

## ОТРИМАННЯ ФЕРТИЛЬНИХ РОСЛИН–РЕГЕНЕРАНТІВ СОНЯШНИКУ (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) ШЛЯХОМ ОРГАНОГЕНЕЗУ *IN VITRO*

В.О. Бабич<sup>1,2</sup>, О.І. Варченко<sup>1,2</sup>, І.С. Гнатюк<sup>1,2</sup>, М.В. Кучук<sup>1</sup>,  
М.Ф. Парій<sup>2</sup>, Ю.В. Симоненко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України  
(м. Київ, Україна)

e-mail: [vikuhababych@gmail.com](mailto:vikuhababych@gmail.com); ORCID: 0000-0002-1022-9250

e-mail: [okvarchenko@gmail.com](mailto:okvarchenko@gmail.com); ORCID: 0000-0003-1534-1716

e-mail: [ignatyuk94@gmail.com](mailto:ignatyuk94@gmail.com); ORCID: 0000-0002-0377-4242

e-mail: [nkuchuk@icbge.org.ua](mailto:nkuchuk@icbge.org.ua); ORCID: 0000-0001-7365-7474

e-mail: [yurisymonenko@hotmail.com](mailto:yurisymonenko@hotmail.com); ORCID: 0000-0002-5597-3315

<sup>2</sup> Всеукраїнський науковий інститут селекції (м. Київ, Україна)

e-mail: [pariityroslov@gmail.com](mailto:pariityroslov@gmail.com); ORCID: 0000-0001-9877-2241

Соняшник (*Helianthus annuus* L.) є однією з основних олійних культур у світі та безперечно однією з важких культур для культивування в умовах *in vitro*. Наразі не існує жодного зареєстрованого сорту (клона, лінії, гібрида, популяції) трансгенного соняшнику. Однією з основних проблем при створенні трансгенних рослин є розробка ефективною системи регенерації *in vitro*, що дасть змогу отримувати морфологічно типові фертильні рослини–регенеранти. Відомо, що регенераційну здатність соняшнику можна досліджувати двома шляхами: соматичним ембріогенезом та прямим органогенезом. Завдяки різному співвідношенню регуляторів росту, таких як ауксин та цитокінін, є можливість впливати на частоту регенерації з різних типів тканин. Так, за високих концентрацій ауксинів та низьких концентрацій цитокінінів є можливість індукувати регенерацію коренів. А для індукції регенерації пагонів краще використати високі концентрації цитокініну та низькі концентрації ауксинів. Однак, знаючи різні підходи та методи культивування соняшнику в культурі регенерації *in vitro*, на сьогодні не існує універсального протоколу, що підходить для всіх генотипів соняшнику. Саме тому метою нашої роботи було дослідити регенераційну здатність ліній соняшнику та розробити ефективну систему, що в подальшому буде використано для генетичних досліджень із метою покращення господарсько-цінних ознак. У цій роботі представлено дослідження щодо регенерації 4-х концентрічних ліній соняшнику (*Helianthus annuus* L.) української селекції шляхом органогенезу. Як експлантати використовували сім'ядолі незрілого насіння (21 день після запилення). Індукцію та проліферацію адвентивних бруньок тестували на базовому середовищі з різними концентраціями регуляторів росту. Було встановлено, що оптимальним живильним середовищем для індукції та проліферації адвентивних бруньок є модифіковане середовище MS, доповнене вітамінами за Gamborg, 5 мг/л AgNO<sub>3</sub>, 2 мг/л 2-isopentenyladenine (2-iP), 0,5 мг/л indole-3-acetic acid (IAA), 0,1 мг/л thidiazuron (TDZ). Елонгацію адвентивних пагонів здійснювали на модифікованому живильному середовищі MS, доповненому вітамінами за Gamborg, 5 мг/л AgNO<sub>3</sub>, 1 мг/л 2-iP, 0,5 мг/л N6-benzylaminopurine (BAP). Розроблено ефективну систему укорінення в культурі *in vitro*. Вдалося адаптувати укорінені рослини–регенеранти до септичних умов, що дало змогу отримати насіння.

**Ключові слова:** адвентивні пагони, живильне середовище, фітогормони.

### ВСТУП

Регенераційна здатність рослин давно використовується для клонального мікро-

розмноження у вигляді черенкування та прищеплення [1]. Спроби регенерувати цілі окремі рослини з невеликих тканин або поодиноких клітин *in vitro* розпочалися на початку ХХ ст., коли Haberlandt запро-

понував концепцію культури тканин [2]. Проривом в історії культури тканин стало відкриття того, що баланс двох екзогенних рослинних гормонів, а саме ауксину та цитокініну, може визначити долю регенеруючої тканини. Своєю чергою, високе співвідношення ауксину до цитокініну зазвичай призводить до регенерації коренів, а співвідношення високих концентрацій цитокініну до ауксину, як правило, сприяє регенерації пагонів [3]. Steward зі співавторами далі продемонстрували, що навіть окремі клітини з васкулярної флоєми моркви зберігають тотипотентність — здатність регенерувати цілі рослини [4], таким чином, висвітлюючи дивовижний регенераційний потенціал соматичних клітин рослин.

Здатність до регенерації в культурі *in vitro* вивчалась у багатьох видів рослин, але її індукція не може бути універсальною, оскільки вона є генотипзалежною [5]. Генотипові відмінності в морфогенезі можуть бути пов'язані з різницею рівня ендогенного гормону [6].

Ця регенераційна здатність може бути збільшена за рахунок екзогенних регуляторів росту в культурі *in vitro*. Накопичення фактів свідчить про те, що деякі форми регенерації рослин передбачають перепрограмування диференційованих соматичних клітин, тоді як інші індукують її через активацію відносно недиференційованих клітин у соматичних тканинах [7].

Загалом, соняшник (*Helianthus annuus* L.) — одна з важких культур для маніпуляцій *in vitro* [8; 9]. Морфогенез соняшнику дуже мінливий і залежить від генотипу, компонентів живильних середовищ, типу експлантата умов культивування і т.д. У цього виду було описано різні методи для регенерації за допомогою органогенезу або соматичного ембріогенезу [9], але ефективна система регенерації залишається досить актуальним питанням.

Морфогенез у культурі *in vitro* відбувається за допомогою адвентивного органогенезу, при якому відбувається формування однієї меристеми кореня або пагона в адвентивній бруньці з подальшою її про-

ліферацією в пагін (корінь) і наступним його укоріненням (індукцією пагонів); або соматичного ембріогенезу, в результаті якого формуються соматичні ембріоїди з 2-ма апексами — кореня і пагона.

У цих меристемних тканинах пластиди знаходяться на недиференційованій пропластидній стадії. Розвиток білого нодулярного ембріогенного калюса при соматичному ембріогенезі та утворення зелених адвентивних бруньок при органогенезі передбачають розбіжність режимів диференціювання пластиду під час морфогенезу. Регулятори росту рослин можуть бути залучені для індукції або спрямування різних шляхів диференціювання пластид [6].

Теоретично адвентивні меристеми можуть формуватись двома шляхами:

- з диференційованих клітин експлантата без стадії диференціації;
- з неспеціалізованих, неорганізованих, і диференційованих клітин калюсних тканин [5].

Nicks описав ці два методи регенерації як прямий і непрямий морфогенез, відповідно [10]. На практиці їх не завжди можливо розрізнити. Меристеми, які сформувались прямо, призначені для формування пагонів або соматичних ембріоїдів, можуть проліферувати формуючи регенеративну тканину схожу за зовнішнім виглядом на калюс. Такі меристеми також можуть бути оточені диференційованим калюсом і це ускладнює з'ясування їх походження. Меристеми, які формують пагони, часто можуть бути відділені від калюсної тканини. Альтернативно, меристеми пагонів можуть утворюватися в межах калюса, який до цих пір прикріплений до основної тканини або всередині тканини експлантата, або можуть бути сформовані одночасно з такого калюса і з поверхневих клітин експлантата [11].

Враховуючи, що соняшник є культурою, з якою важко працювати в культурі *in vitro*, оскільки регенераційна здатність залежить від генотипу, поживного середовища та умов культивування, розробка ефективної, робочої системи є актуальною. Тому нашою метою було дослідити регенераційну здатність шляхом органогенезу

*in vitro* на чотирьох генотипах із метою подальшого використання цієї системи на різних генотипах соняшнику.

### АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Соняшник (*Helianthus annuus L.*) є цікавим та важким об'єктом для різноманітних маніпуляцій в культурі *in vitro*. Розробивши ефективну систему регенерації стане можливим ефективно проводити генетичну трансформацію, що базується на здатності клітин регенерувати у морфологічно типові рослини соняшнику. Однак на регенераційну здатність впливає: тип експлантата, поживне середовище та умови культивування.

Є публікації, в яких висвітлені результати дослідження, регенераційної здатності соняшнику, використовуючи різні типи експлантатів та різне співвідношення регуляторів росту [8; 12; 13].

Zhang Z. та Finer, J.J. (2015) проводили дослідження регенераційної здатності соняшнику на лінії RHA280. Робота була спрямована на визначення впливу регуляторів росту на покращення розвитку пагонів. У результаті, імпульсна обробка сім'ядолей середовищем Мурасіге–Скуга (MS), що містить у собі 1,5 мг/л 6-бензінамінопурину (6-BA) та 0,2 мг/л нафтилоцтової кислоти (NAA), з подальшим перенесенням на середовище, яке містить 0,1 мг/л гіберелінової кислоти (GA3), призводить до поліпшеного розвитку пагонів [14].

Nowakowska M. зі співавт. (2020), досліджуючи багаторічний вид соняшнику *Helianthus verticillatus* в культурі *in vitro* розробили протокол клонального мікро-розмноження з використанням пазушних проростків. У цій роботі були використані SSR-маркера з метою визначення однорідності між рослинами–регенерантами та вихідною рослиною. Було встановлено, що всі рослини–регенеранти є однорідними та стабільними порівняно з їх вихідними рослинами [15].

Також дослідження регенераційної здатності проводили на декоративному соняшнику. Qi Y–K. зі співавт. (2018), при здійсненні дослідження регенерацій-

ної здатності декоративного соняшнику (YAN1569, YAN1339, YAN1339, YAN1328) встановили, що в якості експлантатів краще використовувати молоді апикальні бруньки, існує генотипозалежна реакція на регулятори росту (особливо на 6-бензіламінопурин). Кращою концентрацією 6-BA для YAN1569 є 0,6 мг/л, для YAN1339 – 0,6–0,9 мг/л, YAN1339 – 0,6–0,9, а для YAN1328 – 0,9–1,2 мг/л [16].

Робота Kim M.–J. зі співавт. (2016) була спрямована на розробку ефективної системи регенерації та генетичної трансформації *Helianthus tuberosus L.* Автори представили результати вивчення впливу регуляторів росту, умов культивування, тип експлантата та умов трансформації. За даними вчених, найбільша частота регенерації була встановлена на середовищі Мурасіге–Скуга (MS) з додаванням 1 мг/л зеатину [17].

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Рослинний матеріал.** Використовували насіння 4-х ліній соняшнику (2, 3, 19, 35) (21-ша доба після запилення), які були надані Всеукраїнським науковим інститутом селекції. Насіння стерилізували 70% етанолом упродовж 1 хв, після чого переносили їх в 50% розчин гіпохлориту натрію. Насіння промивали 3 рази стерильною дистильованою водою для видалення залишків стерилізуючих агентів. Як експлантати використовували сім'ядолі.

**Індукція адвентивних бруньок.** У всіх експериментах (крім стадії укорінення) використовували макро- і мікроелементи середовища MS [18], вітаміни B5 [19], 3% цукрозу, 5 мг/л AgNO<sub>3</sub>.

Базове середовище було доповнене регуляторами росту різної концентрації:

- 1) 2 мг/л 2-іP, 0,5 мг/л IAA, 0,1 мг/л TDZ [20];
- 2) 2 мг/л 2-іP, 0,5 мг/л picloram, 0,1 мг/л TDZ;
- 3) 1 мг/л BAP, 1 мг/л α-naphthaleneacetic acid (NAA), 0,1 мг/л gibberellic acid (GA3) [21];
- 4) 1 мг/л BAP, 0,25 мг/л IAA, 0,1 мг/л GA3;

5) 2 мг/л kinetin (Кп), 0,5 мг/л NAA.

Середовище автоклаливали при 121°C упродовж 20 хв, перед тим доводили рН 1М розчином КОН або НСІ до 5,7±0,1. Для індукції морфогенезу експлантати культивували без та з освітленням упродовж 21 доби при 25°C. Якщо експлантати культивували в темряві, то через 14 діб їх перенесли на те саме середовище, але в умовах світла на 7 діб.

*Проліферація адвентивних бруньок.* Для проліферації адвентивних бруньок використовували базове середовище з додаванням різних регуляторів росту:

6) 2 мг/л 2-іР, 0,5 мг/л IAA, 0,1 мг/л TDZ [20];

7) 3 мг/л ВАР, 2 мг/л 2-іР.

Експлантати культивували упродовж 14 діб при 16/8 фотоперіоді і 25°C.

*Елонгація адвентивних пагонів.* Елонгація адвентивних пагонів відбувалась на середовищах, які доповнені різною концентрацією цитокінінів та гібереліновою кислотою (10–12 діб).

8) ВАР 0,1 мг/л [22];

9) 2-іР 1 мг/л, ВАР 0,5 мг/л [20];

10) GA3 0,2мг/л [21].

*Укорінення.* Для індукції коренів використовували — макро- і мікроелементів середовища MS [18], вітаміни В5 [19], 2% цукрозу, з додаванням ауксину 1 мг/л indole-3-buteric acid (IBA).

*Адаптація.* Після утворення коренів рослини-регенеранти переносили в ґрунт і вирощували в умовах теплиці (16/8 фотоперіод, 25°C). На фертильних рослинах проводили автотрипінг.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При культивуванні експлантатів на середовищі 1 відбувалась індукція адвентивних бруньок (пагонів) (рис. 1) залежно від умов культивування та генотипу. У лінії 35 адвентивні бруньки формувались по всій поверхні експлантата (рис. 1, а, 1, б), але при культивуванні в різних умовах освітлення їх проліферація (рис. 1, б) краще здійснювалась, якщо експлантати спочатку (14 діб) культивувались на середовищі 1 без освітлення, а потім ек-

плантати переносили на свіже живильне середовище при фотоперіоді 16/8 год (рис. 1, б). У лінії 3 адвентивні бруньки утворювались на проксимальній частині сім'ядолі відносно зародка (рис. 1, в), і при різних умовах культивування різниці між проліферацією в адвентивні пагони не спостерігалось (табл. 1). Адвентивні пагони вдалось отримати тільки на двох генотипах.

На середовищі 2 при заміні IAA на піcloгам у тій самій концентрації (рис. 1, д) відбувалось утворення рихлого неморфогенного калюса у всіх генотипів (фотоперіод 16/8). При культивуванні 14 діб у темряві з подальшим субкультивуванням на світлі (рис. 1, е) на проксимальній частині сім'ядолі спостерігали ризогенез.

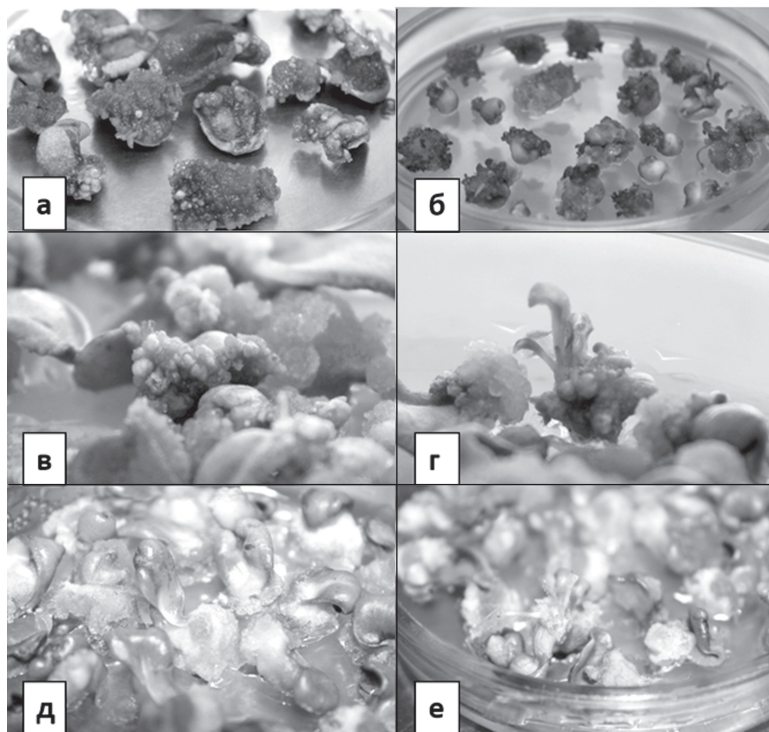
При культивуванні експлантатів на середовищі 3, 4, 5 утворювались морфологічно ненормальні пагони.

Для проліферації адвентивних бруньок використовували середовища 6 і 7. Аналізуючи табл. 1 відсоток проліферації адвентивних бруньок був вищим на середовищі 7 (рис. 2, б), але в подальшому неможливо було елонгувати пагони, тому використовували середовище 6 (рис. 2, а).

Лінія 35 відзначалась вищою частотою проліферованих бруньок, ніж лінія 3 (табл.), але вони піддавались сильній вітрифікації. У лінії 3 адвентивні пагони формувались лише на проксимальній частині сім'ядолі і вони мали нормальну морфологію (рис. 2, в).

Для елонгації пагонів використовували середовища з гібереліновою кислотою, високою та низькою концентрацією цитокінінів. На середовищі з гібереліновою кислотою пагони елонгувались, але піддавались сильній вітрифікації і втрачали морфологічно нормальний вигляд.

Також адвентивні пагони лінії 35 вдалось елонгувати на середовищі 9, але при культивуванні на усіх середовищах вони мали гіпергідратовані тканини, які неможливо було укорінити. Нормальні елонговані адвентивні пагони вдалось отримати тільки у лінії 3 з високою концентрацією цитокінінів (середовище 9) (рис. 3, а).

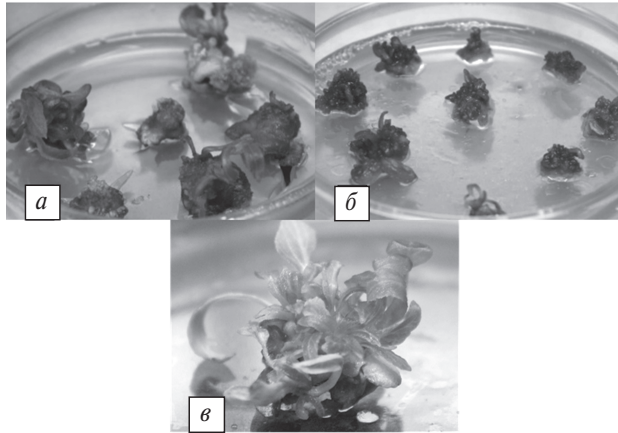


**Рис. 1.** Індукція морфогенезу в культурі *in vitro* соняшнику (*Helianthus annuus L.*)

*Примітки:* а) лінія 35, середовище 1, 16/8 фотоперіод 21 доба; б) лінія 35, середовище 1, 14 діб без освітлення, 7 діб 16/8 фотоперіод; в) лінія 3, середовище 1, 16/8 фотоперіод 21 доба; г) лінія 3, середовище 1, 14 діб без освітлення, 7 діб 16/8 фотоперіод; д) середовище 2, 16/8 фотоперіод 21 доба; е) середовище 2, 14 діб без освітлення, 7 діб 16/8 фотоперіод.

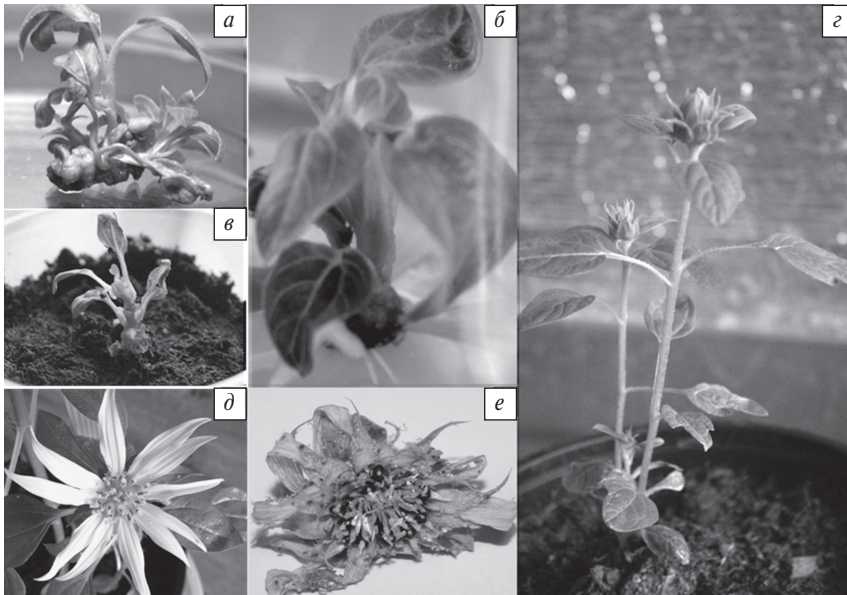
**Органогенез комерційних ліній соняшнику**

Генотип	Умови культивування	Індукція адвентивних бруньок, номер середовища	Індукція адвентивних бруньок, %	Проліферація адвентивних бруньок, номер середовища	Проліферація адвентивних бруньок, %	Елонгація пагонів, номер середовища	Елонгація пагонів, %	Укорінення, %	Адаптація, %
35	Світло	1	85	6	18	8	–	–	–
				7	26	9	–	–	–
	Темрява 14 діб + світло	1	100	6	67	8	16	–	–
				7	82	9	–	–	–
3	Світло	1	75	6	52	8	36	75	80
				7	58	9	–	–	–
	Темрява 14 діб + світло	1	70	6	54	8	35	75	80
				7	62	9	–	–	–



**Рис. 2.** Проліферація адвентивних бруньок

Примітки: а) лінія 35, середовище 6; б) лінія 35, середовище 6; в) лінія 3, середовище 6.



**Рис. 3.** Отримання насіння соняшнику у лінії 3 з адвентивних пагонів з культури *in vitro*

Примітки: а) елонгація пагонів на середовищі 9; б) укорінені адвентивні пагони; в), г) адаптовані *in vivo* рослини–регенеранти; д) цвітіння рослин; е) дозріле насіння соняшнику.

Індукція коренів у рослин–регенерантів відбувалася при культивуванні на середовищі з ауксинами, з додаванням 1 мг/л ІВА, частота укорінення становила 75%. При культивуванні адвентивних пагонів на безгормональному середовищі (контроль) не вдалося індукувати корені. Після

формування коренів рослини переносили в ґрунт і адаптували (рис. 3, в). Таким чином рослини–регенерантів елонгувались *in vivo* (рис. 3, г), завдяки чому вдалося довести їх до цвітіння (рис. 3, д). Після автотрипінгу зав'язалося насіння (рис. 3, е), і через 45 днів його було зібрано.

## ВИСНОВКИ

При культивуванні експлантатів на середовищі 1 частота індукції адвентивних бруньок була найвищою. Аналізуючи табл. 1, визначили, що лінія 35 має вищий відсоток регенерації, ніж лінія 3, але через сильну вітрифікацію рослин–регенерантів неможливо було їх укорінити, на відміну від лінії 3, адвентивні пагони якої мали нормальну морфологію. Рослини–регенеранти вда-

лося отримати тільки на 2-х лініях, отже регенерація соняшнику є генотипзалежною. Хоча адвентивні бруньки краще проліферували на середовищі 7, через те, що далі такі пагони не вдалося елонгувати для проліферації використовували середовище 6. Вдалося розробити ефективну систему укорінення адвентивних пагонів, що дало змогу адаптувати рослини–регенеранти до септичних умов.

## ЛІТЕРАТУРА

- Melnyk, C.W., Meyerowitz, E.M., Plant grafting. *Current Biology*. 2015. Vol. 25. No. 5. Pp. 183–188. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.029>.
- Haberlandt, G., Laimer, M., Rücker, W. (eds.) *Cultivierungsversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Plant tissue culture*. Springer, Vienna, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6040-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6040-4_1).
- Skoog, E., Miller, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultures *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 1957. Vol. 11. Pp. 118–131.
- Steward, F.C., Mapes, M.O., Mears, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 1958. Vol. 45. No. 10. Pp. 705–708. DOI: <https://doi.org/10.2307/2439728>
- George, E.F., Hall, M.A., De Klerk G.-J. Plant propagation by tissue culture. *The Background*. Springer, Vienna, 2008. Vol. 1. Pp. 283–333. DOI: [10.1007/978-1-4020-5005-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_8).
- Bhaskaran, S., Smith, R.H., Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Science*. 1990. Vol. 30. No. 6. Pp. 1328–1337. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1990.0011183X003000060034x>.
- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., Sugimoto, K., Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development*. 2016. Vol. 143. No. 9. Pp. 1442–1451. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.134668>.
- Mohamed, S., Boehm, R., Schnabl, H., Stable genetic transformation of high oleic *Helianthus annuus L.* genotypes with high efficiency. *Plant Science*. 2006. Vol. 171. No. 5. Pp. 546 – 554. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.05.012>.
- Moghaddasi, M.S., Sunflower tissue culture. *Advances in Environmental Biology*. 2011. Vol. 5. No. 4. Pp. 746–755. DOI: <https://pdfs.semanticscholar.org/d207/0ea1f44b6c41319b3e20a859429ce75c37be.pdf>
- Hicks G.S., Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. *The Botanical Review*. 1980. Vol. 46. No. 1. Pp. 1–23. DOI: <http://doi.org/10.1007/DF02860865>.
- Bigot, C., Ohki S., Mousseau J., Experimental data for a strategy of the improvement of the shoot – forming capacity *in vitro*. *Acta Horticulturae*. 1977. Vol. 78. Pp. 125–132. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1977.78.15>.
- Nestares, G., Zorzoli, R., Mroginski, L., Picardi, L. Heritability of *in vitro* plant regeneration capacity in sunflower. *Plant Breeding*. 121(4). 2002. 366–368. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2002.7271109.x>.
- Tarek, H., Françoise, J., Gilbert, A., Jean, K. A new approach for efficient regeneration of a recalcitrant genotype of sunflower (*Helianthus annuus L.*) by organogenesis induction on split embryonic axes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol. 73. 2003. Pp. 81–86. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1022689229547>.
- Zhang, Z., Finer, J.J. Use of cytokinin pulse treatments and micrografting to improve sunflower (*Helianthus annuus L.*) plant recovery from cotyledonary tissues of mature seeds. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 52(4). 2016. 391–399. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-016-9770-9>.
- Nowakowska, M. et al. In Vitro Propagation of an Endangered *Helianthus Verticillatus* by Axillary Bud Proliferation. *Plants*. 2020. 9(6). 712. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9060712>.
- Qi, Y.-K. et al. Research on axillary bud tissue culture and plant regeneration system of ornamental sunflower. *Acta Agriculturae Jiangxi*. 2018. Vol. 30. No.11. Pp.19–22.
- Kim, M.-J. et al. Highly efficient plant regeneration and Agrobacterium–mediated transformation of *Helianthus tuberosus L.* *Industrial Crops and Products*. 2016. 83. 670–679. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.054>.
- Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15. No. 3. Pp. 473–497. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima K. Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 1968. Vol. 50. No. 1. Pp. 151–158. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5).
- Sujatha, M. et al. Combination of thidiazuron and 2-isopentenyladenine promotes highly efficient

adventitious shoot regeneration from cotyledons of mature sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2012. Vol. 111. No. 3. Pp. 359–372. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0202-1>.

21. Fiore, M.C., Trabace, T., Sunseri F. High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 1997.

Vol. 16. No. 5. Pp. 295–298. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01088284>.

22. Lucas, O., Kallerhoff J., Alibert G. Production of stable transgenic sunflowers (*Helianthus annuus* L.) from wounded immature embryos by particle bombardment and co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Breeding*. 2000. Vol. 6. No. 5. Pp. 479–487. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1026583931327>.

## REFERENCES

- Melnyk, C.W. & Meyerowitz, E.M. (2015). Plant grafting. *Current Biology*, 25, 5, 183–188 [in English].
- Haberlandt, G., Laimer, M. & Rücker, W. (eds.) (2003). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Plant tissue culture* [in German].
- Skoog, F. & Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultures *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11, 118–131 [in English].
- Steward, F.C., Mapes, M.O. & Mears, K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 45, 10, 705–708 [in English].
- George, E.F., Hall, M.A. & De Klerk G.-J. (2008). Plant propagation by tissue culture. *The Background*, 1, 283–333 [in English].
- Bhaskaran, S. & Smith, R.H. (1990). Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Science*, 30, 6, 1328–1337 [in English].
- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A. & Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development*, 143, 9, 1442–1451 [in English].
- Mohamed, S., Boehm, R. & Schnabl, H. (2006). Stable genetic transformation of high oleic *Helianthus annuus* L. genotypes with high efficiency. *Plant Science*, 171, 5, 546–554 [in English].
- Moghaddasi, M.S. (2011). Sunflower tissue culture. *Advances in Environmental Biology*, 5, 4, 746–755 [in English].
- Hicks, G.S. (1980) Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. *The Botanical Review*, 46, 1, 1–23 [in English].
- Bigot, C., Ohki S. & Mousseau J. (1977). Experimental data for a strategy of the improvement of the shoot – forming capacity *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 78, 125–132 [in English].
- Nestares, G., Zorzoli, R., Mroginski, L. & Picardi, L. (2002). Heritability of *in vitro* plant regeneration capacity in sunflower. *Plant Breeding*, 121(4), 366–368 [in English].
- Tarek, H., Françoise, J., Gilbert, A. & Jean, K. (2003). A new approach for efficient regeneration of a recalcitrant genotype of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by organogenesis induction on split embryonic axes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73, 81–86 [in English].
- Zhang, Z., & Finer, J.J. (2016). Use of cytokinin pulse treatments and micrografting to improve sunflower (*Helianthus annuus* L.) plant recovery from cotyledonary tissues of mature seeds. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 52(4), 391–399 [in English].
- Nowakowska, M. et al. (2020). In Vitro Propagation of an Endangered *Helianthus Verticillatus* by Axillary Bud Proliferation. *Plants*, 9(6), 712 [in English].
- Qi, Y.-K. et al. (2018). Research on axillary bud tissue culture and plant regeneration system of ornamental sunflower. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 30, 11, 19–22 [in English].
- Kim, M.-J. et al. (2016). Highly efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Helianthus tuberosus* L. *Industrial Crops and Products*, 83, 670–679 [in English].
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 3, 473–497 [in English].
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. & Ojima K. (1968). Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50, 1, 151–158 [in English].
- Sujatha, M. et al. (2012). Combination of thidiazuron and 2-isopentenyladenine promotes highly efficient adventitious shoot regeneration from cotyledons of mature sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 111, 3, 359–372 [in English].
- Fiore, M.C., Trabace, T. & Sunseri F. (1997). High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 16, 5, 295–298 [in English].
- Lucas, O., Kallerhoff J. & Alibert G. (2000). Production of stable transgenic sunflowers (*Helianthus annuus* L.) from wounded immature embryos by particle bombardment and co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Breeding*, 6, 5, 479–487 [in English].

Стаття надійшла до редакції журналу 07.07.2020