

ОПТИМІЗАЦІЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ЕТАПІВ КЛОНАЛЬНОГО МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ *ASPARAGUS OFFICINALIS L.*

Ю. В. КОЛОМІЄЦЬ, доктор сільськогосподарських наук, професор
А. О. СКУБА, студентка

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: mathscuba@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-1919-6336>

<https://orcid.org/0000-0001-7033-3984>

Анотація. Встановлено оптимальні умови стерилізації рослинного матеріалу з метою одержання асептичної культури *Asparagus officinalis L.* Підібрано найефективніші концентрації регуляторів росту, зокрема кінетину, індоліл-3-оцтової, індоліл-3-масляної, нафтилоцтової кислот, 6 бензиламінопурина, мінеральних компонентів живильного середовища для етапів морфогенезу, використання яких уможливорює значне підвищення ефективності процесу клонального розмноження. Для отримання генетично однорідного посадкового матеріалу показано доцільність використання кінетину (1 мг/л) з коефіцієнтом розмноження експлантів 6,0. Пришвидшено етап ризогенезу мікропагонів спаржі лікарської *in vitro*, що забезпечує укорінювання на рівні 63%. Вивчення впливу регуляторів росту сприятиме розвитку технологій культивування ізольованих клітин і тканин спаржі лікарської з метою швидкого розмноження та отримання здорового, високоякісного посадкового матеріалу.

Ключові слова: *Asparagus officinalis L.*, експлантат, стерилізація, морфогенез *in vitro*, регулятори росту

Вступ.

На даному етапі український ринок відчуває недостачу у сировині спаржі лікарської. Ця багаторічна овочева культура має харчову, кулінарну, естетичну та фармацевтичну цінність (Thapa et al., 2020). Завдяки наявності в складі спаржі відносно високих кількостей клітковини, антоціанів, флавоноїдів, сапонінів, інших низькомолекулярних органічних сполук її вживання комплексно покращує здоров'я людини (Guo et al., 2020).

Доведено перехід пухлинних клітин до апоптозу *in vitro* та *in vivo* за впливу стероїдного сапоніну рослини аспараніну А (Zhang et al., 2020). Світовими лідерами з вирощування спаржі є Китай, Перу, Мексика, Німеччина (Richter et al., 2019).

Розширення промислових площ цієї культури обмежується кількома чинниками. По-перше, високими економічними ризиками. По-друге, відсутністю вітчизняного посадкового матеріалу.

По-третє, недоцільністю підтримання плантацій уже за 10-12 років вирощування внаслідок зменшення врожайності і ураження фітопатогенними грибами, переважно *Fusarium spp.*, хоча тривалість життя рослини може сягати 20 років. По-четверте, трудомісткістю розділення особин різної статі, необхідної в зв'язку з вищою продуктивністю чоловічих рослин (Pegiou et al., 2019).

Літературні дані щодо біотехнології спаржі лікарської суперечливі і не вирішують вищевказаних викликів. Недостатньо даних про культуру насіння спаржі, зокрема ефективні умови стерилізації та проростання, хоча саме насіння є оптимальним вихідним матеріалом, адже зародок дозволяє сформувати повноцінну рослину. Перешкодами до широкого впровадження мікроклонального розмноження спаржі залишаються складність укорінення, значна соматональна мінливість, висока ціна методу (Cardoso et al., 2018; Regalado et al., 2015). Для вирішення цих проблем потрібна оптимізація біотехнологічного процесу, яка передбачає підвищення ефективності отримання асептичного життєздатного матеріалу, підбір складу живильного середовища для культивування *in vitro* спаржі лікарської та забезпечення умов укорінення рослин, що дозволить за короткий строк отримати значну кількість якісного, генетично однорідного посадкового матеріалу для створення промислових насаджень (Azad & Amin, 2017; Carmona-Martín et al., 2014; Paudel et al., 2018; Štajner, 2012). Саме тому актуальними є комплексні біотехнологічні та фізіологічні дослідження морфогенезу цінних рослин виду *Asparagus officinalis* L.

Мета роботи – оптимізувати біотехнологічні етапи клонального мікророзмноження для прискореного розмноження *Asparagus officinalis* L.

Матеріали та методи.

Матеріалом дослідження слугувало насіння спаржі лікарської сорту «Білосніжка» виробництва «Флора Маркет™». З метою оптимізації умов одержання асептичних культур спаржі лікарської застосовували поверхневу обробку рослинного матеріалу гіпохлоритом натрію (NaClO) у формі водного розчину комерційного засобу «Білізна» з вмістом діючої речовини 3%. Асептичні умови створювали згідно із загальноприйнятими методиками (Мельничук et al., 2011).

На етапі введення в культуру *in vitro* як базове використовували живильне середовище Мурасіге-Скута (МС) (Murashige & Skoog, 1962) з вдвічі зменшеним вмістом мінеральних солей та вітамінів, в одному з варіантів використовували регулятори росту (табл. 1). Рослинний матеріал культивували у темновій кімнаті за температури $+26 \pm 2$ °C і відносної вологості повітря 60–70 %. Двічі на тиждень визначали ступінь розвитку проростків за умовною 5-тибальною шкалою, де 0 – відсутність проростання, 1 – початок проростання, 2 – пагони довжиною до 0,5 см, 3 – пагони до 1 см, 4 – пагони до 2 см, 5 – пагони понад 2 см.

Для вивчення впливу регуляторів росту на розмноження рослин спаржі лікарської в культурі *in vitro* застосовували чотири модифікації живильного середовища МС, до якого додавали кінетин, індоліл-3-ілоцтову, індоліл-3-масляну, нафтилоцтову кислоти, 6бензиламінопурин у концентраціях від 0,1 до 1 мг/л. Тривалість культивування мікропагонів становила три тижні. Рослинний матеріал культивували у світловій кімнаті при 16-годинному фотоперіоді. Ефективність живильних середовищ встановлювали за коефіціє-

ентом мікророзмноження, кількістю придатних до субкультивування пагонів та їх відсотковою часткою від усіх пагонів, кількістю отриманих в подальшому експлантатів, довжиною пагонів та метамерів, кількістю метамерів. Інтенсивність калусогенезу визначали візуально за 5-тибальною шкалою: 1 – відсутність калусу, 2 – слабе калусоутворення, 3 – середнє, 4 – сильне, 5 – інтенсивне. *Вимірювання показників та розрахунків кількісних даних здійснювали через 40 діб культивування.*

Процес ризогенезу мікропагонів досліджували на живильному середовищі МС з додаванням індоліл-3-масляної кислоти (ІМК), α -нафтилоцтової кислоти (НОК), 6-бензиламінопурина (6-БАП) у різних концентраціях (табл. 1). У процесі культивування визначали кількість бічних коренів, довжину основного кореня та відсоток укорієних експлантатів. Облік біометричних показників проводили кожні два тижні впродовж двох місяців.

Статистичну обробку здійснювали за допомогою одностороннього ANOVA, що базується на рангах та

χ^2 тесту Пірсона. Рівень значущості результатів встановлено $p < 0,05$. У випадку наявності істотної різниці виконували апостеріорний тест Данна. Як програмне середовище використовували Microsoft 365 Excel та бібліотеки SciPy, Pandas, scikit-posthocs мови програмування Python.

Результати та обговорення.

Попри велику кількість досліджень умов мікророзмноження спаржі лікарської, літературні дані досі є неоднозначними, можливо, через використання різних сортів. Крім того, метод досі залишається тривалим і дорогим, що обмежує його ширше застосування. Тому є необхідним оптимізація біотехнологічної схеми для українських сортів спаржі лікарської на всіх етапах мікротхонального розмноження *in vitro*.

Метою стерилізації вихідних експлантатів є, з одного боку, повне знищення сторонньої мікрофлори, з іншого, збереження повною мірою цілісності тканин зародка. Toma and Rsheed, 2012 пропонують обробку насіння 0,1% гід-

Таблиця 1. Склад живильних середовищ для проліферації спаржі лікарської

Назва середовища	Базовий склад	Ростові речовини
«Seed1»	½ МС + агар 8 г/л + сахароза 30 г/л	-
«Seed2»		+ 6-БАП 2 мг/л + тіамін (В1) 0,4 мг/л + інозитол 100 мг/л
«Shoot1»	МС + агар 8 г/л + сахароза 30 г/л	+НОК 0,2 мг/л + 6-БАП 1 мг/л
«Shoot2»		+ ІМК 1 мг/л + 6-БАП 1 мг/л
«Shoot3»		+ НОК 0,1 мг/л + 6-БАП 0,5 мг/л
«Shoot4»		+ кінетин 1 мг/л
«Root1»	МС + агар 8 г/л + сахароза 30 г/л	+ НОК 1,5 мг/л + 6-БАП 0,5 мг/л
«Root2»		+ ІМК 0,5 мг/л
«Root3»		+ НОК 0,3 мг/л

паргіум(I) хлоридом (Hg_2Cl_2) протягом 15 хв. Як відомо, сполуки важких металів є надзвичайно токсичними для людини і їх використання пов'язано з високим ризиком. Також раніше запропоновано поверхневу обробку в серії концентрацій NaClO від 70 до 10 % сумарною тривалістю 30 хв (Rasad et al., 2019). Наявні дані про високу ефективність обробки 0,1% розчином Діациду (цетилпіридинію хлорид 0,6 г/л, метилртуті хлорид 0,3 г/л) протягом 10 хв, за якої частка пророслих насінин становила 88,5% (Sargsyan et al., 2015).

Найефективнішим стерилізуючим агентом для тканин зародку насінини спаржі лікарської виявився NaClO 0,75% за експозиції 30 хв. Кількість стерильних проростків спаржі за умов даного способу стерилізації була 100 %. Максимальний відсоток життєздатних рослин становив 83 %. У разі зменшення часу експозиції 20 хв різко зменшувалася кількість стерильних проростків до 19 %, і, як наслідок, частка життєздатних насінин 50 %, які не проростали в умовах інтенсивного ураження грибами. За використання 1% NaClO протягом 20 хв

одержано 63,4 % стерильних проростків, з яких 58,2 % були життєздатними, що пов'язано з токсичною дією натрій гіпохлориту на рослини. Визначений нами як найбільш оптимальний спосіб обробки однією концентрацією 0,75 % NaClO протягом 30 хв є найбільш простим та економічним і водночас забезпечує повне знезараження при мінімальному рівні пошкодження рослин.

Перші ознаки росту спаржі лікарської на двох варіантах живильного середовища виявлено на 10 добу культивування (табл. 1). Статистично достовірну різницю в розвитку експлантів на різних живильних середовищах встановлено лише на 41 добу культивування (рис. 1) В кінці періоду проростання насіння через 50 діб оцінку 5 балів отримали 78 % експлантів на середовищі з додаванням 6-БАП і 58 % – на середовищі без регуляторів росту. Таким чином, не вдалося встановити істотного ефекту БАП в концентрації 2 мг/л на швидкість росту проростка.

Rasad et al. 2019 використовували для індукції розвитку насіння спаржі живильне середовище МС без регуляторів

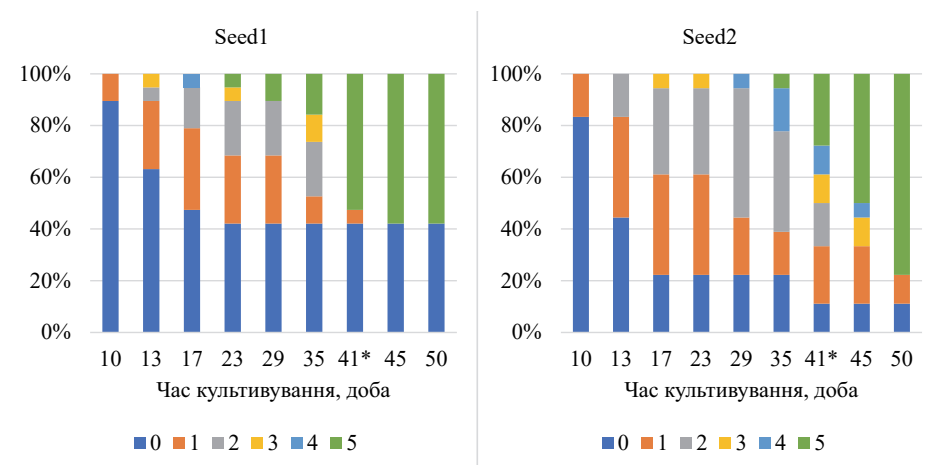


Рис. 1. Розвиток проростків спаржі лікарської залежно від складу живильного середовища, * $p < 0,05$

росту, насіння проростало на 14 добу культивування. Для *A. densiflorus* L. запропоновано ефективне середовище МС з додаванням 6-БАП, інозитолу і тіаміну (Toma & Rashed, 2012). Це пояснюється, вірогідно, інгібуючим впливом цитокінінів на транскрипцію під гена *ABI5*, що забезпечує спокій насіння, опосередкований абсцизовою кислотою (Shu et al., 2016). З іншого боку, в роботі Araújo et al., 2019 встановлено двоякий вплив цитокінінів на проростання люцерни усиченої *Medicago truncatula* і як активаторів росту, і як стресових агентів.

У мікроклональному розмноженні рослин найбільш широко серед багатьох класів фітогормонів використовуються ауксини та цитокініни, які можуть діяти як антагоністично, так і синергетично для контролю розвитку меристем (Azizi et al., 2015). Саме підбір збалансованої комбінації регуляторів росту визначає ефективність мікроклонального розмноження і потребує найбільших затрат на емпіричний підбір (Ramawat, 2021).

Експлантати довжиною 1,5-2,5 см пасирували на середовища для морфогенезу (табл. 1). Встановлено статистично достовірну різницю між рослинами, культивованими на різних живильних середовищах за кількістю отриманих експлантатів (рис. 3а, табл.

2). Найгірше рослини розвивались за використання комбінації регуляторів росту «Shoot1» ($2,7 \pm 0,5$ шт.), а найкращі результати отримано на середовищі «Shoot4» ($4,9 \pm 0,6$ шт.). Значення решти показників були близькими у пагонів, що розвивались на живильних різних середовищах (табл. 2, рис. 3 б-в).

Дані наукової літератури щодо оптимального складу живильного середовища для морфогенезу спаржі лікарської різняться. Наприклад, запропоновано протокол з використанням у живильному середовищі НОК 0,2 мг/л, 6-БАП 0,1 мг/л, кінетину 0,2 мг/л та анцимідолу 0,1 мг/л (Štajner, 2012) Sargsyan et al, 2015 при дослідженні сорту спаржі Мері Вашингтон визначили оптимальними концентрації регуляторів росту 6-БАП 1 мг/л, 2,4-Д 0,5 мг/л і НОК 0,5 мг/л, при цьому формувалось 10-15 пагонів на експлантат, а також кінетин 1 мг/л, за використання якого отримували 14 пагонів з експлантату. Досліджуваний нами сорт також показав найвищу ефективність розвитку пагонів за наявності кінетину в середовищі у порівнянні з іншими регуляторами росту.

Відмічено проліферацію пагонів 97,2 % спаржі лікарської японського походження на живильному середовищі МС, що містить 0,45 мг/л 6-БАП та 0,2 мг/л ІМК (Azad & Amin, 2017). Наявні дані про те, що на середовищі з 6-БАП 2 мг/л

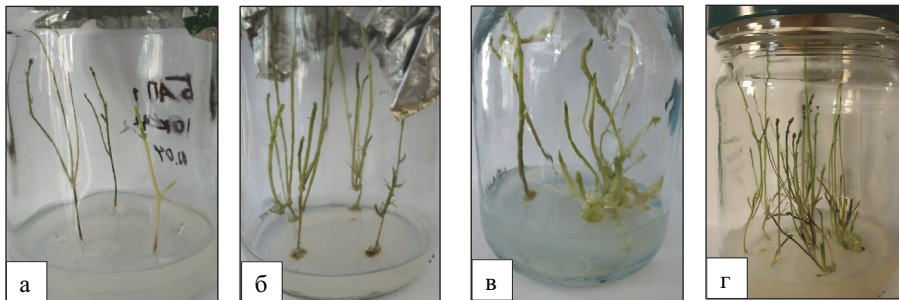


Рис. 2. Розвиток мікропагонів спаржі на живильних середовищах для регенерації протягом чотирьох тижнів (а – «Shoot1», б – «Shoot2», в – «Shoot3», г – «Shoot4»)

Таблиця 2. Вплив складу культурального середовища на розвиток меристемних культур спаржі лікарської (середнє $\pm$ похибка середнього, різні літери вказують на значення, що істотно різняться при $p < 0,05$)

Середовище	Коефіцієнт розмноження	Кількість придатних пагонів, шт.	Кількість отриманих експлантів, шт.	Довжина пагонів, см	Кількість метамерів, шт.	Середня довжина метамера, см	Частка придатних пагонів, %
«Shoot1»	$3,7 \pm 0,7$	$2,0 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,5$ a	$2,9 \pm 0,3$	$3 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1$	63 ± 8
«Shoot2»	$3,9 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,5$ a	$3,0 \pm 0,3$	$3 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$	80 ± 7
«Shoot3»	$5,3 \pm 1,1$	$3,3 \pm 0,5$	$4,1 \pm 0,6$ a,b	$2,7 \pm 0,3$	$2 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$	73 ± 7
«Shoot4»	$6,0 \pm 0,7$	$3,7 \pm 0,5$	$4,9 \pm 0,6$ b	$3,0 \pm 0,1$	$3 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	64 ± 6

та НОК 1 мг/л спостерігається найбільша кількість пагонів (6 шт. на експлантат) у порівнянні з іншими комбінаціями цих регуляторів росту (Rasad et al., 2019). Водночас, для іспанського генотипу спаржі найбільш ефективним є середовище МС, модифіковане EDDHA-Fe (85,7 мг/л) та збагачене 60 г/л сахарози, 0,5 мг/л НОК, 0,7 мг/л кінетину та 2 мг/л анцимідолу (Carmona-Martín et al., 2014).

Таким чином, найбільш часто використовуються середовища, збагачені НОК у поєднанні з цитокінінами. За нашими та літературними даними при морфогенезі спаржі часто відміча-

ється формування калусної тканини. Відомо, що НОК спричиняє появу поліплоїдних клітин в культивованих експлантатах (Mishiba et al., 2006). Також показано, що калус *A.officinalis* демонструє високий рівень соматоклональної мінливості (Regalado et al., 2015),

Склад середовища достовірно впливав на калусоутворення експлантів спаржі лікарської (рис. 4). Цей процес найбільш виражено спостерігали на середовищі «Shoot1», де 38% експлантів мали середній чи високий відсоток калусогенезу, і лише 42 % експлантів не утворювали калус зовсім. На се-

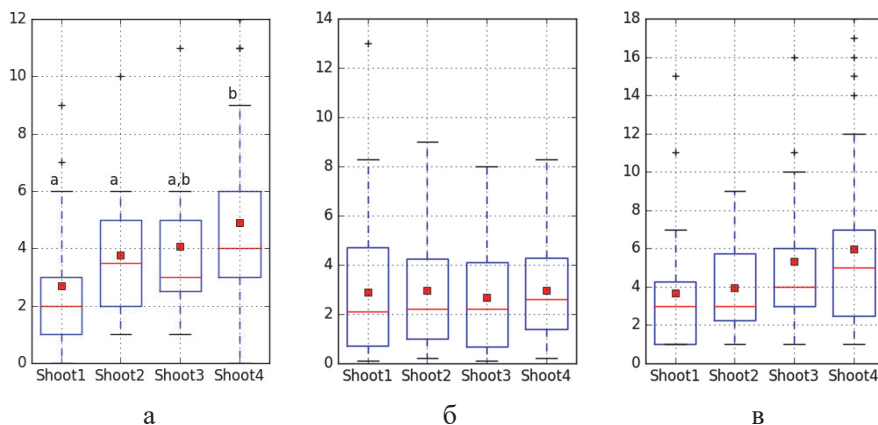


Рис. 3 Розподіл окремих параметрів росту спаржі лікарської залежно від складу середовища: а – кількість отриманих експлантів, шт. (різні літери вказують на значення, що істотно різняться при $p < 0,05$); б – довжина пагонів, см; в – коефіцієнт розмноження (лінія – медіана, крапка – середнє значення)

редовищі «Shoot2» у 50 % відзначали відсутність калюсу, а в 36 % слабе калюсоутворення. За застосування комбінації регуляторів росту «Shoot3» у 67 % експлантатів калюс відсутній, у 27 % – середнє та інтенсивне калюсоутворення. Мінімальний калюсогенез зі статистичною достовірністю спостерігали за додавання лише кінетину в середовище (11 % експлантатів формували калюс зі слабкою чи середньою інтенсивністю).

Для мікророзмноження спорідненого виду *A. racemosus* ефективними є живильні середовища, збагачені комбінаціями кінетин 1,5 мг/л, НОК 0,5 мг/л (4 пагони на експлантат довжиною 6-7,5 см) або 6-БАП 0,5 мг/л, НОК 0,1 мг/л (6 пагонів на експлантат довжиною 3-4 см), в останньому випадку спостерігали невисокий відсоток формування калюсу (Paudel et al., 2018). За даними Patel & Patel, 2015 найкраще формування мікропагонів без утворення калюсу в *A. racemosus* відбувається за обробки ІМК 1 мг/л та 6-БАП 1 мг/л, при цьому коефіцієнт розмноження складає 3,6 пагону на експлантат (Patel & Patel, 2015). В обох варіантах досліджу для *A. officinalis* нами одержано аналогічні результати.

Таким чином, нами запропоновано середовища «Shoot1» та «Shoot3» використовувати для розробки нових сортів, а для отримання генетично однорідних ліній середовище «Shoot4».

Для дослідження ризогенезу живці з 4-ма пагонами пасирували на живильне середовище Мурасіге-Скуга з половинним вмістом мікро- та макроелементів та додаванням регуляторів росту (табл. 1). Корені починали формуватися лише через 2 місяці культивування. Між живильними середовищами «Root2» і «Root3», які містили лише ауксини статистичної різниці не виявлено. Частка укорінених рослин не перевищувала 63%, а за додавання до середовища цитокінінів корені не розвивалися зовсім (рис. 5). Цитокініни сповільнюють розвиток ембріогенної апікально-базальної осі кореня, і таким чином, негативно регулюють процеси укорінення (Ramawat, 2021).

Кількома дослідженнями показано, що пагони спаржі *A. officinalis* добре укорінювались з показниками $8,50 \pm 0,84$ коренів/експлантат на середовищі з БАП 2,0 мг/л та НОК 1,0 мг/л (Rasad et al., 2019). За протоколом Štajner 2012 середовище для укорінення мікропагонів

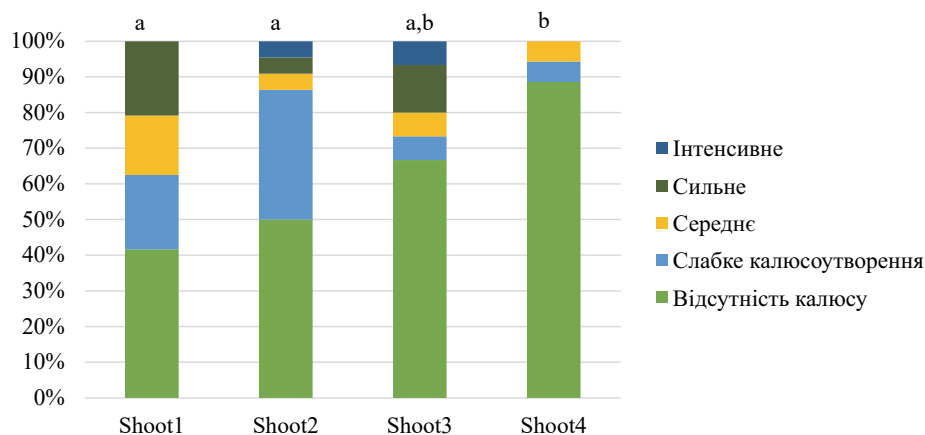


Рис. 4. Інтенсивність калюсоутворення залежно від складу живильного середовища, (різні літери вказують на значення, що істотно різняться при $p < 0,05$)

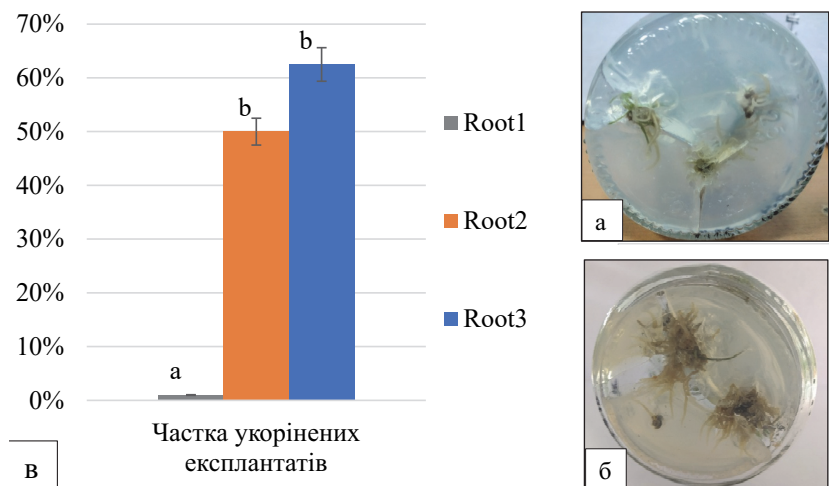


Рис. 5. Ризогенез мікропагонів рослин спаржі лікарської:

а – «Root2», б – «Root3», в – ефективність досліджуваних середовищ за кількістю укорінених експлантів (дані вказані однаковими літерами істотно не відрізняються $p < 0,05$)

спаржі містить 0,2 мг/л НОК та 1,3 мг/л анцимідолу, за таких умов через 5-6 тижнів частота укорінення 82%. Показано також частоту укорінення 66 % за концентрації НОК 0,3 мг/л (Slabbert et al., 1990). Згідно з іншими дослідженнями, оптимальним ауксином для регенерації коренів є ІМК в концентрації 0,5 мг/л, при цьому ризогенез становив 62% (Sargsyan et al., 2015). Також Azad and Amin досягли укорінення 98,3% на середовищі з 0,4 мг/л ІМК. Для укорінення *A. racemosus* також найвищу ефективність має ІМК (Patel & Patel, 2015).

Таким чином, для утворення коренів спаржі виду *A. officinalis* використання НОК загалом вважається одним з найбільш поширених корисних ауксинів для формування коренів, що можна пояснити її хімічною стабільністю, малою рухливістю в рослині та характером пролонгованої дії. Для виявлення економічно вигідного отримання посадкового матеріалу спаржі необхідні подальші дослідження.

Висновки.

Оптимізовано технологію клонального мікророзмноження спаржі лікарської сорту Білосніжка на основі культури *in vitro* на етапах отримання стерильної культури, мультиплікації і ризогенезу. На етапі стерилізації найбільший відсоток життєздатних стерильних експлантів спаржі лікарської 83% отримано при застосуванні 0,75% розчину натрій гіпохлориту протягом 30 хв. На етапі одержання культури *in vitro* за використання безгормонального живильного середовища Мурасіге-Скуга та збагаченого БАП 2 мг/л одержано однакові результати. На етапі власне мікроклонального розмноження спаржі лікарської встановлено оптимальну концентрацію регулятора росту кінетину 1 мг/л, яка достовірно підвищувала кількість отриманих експлантів. На етапі укорінення показано ефективність середовищ, з додаванням ауксинів ІМК 0,5 мг/л або НОК 0,3 мг/л на рівні до 63% укорінених експлантів.

Referens

- Thapa, S., Rawal, S., Bist, S. (2020). Highlighting the nutritional and medicinal value of Asparagus along with its cultivation practices. *Matrix Science Pharma*, 4(1), 18. https://doi.org/10.4103/mtsp.mtsp_4_20
- Guo, Q., Wang, N., Liu, H., Li, Z., Lu, L., Wang, C. (2020). The bioactive compounds and biological functions of *Asparagus officinalis* L. – A review. *Journal of Functional Foods*, 65, 103727. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103727>
- Zhang, F., Zhang, Y. Y., Sun, Y. S., Ma, R. H., Thakur, K., Zhang, J. G., Wei, Z. J. (2020). Asparanin A from *Asparagus officinalis* L. Induces G0/G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Endometrial Carcinoma Ishikawa Cells via Mitochondrial and PI3K/AKT Signaling Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(1), 213–224. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07103>
- Richter, B., Gurk, S., Wagner, D., Bockmayr, M., Fischer, M. (2019). Food authentication: Multi-elemental analysis of white asparagus for provenance discrimination. *Food Chemistry*, 286(January), 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.105>
- Pegiou, E., Mumm, R., Acharya, P., de Vos, R. C. H., Hall, R. D. (2019). Green and White Asparagus (*Asparagus officinalis*): A Source of Developmental, Chemical and Urinary Intrigue. *Metabolites*, 10(1), 17. <https://doi.org/10.3390/metabo10010017>
- Cardoso, J. C., Sheng Gerald, L. T., Teixeira da Silva, J. A. (2018). Micropropagation in the Twenty-First Century (pp. 17–46). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_2
- Regalado, J. J., Carmona Martín, E., Castro, P., Moreno, R., Gil, J., Encina, C. L. (2015). Study of the somaclonal variation produced by different methods of polyploidization in *Asparagus officinalis* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(1), 31–44. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0747-x>
- Azad, M. A. K., Amin, M. N. (2017). Regeneration of *Asparagus officinalis* L. Through Embryogenic Callus. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 27(1), 21–31. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v27i1.35008>
- Carmona-Martín, E., Regalado, J. J., Padilla, I. M. G., Westendorp, N., Encina, C. L. (2014). A new and efficient micropropagation method and its breeding applications in *Asparagus* genera. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 119(3), 479–488. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0548-7>
- Paudel, N., Aryal, M. R., Puri, R. H. (2018). Effect of hormone for in vitro propagation of *Asparagus racemosus* Wild. *Current Life Sciences*, 4(4), 53–61. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1407185>
- Štajner, N. (2012). Micropropagation of Asparagus by In Vitro Shoot Culture, In: Lambardi M., Ozudogru E., Jain S. (eds) *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 994, 341-351. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8_27
- Мельничук, М. Д., Григорюк, І. П., Новак, Т. В., Кляченко, О. Л., Коломієць, Ю. В., Спиридонов, В. Г., Ключадаєнко, А. А., Антіпов, І. О., Оверченко, В. В., Облап, Р. В., & Новак, Н. Б. (2011). Біотехнологія рослин. Практикум. ТОВ “Арар Медія Груп.”
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Toma, R. S., Rashed, K. A. (2012). In Vitro Propagation through Seed Culture and Regeneration of *Asparagus densiflorus* L. through Callus Cultures Derived from Hypocotyls. *Int. J. Pure Appl. Sci. Technol.*, 9(2), 94–102.
- Rasad, F. M., Hasbullah, N. A., Azis, N. A., Daud, N. F., Lassim, M. M. (2019). Micropropagation of *Asparagus officinalis* L. (Garden Asparagus) In Vitro. *International Journal of Life Sciences Research*, 7(3), 123–129. www.researchpublish.com

16. Sargsyan, E., Vardanyan, A., Parsaeimehr, A., Bekyan, A., Ani, B. (2015). Elaboration of *Asparagus officinalis* L. by in vitro and Hydroponic Combined Method. *American Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2(6), 82–86. <https://ssrn.com/abstract=2986530>
17. Shu, K., Liu, X., Xie, Q., He, Z. (2016). Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. *Molecular Plant*, 9(1), 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.010>
18. Araújo, S., Pagano, A., Dondi, D., Lazzaroni, S., Pinela, E., Macovei, A., Balestrazzi, A. (2019). Metabolic signatures of germination triggered by kinetin in *Medicago truncatula*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46866-6>
19. Azizi, P., Rafii, M. Y., Maziah, M., Abdullah, S. N. A., Hanafi, M. M., Latif, M. A., Rashid, A. A., Sahebi, M. (2015). Understanding the shoot apical meristem regulation: A study of the phytohormones, auxin and cytokinin, in rice. *Mechanisms of Development*, 135, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2014.11.001>
20. Ramawat, K. G. (2021). An Introduction to the Process of Cell, Tissue, and Organ Differentiation, and Production of Secondary Metabolites (pp. 1–22). https://doi.org/10.1007/978-3-030-30185-9_35
21. Mishiba, K. I., Tawada, K. I., Mii, M. (2006). Ploidy distribution in the explant tissue and the calluses induced during the initial stage of internode segment culture of *Asparagus officinalis* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 42(1), 83–88. <https://doi.org/10.1079/IVP2005724>
22. Patel, L. S., Patel, R. S. (2015). Rapid In vitro Micro Propagation of *Asparagus racemosus* Willd. from Nodal Explants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(5), 607–617. <http://www.ijcmas.com>
23. Slabbert, M., Lindeque, J., Ferreira, D. I. (1990). Rapid in vitro multiplication of *Asparagus*. *South African Journal of Botany*, 56(3), 331–335. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(16\)31061-4](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(16)31061-4)

Y. Kolomiets, A. Skuba, (2021). OPTIMIZATION OF BIOTECHNOLOGICAL PROCESS CLONAL MICROPROPAGATION IN VITRO OF ASPARAGUS OFFICINALIS L. . BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 12(3): 24-33. <https://doi.org/10.31548/biologiya2021.03.003>.

Abstract. The study presents the results of obtaining regenerated plants of asparagus from seeds. Surface sterilizing the seeds by 0,75% sodium hypochlorite for 30 min is effective, during this obtained 83% viable sterile plants. The Murashige and Skoog medium supplemented with 6benzylaminopurine (2 mg/L), inositol (100 mg/L) and thiamine (0,4 mg/L) was found to be the best for seed germination. The expediency of using kinetin (1 mg/L) as a growth regulator to obtain a homogeneous plant material was established. The reproduction coefficient was 6,0. Only 11% of the explants formed callus. For the selection needs and production of somaclonal variants, the use of the culture medium with indole-3-acetic acid (0,2 mg/L) and 6benzylaminopurine (1 mg/L) is justified. In this condition reproduction coefficient was 3,7, and the level of different intensity callusogenesis was 59%. The rooting of obtained plants was performed in Murashige and Skoog medium supplemented with a half dose of macro- and micronutrients and growth regulators. Rooting frequency was up to 63%. The knowledge of hormonal requirements helps to promote isolated tissue and cells technologies of asparagus with purpose of rapid propagation and obtaining healthy, high-quality planting material.

Keywords: *Asparagus officinalis*, in vitro, seeds, sterilization, morphogenesis, cytokinin, auxin.