendorf–Joosten J.M.C. Controlling the gaseous composition in vitro–description of a flow system and effects of the different gaseous components on in vitro growth of potato plantlets / J. M. C. Buddendorf–Joosten, E. J. Woltering // *Sci. Hortic.* – 1996. –V. 65. – P.11–23.
121. Casal J.J. The serine–rich N–terminal domain of oat phytochrome a helps regulate light responses and subnuclear localization of the photoreceptor/ J.J.Casal, S.J.Davis, D.Kirchenbauer [et al.] // *Plant Physiology.* – 2002. – V. 129. – P. 1127–1137.
122. Cassels A.C. In vitro Induction of Virus–Free Potatoes by Chemotherapy: Biotechnology in Agriculture and Forestry: 3. Potato / Bajaj, Y.P.S. (Ed.)/ Alan C. Cassels.– UK: Springer–Verlage, 1987.–P. 40–50.
123. Castro I.J. Electroterapia como alternativa para la eliminaciyn del virus DMV en malanga/ I.J.Castro, P.R.Hernandez, C.B. La Cruz // *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica).* – 2001. – N.60. – P. 57–60.
124. Changes in culture conditions and medium formulation to improve efficiency of *in vitro* culture of coconut embryos in Mexico: Coconut embryo in vitro culture part II : Engelmann F., Batugal P., Oliver J., (eds.)/ A.Pech, J.Santamara, R.Souza [et al.] / – Serdang, Malaysia: IPGRI–APO,2002. – P. 122–137.
125. Chen R. Gravitropism in Higher Plants/ R.Chen, E.Rosen, H.P. Masson // *Plant Physiology.* – 1999. – V. 120. – P. 343–350.
126. Chory J. Light modulation of vegetative development / Joane Chory / *Plant Cell.*—1997. – V. 91. – P. 1225–1234.
127. Christophe A. Quantitative contributions of blue light and PAR to the photo–control of plant morphogenesis in *Trifolium repens* (L.) / A.Christophe, B.Mouliia, C.Varlet–Grancher // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V. 57. – P.2379 – 2390.
128. Cieślińska M. Application of thermo– and chemotherapy in vitro for eliminating some viruses infecting *Prunus* sp. fruit trees / M.Cieślińska // *J.Fruit and Ornam. Plant Res.* – 2007. – V. 15. – P. 117–124.
129. Circadian clock–regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in *Arabidopsis* II / R.Toth, E.Kevei, A.Hall [et.al.]// *Plant Physiol.*– 2001. – V.127,№ 4. – P. 1607–1616.
130. Clack T. The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by 5 genes – the sequences and expression of *PHYD* and *PHYE*/ T.Clack, S.Mathews, R.A.Sharrock / *Plant Molecular Biology.* – 1994. – V. 25. – P. 413–427.
131. Clark M.F. Characterization of the microplate method of the enzyme–linked immunosorbent assay for the detection of plant virus/ M.F. Clark, A.N. Adams / *J. Gen. Virol.* – 1977. – V.34. – P.475–483.
132. Complex physiological and molecular processes underlying root gravitropism/ R.J.Chen, C.H.Guan, K.Boonsirichai [et al.]// *Plant Mol. Biol.* – 2002. – V.49. –P. 305–317.

133. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures/ T.Gaspar, T.Franck, B.Bisbis//Plant Growth Regulation. – 2002. – V.37. – P. 263–285.
134. Conjugation–mediated plasmid exchange between bacteria grown under space flight conditions / P.De Boever, V.Ilyin, D.Forget–Hanus [et al.] // Microgravity sci. technol. – 2007.–V.5–6. – P.138–144
135. Coordination of phytochrome levels in phyB mutants in Arabidopsis as revealed by apoprotein–specific monoclonal antibodies / M.Hirschfeld, J. M.Tepperman, T.Clack [et al.]// Genetics.–1998. – V.149.– P. 523– 535.
136. Correll M. The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots/ M.J.Correll, J.Z. Kiss // Plant and Cell Physiology. – 2005. – V. 46. – P.317–323.
137. Costa S.‘Open minded’ cells: how cells can change fate/ S.Costa, P. Shaw // Trends Cell Biol. – 2007. – V. 17. – P. 101–106.
138. Cournac L. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated in vitro in different conditions of aeration, sucrose supply and CO₂ enrichment/ L.Cournac, B.Dimon, P. Carrier et al./ Plant Physiol. – 1991. – V. 97. – P. 112–117.
139. Crowther J.R. ELISA: Theory and practice/ J.R. Crowther. – N.Y.:Hamana Press, 1995. – 223 p.
140. Cuello J.L. Latest developments in artificial lighting technologies for bioregenerative space life support/ J.L. Cuello / in: M Dorais (ed), Proc 4th Intr ISHS Symposium on Artificial Lighting, Nov 7–9, 2000.– Québec City, Québec, Canada, 2002. – P.215.
141. Darkness improves growth and delays necrosis in nonchlorophyllous habituated sugarbeet callus: biochemical changes/ C.Kevers, B.Bisbis, F.Le Dily [et al.] // In Vitro Cell.Dev. Biol.Plant. – 1995. – V.31. – P.122–126.
142. Deng R. In vitro hardening of red raspberry through CO₂ enrichment and relative humidity reduction on sugar–free medium / R.Deng, J. Donnelly // Can. J. Plant Sci. – 1993. – V. 73. – P. 1105–1113.
143. Desjardins Y. Carbon nutrient in vitro regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagation system/ Y.Desjardins, C.Hdider, J.Riek; In: Aitken–Christie, J.; Kozai, T.; Smith, M. A. L., eds. Automation and environmental control in plant tissue.– Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers,1995. – P.441– 465.
144. Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation/ M.D.Serret, M.I. Trillas, J.Matas [et al.] // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1996. – V.45. – P.1–16.
145. Devlin P.F. A genomic analysis of the shade avoidance response in Arabidopsis/ P.F. Devlin, M.J. Yanovsky, S.A. Kay //Plant Physiology. – 2003. – V. 133. – P. 1617–1629.
146. Devlin P.F. Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity/ P.F.Devlin, S.A.Kay //The Plant Cell. – 2000. – V. 12. –P. 2499–2509.
147. Devlin P.F. Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in Arabidopsis II/ P.F.Devlin, S.R.Patel, G.C.Whitelam // Plant Cell. – 1998. – V.10. –P. 1479–1488.
148. Dhital S.P. Electrotherapy and chemotherapy for eliminating double–infected potato virus (PLRV and PVY) from in vitro plantlets of potato (*Solanum tuberosum* L.)/ S.P.Dhital, H.T.Lim, B.P.Sharma //Hortic. Environ. Biotechnol. – 2008. – V. 49. –P.52–57.
149. Diagnostico y saneamiento de *Banana Streak Virus* (BSV) en *Musa* spp. / P.R.Hernandez, H.Bertrand, P.Lepoivre [et al.]. //Centro Agricola. – 2002. – № 2. – P. 42–47.
150. Díaz–Pérez J.C. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil/ J.C.Díaz–Pérez, E.G.Sutter, K.A. Shackel// Physiol. Plant. – 1995. – V.95. – P. 225–232.

151. Díaz-Pérez J.C. Effect of in vitro–formed roots and acclimatization of water status and gas exchange of tissue–cultured apple shoots/ J.C.Díaz-Pérez, K.A.Shackel, E.G. Sutter // *J. amer. Soc. hort. Sci.* – 1995. – V. 120. – P. 435–440.
152. Diettrich B.Reduction of water loss during ex vitro acclimatization of micropropagated *Digitalis lanata* clone plants/ B. Diettrich , H.Mertinat, M.Luckner // *Biochem. Physiol. Pflanz.* – 1992. – V.188. – P. 23–31.
153. Differentiation of plant gravirecepting and graviresponding cells in altered gravity / E.L.Kordyum, G.G.Martyn, G.V.Shevchenko [et al.] // *Journal of Gravitational Physiology.* – 2005. – V. 12, № 1. – P. 189–190.
154. Donnelly D. J. Potato microtuber production and performance: a review / D. J.Donnelly, W.K.Coleman, S. E.Coleman // *Am. J. Potato. Res.* – 2003. – V. 80. – P. 103–115.
155. Dynamic changes in the frequency and architecture of plasmodesmata during the sink–source transition in tobacco leaves/ I.M. Roberts, P.Boevink, A.G. Roberts, [et al.] // *Protoplasma.* – 2001. – V. 218.–P. 31–44.
156. Effect of light intensity and CO₂ enrichment during in vitro rooting on subsequent growth of plantlets of strawberry, raspberry and asparagus in acclimatization/ F.Laforge, C. Lussier, Y.Desjardins [et al.] // *Scientia Hort.* – 1991. – V.47. – P. 259–269.
157. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets in vitro/ S.J.Kim, E.J.Hahn, J.–W.Heo, K.Y. Paek [et al.]// *Sci Hort* – 2004. – V.101. – P.143–151
158. Effects of light intensity and lighting direction on the photoautotrophic growth and morphology of potato plantlets in vitro/ Y.Kitaya, O.Fukuda, T.Kozai, [et al.] // *Sci Hort.* – 1995. – V.62. – P.15–24.
159. Erickson R.O. The plastochron index / R.O.Erickson, F.J. Michelini // *Amer. J. Bot.*– 1957. – V. 44. – P. 297–305
160. Evans M.L. Cellular specificity of the gravitropic motor response in roots/ M.L.Evans, H.Ishikawa // *Planta Suppl.* – 1997. – V.203 – P.115–122.
161. Ewing E.E. The role of hormones in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization // *Plant hormones, physiology, biochemistry and molecular biology: Ed. P.G. Davies / E.E. Ewing .–Dordrecht: Kluwer, 1995.– P. 698–724.*
162. Expression of transcription factors after short–term exposure of *Arabidopsis thaliana* cell cultures to hypergravity and simulated microgravity (2–D/3–D clinorotation, magnetic levitation)/ M.Babbick, C.Dijkstra, O.J.Larkin [et al.] // *Advances in Space Research .– 2006.– V. 39.–P.1182–1189.*
163. Faccioli G. Control of Potato Viruses using Meristem and Stem–cutting Cultures, Thermoheraphy and Chemotherapy : Virus and Virus–like Diseases of Potatoes and Production of Seed–Potatoes (Ed. G. Loebenstein et al.)/ G.Faccioli.–The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.–2001.– P. 365–390.
164. Faccioli G. Eradication of Potato virus Y and Potato leafroll virus by chemotherapy of infected potato stem cuttings/ G.Faccioli, M.C.Colalongo // *Phytopathol. Mediterr.* – 2002. – V. 41. – P.76–78.
165. Fedoroff N. Redox regulatory mechanisms in cellular stress responses redox regulatory mechanisms in cellular stress responses/ Nina Fedoroff / *Ann.Bot.*– 2006. – V.98. – P. 289–300.
166. Franklin K. A. Phytochromes and shade–avoidance responses in plants / K.A. Franklin,G.Y C. Whitelam // *Ann. Botany.* – 2005. – V 96,№2. – P.169–175.
167. Franklin K.A. Light signals, phytochromes and cross–talk with other environmental cues/Keara A. Franklin, Garry C. Whitelam // *J.Exp.Bot.* – 2004. – V 55, №395. – P. 271–276.

168. Franklin K.A. Phytochrome A is an irradiance-dependent red light sensor/ K.A.Franklin, T.Allen, G.C.Whitelam // The Plant Journal. – 2007. – V.50. – P.108–117.
169. Franklin K.A. Phytochrome functions in Arabidopsis development/ Keara.A.Franklin, Philipp H. Quail //J. Exp.Bot. – 2010. –V.61,№1. – P. 11–24
170. Franklin K.A. Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in Arabidopsis / K.A.Franklin, U.Praekelt, M. W. Stoddart et al./ Plant Physiol. – 2003 . – V.131. – P.1340–1346
171. Fujiwara K. Physical microenvironment and its effects: Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture : Aitken–Christie J., Kozai, T., Smith, M.A.L. (Eds.) / K.Fujiwara, T.Kozai.– Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers,1995. – P. 319–369.
172. Fujiwara K. Time course of CO₂ exchange of potato cultivars in vitro with different sucrose concentrations in culture medium/ K.Fujiwara, S.Kira,, T.Kozai// J. Agr. Meterol. – 1992. – V.48. – P.49–56.
173. Fukaki H. The RHG gene is involved in root and hypocotyl gravitropism in Arabidopsis thaliana/ H.Fukaki, H.Fujisawa, M.Tasaka // Plant Cell Physiol. – 1997. – V.38. – P. 804–810.
174. Function of phytochrome A in potato plants as revealed through the study of transgenic plants/ A.G.Heyer, D.Mozley, V.Landschutze [et al.] // Plant Physiol.– 1995. –V. 109.– P. 53–61.
175. Ghashghaie J. Effects of agar concentration on water status and growth of rose plants cultured in vitro / J.Ghashghaie, F.Brenckman, , B. Saugier // Physiol. Plant. – 1991. – V.82. – P. 73–78.
176. Ghashghaie J. Water relations and growth of rose plants cultured in vitro under various relative humidities/ J.Ghashghaie, F.Brenckmann, B. Saugier // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1992. – V.30. – P. 51–57.
177. Gil P. Photocontrol of subcellular partitioning of phytochrome–B: GFP fusion protein in tobacco seedlings/ P.Gil, S. Kircher, E.Adam // Plant Journal. – 2000. –V. 22. – P. 135–145.
178. Gilly C. Ultrastructure and radiolabelling of leaf cuticles from ivy (*Hedera helix* L.) plants in vitro and during ex vitro acclimatization / C. Gilly, R.Rohr, A.Chame // Ann. Bot. – 1997. – V.80. – P. 139–145.
179. Gonzalez J.E. Diagnóstico de enfermedades virales pertenecientes al genero de los potivirus en los genotipos de came "Pacala Duclos" (*Dioscorea alata* L.) y Came de Guinea (*Dioscorea rotundata* Poir.). Aplicación de la corriente eléctrica al saneamiento/ Jorje.E. Gonzalez // Tesis para obtención del grado Académico Master en Ciencias en Biotecnología.– IBP. Universidad Central de las Villas, Cuba, 2005. – P. 126.
180. Gopal J. Use of microtubers for slow-growth *in vitro* conservation of potato germplasm/ J.Gopal, A.Chamail, D. Sarkar // Plant Genet Resour Newslet. – 2005. – V.141. – P. 56–60.
181. Gravity independence of seed-to-seed cycling in *Brassica rapa*/ M.E.Musgrave, A.Kuang, Y.Xiao [et al.] // Planta. – 2000. – V.210, N3. – P. 400–406.
182. Griffith H.M. Effect of chemical and heat therapy on virus concentration in in vitro plantlets/ H.M.Griffith, S.A Slack, J.H.Dodds // Can. J. Bot. – 1990. – V.68. –P.1515–1521.
183. Grout B.W. Photosintetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting/ B.W. Grout, S.Millam //Ann.Bot. – 1985. – V.55, № 1.–P.129.
184. Growth a cress seedlings and morphogenesis of root gravisensors under clinorotation and unidirectional red or blue light / D. Rakleviciene, D.Svegziene, G.Tamulatis [et al.]// Journal of Gravitational Physiology. – 2005. – V. 12, N.1. – P. 209–210.

185. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* in different conditions of aeration, sucrose supply, and CO₂ enrichment/ L. Cournac, B.Dimon, P.Carrier [et al.] // Plant Physiol. – 1991. – V. 97. – P. 112–117.
186. Hall R.D. Plant cell culture protocols //Methods in molecular biology, V.III. / R.D. Hall. – Totowa, NJ: Humana Press, 1999. – 156 p.
187. Hasenstein K.H.The microtubule cytoskeleton does not integrate auxin transport and gravitropism in maize roots / K.H.Hasenstein, E.B.Blancaflor, J.S.Lee // Physiol. Plantarum. – 1999. – V. 105. – P.729–738.
188. Hauser B. The phytochrome gene family in tomato includes a novel subfamily / B.Hauser, M–M.Cordonnier–Pratt, F.Danielvedale [et al.]//Plant Molecular Biology. – 1995. – V.29. – P. 1143 – 1155.
189. Hempel M. From Micropropagation to "Microponics" / M.Hempel // Practical Hydroponics International. – 1993. – № 6. – P. 21–23.
190. Heyer A.G. Isolation and characterization of a cDNA clone coding for potato type B phytochrome/ A.G. Heyer, C.Gatz //Plant Mol. Biol. – 1992. – V. 20. – P. 589–600.
191. Hisada A. Light–induced nuclear translocation of endogenous pea phytochrome A visualized by immunocytochemical procedures/ A.Hisada, H.Hanzawa, J.L.Weller et al.// Plant Cell. – 2000. – V. 12. – P. 1063–1078.
192. Histological observation of changes in leaf structure during successive micropropagation stages in *Aralia elata* and *Phellodendron amurense*/ S. Yokota, M.Z.Karim,M.A.K. Azad, [et al.] // Plant Biotechnology. – 2007. – V.24. – P. 221 –226.
193. Hughes B.R. No small potatoes/ B. R. Hughes, V.S. Machado, Ahmed Ali /Agri–food research in Ontario. – 1993. –V.16, N 1.– P.20–24.
194. Huq E. Nuclear translocation of the photoreceptor phytochrome B is necessary for its biological function in seedling photomorphogenesis / E.Huq, B. Al–Sady, P.H. Quail // Plant Journal. – 2003 – V.35. – P. 660 – 664.
195. Hydrotropism in abscisic acid, wavy, and agravitropic mutants of *Arabidopsis thaliana*/ N.Takahashi, N.Goto, K.Okada [et al.] // Planta. – 2002. – V. 216. – P. 203 – 211.
196. Hydrotropism interacts with gravitropism by degrading amylo–plasts in seedling roots of *Arabidopsis* and radish / N.Takahashi, Y.Yamazaki, A.Kobayashi [et al.], // Plant Physiol. – 2003. – V. 132. – P. 805–810.
197. *In vitro* culture: environmental conditions and plantlet growth as affected by vessel type and stopper material// J. Solárová, D.Součková, J.Ullmann [et al.]// Zahradnictví (Prague). – 1996. – V. 23. – P.51–58.
198. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂/ H.Lopez–Delgado, J.F. Dat, Ch.H. Foyer [et al.]// J. Experim.Botany. – 1998. – V. 49, N.321. – P. 713–720.
199. Influence of *in vitro* growth conditions on *in vitro* and *ex vitro* photosynthetic rates of easy– and difficult–to–acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes// C.Valero–Aracama, S.B.Wilson, M.E.Kane, N.L.Philman// In Vitro Cell.Dev.Biol.–Plant. – 2007. – № 43. – P. 237–246.
200. Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period/ J. H.Seon, Y. Y.Cui, T.Kozai [et al.]// Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2000. – № 61. – P.135–142.
201. Influence of microgravity on ultrastructure and storage reserves in seeds of *Brassica rapa* L./ A.Kuang, Y.Xiao, G. McClure [et al.] // Annals of Botany. – 2000. – V.85. – P.851–859.
202. Involvement of brassinosteroids in the gravitropic response of primary root of maize/ S.K.Kim, S.C.Chang, E.J.Lee [et al.]// Plant Physiol. – 2000. – V. 123. – P 997–1004.
203. Islam R. Successful application of biotechnology in patato/ R.Islam , A.A. Alsdon // Bangladesh j. genet, biotechnol. – 2003. – №4. – P.1–6.

204. Isolation and characterization of phyC mutants in Arabidopsis reveals complex cross-talk between phytochrome signalling pathways / E.Monte, J.M.Alonso, J.R. Ecker [et al.] // *The Plant Cell*. – 2003. – V.15. – P.1962–1980.
205. Jackson S.D. Multiple signalling pathways control tuber induction in potato/ S.D. Jackson // *Plant Physiol.* – 1999. – V.119. – P.1–8.
206. Jackson S.D. Phytochrome B affects the levels of a graft-transmissible signal involved in tuberization / S.D.Jackson, P.James, S. Prat [et al.] // *Plant Physiol.* – 1998. – V.117. – P. 29–32.
207. Jackson S.D. Regulation of tuber induction in potato by daylength and phytochrome / S.D.Jackson, S.Pratt, B.Thomas // *ISHS Acta Horticulturae*. – 2007. – V. 435.– 567–572.
208. Jacobsen S. E. Mutations at the SPINDLY locus of Arabidopsis alter gibberellin signal transduction / S.E.Jacobsen, N.E.Olszewski // *Plant Cell*. – 1993. – V.5. – P. 887 – 896.
209. Jao R.C. Growth of potato plantlets *in vitro* is different when provided concurrent versus alternating blue and red light photoperiods/ R.C. Jao, W. Fang // *HortSci.*– 2004. – V. 39. – P.380–382.
210. Jeong B.R. Environmental control and photoautotrophic micropropagation/ B.R.Jeong, K.Fujiwara, T.Kozai // *Hort. Rev.* – 1995. – V. 17. – P.123–170.
211. Jetten J. S. Potato virus X: a model system for virus replication, movement and gene expression/ J. S. Jetten, S. Yoshinari,C.Hemenway // *Mol. Plant Pathol.* – 2003. – V. 4. – P. 125–131.
212. Kalinina I. Tubulin Cytoskeleton in Arabidopsis thaliana Root Cells Under Clinorotation/ I.Kalinina, G.Shevchenko, E.Kordyum // *Microgravity Sci. Technol.* – 2009. – V.21. – P.187–190.
213. Kane M.E. Propagation from preexisting meristems: Plant tissue culture: Concepts and Laboratory Exercises, Second Edition : R.Trigiano, D.Gray, (Eds.)/ M.E. Kane.– Boca Raton, FL: CRC Press, 2000. – P. 75–86.
214. Karabaev M. Cultivated cells of wheat and maize: biotechnology and breeding. // M.Karabaev, O.Shegebaev // *Abstracts 5th International Wheat Conference*, June 10–14, Turkey, Ankara, 1996. – P. 366.
215. Kende H. The five classical plant hormones / H.Kende, J.A.D. Zeevart// *Plant Cell.*–1997. – V.9. – P. 1197–1210.
216. Kendrick R.E. Photomorphogenesis in plants, 2nd edn. / R.E. Kendrick, G.H.M.–Kronenberg Dordrecht.–The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994.– 312 p.
217. Kim L. Light-induced nuclear import of phytochrome-A: GFP fusion proteins is differentially regulated in transgenic tobacco and Arabidopsis/ L.Kim, S.Kircher, R.Toth [et al.] // *Plant Journal*. – 2000. – V. 22. – P. 125–133.
218. Kircher S. Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm/ S.Kircher, P.Gil, Kozma– L.Bognar [et al.]// *Plant Cell*. – 2002. – V.14. – P. 1541–1555.
219. Kirdmanee C. Effect of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro* / C. Kirdmanee, Y. Kitaya, T.Kozai // *In Vitro cell. dev. Biol.* – 1995. – V. – 31. – P. 144–149.
220. Klymchuk D.O. Changes in ultrastructure of mitochondria in root apex cells of soybean seedlings in microgravity / D.O. Klymchuk // *Journal of Gravitational Physiology*– 2005. – V.12, N.1. – P. 215–216.
221. Klymchuk D.O. Changes in vacuolation in the root apex cells of soybean seedlings in microgravity / D.O. Klymchuk // *Advance in Space Researches.*– 2003. – V. 31, N 10. – P. 2283–2288.
222. Kordyum E.L. Biology of plant cell in microgravity and under clinostating/ Elisaveta L. Kordyum // *Intern. Review of Cytology*. – 1997. – V.1. N 171. – P. 1–77.

223. Kozai T. Acclimatization /T.Kozai, S. M. A. Zobayed; In: R.Spier, ed.: Encyclopedia of cell technology.– New York: John Wiley & Sons, 2000. – P.1–12.
224. Kozai T. Effect of sideways lighting on the growth and morphology of the potato / T. Kozai, M. Hayashi, O. Ochiai // J.Jpn. Soc. Hort Sci. – 1991. – V. 60. – P.228–229.
225. Kozai T. In vitro aerial environments and their effects : Photoautotrophic (Sugar-Free Medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System: Kozai, T., Afreen, F., Zobayed, S.M.A., (Eds.)/ T.Kozai, C.Kubota.– Dordrecht, The Netherlands: Springer,2005. – P. 31–52.
226. Kozai T. Environmental control in plant tissue culture – general introduction and overview: Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture:Aitken–Christie J., Kozai, T., Smith, M.L. (ed.) / T.Kozai, M.A.L. Smith – Dordrecht – Boston – London: Kluwer Academic Publishers,1995. – P. 301–318.
227. Kubota C. In situ estimation of carbon balance of in vitro sweetpotato and tomato plantlets cultured with varying initial sucrose concentrations in the medium/ C.Kubota, M.Ezawa, T.Kozai, [et al.] // J. Amer. Hort. Sci. – 2002. – V.127. – P. 963–970.
228. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis/ J.Friml, J.Wisniewska, E.Benkova [et al.] //Nature. – 2002. – V.415. – P. 806–809.
229. Le V.Q. Opposite effects of exogenous sucrose on growth, photosynthesis and carbon metabolism of in vitro plantlets of tomato (*L. esculentum* Mill.) grown under two levels of irradiances and CO₂ concentration / V.Q.Le, G.Samson, Y.Desjardins/ J. Plant Physiol. – 2001.– V. 158. – P .599–605.
230. Lee B. Control of Plant Architecture: The Role of Phyllotaxy and Plastochron// Byeong–ha Lee , Si–in Yu, David Jackson // J. Plant Biol. – 2009. – V. 52. – P. 277–282.
231. Leicht S.A. Differential responses of invasive *Celastrus orbiculatus* (Celastraceae) and native *C. scandens* to changes in light quality/ S.A.Leicht, J.A. Silander // Am. J. Bot. – 2006. – V. 93. – P.972– 977.
232. Li J. Brassinosteroid actions in plants / J. Li, Joane Chory//J. Exp. Bot. – 1999. V.50. – P. 275 – 282.
233. Lichtenthaler H.K. The stress concept in plants: An introduction / H.K. Lichtenthaler // Stress of Life.–Ann.N.YAcad. Sci. – 1998. – V. 851.– P.187–198.
234. Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways / L.Ma, J.Li, L.Qu [et al.] // Plant Cell. – 2001.–V.13, N 12. – P. 2589–2607.
235. Low–shear modeled microgravity: a global environmental regulatory signal affecting bacterial gene expression, physiology, and pathogenesis/ C.A.Nickerson, M.C.Ott, J.W.Wilsona, R.Ramamurthy [et al.] //J. Microbiological Methods. – 2003. – V.54. – P. 1– 11.
236. Lozoya–Saldaca H. Electrotherapy and shoot tip culture eliminate potato virus X in potatoes / H.Lozya–Saldaca, J.F.Abelly, G. R. de la Garcia // Am. Potato. J. – 1996.–V. 73. – P.149–154.
237. Lucas W. J. Plant viral movement proteins: agents for cell–to–cell trafficking of viral genomes/ W. J. Lucas // Virology. – 2006. – V. 344. – P. 169–184.
238. Mahalingam R. Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species/ R.Mahalingam, N.Fedoroff // Physiologia Plantarum. – 2003. – V.119. – P. 56–68.
239. Maldonado L.A. Constraints to potato production and use of potato in Asia/ L.A.Maldonado, J.E.Wright, G.J. Scott //Am. J. Potato Res. – 1998. – V.75. – P.71–79.

240. Mancinelli A. L. The physiology of phytochrome actions / Alberto L. Mancinelli / Photomorphogenesis in plants / Eds R. E. Kendrick, G. H. M. Kronenberg.—Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1994. – P. 211–270.
241. Martins M. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers/ M.Martins, D.Sarmento, M.M.Oliveira //Plant Cell Rep. – 2004. – V.23. – P.492–496.
242. Mashinsky A. L. Results and Prospects of Studying the Gravitationally Sensitive Systems of Plants under Conditions of Space Flight/ A. L. Mashinsky, G. S. Nechitailo //Physics and Astronomy and Russian Library of Science. – 2001. – V. 39, № 4. – P. 317–327.
243. Mathews S. Adaptive Evolution in the Photosensory Domain of Phytochrome A in Early Angiosperms/ S.Mathews, J. G. Burleigh,M.J. Donoghue // Mol. Biol. Evol. – 2003. – V.20,№7. – P.1087–1097.
244. Mathews S. Phytochrome Evolution in Green and Nongreen Plants/Sarah Mathews //Journal of heredity.– 2005. – V. 96, N 3. – P. 197–204.
245. Mathews S. Phytochrome gene diversity/ S. Mathews, R.A.Sharrock / Plant, Cell and Environment. – 1997. – V.20. – P. 666–671.
246. Mathews S. The study of ancient adaptation: a case study of a phytochrome gene pair from early-diverging angiosperms : Plant adaptation: molecular genetics and ecology / Sarah Mathews.– Vancouver, British Columbia, Ottawa,Ontario: NRC Research Press. – 2004. – P.143–152.
247. Matthews R.E.F. Chemotherapy and plant viruses/ R.E.F. Matthews //J.Gen. Microbiol. – 1953. – V.8. – P.277–288.
248. Matysiak B. Acclimatization and the growth of *Ficus benjamina* microcuttings as affected by carbon dioxide concentration/ B.Matysiak, J. Nowak // J. hort. Sci. Biotechnol. – 1998. – V. 73. – P.185–188.
249. McCormac A.C. Light–signalling pathways leading to the co–ordinated expression of HEMA1 and Lhcb during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*/ A.C.McCormac, M.J. Terry //The Plant Journal. – 2002. – V.32. – P.549–559.
250. McCown B. H. Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: Dealing with genetic predeterminism/ B.H. McCown // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.– 2000. – V.36. – P.149–154.
251. McCown B.H. Field performance of micropropagated potato plants : Biotechnology in Agriculture and Forestry. – 3: Potato/ B.H.McCown, G.A.Wattimena. – Berlin: Springer–Verlag, 1987. – P. 80–87.
252. McCown B.H. A general approach for developing a commercial macropropagation system / B.H.McCown, D.D. McCown//In Vitro Cel.Develop.Biol.–1999.–V.35.–P.276–277.
253. McGrath R. B. Ethylene signaling in Arabidopsis: events from the membrane to the nucleus / R.B. McGrath, J.R. Ecker //Plant Physiol. Biochem. – 1998. – V.36. – P. 103–113.
254. Mehrotra Shakti Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization/ Shakti Mehrotra, Goel Manoj Kumar, Kukreja Arun Kumar[et al.] //Afr. J. Biotechnology. – 2007.–V.6,№13.– P. 1484–1492.
255. Mehta Satish K. Reactivation of latent herpes viruses in cosmonauts during a soyuz taxi mission/ Satish K.Mehta, Duane L. Pierson // Microgravity sci. technol.– 2007.–V.5–6. – P.215–218
256. Mellor F.C.Virus–free Potatoes through meristem culture: Biotechnology in Agriculture and Forestry.–3:Potato/ F.C. Mellor,A. Stace–Smith.– Berlin: Springer–Verlag, 1987.– P. 30–39.

257. Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x canadensis* Moench. cv Robusta)/ M.Strnad, J.Hanuš, T.Vaněk // *Phytochemistry*. – 1997. – V.45. – P. 213–218.
258. Microgravity as a novel environmental signal affecting *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence/ C.A.Nickerson, C.M.Ott, S.J.Mister [et al.]// *Infection and Immunity*. – 2000. – V.68,№6. – P. 3147–3152.
259. Mishchenko L.T. Clinostating effects on biochemical characteristics and productivity of healthy and virus-infected wheat plants of dwarf Apogee variety / L.T.Mishchenko, A.M.Silayeva, I.A.Mishchenko // *Advances in Space Research*. – V. 34. – 2004. – P. 1607–1611.
260. Morel G.M. Guerison de dahlias atteints d'une maladie virus/ G.M. Morel, C.Martin // *Comptes rendus hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences, Paris*. – 1952. – V.235. – P.1324–1325.
261. Morphological changes in woody stem of *Prunus jamasakura* under simulated microgravity / E.Yoneyama, Y.Ishimoto–Negishi, Y. Sano [et al.]// *Biological Sciences in Space*, 2004. – V.18, № 1. – P. 3–6.
262. Mosaleeyanon K. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO₂-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium/ K.Mosaleeyanon, S.Chaum, C. Kirmanee // *Sci. Hortic.* – 2004. – V.103. – P.51–63.
263. Muleo R. Light quality regulates shoot cluster growth and development of MM106 apple genotype in *in vitro* culture/ R.Muleo, S. Morini // *Sci Hort.* – 2003. – V.108.–P.364–370.
264. Muleo R. Photoregulation of growth and branching of plum shoots: physiological action of two photosystems/ R.Muleo, S.Morini, S. Casano // *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. – 2001. – V.37. – P.609–617.
265. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture / T.Murashige, F.A. Scoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – V.15,№13. – P. 483–487.
266. Murashige T. Plant propagation by tissue culture: practice with unrealized potential : *Handbook of Plant Cell Culture*: P.V.Ammirato, D. A.Evans, W. R.Sharp eds. / T.Murashige.– McGraw–Hill, New York. – 1990. – V.5. – P. 3–9.
267. Mutant analyses define multiple roles for phytochrome C in *Arabidopsis thaliana* photomorphogenesis/ K.A.Franklin, S.J.Davis, W.M.Stoddart [et al.]// *The Plant Cell*. – 2003. – V.15. – P.1981–1989.
268. Nakayama M. Effect of presence absence of sugar in the medium and natural forced ventilation on photosynthetic rates of potato plantlets *in vitro* / M. Nakayama, T.Kozai, K. Watanabe // *Plant Tissue Cult. Lett.* – 1991. – V.8. – P.105–109.
269. Neff M.M. Genetic Interactions between Phytochrome A, Phytochrome B, and Cryptochrome 1 during *Arabidopsis* Development/ Michael M. Neff, Joanne Chory// *Plant Physiol.* – 1998. – V. 118. – P. 27–36.
270. Nielsen K. Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective/ K.Nielsen, R.S. Boston // *Annu Rev Plant Physiol, Plant Mol Biol.* – 2001. – V.52. – P.785–816.
271. Nutritional and flavor components of *Brassica rapa* L. grown on ISS / M.E.Musgrave, A. Kuang, J.Blasiak, [et al.] // *Journal of Gravitational Physiology*.–2005. – V. 12, N. 1. – P. 185–186.
272. O'Herlihy E.A. Influence of *in vitro* factors on titre and elimination of model fruit tree Viruses / E.A. O'Herlihy, J.T. Croke, A.C. Cassells // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2003. – V.72. – P.33–42.
273. Overexpressed phytochrome C has similar photosensory specificity to phytochrome B but a distinctive capacity to enhance primary leaf expansion / M.Quin, R.Kuhn, S. Moran, P.H. Quail // *Plant J.* – 1997. – V.12. – P. 1163–1172.

274. Oyama T. The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl / T.Oyama, Y.Shimura, K.Okada // *Genes Develop.* – 1997. – V.11. – P. 2983–2995.
275. Pelacho A.M. Effects of photoperiod on kinetin-induced tuberization of isolated potato stolons cultured in vitro/A.M.Pelacho, A.M. Mingo-Castel. // *Am. Potato J.* – 1991. – V. 68. – P.533 – 541.
276. Perbal G. Mechanotransduction in gravisensing cells/ G. Perbal, D.Driss-Ecole // *Trends Plant Sci.* – 2003. – №8. – P. 498–504
277. Philman N.L. Micropropagation of *Uniola paniculata* L. (sea oats) from tiller explants/ N.L.Philman, M.E. Kane // *HortScience.* – 1994. –V.29. – P. 559
278. Photoautotrophic micropropagation of Russet Burbank potato/ K.Pruski, T. Astatkie, M. Mirza [et al.] // *Plant Cell Tiss Org Cult.* – 2002. – V. 69. – P.197–200.
279. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania Somnifera* (L.) Dunal. plantlets / Sang-Ho Lee, Rajesh Kumar Tewari, Eun-Joo Hahn [et al.]// *Plant Cell Tiss Organ Cult* – 2007. – V. 90. – P.141–151.
280. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of in vitro cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization/ G.Fila, J.Ghashghaie, J.Hoarau [et al.] / *Physiol. Plant.* – 1998. – V. 102. – P. 411– 418.
281. Phytochrome A mediates the promotion of seed germination by very low fluences of light and canopy shade light in Arabidopsis/ J.F. Botto, R.A. Sanchez, G.C. Whitelam [et al.]// *Plant Physiology.* – 1996. – V.110. – P. 439–444.
282. Phytochrome A resets the circadian clock and delays tuber formation under long days in potato / M.J.Yanofsky, M. Izaguirre, J.A. Wagmaister // *Plant J.* – 2000. – V.23. – P.223–232.
283. Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in Arabidopsis by controlling elongation growth and flowering time / P. F. Devlin, S.Robson R. S. R.Patel [et al.] // *Plant Physiol.* – 1999. – V.119. – P. 909–915.
284. Phytochrome E controls light-induced germination of Arabidopsis / L. Hennig, W.M. Stoddart, M. Dieterle [et al.] // *Plant Physiology.* – 2002. – V. 128. – P. 194–200.
285. Plant growth regulators in plant tissue culture / Th. Gaspar, C. Kevers, C. Penel [et al.] // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* – 1996. – V. 32. – P. 272–289.
286. Plant-centered biosystems in Space environments: technological concepts for developing a plant genetic assessment and control system / T.L. Lomax, K.A. Findlay, T. J. White // *Gravitational and Space Biology Bulletin.* – 2003. – №16. – P. 91–99.
287. Pospíšilová J. Photosynthetic responses to stresses during *in vitro* cultivation / J. Pospíšilová, J. Solárová, J. Čatský // *Photosynthetica.* – 1992. – №26. – P. 3–18.
288. Prasad M.N.V. Plant acclimation and adaptation to natural and anthropogenic stress / M.N.V. Prasad, Z. Rengel // *Stress of Life. – Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1998. – V. 851. – P. 216–223.
289. Preece J.E. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field: Micropropagation. Technology and Application: Debergh P.C., Zimmerman R.H. (ed.) / J.E. Preece, E.G. Sutter.– Dordrecht – Boston – London: Kluwer Academic Publishers, 1991. – P. 71–93.
290. Protocol to Achieve Photoautotrophic Coconut Plants Cultured In Vitro With Improved Performance Ex Vitro: Plant Cell Culture Protocols: V. Loyola-Vargas M. F.Vázquez-Flota (ed.). [G. Fuentes, C.Talavera, Y. Desjardins et al.] – Totowa, New Jersey: Humana Press, 2006. – P.131–145.

291. Quail P.H. Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? / Philip.H.Quail // *Current Opinions in Plant Biology*. – 2002. – V. 14. – P. 180–188.
292. Quail P.H. Phytochrome genes and their expression / *Photomorphogenesis in Plants*, 2nd edn (eds R. E. Kendrick & G. H. M Kronenberg /Philip.H.Quail.– Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. – 1994. – P. 71–103.
293. Ramarao Vepachedu Molecular characterization and post–transcriptional regulation of *ME1*, a type–I ribosome–inactivating protein from *Mirabilis expansa* / Ramarao Vepachedu, Harsh Pal Bais, J. M. Vivanco // *Planta*. – 2003. – V. 217. – P. 498–506.
294. Ranalli P. Microtuber and minitubers production and field performance compared with normal tubers/ P.Ranalli, B. G.Ruaro, P. Delre [et al.]// *Potato Res.* – 1994. –V.37. – P. 383–391.
295. Recent advances in environmental control in micropropagation: Plant production in closed ecosystems: Goto E., Kurata K., Hayashi M., Sasa S. (ed.)/ [C. Kubota, K.Fujiwara, Y.Kitaya et al.]– Dordrecht – Boston – London: Kluwer Academic Publishers,1997. – P. 153–169.
296. Regulation of potato tuberization by daylength and gibberellins/ V.Amador, J. Bou, J. Martínez–García, [et al.]// *Int. J. Dev. Biol.* – 2001. – V. 45 (S1). – P. 37–38.
297. Ribavirin, electric current and shoot–tip culture to eliminate several potato viruses/ J.Y.Yi, H.W. Seo, Y.M. Choi [et al.]// *J. Plant Biotechnol.* – 2003. – V.5. – P. 101–105.
298. Rocket seedling production on the International Space Station: Growth and Nutritional properties / G.Colla, A.Battistelli, S.Proietti, [et al.] // *Microgravity sci. technol.* – 2007. – V.5–6. – P.118–121.
299. Root gravitropism: an experimental tool to investigate basic cellular and molecular processes underlying mechanosensing and signal transmission in plants/ K.Boonsirichai, C.Guan, R.Chen [et al.] // *Annu Rev Plant Biol.* – 2002. – V. 53. – P. 421–447.
300. Rosen E. Root gravitropism: a complex response to a simple stimulus/ E.Rosen, R.J. Chen, P.H. Masson // *Trends Plant Sci.* – 1999. – V.4. – P. 407–412.
301. Sabry M.Y.M. Evaluation of some therapies to eliminate *Potato Y Potyvirus* from potato plants/ M.Y.M. Sabry, H.H. Maher, M.H. Abdel–Ghaffar/ *Int. J. Virology.* – 2009. – V.5 (2). – P. 64–76 .
302. Salazar L.F. Potato viruses and their Control/ L.F. Salazar. – Lima, Peru: International Potato Center, 1996.
303. Sallanon H. Influence of growth room and vessel humidity on the *in vitro* development of rose plants / H.Sallanon, Y. Maziere// *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1992. – V.30. – P.121–125.
304. Schäfer E. Photomorphogenesis in plants and bacteria: 3rd edn./ E.Schäfer, F.Nagy.– Dordrecht, The Netherlands: Springer. – 2006. – 215 p.
305. Schnabl H. Gravistimulated Effects in Plants: Astrobiology, The Quest for the Conditions of Life/ Haide Schnabl.– Berlin, Heidelberg: Springer,2001. – P.296–310.
306. Schneider P. Quantitative determination of the gibberellins GA₃ and GA₁ in Spruce (*Picea abis* L.) needles by a highly sensitive solid–phase enzyme immunoassay / P.Schneider, K.Horn, R.Lauterbach [et al.] // *J.Plant.Physiol.* – 1991. – V.139. – P.229 – 234.
307. Seabrook J.E.A. Effect of photoperiod on *in vitro* tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.)/ J.E.A Seabrook, S.Coleman, D.Levy // *Plant Cell Tiss Org Cult.* – 1993. – V.34. – P.43–51.
308. Seabrook J.E.A. Prevention of stem growth inhibition and alleviation of intumescence formation in potato plantlets in vitro by yellow filters/ J.E.A. Seabrook, L.K .Douglass. // *Amer. J. Potato. Res.* – 1998. – V.75. – P. 219–224.
309. Seabrook J. E. A.Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum*) *in vitro*: A review / Janet E. A. Seabrook // [Amer. J. Potato Res.](#) – 2005. – V82, N5. – P. 353–367.

310. Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-Zip protein, a negative regulator of gene expression / C. Steindler, A.Matteucci, G.Sessa [et al.]// *Development*. – 1999. – V.126. – P. 4235–4245.
311. Shani E. The role of hormones in shoot apical meristem function/ E. Shani, O. Yanai, N. Ori//*Current Opinion in Plant Biology*. – 2006. – V. 9. – P.484–489.
312. Shen–Miller J. Nucleolar transformation in plants grown on clinostats/ J.Shen–Miller, R.R. Hinchman // *Protoplasma*. – 1995. – V.185. – P. 194–204.
313. Skagen E.B. Effect of simulated and real weightlessness on early regeneration stages of *Brassica napus* protoplasts/E.B. Skagen, T.–H. Iversen//*In vitro Cellular Developmental Biology–Plant*. – 2000. – V.36. – P. 312–318.
314. Smith H. Phytochrome, a family of photoreceptors with multiple physiological roles/ H.Smith, G.C. Whitelam // *Plant, Cell and Environment*. – 1990. –V.13. – P. 695–707.
315. Smith H. Phytochrome-mediated responses – Implications for controlled environment research facilities: International Lighting in Controlled Environments Workshop :T.W.Tibbitts (ed.). / H. Smith.– NASA–CP–95–3309,1994. – P.57–67.
316. Smith H. Phytochromes and light signal perception by plants an emerging synthesis/ H.Smith // *Nature*. – 2000. – V.407. – P.585–591.
317. Smith H. The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes/ H.Smith, G.C. Whitelam // *Plant, Cell and Environment*. – 1997. – V.20. – P. 840–844.
318. Spalding E.P. Illuminating topics in plant photobiology/ E. P. Spalding, K.M. Folta // *Plant, Cell and Environment*. – 2005. – V. 28. – P. 39–53.
319. Spomer L.A. Direct measurement of water availability in gelled plant tissue culture media/ L. A.Spomer, M. A. L.Smith // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. – 1996. – V.32. – P. 210–215.
320. Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment/ S.K.Sharma, G.J. Bryan , M.O. Winfield [et al.] // *Planta*. – 2007. – V.267. – P. 498–507.
321. Taran O.P. Effectiveness of biologically active growth regulators under conditions of simulated microgravity and viral infection in potato plants/ G.S.Yanishevskaya, O.P.Taran, L.T. Mishchenko //26th Annual international gravitation physiology meeting, “Life in space for life on earth”, 26 June–1 July 2005. – Cologne, Germany. – P. 243–245.
322. Taran O.P. Mechanisms of induced resistance of potato plants to the biotic factors in simulated microgravity/ O.P.Taran, O.I.Gordeychik, L.T. Mishchenko // 1st International Trans Caucasus Conference on Plant Pathology.–Tbilisi,Georgia, 25–27 September, 2008. – P.41.
323. Taran O.P. Simulated microgravity effects on the resistance of potato plants to viral infection/ L.T.Mishchenko, O.I.Gordeychik, O.P. Taran // COSPAR 2006–A–01407; F1.1–0025–06), COSPAR, China, Beijing (Pekin), 15–21 July 2006. – P. 326.
324. Temporal evolution of the Arabidopsis oxidative stress response/ R.Mahalingam, N.Shah, A.Scrymgeour [et al.]// *Plant Molecular Biology*. – 2005. – V.57. – P. 709–730.
325. The adaptive evolution of plasticity: phytochrome–mediated shade avoidance responses/ J.Schmitt, J.R.Stinchcombe, M. Sh.Heschel, H.Huber // *Integrative and Comparative Biology*. – 2003. –V. 43 (3). – P.459 – 469.
326. The high–energy action controlling plant responses and development / H. Borthwic, S.Hendricks, M.Schneider [et al.] / *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1969. – V.64. – P. 479.

327. The histidine kinase-related domain of Arabidopsis phytochrome A controls the spectral sensitivity and the subcellular distribution of the photoreceptor/ R.Müller, A.Fernández Pinās, A.Hiltbrunner [et al.] // *Plant Physiol.* – 2009. – V. 150. – P.1297–1309.
328. The light-induced reduction of the gravitropic growth-orientation of seedlings of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. is a photomorphogenic response mediated synergistically by the far-red-absorbing forms of phytochromes A and B/ C.Poppe, R.P.Hangarter, R.A.Sharrock [et al.] // *Planta.* –1996. – V. 199. –P. 511–514.
329. *Thorpe T.A.* History of plant tissue culture: Plant cell culture protocols / Trevor A. Thorpe/ (Loyola-Vargas V. M. and Vázquez-Flota F. ed.)– Totowa, New Jersey: Humana Press, 2006. – P.9–35.
330. Tichá I. Optimization of photoautotrophic tobacco *in vitro* culture: effect of suncaps closures on plantlet growth/ I.Tichá / *Photosynthetica.* – 1996. –V.32. – P. 475–479.
331. Time-course of changes in amounts of specific proteins upon exposure to hyper-g, 2-D clinorotation, and 3-D random positioning of *Arabidopsis* cell cultures / Z.Barjaktarovi, A.Nordheim, T. Lamkemeyer [et al.] // *J.Exp.Bot.* – 2007. – V. 58 (15–16). – P.4357–4363.
332. Traas J. The shoot apical meristem: the dynamics of a stable structure/ Jan Traas, Teva Vernoux // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* – 2002. – V. 357. – P. 737–747.
333. Trewavas A. Green plants as intelligent organisms. *Trends in Plant / A.Trewavas // Science.* – 2005. –V.10.– P.413–419.
334. Universal role for inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling in plant gravitropism/ I.Y.Perera, Chiu-Yueh Hung, Shari Brady [et al.] // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 140.–746–760.
335. Valero-Aracama C. Starch utilization during *in vitro* rooting of easy- and difficult-to-acclimatize sea oats (*Uniola paniculata*) genotypes / C.Valero-Aracama, M.E.Kane, N.L.Philman [et al.] // *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* – 2004. –V.54. – P. 22–27.
336. Van Huylenbroeck J.M. Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants / J.M.Van Huylenbroeck, A.Piqueras, P.C. Debergh // *Plant. Sci.* – 1998. – V.134. – P. 21–30.
337. Van Telgen, H.–J. Effect of propagation and rooting conditions on acclimatization of micropropagated plants/ H.–J.Van Telgen, A. Van Mil, B.Kunneman // *Acta. bot. neerl.* – 1992. – V.41. – P.453–459.
338. Vasilenko A. Energetic metabolism response in algae and higher plant species from simulation experiments with the clinostat / A.Vasilenko, A.F. Popova // *Advances in Space Research.* – 1996. – V.17. – P. 103–106.
339. Verchot-Lubicz J. Molecular biology of potexviruses: recent advances / J.Verchot-Lubicz, Ye Chang-Ming and D. Bamunusinghe // *J. Gen. Virol.* – 2007. –V. 88. –P.1253–1278.
340. Verchot-Lubicz J.. A new model for cell-to-cell movement of potexviruses. *Mol Plant Microbe Interact.* – 2005. – V.18. – P. 283–290.
341. Verma H. Endogenous virus inhibitors from plants, their physical and biological properties: Antiviral Proteins in Higher Plants: M. Chessin, D. Deborde, and A. Zipf, eds/ H.Verma, M.Varsha, V. K. Baranwal. – Boca Raton, FL: CRC Press,1995. – P. 1–22.
342. Virus eradication: tissue culture of meristems, thermotherapy, and chemotherapy : Techniques in plant virology, CIP training manual, 4.0 Control.– CIP.–Lima, Peru, 1999. – P. 1–8. (Sec. 4.2.).
343. Vivanco J.M.Antiviral and Antiviroid Activity of MAP-containing Extracts from *Mirabilis jalapa* Roots/ J.M.Vivanco, M. Querci, L.F. Salazar // *Plant Disease.*– 1999. – V. 83, N 12. – P. 1116–1121.

344. Wang X. Interaction of cryptochrome 1, phytochrome, and ion fluxes in blue–light–induced shrinking of *Arabidopsis* hypocotyl protoplasts / X.Wang, M. Lino // *Plant Physiol.* – 1998. – V.117 – P. 1265–1279.
345. Wardle K. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity/ K.Wardle, E.B.Dobbs, K.C.Short // *J.Amer.Soc.Hort. Sci.* – 1983. – V.3. – P. 386–389.
346. Weiler E.W. Levels of indole–3–acetic acid in intact and decapitated coleoptiles as determined by a specific and highly sensitive solid–phase enzyme immunoassay/ E.W. Weiler, P.S.Jordan, W. Conrad / *Planta.* – 1981. – V.149. – P.561–571.
347. Whitelam G.C. Roles of different phytochromes in *Arabidopsis* photomorphogenesis/G.C. Whitelam, P.F. Devlin // *Plant, Cell and Environment.* –1997. – V 20. – P. 752–758.
348. Wilson D.A. Light spectral quality effects on the growth of potato (*Solanum tuberosum* L.) nodal cuttings *in vitro* / D.A. Wilson, R.C. Weigel, R.M. Wheeler // *In Vitro Cell Dev. Biol.* – 1993. – V.29. – P.5–8.
349. Xiao Yulan Photoautotrophic growth of Sugarcane plantlets *in vitro* as affected by photosynthetic photon flux and vessel air exchanges / Xiao Yulan, Lok Yee Hin, T. Kozai // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2003. – V.39. – P.186–192.
350. Yamaguchi R. Light–dependent translocation of a phytochrome B–GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*/ R.Yamaguchi, M.Nakamura, N.Mochizuki et al.// *Journal of Cell Biology.* – 1999. – V.145. – P. 437–445.
351. Yang H.Q. The signaling mechanism of *Arabidopsis CRY1* involves direct interaction with *COPI* / H. Q.Yang, R. H.Tang, A.R.Casmore // *Plant Cell.*—2001.—V.13. – P. 2573–2587.
352. Yanovsky M.J. Missense mutation in the *PAS2* domain of phytochrome A impairs subnuclear localization and a subset of responses/ M.J.Yanovsky, J.P.Luppi, D.Kirchbauer et al.// *Plant Cell.* – 2002. – V.14. – P.1591–1603.
353. Yeh K.C. Eukaryotic phytochromes: light–regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry / K. C. Yeh, J. C. Lagarias // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1998. – V.95. – P. 13976–13981.
354. Yoshihara Takeshi Identification of the Gravitropism–Related Rice Gene *LAZY1* and Elucidation of *LAZY1*–Dependent and – Independent Gravity Signaling Pathways/ Takeshi Yoshihara, Ino Moritoshi // *Plant Cell Physiol.* – 2007. – №48. – P. 678–688.
355. Yulan Xiao Commercial application of a photoautotrophic micropropagation system using large vessels with forced ventilation: Plantlet growth and production cost / Xiao Yulan, Toyoki Kozai // *HostScience.* – 2004. – V.39, №6. – P. 1387–1391.
356. Zipf A. Mechanisms of antiviral protein activity in higher plants: Antiviral Proteins in Higher Plants / A. Zipf. – Boca Raton, FL : CRC Press,1995. – P. 133–146.
357. Ziv M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants.: Micropropagation: Technology and Application : Debergh, P., Zimmerman, R., (Eds.)/ M.Ziv.– Dordrecht.: Kluwer Academic Publishers, 1990.– P. 45–69.
358. A cyanobacterial phytochrome two–component light sensory system / K. C. Yeh, S. H.Wu, J. T. Murphy [et al.] // *Science.* – 1997. – V.277. – P. 1505–1508.