

А. І. Опалко<sup>1,2</sup>, В. Д. Адаменко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України

<sup>2</sup>Уманський національний університет садівництва

## ІНДУКУВАННЯ МОРФОГЕНЕЗУ *IN VITRO* У ЗИГОТИЧНИХ ЕКСПЛАНТІВ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *CASTANEA* MILL.

Узагальнено дані літературних джерел щодо цінності представників роду *Castanea* Mill. з погляду вирішення проблеми раціонального використання й охорони генетичного різноманіття рослинних ресурсів, поповнення сортименту горіхоплідних культур в Україні за рахунок інтродукції нових сортів *Castanea sativa* Mill. з визначеними харчовими і дієтичними властивостями горіхів, цінністю для фармації плодів і всієї рослини, високою декоративністю дерев, їхньою фітомеліоративною ефективністю та якістю деревини, а також перспективи залучення в каштанокультуру інших видів роду. Констатується, що до недавнього часу зусилля науковців, спрямовані на популяризацію каштану істивного в Україні, гальмувались упередженістю щодо недостатньої адаптивності його рослин до агроекологічних умов, зокрема умов зимівлі, та консервативністю споживача, незвиклого використовувати як власне горіхи каштану, так і продукти їхньої переробки. Зазначається, що нині з-поміж проблем інтродукування і впровадження каштану істивного у вітчизняне садівництво, які потребують швидкого розв'язання, однією з найактуальніших є завдання поліпшення способів масового вегетативного розмноження його найбільш цінних генотипів. Пропонується вдосконалити техніку *in vitro*, що використовується при розмноженні багатьох плодкових, декоративних і лісових деревних порід, і адаптувати її до розмножуваних представників роду *Castanea*.

### Вступ

Традиційна концепція використання світових природних ресурсів, зокрема рослинних, почала поступово переглядатися з сімдесятих років минулого сторіччя відповідно до сформованих унаслідок тріумфу «зеленої революції» принципів сталого розвитку сільського господарства [1–3], хоча темпи інтенсифікації аграрного виробництва у промислово-розвинених державах стали стрімко прискорюватися ще з XIX сторіччя, рівнобіжно зі зростанням чисельності міського населення і відповідним зменшенням кількості працюючих в аграрному виробництві [2]. Сформульовані у восьмидесятих роках минулого сторіччя ідеї щодо необхідності ревізії самої стратегії подальшого збільшення врожайності сільськогосподарських рослин і продуктивності агроєкосистем набули подальшого розвитку у новій концепції, зорієнтованій на підвищення антропоадаптивного потенціалу рослинництва, зокрема стосовно формування біотехнологічними методами ознак антропоадаптивності у новостворюваних сортів [4, 5]. При цьому особливої актуальності набуває проблема раціонального використання й охорони генетичного різноманіття рослинних ресурсів [6, 7].

Разом з тим, намагання екологів і селекціонерів домогтися сповільнення, а в перспективі навіть реверсії, процесів збіднення біотичного різноманіття й руйнування природних земельних ресурсів закликаючи до самообмеження і раціоналізації споживання та спонукаючи до розумного використання селекційних досягнень [8–10] наштовхуються на природжений егоїзм кожної людини окремо [11], а також груповий егоїзм кожної держави, як і майже кожного національного, політичного, клерикального й іншого соціального угруповання.

Натомість досвід останніх десятиріч свідчить про планомірне культивування у широкого загалу ірраціональних потреб. Такі потреби жодним чином не пов'язані ні з виживанням, ні з задоволенням фізіологічних чи соціальних, духовних або матеріальних, ані інших раціональних потреб, у тому числі в забезпеченні самозбереження, самоствердження й самореалізації [12, 13]. Спроби державних обмежень споживання не були ефективними в минулому, неефективні нині, і наївно сподіватися, що вони стануть більш ефективними в досяжному майбутньому. Ці штучні потреби насаджуються на догоду комерційним інтересам обмеженого кола

недобросовісних виробників та корумпованих чиновників і не усвідомлено підтримуються більшістю малоосвічених споживачів [14]. Керівники, орендарі та власники екологічно небезпечних виробництв і об'єктів здебільшого не тільки не виявляють жодної ініціативи, а й усіма можливими способами, іноді на межі дозволеного, намагаються ігнорувати будь-які екологічні заходи, що вимагають від них капіталовкладень.

Реальні важелі стимулювання проведення природоохоронних заходів в Україні (як і в багатьох інших державах) наразі відсутні. Водночас моніторинг діяльності виробників сільськогосподарської товарної продукції свідчить про численні факти порушень, зокрема про ексцесивну ерозію, що часто призводить до повного руйнування ґрунтів, без будь-якої компенсації щодо їхньої порушеної родючості. Частка земельних ресурсів у складі продуктивних сил держави перевищує 40%. При цьому сільськогосподарська освоєність суші становить 72,2%, а частка ріллі в загальній площі сільськогосподарських угідь досягає загрозливих 79%. Це набагато більше, ніж в інших аграрно-розвинених країнах світу [15–18].

Існуючі диспропорції біотичних взаємодій в екосистемі, зумовлені нехтуванням потреб охорони генетичного різноманіття рослинних і збереження інших природних ресурсів, може спричинити серйозні місцеві, регіональні і навіть глобальні екологічні наслідки. Використання екологічно обґрунтованої соціотехнічної стратегії управління природними ресурсами може збільшити стійкість сільськогосподарського виробництва за одночасного зниження допустимих меж небажаних наслідків. Йдеться про мінімізацію обробітку ґрунту та інноваційне [19, 20] антропоадаптивне рослинництво [1, 2, 14], однією з найважливіших складових якого є збагачення різноманіття генотипів усіх культивованих в Україні рослин та введення у культуру нових [21].

У зв'язку з цим пошук і різностороннє вивчення та забезпечення ефективного використання перспективних, але наразі недооцінених рослин, що здебільшого відомі лише вузькому колу любителів дикої природи, надзвичайно зростає, особливо стосовно нових для України плодкових і ягідних рослин. На підвищену увагу заслуговують представники роду *Castanea* Mill., до якого належить каштан їстівний.

В Україні види *Castanea*, зокрема європейський каштан, *Castanea sativa* Mill., вважаються нетрадиційними для вирощування, хоча

природно-економічний потенціал багатьох регіонів України цілком сприятливий для культивування цієї горіхоплідної рослини [22, 23]. Інтродукція *C. sativa* в Україну розпочалася науковцями Кременецького Ботанічного саду у 1806 році [24], а за свідченням Франца Гербіха [25] на Північну Буковину його у 1859 р. завезли угорці. Місцеве населення оцінило харчове значення плодів, декоративність дерев та лікувальні властивості каштану їстівного, однак подальше поширення цієї надзвичайно цінної рослини гальмувалось упередженням щодо її недостатньої морозостійкості, що ґрунтувалось на субтропічному походженні видів *Castanea*.

Натомість у Європі *C. sativa* став привертати увагу населення не лише як плодова культура та матеріал для декоративного садівництва, а також як джерело цінної деревини [3, 26]. Нині, зважаючи на багатофункціональну роль каштана їстівного, зусилля, спрямовані на поліпшення технологій розмноження, вирощування і всебічного використання, стають все більш актуальними для управління рослинними ресурсами і агролісомеліорації [27].

Окрім згаданого *C. sativa* господарче значення мають східні види *Castanea*, зокрема *C. mollissima* Blume, *C. crenata* Siebold & Zucc. і *C. henryi* (Skan) Rehder & E. H. Wilson, горіхи яких разом з плодами *C. sativa*, впродовж віків були необхідною для виживання людини їжею у багатьох регіонах Азії, Південної Європи та більшості країн Середземномор'я, а також північноамериканський вид *C. dentata* (Marshall) Borkh., що до епіфітотії *Cryphonectria parasitica* (Murril.) Barr. домінував у широколистих лісах Північної Америки [27].

У спільній базі даних Королівських ботанічних садів у Кью (Англія) і Ботанічного саду Міссурі (США) у переліку рослин роду *Castanea*, що належать до родини *Fagaceae* Dumort., налічується 56 наукових видових назв, з яких лише дев'ять визнані. Це *C. crenata*, *C. dentata*, *C. henryi*, *C. mollissima* і *C. sativa*, про які вже йшлося та *C. ozarkensis* Ashe, *C. pumila* (L.) Mill., *C. seguinii* Dode, а також вид гібридного походження *C. ×neglecta* Dode. До синонімів віднесено 33 і непевними є — 14 наукових видових назв. Додатково у переліку наводиться також 83 наукові назви внутривидового рангу [28]. За даними нещодавно виконаного [29] аналізу ДНК хлоропластів (cpDNA) висловлено припущення щодо походження *C. ×neglecta* внаслідок схрещування між *C. dentata* і *C. pumila*.

Нині представники роду *Castanea*, завдяки активності науковців Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України [22, 24, 30] та Національного університету біоресурсів і природокористування України [23], до яких порівняно недавно долучилися дослідники Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України [31], набувають все більшої популярності в Україні не лише як горіхоплідна, а й як цінна декоративна рослина для ландшафтного дизайну, що спроможна замінити у міських насадженнях *Aesculus hippocastanum* L. (гірकोкаштан звичайний або каштан кінський). Впродовж останнього десятиріччя насадження гіркокаштану, що належить до роду *Aesculus* L. (раніше *Hippocastanum* Mill.) з родини *Sapindaceae* Juss. (колишня *Hippocastanaceae* A. Rich.) значно втратили свою декоративну привабливість унаслідок стрімкої інвазії каштанової мінуючої молі, *Cameraria ohridella* Deschka & Dimic, гусениці якої розвиваються в тканинах листка. Сильне пошкодження призводить до передчасного в'янення і всихання листя [32] вже з середини літа і втрати декоративності дерев.

Тож зусилля фахівців зеленбудів і науковців нині спрямовуються у двох напрямках: віднайти ефективні й екологічно-безпечні засоби захисту цієї рослини від шкідника та/або замінити її у міських насадженнях деревами інших видів, що були б імунні проти *C. ohridella* не поступаючись гіркокаштану декоративністю. Зважаючи на те, що насадження гіркокаштану розташовані у людних місцях, застосування хімічних засобів захисту вельми обмежене. Називають відносно стійкі види гіркокаштану, це: гіркокаштан асамський (*A. assamica* Griff.), голий (*A. glabra* Willd.), дрібноквітковий (*A. parviflora* Walter), каліфорнійський (*A. californica* (Spach) Nutt.), китайський (*A. chinensis* Bunge) та індійський (*A. indica* (Wall. ex Cambess.) Hook.), однак можливості їхнього адаптування й поширення в Україні ще потребують спеціальних досліджень. Натомість каштан їстівний, характеризуючись неабиякою декоративною привабливістю [3, 26], високою поживністю й багатим вітамінним складом горіхів, що зумовлює їхню харчову і дієтичну цінність [33] та антиоксидантними властивостями квіток, листя, плодів і шкірок (оплоднів) [34], здебільшого спроможний рости й плодоносити скрізь, де росте й плодоносить волоський горіх, *Juglans*

*regia* L. [22, 23, 31]. Це робить *C. sativa* перспективним для впровадження в Україні.

Нагальним завданням щодо адаптування каштанокультури в Україні нині можна визнати необхідність удосконалення технології вирощування якісного сортового садивного матеріалу *C. sativa*. У природних умовах *C. sativa* розмножується насінням, однак зважаючи на роздільностатеву однодомність, що зумовлює високу гетерогенність сіянцевих популяцій, за насінного розмноження сортові ознаки в поколіннях від статевого розмноження не зберігаються. Це спонукає до проведення пошуку альтернативних технологій розмноження *Castanea*, зокрема із включенням біотехнологічної ланки, власне мікроклонального розмноження, що належить до способів вегетативного розмноження, який вже підтвердив суттєві переваги в розсадництві багатьох плодкових, декоративних і лісових деревних порід і стає нині все більш широкоживим методом вирощування чистосортного садивного матеріалу [3, 35–39]. Розмноження *in vitro* найвдаліше поєднує переваги щодо збереження спадковості комплексу бажаних ознак, зокрема адаптивності до умов вирощування з якістю плодів та іншими господарчо-цінними ознаками.

Відомі способи вегетативного розмноження *in vitro* загалом дещо умовно можна об'єднати у дві великі групи:

- безпосереднє регенерування рослин з первинних експлантів;
- регенерування рослин через соматичний ембріогенез.

За оптимальних умов способами мікроклонування з однієї маточної рослини можна не лише отримувати до одного мільйона рослин-регенерантів на рік, а й забезпечувати розмноження оздоровленого від вірусних та інших хвороб садивного матеріалу. За цими показниками жоден з інших способів вегетативного розмноження не може конкурувати з технікою *in vitro*. Застосовуючи техніку безпосереднього регенерування рослин з первинних експлантів стимулювання органогенезу здійснюється завдяки введенню цих експлантів на живильне середовище відповідне їхнім генотипам і бажаному напрямку морфогенезу: гомогенез (стеблоутворення) чи ризогенез (формування і ріст коренів). Для цього у базові живильні середовища додаються фітогормони, спочатку з перевагою цитокінінів у співвідношенні цитокінін/ауксин, завдяки чому ініціюється ріст і галузнення придатного для мікроклонування

мікропагона (власне розмноження); далі, змінюючи баланс фітогормонів у складі середовища на користь ауксинів, індукується ризогенез; потім пробіркові рослини-регенеранти пересаджуються на відповідні субстрати для адаптування їх до нестерильних умов *ex vitro*; після чого адаптовані рослини висаджуються на ділянку дорощування. Для цього типу мікроклонування характерна наявність судинних зв'язків між введеною *in vitro* тканиною материнського експланту і тканинами, сформованими внаслідок морфогенної регенерації [39].

Не менші перспективи розкриваються перед дослідниками можливостей запровадження ембріокультури (через соматичний ембріогенез). На відміну від ембріональних (зародкових) клітин, що утворюються із зигот внаслідок статевого запліднення (амфіміксису), ембріодні, або ембріогенні клітини формуються асексуально (без запліднення) і можуть утворювати ембріоди (зародкоподібні структури) безпосередньо із введеного *in vitro* експланта або через калюс. Переваги соматичного ембріогенезу полягають насамперед у скороченні самої процедури мікроклонування розмноження завдяки вилученню зі схеми розмноження етапу ризогенезу і багаторазовому зменшенню кількості пасажувань та клопотів із вкоріненням важковкорінюваних генотипів, а також у перспективах створення технологій виробництва штучного насіння [3, 35, 39, 40], яке на відміну від зиготичного матиме генотип рослини-донора експланта. Принципово важливим моментом щодо перспектив керування процесом ембріогенезу *in vitro* є опанування особливостей найбільш ранніх його етапів, коли окремі клітини раптово набувають здатність розвиватися в ембріодні. Оскільки соматичний ембріогенез відбувається у багатоклітинних структурах, то морфологічна, фізіологічна і біохімічна поляризація розглядаються як потенційно важливі чинники цього процесу [40]. Цю поляризацію досить легко розпізнати під мікроскопом на глобулярній стадії. Верхівка глобулярної структури дає початок пагону, тоді як протилежний базальний полюс, що називають суспензором, дає початок кореню. При вивченні клітин з високою частотою ембріогенезу було з'ясовано, що перше дроблення окремої клітини, в якій розпочинається ембріогенез, зазвичай нерівне. Одна з двох новоутворених клітин характеризується багатою цитоплазмою, друга — має велику вакуолю. Наступні поділи відбуваються переважно в клітинах, з багатою

цитоплазмою. Можна припускати, що такі клітини мають ембріогенні потенції ще до видалення 2,4-Д, однак за наявності цього чи інших ауксинів вони не реалізуються [41].

Важливість представників роду *Castanea* і перспективність їх багатоваріантного використання у горіхівництві, декоративному садівництві, фіто-меліорації та фармації і недостатня відпрацьованість способів вегетативного розмноження із включенням біотехнологічної ланки, зокрема соматичного ембріогенезу, спонукають до аналізу доступної інформації, а також проведення власних досліджень з метою вдосконалення технології і модифікування складу живильних середовищ для мікроклонування розмноження *C. sativa* як найбільш перспективного виду для вітчизняного горіхівництва.

#### Матеріали і методи досліджень

Вивчали ріст і розвиток зиготичних експлантів різної зрілості (30 і 55 діб після запліднення) у порівнянні з експлантами, виділеними із зародків горіхів у повній стиглості представників колекційного фонду *C. sativa* Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України (НДП «Софіївка»). Ембріональні осі (власне зиготичні зародки без сім'ядолей), які використовували за експланти, вирізали скальпелем із стерилізованих горіхів. Усі маніпуляції з експлантами виконували у ламінарній шафі. При цьому застосовували процедури, передбачені класичною схемою мікроклонування розмноження [42], що складається з декількох найбільш значимих етапів: підбір і підготовка стартового матеріалу; стерилізація; введення на живильне середовище; ініціація морфогенезу; адаптація пробіркових рослин до нестерильних умов *ex vitro* та дорощування [35, 39].

Для стерилізації експлантів використовували 2,5% гіпохлорит натрію (NaOCl), який отримували розведенням дистильованою водою (1:1) універсального миючого засобу торгової марки «БІЛИЗНА-ДЕЛЬФА» виробництва ПАТ «ДніпроАЗОТ» та 0,1% водного розчину дихлориду ртуті (HgCl<sub>2</sub>) при різних експозиціях. Зазначені концентрації продемонстрували свої переваги у багаторічних дослідках з різними рослинами, а видову специфічність *C. sativa* щодо жорсткості стерилізації експлантів, зокрема виділених з насіння зиготичних зародків, намагалися забезпечити підбором відповідної експозиції обробки. До кожного із реагентів додавали емульгатор «Твін 80», по дві

краплі на 1 л стерилізатора, що сприяло контакту стерилізатора з експлантами. Після обробки стерилізатором матеріал протягом 10–15 хв. тричі промивали дистильованою стерильною водою.

У виконаних на різних рослинних об'єктах попередніх дослідах було вивчено живильні середовища з макро- і мікроелементами за прописами Драйвера і Куніюкі (DKW), Кнудсона (Kn), Ллойда і Мак Коуна (WPM) та Мурасіге і Скуга (MS). Згадані базові середовища задля трофічної і фітогормональної оптимізації модифікували відповідно потреб *C. sativa* та специфіки окремих етапів мікроклонального розмноження (введення рослинного матеріалу *in vitro*, розмноження, ризогенез). У наступному зиготичні експланти культивували (субкультивували) на живильних середовищах MS [43] та DKW [44] з нашими модифікаціями, що стосувались їхнього складу, зокрема вмісту фітогормонів і окремих трофічних компонентів.

Виділені з горіхів зиготичні зародки вводили на відповідні живильні середовища та індукували розвиток мікропагонів. Надалі використовували для проліферації, пророщування і конверсійних досліджень матеріали брали із вторинних регенерантних ліній отриманих унаслідок послідовного субкультивування з 6-тижневими інтервалами. Всі культури інкубували за 16-годинного фотоперіоду під люмінесцентними лампами білого світла зі щільністю потоку фотонів  $30 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  та температурою повітря за світлового періоду  $25^\circ\text{C}$ , а темного —  $20^\circ\text{C}$ . Ефективність застосовуваних технологій мікроклонування *C. sativa* вивчали методом порівняльного аналізу результатів експериментальних і теоретичних досліджень, виконаних у різних країнах світу з різними рослинами [3, 35, 39–41, 45–87] та узагальненням отриманої інформації з матеріалами власних експериментів, що стосуються мікроклонального розмноження *C. sativa* через культуру зародків виділених з горіхів різної зрілості. Статистичний аналіз проводили за Фішером [88], перевірку гіпотез здійснювали на рівні значимості не менше 0,05 для двостороннього критерію.

### Результати досліджень та їх обговорення

Як засвідчили наші дослідження, головними параметрами, що визначали плин і результативність мікроклонального розмноження *C. sativa*, були генотип, вік і фізіологічний стан маточної рослини, з якої заготовляли матеріал для мікроклонування, тип експланта, стадія його розвитку, а також специфічність

взаємодії між певним середовищем і введеним *in vitro* експлантом (рис. 1).

Аналізуючи численні публікації, що стосуються соматичного ембріогенезу як способу вегетативного мікроклонального розмноження через зародкоподібні структури отримані асексуально із культивованих *in vitro* соматичних клітин, зазначимо два підходи [3, 39–41, 45]:

- ініціювання соматичного ембріогенезу безпосередньо з тканин введеного експланта, з якого внаслідок проліферації і морфогенезу утворюються ембріоїди (прямий ембріогенез);
- отримання калюсної тканини, в якій індукується диференціація калюсу, а вже потім формуються ембріоїди (непрямий ембріогенез).

Водночас зафіксовані факти і вторинного ембріогенезу, коли на поверхні ембріоїдів, що утворилися, з'являються додаткові (вторинні) ембріоїди [45].

Модель розвитку введених *in vitro* експлантів має видоспецифічний характер і залежить від складу живильних середовищ, зокрема балансу фітогормонів ауксинової і цитокінінової (іноді гіберелінової) природи та ряду зовнішніх чинників, умов культивування (спектру та інтенсивності освітлення, фотоперіоду, температури тощо) [36, 45–49].

Опубліковані багатьма дослідниками результати щодо мікроклонування *Castanea* [3, 35–38] та інших рослин [39–41, 43–45, 47–55] свідчать про різноманіття рослинних тканин і органів, що можуть бути використані за джерело експлантів. Йдеться про ембріони, ембріональні осі, сім'ядолі, листки, а також гіпокотиль, кореневі й стеблові апекси тощо. При цьому результативність мікроклонального розмноження визначається якістю стерилізації та складом живильних середовищ, що має відповідати сортовим і видовим особливостям розмножуваної рослини та специфіці завдання на кожному з етапів культивування [45].

Підбір і підготовка стартового матеріалу визначається метою, задля якої експланти вводяться *in vitro*, а також рівнями відпрацьованості методики для генотипів рослин, щодо яких бракує достовірної інформації стосовно способів мікроклонального розмноження, зокрема маніпуляцій з експлантами, прописів живильних середовищ для введення, проліферації, ризогенезу тощо [46]. Представники *Castanea*, і зокрема *C. sativa*, належать до рослин, способи мікроклонального розмноження яких недостатньо адаптовані щодо їхньої біології росту і розвитку,

хоча трапляються окремі публікації в Україні [23, 43] і дещо більше закордоном [3, 66, 69, 73–75, 77, 84, 85], однак у більшості зарубіжних публікацій йдеться не лише про *C. sativa*, а й про інші,

більш важливі для країн, у яких проводилися дослідження, види [35, 37, 38, 53, 55, 64–66, 72, 78, 83].



Рис. 1. Етапи мікроклонального розмноження і чинники результативності

При розмноженні деревних рослин живцями, і зокрема мікроживцями *in vitro*, вік і фізіологічний стан маточної рослини-донора експлантів загалом має схоже значення для всіх порід, що вивчалися в програмах з мікроклонального розмноження. Загальновідомо, що краще вкорінюються, а вкорінені живці успішніше розвиваються, якщо вони були нарізані з рослин ювенільного віку у фазу їхнього активного росту. *C. sativa*, як і решта видів деревних рослин, характеризується різними морфогенними потенціями на ювенільному і зрілому етапах онтогенезу. У культурі тканин, як і за вкорінювання живців в стандартних умовах, спроможність до вегетативного розмноження знижується зі збільшенням віку рослини-донора експлантів та/або живців від сходів до дорослого дерева. Вивчення

фізіологічних механізмів прояву переваг саме онтогенетично молодих рослин засвідчило, що їхня спроможність до морфогенної регенерації зумовлюється рівнями метилування ДНК. Впродовж нормального перебігу онтогенезу глобальне деметилування повторюваних послідовностей генома разом з локальним їх метилуванням відбувається хвилеподібно [85]. За залишками аденіну виявлено унікальну геномну організацію різних систем метилування ДНК у рослин [82]. Метилування ДНК полягає в приєднанні до цитозину метильної групи у складі CpG-динуклеотиду в позиції C5 цитозинового кільця. Метильований цитозин може згодом окислюватись відповідними ферментами, що зумовлює його наступне деметилування у цитозин. З кожним циклом метилування/деметилування спостерігається

поступове збільшення рівнів метилювання ДНК, що прогресує впродовж старіння дерев [58] з рівнобіжною втратою в процесі старіння морфогенної спроможності, зокрема регенерувати корені й нові стебла [80].

З'ясувалось, що напівздерев'янілі пагони сіянців *C. sativa* мають нижчий рівень метилювання (13,7%), порівняно зі здерев'янілими пагонами, в яких середній рівень метилювання ДНК становив 15,0%. Рівень метилювання ДНК пагонів у період спокою зростає до 23,0% незалежно від віку донорного дерева [58]. Розвиток генеративної сфери і запліднення відбувається разом з перебігом перехідного етапу деметилювання. Далі насінний розвиток супроводжується збільшенням метилювання ДНК. Саме на цьому ґрунтується пояснення ефективності індукування соматичного ембріогенезу з насінних зародків, коли внаслідок деметилювання зростає морфогенна спроможність і у циклах метилювання/деметилювання з'являються «вікна» для соматичного ембріогенезу. Тобто періоди зниження рівнів метилювання сприяють плюрипотентності [57], а отже, ініціюванню і проходженню соматичного ембріогенезу [85].

За свідченням І. В. Митрофанової (2009) [49] характерною особливістю зиготичних і соматичних зародків крупнонасінних субтропічних і тропічних видів є їх досить великі розміри. Встановлено, що такі зародки проростають в умовах *in vitro* тільки за повного їх дозрівання.

У наших дослідженнях щодо зв'язку розмірів горіхів і насінних зародків з рівнями стиглості насіння *C. sativa* з'ясувалось, що на 55 добу після запилення середній розмір горіха досягав 2,5–3,0 см у діаметрі, тоді як діаметр 30-добових горіхів був 1,5–2,0, а повністю сформованих — 3,0–4,0 см. Схожі співвідношення спостерігали при вимірюванні зародків: якщо 30-добові зародки були завдовжки 3–5 мм, то 55-добові — 7–10, а у повністю сформованих горіхах — 10–12 мм.

Стосовно зв'язку ступенів зрілості зиготичних експлантів з результативністю введення *in vitro* повідомлення різних авторів розходяться [35, 36, 38, 73–75, 83]. У наших дослідах ефективність введення 30-добових зародків була найнижчою і не перевищувала 59% у різні роки з горіхів від вільного запилення *C. sativa* 'Софіївський' (58,7; 58,9; 58,5; 58,8; 58,6; 58,6) зі зменшенням ефективності при введенні зародків від гейтоногамії *C. sativa* 'ДЕУ 890'×*C. sativa* 'ДЕУ 890' до

близько 20% (20,6; 20,4; 20,4; 20,1; 20,5; 20,3). У варіантах введення гібридних зародків *C. sativa* 'Софіївський'×*C. sativa* 'ДЕУ 890' ефективність введення була близько 60%, що дещо нижче, ніж за вільного запилення *C. sativa* 'Софіївський'. У варіантах вільного запилення *C. sativa* 'ДЕУ 890' ефективність введення 30-добових зародків була майже такою ж низькою, як при гейтоногамії цієї форми. Комбінація *C. sativa* 'УНС'×*C. sativa* 'ДЕУ 890' продемонструвала ефективність введення близько 49%. Припускаючи, що ефективність введення може свідчити про життєздатність зародка, можна вважати, що життєздатність зародків, які походять від материнської форми *C. sativa* 'Софіївський' вища, ніж матеріалів від *C. sativa* 'ДЕУ 890'.

Результативність введення зиготичних експлантів з 30-добових зародків була у 1,5–4,3 разів нижчою, ніж 55-добових зародків, що мало відрізняється від показників введення зародків зі стиглих горіхів.

Стерилізація стартового матеріалу належить до надзвичайно відповідальних етапів будь-якого способу мікроклонального розмноження [48], адже ефективність введення *in vitro* цілком залежить від схеми стерилізації і стерилізатора (типу реагенту, що стерилізує). Враховуючи те, що горіхи *C. sativa* були зібрані нами в умовах паркових насаджень, а на поверхні плодів каштану істотно априорі міститься велика кількість грибів, їхніх спор та бактерій, згідно рекомендацій О. В. Колесніченко зі співавторами (2007) горіхи перед виділенням зародків промивали проточною й дистильованою водою і обробляли у полум'ї спиртівки [23]. Для отримання стерильного матеріалу рекомендується підбирати такі композиції, що нейтралізують мікрофлору завдаючи при цьому мінімальну шкоду тканинам рослин [48], що й було зроблено у попередніх рекогносцирувальних дослідженнях на різних об'єктах.

Результати наших дослідів зі стерилізації зародків *C. sativa* (табл. 1) засвідчили, що ефективність стерилізації (вихід стерильних експлантів) з використанням як 2,5% гіпохлориту натрію, так і 0,1% дихлориду ртуті зростала зі збільшенням експозиції, що цілком закономірно. Однак стосовно виходу експлантів, що зберегли життєздатність, то у варіантах з 0,1% дихлоридом ртуті істотно кращою була експозиція 0,5 хв., тоді як за стерилізації 2,5% гіпохлоритом натрію найбільшу кількість життєздатних експлантів отримали у варіанті з обробкою зародків *C. sativa* впродовж 1,0 хв.

1. Вихід стерильних і життєздатних експлантів (зародків) *C. sativa* залежно від стерилізатора і експозиції стерилізації (2013–2014 рр.)

Стерилізатор і концентрація	Експозиція стерилізації, хв.	Стерильних експлантів, %	Життєздатних експлантів, %
Дихлорид ртуті (HgCl <sub>2</sub> ), 0,1%	0,3	68,0	37,0
	0,5	72,4	70,0*
	1,0	79,6*	56,7
	1,5	96,3*	1,7*
Гіпохлорит натрію (NaOCl), 2,5%	0,3	41,2	23,2
	0,5	56,8	48,3
	1,0	88,6*	86,0*
	1,5	91,8*	69,7

\*Примітка: різниця істотна за  $P < 0,05$

Підбір живильних середовищ і їх модифікування за мінеральним та/або гормональним складом при мікроклональному розмноженні будь-якої трав'янистої і деревної рослини, зокрема із застосуванням соматичного ембріогенезу, вважаються надзвичайно відповідальними завданнями [3, 35, 41, 43–46]. Саме вміст трофічних компонентів і регуляторів росту в живильних середовищах визначає їхнє функціонування як індукторів, інгібіторів чи тригерів різних етапів соматичного ембріогенезу. Незважаючи на визнані харчові і дієтичні властивості горіхів представників роду *Castanea*, їхню цінність для фармації, високу декоративність дерев та інші господарчо-корисні ознаки, а також дефіцит якісного садивного матеріалу цієї рослини, публікацій про успішне застосування техніки соматичного ембріогенезу для розмноження *Castanea* до недавнього часу було небагато [55], однак після повідомлення про індукування соматичних зародків у каштану їстівного з листових експлантів, опублікованого у 2003 р. Е. Цорредірою зі співавторами [37] їхня кількість суттєво зросла [3, 23, 35, 36, 58, 66, 77, 78, 84, 85].

Живильні середовища традиційно класифікуються за метою, для досягнення якої вони використовуються. Згідно такого підходу розрізняють середовища для введення, для проліферації, а також для морфогенезу (гемогенезу і ризогенезу). Відомі ще середовища для ініціювання соматичного ембріогенезу, для депонування тощо. На суттєві відмінності щодо генетичної стабільності у мікроклональних

лініях, отриманих внаслідок багаторазового субкультивування на твердих (агаризованих) і в рідких (суспензійних) культурах вказує В. А. Кунах. Істотні цитогенетичні відмінності спостерігались також за мікроклонування на однакових середовищах з різними джерелами вуглеводів (сахароза, лактоза), тривалості інтервалів між субкультивуваннями тощо [48].

Функції фітогормонів відрізняються від більшості гормонів, що функціонують в організмах тварин і людини. Характеризуючись плейотропними ефектами вони беруть участь у контролюванні і регулюванні процесів розвитку рослини у широкому діапазоні. Разом з тим, гормональні ефекти щодо будь-якого процесу розвитку рослини досить видоспецифічні. Наприклад, етилен інгібує ріст у дводольних і більшості однодольних, однак має промоторний прояв для багатьох водних рослин. Крім того, у багатьох обставинах два або більше гормонів можуть взаємодіяти синергічно або антагоністично, рівнобіжно впливаючи на біосинтез або метаболізм інших гормонів, унаслідок чого змінювати ендогенні баланси. Прогнозування можливих проявів фітогормонального модифікування живильних середовищ ускладнюється ще й тим, що світловий режим, якість води, поранення при виділенні експлантів, патогени тощо можуть змінювати гормональні відповіді введених *in vitro* матеріалів [61, 67, 81]. Тому відомі рекомендації щодо регулювання росту калюсу, ризо- і гемогенезу за допомогою зміщення фітогормонального балансу [48] потребують конкретизації і емпіричного підбору в багаторазових



«спробах і помилках» стосовно кількості ауксинів і цитокінінів і їх якісного складу.

Характерно, що рівні ендогенної  $\beta$ -індолил-оцтової кислоти (ІОК) у мікропагонах *C. sativa* поступово зростали після кожного пасажу спонтанно, тоді як вміст абсцизової кислоти (АБК), цитокінінів і гиббереллової кислоти (ГКЗ) знижувався у послідовних субкультурах, що стимулювало коренеутворення.

З-поміж вивчених нами середовищ для введення зиготичних зародків *in vitro* кращі результати було отримано у варіантах DKW 10 і MS 3 та MS 19. Модифіковане середовище DKW 10 додатково (порівняно з базовим) містило аскорбінову кислоту (вітамін С — 1,0 мг/л) та 0,5 мг/л амінокислоти аденін ( $C_5H_5N_5$ ), а також 0,5 мг/л 6-бензіламінопурін (6-БАП), що належить до синтетичних цитокінінів пуринової природи, і 0,08 мг/л ауксину — індолімасляної кислоти (ІМК) та 0,05 мг/л гібереллової кислоти (ГКЗ).

Модифіковане середовище MS 3 готували з половинним вмістом основних макро- і мікроелементів та половинною кількістю сахарози (15000 мг/л), передбачених прописом базового середовища MS, однак при приготуванні модифікованого середовища було зменшено вдвічі (порівняно зі складом базового) вміст гліцину (2-амінооцтової кислоти,

$NH_2CH_2COOH$ ) до 1,0 мг/л. Крім того до середовища MS 3 введено 1,0 мг/л (подвійну кількість) ніотинової кислоти (вітамін РР), а також збільшено вміст тіаміну (вітамін В1) до 1,0 мг/л та додано 6-БАП (1,0 мг/л).

Відповідно модифіковане середовище MS 19, як і вищеописане MS 3, готували також з половинним вмістом основних макро- і мікроелементів та половинною кількістю сахарози, однак було додано 0,5 мг/л аденіну.

Середовища для проліферації і вкорінення відрізняються насамперед за балансами фітогормонів ауксинової і цитокінінової природи. Зважаючи на те, що у процесі нормального росту і розвитку рослин утворюються вторинні метаболіти, до яких належать ауксини і цитокініни, які сприяють взаємозв'язку між клітинами, тканинами і органами, регулюючи і стимулюючи їхній ріст і розвиток [48, 56], ці природні сполуки і їх синтетичні аналоги включають до складу живильних середовищ з метою регулювання морфогенезу. З-поміж вивчених модифікацій живильних середовищ кращим для проліферації (власне розмноження) зиготичних експлантів *C. sativa* виявилось середовище MS 6 (табл. 2), на якому було досягнуто найвищих коефіцієнтів розмноження, що становив у різні сезони від 8 до 15 за один пасаж.

2. Склад середовища для вкорінення мікроклонів *C. sativa* порівняно з середовищем для розмноження, мг/л

Середовище для розмноження MS 6		Середовище для вкорінення MS 25
Макроелементи — 1/2 MS		
Мікроелементи — 1/2 MS		
Вітаміни		
Тіамін-НСІ (В <sub>1</sub> )	1,0	1,0
Піридоксин-НСІ (В <sub>6</sub> )	0,5	0,5
Ніотинова к-та (РР)	0,5	0,5
Амінокислоти		
Гліцин (2-амінооцтова кислота)	1,0	1,0
Регулятори росту		
6-БАП	1,0	—
ІОК	—	0,5
НОК	—	1,0
Джерело вуглеводнів		
Сахароза	30000,0	20000,0

Переваги цього живильного середовища можна пояснювати оптимальним вмістом 6-БАП і відсутністю ауксинів, завдяки чому знімалось апікальне домінування, пробуджувались бічні бруньки, що сприяло збільшенню коефіцієнтів розмноження.

Модифіковане середовище MS 25, на якому найактивніше відбувався ризогенез, відрізнялось від середовища для проліферації лише зменшенням до 20 г/л сахарози та складом регуляторів росту. З його складу було вилучено 6-БАП і додатково

введено 0,5 мг/л ІОК та 1,0 мг/л НОК, унаслідок чого було досягнуто коренеутворення у 90,3% живців.

Пересаджування пробіркових рослин в умови переважно автотрофного живлення *ex vitro* належить також до надзвичайно відповідальних етапів. Річ у тім, що між корінням, стеблами і листками рослин на етапах *in vitro* і після пересаджування *ex vitro* спостерігаються суттєві анатомічні та гістологічні відмінності (табл. 3).

### 3. Анатомічні та гістологічні відмінності між корінням, стеблами і листками рослин *in vitro* і після пересаджування *ex vitro* (за Ziv M. and J. Chen, 2008 [87] зі змінами)

Органи і тканини	<i>In vitro</i>	<i>Ex vitro</i>
Корені	тоненькі, часто мало розгалужені	розвинена коренева система
епідерміс	однорядний	одно- та багаторядний
перидерм	обмежений	багатошаровий
кора	рихла, складається з нерегулярно збільшених, гіпертрофованих окремих клітин та численних міжклітинних просторів; вільна організація коркової паренхіми; часто містить пластиди з хлорофілом та іншими пігментами, а також крохмальні зерна	сформована з клітин основної меристеми і характеризується одномірною компактною організацією клітин
судинні пучки	вузькі, недорозвинені, обмежують функціонування вторинного камбію	забезпечують нормальне функціонування камбію
ксилема і флоема	слабко розвинені; декілька розкиданих ксилемних пучків зі змінним характером стели; відсутня або недостатньо розвинена вторинна ксилема; флоема часто містить пластиди з хлорофілом й іншими пігментами та крохмальні зерна	розвинена вторинна ксилема з 5–8-полюсами закладання стели
кореневі волоски	у невеликій кількості або відсутні, а ті, що є, здебільшого товсті й короткі, що утруднює поглинання і транспорт води і водорозчинних елементів живлення	довгі, тоненькі, волокнисті здатні нормально виконувати всисну і видільну функції
Стебла	малого діаметру	великого діаметру
епідерміс	обмежений розвиток	повний розвиток
кора	обмежений розвиток, небагато коленхіми, невелика кількість склеренхімних волокон; є крохмальні зерна в розвиненому стеблі	повний розвиток з безперервним циліндром коленхіми
судинні пучки	слабо розвинені; знижена або відсутня активність камбію; в судинних пучках спостерігається велика кількість крохмальних зерен	повний розвиток
ксилема і флоема	у щільній флоемі цитоплазматичної паренхіми часто ініціюється коріння; крохмальні зерна можна спостерігати в паренхіматозних клітинах ксилеми і флоєми на ранніх стадіях	товсті шари склеренхіми в флоемі стели
паренхіма	обмежений розвиток, має лише тонкі клітинні стінки; у стовбурах можна спостерігати крохмальні зерна	повний розвиток, має тонкі й товсті клітинні стінки
калюс	часто супроводжує ризогенез	зазвичай не утворюється
Листки	малого розміру з недорозвиненою восковою кутикулою	повний розвиток
продихи	широко розкриті	повністю або частково закриті

Описана Анабелю Мартін зі співавторами і перевірена нею в багаторічних дослідах техніка мікоризації [62, 63] заслуговує окремого аналізу.

У цитованих дослідженнях було вивчено мікоризні потенціали чотирьох видів вищих грибів *Amanita muscaria* Hooker, *Laccaria laccata* (Scop. ex Fr.)

Berk and Br., *Piloderma croceum* Erikss and Hjortst та *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker and Couch щодо спроможності колонізувати коріння розмножених і вкорінених *in vitro* рослин *C. sativa*. Для цього агарове модифіковане для вкорінення MS середовище розливали у чашки Петрі діаметром 13 см,

які в міру застигання агару розташовували під кутом 60° до горизонталі у спеціальні штативи (рис. 2). За три тижні до пересаджування в середовище вводили мікоризу грибів, стимулювальний ефект яких вивчався.

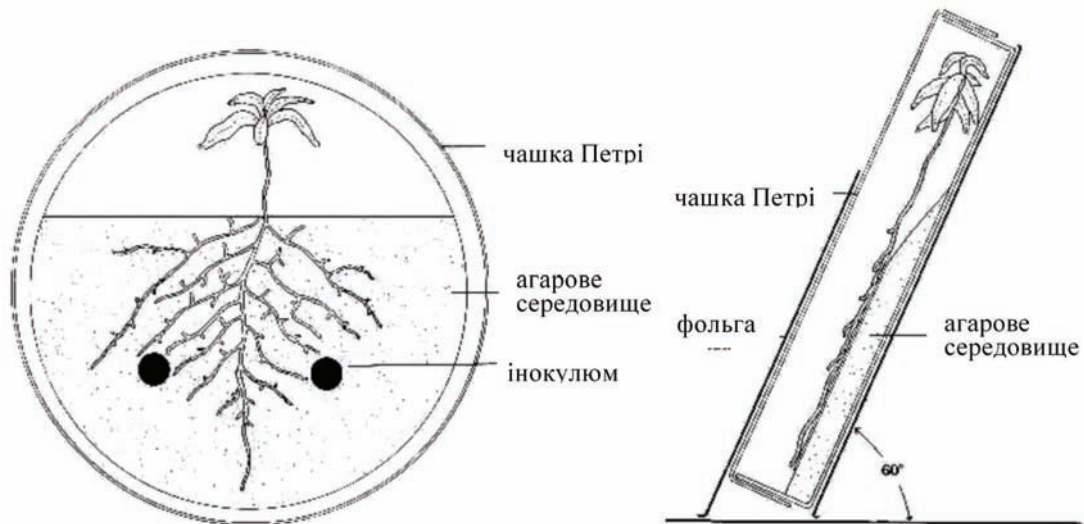


Рис. 2. Розташування вкорінених пробіркових рослин *C. sativa* у чашки Петрі при пересаджуванні їх на агарове середовище інокульоване аксенічною мікоризою (за Anabela Martins, 2008 [63])

Перед інокуляцією контролювали відсутність конденсату рідини на внутрішній поверхні кришок. За контроль використовували такі самі чашки Петрі з немікоризованим середовищем. Після пересаджування вкорінених пробіркових рослин їхню кореневу систему затіяли алюмінієвою фольгою, щоб запобігти фото-окисленню.

З'ясувалось, що вивчені впродовж 90 діб з моменту інокуляції гриби відрізнялись за спроможністю колонізувати коріння каштана і, відповідно, за стимулюванням розвитку кореневої системи. Пересаджені у чашки Петрі пробіркові рослини мали тонькі корінці білого кольору і без корневих волосків. У варіанті з *P. tinctorius* уже на п'яту добу контакту з мікоризованим середовищем спостерігався розвиток кореня і ініціація корневих волосків, а на 20 добу рослини *C. sativa* формували добре розгалужену кореневу систему. При цьому активно росли стебла і листя [63].

### Висновок

Отже, проведений аналіз літературних джерел і результатів власних спостережень дає підстави

рекомендувати впровадження представників роду *Castanea* Mill., зокрема *Castanea sativa* Mill. з визначеними харчовими і дієтичними властивостями горіхів, в Україні.

Очікуване підвищення ефективності мікроклонального розмноження представників *C. sativa* можна пов'язувати з удосконаленням технології адаптації вкорінених пробіркових рослин не лише до нестерильних умов *ex vitro*, а також з пошуком заходів стимулювання їх росту і розвитку у незвичних для вкорінених *in vitro* рослин температурних умовах, нестабільного гідрорежиму й фотоперіоду, домагаючись відновлення порушеного в лабораторних умовах гомеостазу і біологічної рівноваги.

Проведення у більш широких обсягах заслуговують дослідження з ініціювання соматичного ембріогенезу *Castanea*, зокрема щодо пошуку можливостей розробки технології отримання ембріодів для створення *in vitro* штучного насіння.

### Перелік посилань

1. Опалко А.И. Проблемы сохранения генетического разнообразия растительных ресурсов в третью эпоху глобализации / А.И. Опалко // Состояние

- горных и склоновых земель Северо-Кавказского федерального округа и проблемы сохранения плодородия почв, развития систем земледелия, лугопастбищного хозяйства, животноводства на ландшафтной и ресурсосберегающей основе: матер. совещан. Россельхозакадемии, Отделение земледелия, ГНУ Северо-Кавказский научно-исследовательский институт горного и предгорного сельского хозяйства. — Владикавказ: ИПК Литера, 2012. — С. 146–147.
2. Опалко А. І. Антропоадаптивність рослин як базисний компонент нової хвилі «зеленої революції» / А. І. Опалко // Генетика і селекція: досягнення та проблеми: тези доп. міжнарод. наук. конференції (м. Умань, 18–20 березня 2014 р.) / [Редкол.: О. О. Непочатенко (відп. ред.) та ін.]. — Умань: УНУС, 2014. — С. 84–87.
  3. Vieitez A. M. Protocol for micropropagation of *Castanea sativa* / A. M. Vieitez, M. C. Sánchez, M. L. García-Nimo and A. Ballester // Protocols for micropropagation of woody trees and fruits / [Eds. S. Mohan Jain and H. Häggman]. — Dordrecht: Springer, 2007. — Ch. 28. — P. 299–312.
  4. Опалко А. И. Влияние экзогенной ДНК на антропоадаптивность озимой пшеницы / А. И. Опалко, И. К. Котко // Селекционно-генетические методы повышения продуктивности культурных растений. — Умань: УСХИ, 1989. — С. 11–15.
  5. Opalko A. I. Wykorzystanie obcego DNA dla uzyskania antropoadaptacyjnych mutacji pozenicy ozimej / A. I. Opalko, I. K. Kotko // Hodowla roślin i nasiennictwo (Biuletyn branżowy). — № 2. — 1992. — S. 1–4.
  6. Опалко А. І. Проблема збереження рослинних генетичних ресурсів / А. І. Опалко, О. А. Опалко // Зб. наук. праць Млївського ІС ім. Л. П. Симиренка та УСГА. — Млїв; Умань, 2000. — С. 10–13.
  7. Опалко О. А. Проблеми охорони генетичного різноманіття рослинних ресурсів / О. А. Опалко, А. І. Опалко // Екологічна наука і освіта в педагогічних вузах України: матер. Всеукр. наук. конф. — К.: Наук. світ, 2000. — С. 155–157.
  8. Арент К. П. Экономические аспекты экологизации развития народного хозяйства / К. П. Арент; [Монография]. — М.: МГУ природопользования, 2001. — 193 с.
  9. Гулінчук Р. М. Проблеми формування і використання потенціалу земель сільськогосподарського призначення / Р. М. Гулінчук // Інноваційна економіка. — 2012. — № 6 (32). — С. 102–105.
  10. Жученко А. А. Мобилизация мировых генетических ресурсов и средоулучшающие фитотехнологии: Учеб. пособие / Александр Александрович Жученко (мл.). — М.: Рос. ун-т дружбы народов, 2007. — 149.
  11. Berger P. L. The social construction of reality: A treatise in the sociology of knowledge / Peter L. Berger and Thomas Luckman. — London et al.: Penguin Books Ltd, 1991. — 251 p.
  12. Dumont F. A History of personality psychology: Theory, science, and research from hellenism to the twenty-first century / Frank Dumont. — Cambridge: Cambridge University Press, 2010. — 559 p.
  13. Hergenhahn B. R. An introduction to the history of psychology / B. R. Hergenhahn. — Belmont (CA) et al.: Cengage Learning, 2013. — 720 p.
  14. Опалко А. И. Антропоадаптивность растений как базисный компонент рационального использования земельных ресурсов / А. И. Опалко // Развитие регионов в XXI веке: мат. I Международ. науч. конф.: Сев. — Осет. гос. ун-т им. К. Л. Хетагурова. (31 октября–2 ноября 2013 г.) [Под об. ред. В. Г. Созанова]. — Владикавказ: ИПЦ СОГУ, 2013. — Часть I. — С. 348–354.
  15. Гавриленко О. П. Екогеографія України: навч. посібник: рек. МОНУ / О. П. Гавриленко. — К.: Знання, 2008. — 646 с.
  16. Медведєв В. В. Стан робіт з моніторингу ґрунтів в Україні / В. В. Медведєв, Т. М. Лактіонова // Еколог. вісн. — К.: Всеукр. еколог. ліга, 2003. — С 8–10.
  17. Національна доповідь про стан навколишнього природного середовища в Україні у 2000 році. — К.: Мінекономресурсів, 2001. — 184 с.
  18. Олійник Я. Б. Основи екології: підручник / Я. Б. Олійник, П. Г. Шищенко, О. П. Гавриленко. — К.: Знання, 2012. — 558 с.
  19. Coughenour C. M. Conservation tillage and cropping innovation constructing the new culture of agriculture / C. Milton Coughenour and Shankariah Chamala. — Ames: Iowa State University Press, 2000. — 360 p.
  20. Vandermeer J. The ecology of agroecosystems / John Vandermeer. — Sudbury (Massachusetts) et al.: Jones and Bartlett Publishers, LLC, 2011. — 387 p.
  21. Опалко А. І. Необхідність збагачення різноманіття генотипів садових рослин в Україні / А. І. Опалко // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. — 2012. — Вип. 3 (13). — С. 35–39.
  22. Klymenko S. Non-traditional fruits and berry plants in the Register of sorts of plants of Ukraine / S. Klymenko, J. Brindza, O. Grygorieva // Bezpečnost a kvalita potravín — Nitra, 2010, S. 244–247.
  23. Колесніченко О. В. Біолого-екологічні системи

- стійкості та адаптації рослин *Castanea sativa* Mill.: О. В. Колесніченко, І. П. Григорюк, С. М. Грисюк; [Монографія]. — К.: Компрінт, 2012. — 334 с.
24. Дорошенко О. Інтродукція і можливості використання *Castanea sativa* Mill. та *Corylus colurna* L. в Україні / О. Дорошенко, Н. Трофименко // Інтродукція та збереження рослинного різноманіття // Вісник Київського нац. ун-ту ім. Т. Г. Шевченка. — 2009. — № 20. — С. 101–102.
  25. Якубовська Є. Б. Інтродукція каштана посівного (*Castanea sativa* Mill.) в умовах Чернівецької області / Є. Б. Якубовська, Н. М. Шумко // Клінічна та експериментальна патологія. — 2014. — Т. 13, № 1 (47). — С. 202–205.
  26. Bounous G. The chestnut: a multipurpose resource for the new millennium / G. Bounous // Acta Horticulturae (III International chestnut congress). — 2005. — Vol. 693, p. 33–40.
  27. Bounous G. Chestnut: botany, horticulture, and utilization / Giancarlo Bounous and Daniela Torello Marioni // Horticultural Reviews / [Ed. Jules Janick]. — 2005. — Vol. 31, Ch. 6. — P. 291–347.
  28. The Plant List by the Royal Botanic Gardens Kew and Missouri Botanical. — 2014. URL: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Fagaceae/Castanea/#statistics> (Дата звернення: 17.08.2014).
  29. Shaw J. Phylogeny and phylogeography of North American *Castanea* Mill. (Fagaceae) using cpDNA suggests gene sharing in the southern appalachians (*Castanea* Mill., Fagaceae) / Joey Shaw, J. Hill Craddock, Meagan A. Binkley // *Castanea*. — 2012. — Vol. 77, № 2. — P. 186–211.
  30. Вергун О. М. Біохімічний склад плодів деяких нетрадиційних плодкових культур / О. М. Вергун, Д. Б. Рахметов, С. В. Клименко, О. В. Григор'єва // Лікарське рослинництво: від досвіду минулого до новітніх технологій: матер. Міжнарод. наук-практич. інтернет-конф. (Полтавська державна аграрна академія, травень 2012). — Полтава, 2012. — С. 13–19 с.
  31. Адаменко В. Д. Колекція роду *Castanea* Mill. Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України / В. Д. Адаменко // Інтродукція та досвід паркобудівництва в Степовій зоні України: міжнар. наук. конф., присвяч. 125-річчю дендропарку «Асканія Нова» (Асканія Нова, 23–25 травня 2012 р.): Вісті Біосферного заповідника «Асканія Нова» (Спецвипуск). — 2012. — Т. 14 — С. 24–26.
  32. Акимов И. А. Биология каштановой минирующей моли *Cameraria ohridella* (Lepidoptera, Gracillariidae) в Украине. Сообщение 2 / И. А. Акимов, М. Д. Зерова, Н. Б. Нарольский и др. // Вестн. зоологии. — 2006. — Т. 40, № 4. — С. 321–332.
  33. Yildiz, M. U. Physicochemical properties of wild chestnut (*Castanea sativa* Mill.) fruit grown in Turkey / M. U. Yildiz, M. M. Özcan, S. Çalışır et al. // World Applied Sciences Journal. — 2009. — Vol. 6, № 3. — P. 365–372.
  34. Barreira J. C. M. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit / João C. M. Barreira, Isabel C. F. R. Ferreira, M. Beatriz P. P. Oliveira and José Alberto Pereira // Food Chemistry. — 2008. — Vol. 107. — P. 1106–1113.
  35. Corredoira E. Somatic embryogenesis in chestnut / E. Corredoira, A. Ballester, F. J. Vieitez and A. M. Vieitez // Somatic embryogenesis. Plant cell monographs [Eds. A. Mujib and J. Šamaj]. — Berlin: Springer-Verlag Heidelberg, 2006. — P. 177–199.
  36. Колесніченко О. В. Біотехнологічні аспекти введення в культуру *in vitro* каштана їстівного (*Castanea sativa* Mill.) / О. В. Колесніченко, А. А. Кловаденко, М. Д. Мельничук та ін. // Доповіді НАН України. — 2007. — № 5. — С. 159–164.
  37. Corredoira E. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants / Elena Corredoira, Antonio Ballester and Ana M. Vieitez // Annals of Botany. — 2003. — Vol. 92, № 1. — P. 129–136.
  38. Corredoira E. Improved germination of somatic embryos and plant recovery of European chestnut / Elena Corredoira, Silvia Valladares, Ana M. Vieitez and Antonio Ballester // *In vitro* cellular and developmental biology — Plant. — 2008. Vol. 44, № 4. — P. 307–315.
  39. Terzi M. Somatic embryogenesis / M. Terzi, F. Lo Schiavo // Plant tissue culture: Applications and limitations [Ed. Sant Saran Bhajwani]. — Amsterdam: Elsevier, 1990. — Ch. 3. — P. 54–66.
  40. Halperin W. Ultra-structure changes during growth and embryogenesis on carrot cell cultures / W. Halperin and W. A. Jensen // Journal of Ultrastructure Research. — 1967. — Vol. 18. — P. 428–443.
  41. Gorst J. Ionic currents traversing cell clusters from carrot suspension cultures reveal perpetuation of morphogenetic potential as distinct from induction of embryogenesis / Janet Gorst, Robyn L. Overall, Wolfgang Wernicke // Cell Differentiation. — 1987. — Vol. 21, № 2. — P. 101–109.
  42. Beyl C. A. Getting started with tissue culture-media preparation, sterile technique and laboratory equipment / Caula A. Beyl // Plant propagation concepts and laboratory exercises, Second edition [Eds. Caula A. Beyl, Robert N. Trigiano]. — Boca Raton: CRC Press, 2014. — Ch. 31 — P. 371–384

43. *Murashige T.* Revised Medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture / Toshio Murashige, Folke K. Skoog // *Physiol. Plant.* — 1962. — Vol. 15. — P. 473–497.
44. *Driver J. A.* *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock / John A. Driver, Andrew H. Kuniyuki // *Hort. Science.* — 1984. — Vol. 19, № 4. — P. 507–509.
45. Лаврентьева А. Використання біотехнологічних методів розмноження декоративних інтродуцентів / А. Лаврентьева // *Вісник Львівського ун-ту.* — 2004. — Серія біологічна, Вип. 36. — С. 137–145.
46. Барсукова О. Н. Генотип роду *Malus* Mill. и его иммунологическая характеристика для целей селекции / (Дисс. в ф-ме науч. докл. ... д-ра с. — х. наук). — СПб., 1993. — 48 с.
47. Косенко І. С. Регенерація рослин у процесі мікроклонального розмноження / І. С. Косенко, А. І. Опалко, М. В. Небиков // Автохтонні та інтродуковані рослини: Зб. наук. праць НДП «Софіївка» НАН України. — 2008. — Вип. 3–4. — С. 57–67.
48. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
49. Митрофанова И. В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений / И. В. Митрофанова // *Физиология и биохимия культ. растений.* — 2009. — Т. 41, № 6. — С. 496–509.
50. Сербін А. Г. Біотехнологія лікарських рослин / А. Г. Сербін, Л. М. Сіра, Т. О. Слободянюк // *Фармацевтична ботаніка; підруч. за ред. Л. М. Сірої.* — Вінниця: Нова книга, 2007. — С. 134–137.
51. Тюкавин Г. Б. Основы биотехнологии моркови / Г. Б. Тюкавин; [Монография]. — М.: ВНИИССОК, 2007. — 480 с.
52. Шевелуха В. С. Сельскохозяйственная биотехнология: Учебник / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. З. Кочиева и др.; 3-е изд., перераб. и доп. [Под ред. В. С. Шевелухи.]. — М.: Высш. шк., 2008. — 710 с.
53. Andrade G. M. Enhancement of American chestnut somatic seedling production / G. M. Andrade, S. A. Merkle // *Plant Cell Reports.* — 2005. — Vol. 24, № 6. — P. 326–334.
54. Beyl C. A. Juvenility and its effect on macro- and micropropagation / Caula A. Beyl // *Plant propagation concepts and laboratory exercises; second edition* [Eds. Caula A. Beyl, Robert N. Trigiano]. — Boca Raton: CRC Press, 2014. — Ch. 6. — P. 85–94.
55. Carraway D. T. Plantlet regeneration from somatic embryos of American chestnut / Daniel T. Carraway, Scott A. Merkle // *Canadian Journal of Forest Research.* — 1997. — Vol. 27, № 11. — P. 1805–1812.
56. Goh T. Systems biology approaches to understand the role of auxin in root growth and development / Tatsuaki Goh, Ute Voß, Etienne Farcot et al. // *Physiologia Plantarum.* — 2014. — Vol. 151, № 1. — P. 73–82.
57. Hajkova P. Epigenetic reprogramming in the germline: towards the ground state of the epigenome / Petra Hajkova // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.* — 2011. — Vol. 366, № 1575. — P. 2266–2273.
58. Hasbún R. *In vitro* proliferation and genome DNA methylation in adult chestnuts / R. Hasbún, L. Valledor, M. Berdasco et al. // *Acta Horticulturae (III International chestnut congress).* — 2005. — Vol. 693. — P. 333–340.
59. Kane M. E. Micropropagation / Michael E. Kane, Philip Kauth and Scott Stewart // *Plant propagation concepts and laboratory exercises, second edition* / [Eds. Caula A. Beyl, Robert N. Trigiano]. — Boca Raton: CRC Press, 2014. — Ch. 30 — P. 359–370.
60. Lau S. Early embryogenesis in flowering plants: Setting up the basic body pattern / S. Lau, D. Slane, O. Herud, J. Kong, G. Jürgens // *Annual Review of Plant Biology.* — 2012. — Vol. 63. — P. 483–506.
61. Machakova Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors / I. Machakova, E. Zazimalova and E. F. George // *Plant propagation by tissue culture* / [Eds. Edwin F. George, Michael A. Hall and Geert-Jan De Klerk]. — Dordrecht: Springer, 2008. — Ch. 5. — P. 175–204.
62. Martins A. Influence of mycorrhization on physiological parameters of micropropagated *Castanea sativa* Mill. plants / A. Martins, A. Casimiro and M. S. Pais // *Mycorrhiza.* — 1997. — Vol. 7, № 3. — P. 161–165.
63. Martins A. *In vitro* mycorrhization of micropropagated plants: studies on *Castanea sativa* Mill. / Anabela Martins // *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry* / [Eds. Zaki Anwar Siddiqui, Mohd. Sayeed Akhtar and Kazuyoshi Futai]. — Dordrecht: Springer, 2008. — Ch. 14. — P. 321–336.
64. Merkle S. A. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning / S. A. Merkle, W. A. Parrott, E. G. Williams // *Plant tissue culture: Applications and limitations* [Ed. Sant Saran Bhajwani]. — Amsterdam: Elsevier, 1990. — Ch. 4. — P. 67–101.
65. Merkle S. A. Forest tree biotechnology / Scott A. Merkle, Jeffrey F. D. Dean // *Current opinion in biotechnology.* — 2000. — Vol. 11, № 3. — P. 298–302.
66. Miranda-Fontañá M. E. Effect of genotype on micropropagation and post-propagation growth of 35

- commercial clones of *Castanea* sp. / M. E. Miranda-Fontañña J. Fernández-López // *Acta Horticulturae* (III International chestnut congress). — 2005. — Vol. 693. — P. 313–320.
67. *Moshkov* Plant growth regulators III: Gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors; miscellaneous compounds / I. E. Moshkov, G. V. Novikova, M. A. Hall and E. F. George // *Plant propagation by tissue culture* / [Eds. Edwin F. George, Michael A. Hall and Geert-Jan De Klerk]. — Dordrecht: Springer, 2008. — Ch. 7. — P. 227–282.
68. *Nelson C. D.* Biotechnology of trees: Chestnut / C. D. Nelson, W. A. Powell, S. A. Merkle et al. // *Tree biotechnology* [Eds. K. G. Ramawat, Jean-Michel Mérillon, M. R. Ahuja]. — Boca Raton: CRC Press, 2014. — Ch. 1 — P. 3–35.
69. *Piagnani C.* Somatic embryogenesis in chestnut / C. Piagnani, T. Eccher / *Proceedings of the first ISHS symposium on in vitro culture and horticultural breeding* (Cesena, Italy, 30 May–3 June 1989) [Eds. J. Janick, R. H. Zimmerman] // *Acta Horticulturae*. — 1990. — Vol. 280. — P. 159–161.
70. *Pijut P. M.* Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity / Paula M. Pijut, Shaneka S. Lawson and Charles H. Michler // *In vitro cellular and developmental biology — Plant*. — 2011. — Vol. 47. — P. 123–147.
71. *Raemakers K.* Proliferative somatic embryogenesis in woody species / K. Raemakers, E. Jacobsen, R. Vissler // *Somatic embryogenesis in woody plants* [Eds. S. M. Jain, P. K. Gupta, R. J. Newton]. — Dordrecht: Kluwer, 1999. — Vol. 4. — P. 29–59.
72. *Robichaud R. L.* Treatments effecting maturation and germination of American chestnut somatic embryos / Rodney L. Robichaud, Veronica C. Lessard, Scott A. Merkle // *Journal of Plant Physiology*. — 2004. — Vol. 161, № 8. — P. 957–969.
73. *Şan B.* Somatic embryogenesis from immature cotyledons of some European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars / Bekir Şan, Mehmet Sezgin, Hatice Dumanoglu, A. İlhami Köksal // *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. — 2007. — Vol. 31, № 3. — P. 175–179.
74. *Sauer U.* Somatic embryogenesis from ovaries, developing ovules and immature zygotic embryos, and improved embryo development of *Castanea sativa* / U. Sauer, E. Wilhelm // *Biologia Plantarum*. — 2005. — Vol. 49, № 1. — P. 1–6.
75. *Sezgin M.* Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledons of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) / Mehmet Sezgin, Hatice Dumanoglu // *In vitro Cellular and Developmental Biology — Plant*. — 2014. — Vol. 50, № 1. — P. 58–86.
76. *Skirvin R. M.* Chimeras / Robert M. Skirvin and Margaret A. Norton // *Plant Propagation Concepts and Laboratory Exercises, Second Edition* [Eds. Caula A. Beyl, Robert N. Trigiano]. — Boca Raton: CRC Press, 2014. — Ch. 7 — P. 95–108.
77. *Tafazoli M.* Plant regeneration through indirect organogenesis of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) / Mehrcekeh Tafazoli, Seyed Mohammad Hosseini Nasr, Hamid Jalilvand and Dariush Bayat // *African Journal of Biotechnology*. — 2013. — Vol. 12 (51). — P. 7063–7069.
78. *Tetsumura K.* Micropropagation of Japanese chestnut (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.) seedlings / Takuya Tetsumura, Kensuke Yamashita. — *HortScience*, 2004. — Vol. 39, № 7. — P. 1684–1687.
79. *Tripepi R. R.* Micropropagation of Woody Plants / Robert R. Tripepi // *Plant propagation concepts and laboratory exercises, Second edition* [Eds. Caula A. Beyl, Robert N. Trigiano]. — Boca Raton: CRC Press, 2014. — Ch. 34. — P. 405–416.
80. *Valledor L.* Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation / Luis Valledor, Rodrigo Hasbún, Mónica Meijón et al. // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. — 2007. — Vol. 91, № 2. — P. 75–86.
81. *Van Staden J.* Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists / J. van Staden, E. Zazimalova and E. F. George // *Plant propagation by tissue culture* / [Eds. Edwin F. George, Michael A. Hall and Geert-Jan De Klerk]. — Dordrecht: Springer, 2008. — Ch. 6. — P. 205–226.
82. *Vanyushin B. F.* DNA methylation in higher plants: Past, present and future / Boris F. Vanyushin, Vasili V. Ashapkin // *BBA — Gene Regulatory Mechanisms*. — 2011. — Vol. 1809, № 8. — P. 360–368.
83. *Viéitez F. J.* *Castanea* spp. / F. Javier Viéitez and Scott A. Merkle // *Biotechnology of fruit and nut crops* / [Ed. R. E. Litz]. — Cambridge, MA: CABI Publishing, 2007. — *Biotechnology in Agriculture, Series 29*, Ch. 9.1. — P. 265–296.
84. *Viéitez F. J.* Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos in chestnut / F. J. Viéitez, M. C. San Jose, A. Ballester, A. M. Viéitez. — *Journal of Plant Physiology*. — 1990. — Vol. 136, № 2. — P. 253–256.
85. *Viejo M.* DNA methylation during sexual embryogenesis and implications on the induction of somatic embryogenesis in *Castanea sativa* Miller / M. Viejo, R. Rodríguez, L. Valledor et al. // *Sexual plant reproduction*. — 2010. — Vol. 23, № 4. — P. 315–323.
86. *Wabnik K.* Modeling framework for the establishment

of the apical-basal embryonic axis in plants / Krzysztof Wabnick, Hélène S. Robert, Richard S. Smith, Jiří Friml // Current biology. — 2013. — Vol. 23, № 24. — P. 2513–2518.

87. Ziv M. The anatomy and morphology of tissue cultured plants / M. Ziv and J. Chen // Plant propagation by tissue culture / [Eds. Edwin F. George, Michael A. Hall and Geert-Jan De Klerk]. — 2008. — Vol. 1. The Background, Ch. 13. — P. 465–478.
88. Fisher R.A. Statistical methods for research workers / Ronald A. Fisher. — New Delhi: Cosmo Publications, 2006. — 354 p.

А. И. Опалко<sup>1,2</sup>, В. Д. Адаменко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный дендрологический парк «Софиевка» НАН Украины

<sup>2</sup>Уманский национальный университет садоводства

### ИНДУЦИРОВАНИЕ МОРФОГЕНЕЗА *IN VITRO* У ЗИГОТИЧЕСКИХ ЭКС- ПЛАНТОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *CASTANEA* MILL.

Обобщены данные литературных источников касающиеся ценности представителей рода *Castanea* Mill. с точки зрения решения проблемы рационального использования и охраны генетического разнообразия растительных ресурсов, пополнения сортирента орехоплодных культур в Украине за счет интродукции новых сортов *Castanea sativa* Mill. с определенными пищевыми и диетическими свойствами орехов, ценностью для фармации плодов и всего растения, высокой декоративностью деревьев, их фитомелиоративной эффективностью и качеством древесины, а также перспективы вовлечения в каштанокультуру других видов рода. Констатируется, что до недавнего времени усилия ученых, направленные на популяризацию каштана съедобного в Украине тормозились мнением о якобы недостаточной адаптивности его растений к агроэкологическим условиям, в частности условиям зимовки, и консервативностью потребителя, непривыкшего использовать как собственно орехи каштана, так и продукты их переработки. Отмечается, что в настоящее время среди проблем интродукции и внедрения каштана съедобного, требующих быстрого разрешения, одной из самых актуальных является задача улучшения способов массового вегетативного размножения его наиболее ценных генотипов. Предлагается усовершенствовать технику *in vitro*, демонстрирующую значительные преимущества при размножении многих плодовых, декоративных и лесных древесных пород, и адаптировать её к размножаемому представителям рода *Castanea*.

А. И. Опалко<sup>1,2</sup>, В. Д. Адаменко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National dendrological park «Sofiyivka» of the NAS of Ukraine

<sup>2</sup>Uman national university of horticulture

### *IN VITRO* MORPHOGENESIS IN ZYGOTIC EMBRYOS OF *CASTANEA* MILL.

The article generalizes the information from literary sources about the value of *Castanea* spp. in terms of solving the problem of rational use and protection of genetic diversity of plant resources, to replenish the assortment of nut-bearing trees in Ukraine at the expense of new cultivars introduction of *Castanea sativa* Mill. with certain nutritious and dietetic properties of nuts. The pharmaceutical value of fruits and the whole plant, the tree decorative characteristics, their phyto-meliorative efficiency and quality of wood as well as the prospects for involving in nut-culture of other species of this genus were discussed. It was stated that the efforts of researchers aimed at popularization of edible chestnut in Ukraine had many obstacles caused by preconception concerning insufficient adaptive characteristics of chestnut trees in Ukrainian agroecological conditions, particularly, inadequate degree of frost resistance and levels of winter hardiness, and conservative attitude of customers who are not used to using chestnuts both as nuts and products of their processing. It was admitted that among the problems of introduction of edible chestnut, which require urgent solution, one of the most topical ones is the task of improving the ways of mass vegetative propagation of its most valuable genotypes. It was suggested to improve the *in vitro* methods which demonstrate considerable advantages in propagation of many fruit, decorative and forest trees and adapt them to the propagated *Castanea* genus representatives.