

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології**

Кафедра біотехнології та біоінженерії

спеціальність 162 – «Біотехнології та біоінженерія»

Допустити до захисту

Декан _____ М.І.ГИЛЬ

«_____» _____ 20__ р.

Рекомендувати до захисту

В.о. зав.кафедри _____ О.І.КАРАТЄЄВА

«_____» _____ 20__ р.

**ОСОБЛИВОСТІ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ОЖИНИ
СОРТУ «ТОРНФРІ» (*RUBUS FRUTICOSUS* L.) ТА ЛАВАНДИ
(*LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL.) В УМОВАХ ФГ «АГРОЛАЙФ»**

04.02. – КР. 67-О. 24 05 20.009

Виконавець:

здобувачка IV курсу _____ Анна ГОРЛОВА

Науковий керівник:

доцент ка _____ Олена ЮЛЕВИЧ

Рецензент:

доцентка _____ Олена КАРАТЄЄВА

Миколаїв 2024

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	8
1.1. Способи мікроклонального розмноження	8
1.2. Характеристика та народногосподарське значення ожини (<i>Rubus Fruticosus</i> L.) та лаванди (<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.)	14
РОЗДІЛ 2. Матеріали, умови і методика виконання роботи	22
2.1. Місце та об'єкт досліджень	22
2.2. Методика виконання роботи	22
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	26
3.1. Оцінка складу середовищ для мікроклонального розмноження лаванди сорту «Каховка»	26
3.2. Оцінка складу середовищ для мікроклонального розмноження ожини сорту «Торнфрі»	29
3.3. Схема мікроклонального розмноження рослин	34
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ	38
ВИСНОВКИ	42
ПРОПОЗИЦІЇ	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	44

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу виконано на 46 сторінках друкованого тексту, з використанням 29 бібліографічних джерел спеціальної, довідкової літератури та періодичних видань. До роботи внесено 4 таблиці і 7 рисунків.

Тема роботи: «Особливості мікроклонального розмноження ожини сорту «Торнфрі» (*Rubus fruticosus* L.) та лаванди (*Lavandula angustifolia* Mill.) в умовах ФГ «Агролайф».

Ключові слова: ожина, лаванда, мікроклональне розмноження, експлант, поживне середовище, ауксини, цитокініни.

Предметом досліджень були склад поживних середовищ та їх вплив на показники росту і розвитку ожини сорту «Торнфрі» (*Rubus fruticosus* L.) та лаванди (*Lavandula angustifolia* Mill.) в умовах *in vitro*.

Об'єктами дослідження були ожина сорту «Торнфрі» та лаванда вузьколиста сорту «Каховка». Донорні рослини вирощували в умовах закритого ґрунту. У якості експлантів використовували апікальні меристеми висотою 0,3-1,0 мм, які виділяли з верхівкових та пазушних бруньок стебла однорічних рослин.

Для визначення показників росту і розвитку рослин експланти культивували в термостатованій культуральній кімнаті при температурі 25-26°C, освітленості 2-3 кЛк, відносній вологості повітря 60-70%. Для аналізу враховувались такі дані: частота регенерації (%); висота основного пагону (мм); кількість пар листків (шт); коефіцієнт розмноження.

Досліджена можливість спрощення складу живильного середовища Мурасіге і Скуга для етапу мікророзмноження лаванди за рахунок зниження концентрацій або виключення окремих компонентів. У процесі мікроклонального розмноження ожини сорту «Торнфрі» оцінювався вплив концентрації 6-бензиламінопурину (6-БАП).

Метою дослідження було оцінка впливу поживних середовищ та визначення оптимального складу компонентів для покращення кореневої індукції рослин і процесу укорінення.

Завдання досліджень наступні:

- оцінити вплив типу середовища і концентрації ауксину на розвиток коренів лаванди;
- визначити вплив концентрації цитокініна 6-БАП на показники розвитку ожини;
- оцінити вплив середовищ різного складу на коренеутворення ожини сорту «Торнфрі»;
- дослідити вплив концентрація цукрів на процеси коренеутворення рослин.

Дослідження проводилось на базі ФГ «Агролайф» м. Миколаїв протягом 2024року.

В результаті досліджень процесів розмноження лаванди сорту «Каховка» *in vitro*, було встановлено концентрації ауксинів і цитокінінів у живильних середовищах для власне мікророзмноження і укорінення. Оптимальним середовищем для мікророзмноження є агаризоване живильне середовище MS, доповнене кінетином (1,0 мг/л) і гібереловою кислотою (1,0 мг/л). Оптимальним середовищем для укорінення мікроживців лаванди сорту «Каховка» є середовище $\frac{1}{2}$ MS з концентрацією Fe-хелату – 5 мг/л, сахарози – 20 г/л, ІМК – 1,5 мг/л.

Вивчено регенераційну здатність бічних бруньок ожини сорту «Торнфрі» й встановлено доцільність використання невисоких концентрацій цитокініну 6-БАП (0,5-1,0 мкМ). Встановлено, що для укорінення мікрокущиків ожини сорту «Торнфрі» у поживне середовище необхідно додавати сахарозу у концентрації 25 г/л, що сприятиме утворенню довших і міцніших коренів.

ВСТУП

Основні напрямки розвитку біотехнології рослин охоплюють широке коло завдань, у тому числі прискорене виробництво високоякісного посадкового матеріалу сільськогосподарських, лісових і декоративних культур, а також отримання відновлюваної рослинної лікарської сировини і біологічно активних добавок (БАД) рослинного походження для сучасної медицини [11].

Відмінною рисою сучасної біотехнології рослин є те, що практично всі її розділи засновані на використанні рослинних об'єктів *in vitro*. Це можуть бути стерильні пробіркові рослини, культури органів, тканин і клітин рослин, ізольовані протопласти, спрямовані на отримання нових форм рослин, полегшення селекційного процесу, ефективне розмноження і оздоровлення цінних генотипів [9].

На підставі вивчення та морфогенезу *in vitro* створено технологію мікроклонального розмноження рослин, яка в багатьох країнах стала успішною комерційною галуззю сільського господарства. Розмноження посадкового матеріалу шляхом мікроклонування – одна з найбільш важливих галузей для отримання вирівняного посадкового матеріалу високої якості. Мікроклональне розмноження рослин можна проводити різними способами, серед яких найбільш поширені:

- мікрочеренкування пробіркових рослин;
- індукція утворення мікробульб і мікроцибулин;
- ізоляція бруньок з подальшим їх культивуванням на середовищах з фітогормонами і індукцією утворення пагонів.

Переваги мікроклонального розмноження порівняно з традиційними методами полягають у значно більш високому коефіцієнті розмноження (за мікроклонального розмноження можна отримати до 100 тис. рослин на рік, тоді як при звичайному – 5-100 рослин за аналогічний період); у мініатюризації процесу, що приводить до економії площ, зайнятих матковими рослинами і

рослинами, що розмножуються; у розмноженні і укоріненні рослин, які зовсім не розмножуються або погано розмножуються звичайним методом.

Принципово важливо, що мікроклональне розмноження часто супроводжується оздоровленням рослин. Невеликий розмір експлантів (частина рослини, яка використовується як вихідний матеріал), що застосовуються для мікроклонального розмноження, їх поверхнева стерилізація, асептичне (стерильне) культивування на стерильних живильних середовищах в умовах, що виключають інфікування, оздоровлює одержувані рослини від нематод і бактеріальних патогенів.

У поєднанні з термо- і хіміотерапією метод мікроклонального розмноження дає можливість значною мірою позбутися і вірусів, віроїдів і мікоплазм. Він широко використовується для отримання великої кількості посадкового матеріалу декоративних і овочевих культур. Це чудовий метод вегетативного розмноження цінних гібридних рослин, що дозволяє зберігати ефект гетерозису. У ряді країн, у тому числі й Україні, існують промислові технологічні лінії з розмноження квіткових культур та інших рослин методами культури *in vitro* [6, 9].

Досить важливим питанням є спрощення складу живильного середовища і зниження його вартості, що в кінцевому підсумку сприятиме підвищенню ефективності біотехнології і зниження собівартості пробіркових рослин. Отже, основною проблемою розмноження ожини та лаванди *in vitro* є визначення складу живильних середовищ, а саме оптимальної концентрації ауксинів і цитокінінів для нормального росту і розвитку регенерантів. Ця проблема є дуже важливою як і з наукової, так і з практичної точки зору і вимагає детального вивчення.

Оскільки кожен вид і навіть сорт рослин має свої специфічні вимоги до умов культивування, метою роботи було вивчення впливу регуляторів росту на регенерацію і мікророзмноження *in vitro* ожини сорту «Торнфрі» (*Rubus Fruticosus* L.) та лаванди (*Lavandula angustifolia* Mill.).

Завдання досліджень наступні:

- оцінити вплив типу середовища і концентрації ауксину на розвиток коренів лаванди;
- визначити вплив концентрації цитокініна 6-БАП на показники розвитку ожини;
- оцінити вплив середовищ різного складу на коренеутворення ожини сорту «Торнфрі»;
- дослідити вплив концентрація цукрів на процеси коренеутворення рослин.

РОЗДІЛ 1

Огляд літератури

1.1. Способи мікроклонального розмноження

Сучасні методи біотехнології дозволяють здійснити прискорене розмноження нових форм, сортів і навіть одиничних екземплярів рослин, що володіють цінними ознаками. В даний час мікроклональне розмноження широко застосовується для масового розмноження багатьох господарсько-цінних плодових і декоративних видів (малина, ожина, бузок, лаванда, м'ята, шавлія та ін.) [14].

Генетичною основою вегетативного розмноження є тотипотентність – властивість клітин реалізувати власну генетичну інформацію, яка забезпечує їх диференціацію і розвиток до цілого організму. Регенерація рослин *in vitro* може проходити декількома шляхами – органогенез, культура зародків чи соматичний ембріодогенез. За мікроклонального розмноження найстабільніше генетичний матеріал зберігається за використання в якості вихідного матеріалу апікальної меристеми.

Метод клонального мікророзмноження рослин в культурі *in vitro* є способом масового безстатевого розмноження рослин в культурі тканин і клітин. Існує кілька основних способів клонального мікророзмноження рослин, що характеризуються різним ступенем надійності щодо генетичної стабільності форм, які розмножуються, універсальністю для певних рослин, коефіцієнтом розмноження і повторюваністю результатів.

Перший спосіб мікроклонального розмноження полягає в отриманні рослин-регенерантів з калусних тканини шляхом органогенезу або соматичного ембріогенезу. Ця модель несе в собі найбільшу можливість генетичної мінливості рослин-регенерантів, оскільки останні утворюються з меристематичних новоутворень, що виникають у популяції дезінтегрованих,

так званих калусних клітин, як правило, генетично гетерогенних. Цей спосіб зазвичай використовується для отримання генетично змінених рослин-регенерантів, які називаються соматоклональними.

Друга модель мікроклонального розмноження – це індукція розвитку пагонів безпосередньо з тканини експлантів. Здатність до індукції адвентивних бруньок у звичайних умовах зустрічається у деяких видів рослин, що використовується для їх розмноження. Умови культивування *in vitro* можуть значною мірою стимулювати цей процес. Так, при розмноженні *in vitro* на листових пластинках і черешках суниці, листових пластинках малини спостерігалось формування адвентивних бруньок і пагонів.

Найбільшого поширення набула третя модель розмноження – проліферація пазушних пагонів, заснована на знятті апікального домінування. Цей метод вже почали застосовувати для промислового виробництва посадкового матеріалу деяких культур, і в даний час він є найбільш надійним щодо розмноження плодових, ягідних культур і декоративних чагарників. В деталях цей метод вперше було відпрацьовано на суниці на початку 70-х років минулого століття в роботах К. Voxus [7].

Останній метод має ряд надзвичайно важливих переваг: за короткий термін можливе отримання величезної кількості однорідного посадкового матеріалу (коефіцієнт мікророзмноження досягає до 10^5 - 10^7 рослин за рік); прискорюється селекційний процес, терміни отримання товарної продукції нових сортів зменшуються до 2-3 років замість 10-12; можлива підтримка росту рослин цілий рік; вдається розмножувати рослини, які в звичайних умовах розмножуються важко або зовсім не розмножуються вегетативно, можливо в найкоротші терміни отримати велику кількість рослин при обмеженій кількості вихідного матеріалу практично без контакту із зовнішнім середовищем, що істотно знижує ризик реінфікування оздоровленого матеріалу в процесі розмноження.

Проліферація пазушних пагонів заснована на знятті апікального домінування, що може здійснюватися двома шляхами. По-перше, отримання

пагонів нормальних пропорцій з подальшим їх розподілом на мікроживці з одною брунькою, які використовуються в якості вторинних експлантів для повторення циклу розмноження. Теоретично можливість такого способу розмноження становить до 1 млн пагонів з одного протягом року, за умови, що за два місяці можна отримати один пагін, що дає 10 мікроживців. По-друге, шляхом зняття апікального домінування за рахунок уведення в живильне середовище речовин з цитокініною активністю. Це призводить до формування пагонів з відносно укороченими міжвузлями, а пазушні бруньки дають початок новим паросткам. На таких середовищах експланти набувають вигляду «щітки» з маленьких пагонів, кожен з яких може бути рекультивовано.

До культури верхівок пагонів відносять експланти, які називають або стебловими апексами, або стебловими апікальними меристемами, або верхівками пагонів. Для переважної більшості рослин ці типи експлантів найбільше відповідають вимогі, з одного боку, отримання генетично однорідного посадкового матеріалу, а з іншого – наявності досить високого коефіцієнта розмноження. Пояснюється це тим, що у бруньках локалізуються недиференційовані, генетично однорідні меристематичні клітини, які легше вступають на шлях органогенезу, ніж зрілі диференційовані клітини інших органів [3-5].

Крім того, бруньки являють собою сформований рудиментарний пагін, що добре захищений лускою і легко може бути підданий процедурам поверхневої стерилізації.

За нормальних умов ріст пазушних бруньок не проявляється, оскільки їх розвиток загальмовано апікальним домінуванням. Гальмування росту пазушних бруньок обумовлено впливом лідируючого пагону. В основі методу розмноження шляхом активації пазушних меристем лежить процес зняття апікального домінування. Для досягнення інтенсивного росту пагонів необхідно видалити апекс стебла або додати в живильне середовище цитокінін. Взаємодія ендогенного ауксину, що бере участь в явищі апікального

домінування, з іншими фітогормонами, зокрема з цитокініном, призупиняє зростання верхівкової бруньки і стимулює розвиток пазушних бруньок [8, 20].

Метод мікроклонального розмноження за допомогою проліферації пазушних пагонів має мінімальний ступінь ризику щодо отримання неоднорідного потомства, а частота появи мутантних рослин (у розрахунку на кількість новоутворень) не перевищує появи таких при звичайному розмноженні.

Процес мікроклонального розмноження *in vitro* включає наступні основні етапи:

- вибір експланту і введення його в культуру;
- власне мікророзмноження;
- укорінення мікропагонів;
- адаптацію регенерантів до умов *in vivo*.

Успіх всієї роботи багато в чому залежить від першого етапу, тобто правильного вибору вихідної рослини-донора, відбору експлантів і їх стерилізації, а також підбору і оптимізації складу живильного середовища, що забезпечує найкращий ріст і розвиток експлантів.

Відомо, що при виборі материнської рослини необхідно враховувати її фізіологічні, сортові та видові особливості. Вихідні рослини повинні бути здоровими, не ураженими грибковими, бактеріальними та вірусними хворобами, перебувати в стані інтенсивного росту.

При виборі експланта враховують його вік, будову і походження. Для забезпечення максимальної стабільності матеріалу, що клонується, бажано використовувати молоді, слабкодиференційовані тканини. Для деревних порід використовують апікальні і пазушні бруньки, зародки, молоде листя, тобто експланти, що містять меристеми. Чим менше розмір експлантів, тим меншою є його регенераційна здатність. Однак, у великому експланті збільшується можливість появи в клітинах вірусів і інших патогенів [3, 18-21, 23].

Однією з головних проблем, яку необхідно вирішити під час застосування культури *in vitro*, є дезинфекція посадкового матеріалу перед розміщенням його

на живильне середовище. На поверхні вегетуючої рослини і її частин, пагонів, бруньок, проростків та інших джерел експлантів, є велика кількість різноманітних мікроорганізмів, які здатні рости і розмножуватися на живильному середовищі. У процесі свого росту і розвитку грибкові та бактеріальні інфекції не лише використовують поживні речовини живильного середовища, а також значною мірою пригнічують ростові процеси в експлантах. Коли рослина не загинула, часто гальмуються всі біологічні процеси росту і розвитку рослини. Тому стерилізація експлантів повинна бути виконана якомога якісніше.

Стерилізація є невід'ємною частиною на перших етапах мікроклонального розмноження. Якість її, значною мірою, залежить від стериліанта, його концентрації та експозиції. Оптимальний добір стерилізуючої речовини полягає в тому, щоб вона знешкоджувала патогенну мікрофлору і якомога менше шкодила рослинним тканинам. Виникають труднощі у стерилізації об'єктів з тріщинами, заглибинами, пошкодженнями. У цьому випадку не лише поверхнева стерилізація, але й проникання всередину стерилізуючого розчину негативно впливало на ріст тканини в умовах *in vitro*.

Варіант стерилізації підбирається індивідуально і залежить від особливостей експланта. Зазвичай стерилізація складається з декількох етапів, що включають промивання мильним розчином, обробку хінозолом, фундазолом чи хорусом, розчином білизни, сулеми, різними засобами побутової хімії у різноманітних співвідношеннях. Успішність обраної методики стерилізації визначається кількістю отриманого життєздатного матеріалу, придатного для подальшого мікророзмноження [13, 26].

Важливим аспектом біотехнологічної роботи є правильний підбір компонентів живильного середовища, концентрації та співвідношення регуляторів росту в їхньому складі, які і визначають напрями розвитку введеного біоматеріалу. Основою росту тканин і органів рослини є утворення і ріст клітин апікальної меристеми, що проходять низку послідовних етапів: поділу, росту, розтягненням і диференціювання. Реалізація морфогенетичних

потенцій апікальних меристем рослин *in vitro* залежить від балансу в живильному середовищі компонентів, що забезпечують трофічну (макро- і мікросолі, вуглеводи, амінокислоти) та регуляторну (гормони, вітаміни) функції клітин [2, 10].

Вирішальним етапом, від якого залежить успіх мікророзмноження рослин, є вибір оптимального живильного середовища для кожного етапу цього процесу. Вибір середовища значною мірою залежить від типу бажаного морфогенезу. Водночас досягти позитивних результатів для кожної культури можна лише коли підібрати відповідне оптимальне живильне середовище та співвідношення ауксинів і цитокінінів у ньому.

Живильне середовище для культивування також підбирають індивідуально. Використовуються середовища Гамборга, В5, Нича, Лі де Фоссарда та ін. Однак найбільш широко в культурі деревних рослин застосовується середовище Мурасиге і Скуга (MS) в стандартній або половинній концентрації солей [3, 5, 15, 16, 18-21, 25-29]. У поживні середовища на кожному етапі культивування вводяться різні фітогормони. На етапі ініціації і власне мікророзмноженні часто використовується БАП в різних концентраціях (0,5-5,0 мг/л).

Пересадка рослин-регенерантів у ґрунтовий субстрат – відповідальний етап, що завершує процес клонального мікророзмноження. Період адаптації пробіркових рослин до ґрунтових умов – найбільш дорога і трудомістка операція. Нерідко після пересадки рослин у ґрунт спостерігається зупинка в рості, опадання листя і загибель 100% рослин, зокрема через інтенсивний розвиток грибкових і бактеріальних захворювань. На даному етапі, під час перенесення рослин-регенерантів в нестерильні умови, значну увагу необхідно приділити встановленню оптимальної фази розвитку рослин-регенерантів, під час якої вони найбільш пристосовані до перенесення в нестерильні умови. Не кожна рослина, яка росла у пробірці й утворила корінь, здатна до адаптації. До адаптації здатні рослини здебільшого в такій фазі розвитку, коли вони мають добре сформований центральний пагін або кілька пагонів з однією або кількома

парами листків, здатних до фотосинтезу, мають добре сформований корінь або декілька коренів, які у всисній зоні виконують функції поглинання із ґрунту води і мінеральних речовин. Такі рослини здатні до продовження свого росту і розвитку після умов *in vitro* та до успішної адаптації в умовах *ex vitro*.

1.2. Характеристика та народногосподарське значення ожини (*Rubus fruticosus* L.) та лаванди (*Lavandula angustifolia* Mill.)

В останні роки серед населення збільшився інтерес до таких нетрадиційних видів культур, як ожина та малиново-ожинні гібриди. Насадження цих культур характеризуються великою урожайністю, ягоди – високими смаковими властивостями і, на відміну від поширеної в Україні малини, меншою мірою піддаються хворобам [8]. Наприклад, Ожина звичайна – харчова, медоносна, лікарська, кормова, фарбувальна, танідоносна, декоративна рослина [7].

Ожина – кущова рослина, належить до родини розоцвітих (*Rosaceae*), цінна ягідна культура, плоди якої характеризуються унікальними поживними і лікувальними властивостями. У цієї рослини виділяють чотири форми зростання: пряморосла, що стелиться, напівпряморосла і напівсланка [13].

Розрізняються вони напрямком у просторі, тривалістю росту пагонів і способом вегетативного розмноження. Сланкі форми характеризуються затяжним зростанням, мають довгі повзучі пагони і розмножуються укоріненням їх верхівок. Пряморослі мають вертикально зростаючі пагони, обмежений період активного росту і розмножуються кореневими нащадками. Напівпряморослі і напівсланкі займають проміжне положення за тривалістю і напрямком росту між першими двома групами і розмножуються або переважно укоріненням верхівок, або кореневими нащадками [11].

Ожина поширена на території Америки, Англії, Скандинавії, Росії, України та інших країн з теплим кліматом. В Україні популярна ожина двох видів: ожина сиза і ожина кущова. Селекціонери знають більше 290 сортів

ожини, найпоширеніші з них Агавам, БлекСатін, Кіттатіні, Лаутон, Логанберрі, Ері, Уілсонс Ерлі, Ізобільна, Техас, Смутстем, Бойсенберрі і Силван. Розмножується ожина насінням, живцями і кореневими відводками.

У багатьох країнах ожину вирощують у промислових масштабах, зрозуміло, що в першу чергу з харчовою метою. Ожина також використовується для виготовлення косметики і парфумерії. Лідером з вирощування цієї культури є Північна Америка – понад 65 тис. тонн, з яких у США – 35 тис. тонн. Тут діють селекційні програми, які удосконалюють вже існуючі та створюють нові сорти ожини. Європа вирощує 47 тис. тонн ожини, у тому числі: Сербія – 27,5 тис. тонн, Угорщина – 13 тис. тонн. Значний обсяг цієї ягоди виробляють в Англії, Румунії, Польщі, Німеччині та Хорватії.

В Україні ожина менш поширена у садівництві, проте в останні роки спостерігається позитивна тенденція зацікавленості цією культурою, як садівниками-аматорами, так і приватними підприємцями [9].

Протягом останніх років зі сторони виробників продукції садівництва і переробних підприємств спостерігається високий інтерес до сорту ожини «Торнфрі» (англ. «без колючок») з високою якістю ягід і технологічною зручністю рослини [13].

Традиційно ожина звичайна розмножуються верхівковими відводами, відприсками, корінними і зеленими черенками, розділенням куща. Перераховані способи мають низький коефіцієнт розмноження і не дають можливості звільнення рослин від вірусної інфекції. У свою чергу, сучасні методи біотехнології дозволяють здійснити швидке розмноження нових форм, сортів та навіть поодиноких екземплярів рослин, які характеризуються цінними ознаками, і отримати оздоровлений посадковий матеріал. Мікроклональне розмноження широко застосовується для масового розмноження багатьох цінних плодово-декоративних видів: вишні, черешні, мигдаля, малини, грецького горіха та ін. [13].

Дослідження залежності мікророзмноження і укорінення мікропагонів ожини від концентрацій гормонів та інших компонентів поживного середовища

проводилися різними авторами [7, 8, 10, 16]. Так, у дослідженнях Мацкевич О.В. та ін. [8] вивчався вплив концентрацій 6-БАП на розмноження ожини «Торнфрі», у роботі AbdAlla M.M. і Mostafa R.A.A. [16] дослідження були спрямовані на розмноження і на укорінення ожини. За результатами своїх досліджень, вони зробили висновок, що на етапі власне мікророзмноження в поживне середовище слід додавати 2 мг/л 6-БАП. Дослід по укоріненню проводився на поживних середовищах з різними концентраціями індолілмасляної і нафтилоцтової (НОК) кислот. У роботах зазначених вчених основою для середовищ було середовище Мурасиге і Скуга (MS).

Для мікроклонального розмноження ожини звичайної найчастіше використовують фітогормон ІОК в концентрації 0,5-3,0 мг/л (ауксин) та 6-БАП в концентрації 0,5–5 мг/л (цитокінін) [5]. Залежно від поставленої мети багато вчених рекомендують використовувати живильне середовище MS з невеликими модифікаціями співвідношення ауксин/цитокініни. Відомо, що індукування ризогенезу відбувається при збалансуванні вмісту фітогормонів у живильному середовищі за умови переважання ауксинів над цитокінінами згідно з правилом Скуга-Міллера. Також збільшувалась довжина та кількість коренів, що свідчить про позитивний ефект на розвиток кореневої системи підвищеного вмісту ауксину за умов *in vitro*. Загалом, регенеранти, які культивувалися в умовах *in vitro* на модифікованому середовищі, при перенесенні їх у постасептичні умови адаптувалися набагато краще, приживання рослин підвищувалось на 81-89%, порівняно із базовим варіантом. На середовищі для розмноження із переважанням цитокінінів за постасептичних умов приживається незначна кількість регенерантів – 6-10% [14, 18].

Незважаючи на популярність методу мікроклонального розмноження, не існує універсальної схеми культивування *in vitro* для ожини звичайної сорту Торнфрі, немає єдиної думки щодо оптимальних схем стерилізації ініціальних експлантів, щодо впливу живильних середовищ. На сьогоднішній день все ще залишається потреба у розробці конкретних методик розмноження для певних видів та сортів рослин із врахуванням особливостей їх росту та метаболізму. У

сучасних дослідженнях з мікроклонального розмноження ожини звичайної не вивчався детально вплив консистенції живильного середовища на етапі введення ожини в культуру *in vitro*, та індукції множинних пагонів. Пошук та вирішення проблеми оптимальної схеми стерилізації рослинного матеріалу, консистенції живильного середовища є актуальним.

Лаванда (*L. angustifolia*) – це багаторічний, вічнозелений, сильно гіллястий напівчагарник, висотою 60-70 см і діаметром 60-80 см, відноситься до родини ясноткових (*Lamiaceae*). Листки ланцетолінійні зі слабким опушенням і завернутими краями. Забарвлення листків різне – від темно-зеленого до сірого. Кількість пагонів коливається від 130 до 800 штук. Віночок голубуватофіолетовий, темно-синій, світло-синій, білий і рожевий. Плід сухий, складається із чотирьох маленьких продовгувато-овальних, гладеньких, темних, блискучих горішків. Вегетація рослин другого року життя починається в залежності від погодних умов року, зазвичай в кінці першої-початку другої декади квітня. Бутонізація настає в першій-другій декаді травня, фаза розсування квіточок – в першій декаді червня. Через 8-10 днів відмічається фаза забарвленого бутона. Початок фази цвітіння настає в кінці першої декади червня, масове цвітіння – в другій декаді червня. Масове плодоношення спростерігається в другій декаді липня. На одному місці лаванда може рости 15 і більше років. Корінь потужний, гіллястий і мичкуватий. У нижній частині рослини гілки дерев'яністі, голі, щільно зімкнуті, у зв'язку з цим куц має кулясту форму. Зміна гілок у лаванди залежно від умов зростання спостерігається через 7-10 років, а також у разі їх вимерзання, що свідчить про здатність рослини швидко відновлюватися.

Батьківщиною лаванди є регіон Середземномор'я (Франція, Іспанія, Андорра та Італія), але вона вирощується і в багатьох інших країнах світу. Лаванда вузьколиста (*Lavandula angustifolia* Mill.) є однією з основних ефіроолійних рослин в Україні [3, 27].

В озелененні степової зони півдня України, де озеленення проводиться, в основному, за рахунок інтродуцентів, трав'янисті ароматичні рослини

відіграють не останню роль, оскільки вони швидко ростуть і розвиваються, досить стійкі до несприятливих умов зовнішнього середовища і забруднень. Ароматичні рослини і більш посухостійкі в порівнянні з традиційними рослинами, які використовуються в озелененні, невибагливі до ґрунтових умов. Вирощуванню цих рослин сприяють природні умови даного регіону [4]. Серед багатьох видів ароматичних рослин, які мають підвищені декоративні якості і є одними з найкращих для озеленення степової зони півдня України являються лаванда вузьколиста та лавандин (міжвидовий гібрид лаванди вузьколистої та лаванди широколистої). Вона є цінною ефіроолійною та лікарською рослиною, яка з давніх часів використовувалась людьми в медицині та в побуті. Рослини декоративні цілий рік за рахунок сіро-зеленого забарвлення листків, але особливо декоративні під час масового цвітіння [15].

На одній рослині в залежності від сорту, прийомів вирощування, метеорологічних умов та інших чинників утворюється до 2000 квітконосних пагонів. Масова частка ефірної олії в свіжих суцвіттях, з яких отримують ефірну олію, становить від 1 до 4,0%, в залежності від сорту. Щоб зробити цю культуру високорентабельною необхідно щорічно вирощувати до 20 млн.шт. саджанців для закладки плантацій. Реконструкція старовікових насаджень і розширення площ лаванди стримується відсутністю посадкового матеріалу.

Лаванда містить ефірну олію, антоціаніни, фітостероли, цукор, мінерали, кумарову кислоту, гліколеву кислоту, валеренову кислоту, урsoleву кислоту, герніарін, кумарин та дубильні речовини. В останні роки створено сорти лаванди: Рекорд, Степова, Синєва і Ізіда [2].

Квітки і суцвіття як сировина для одержання лавандової олії входять до фармакопей 16 країн світу. Лавандову ефірну олію застосовують у парфумерно-косметичній для створення композиції духів, одеколонів, харчовій, фармацевтичній, миловарній та інших галузях промисловості [10, 32]. У фармацевтичній промисловості олію лаванди включають до складу лікарських препаратів антисептичної, заспокійливої, знеболювальної та спазмолітичної дії, а також для покращення запаху ліків [5].

Широке використання лавандової ефірної олії зумовлює потребу в отриманні якісного генетично однорідного садивного матеріалу. Ефективним методом щодо його отримання є клональне мікророзмноження на основі культури апікальних меристем *in vitro* [9].

В Україні лаванда вирощувалась як ефіроолійна рослина в Криму і Карпатах. Аналіз біологічних особливостей лаванди вузьколистої показує, що перспективним регіоном для її вирощування є зона південного Степу України. Лаванда світлолюбна, посухостійка і теплолюбна рослина. У той же час характеризується високою морозостійкістю [11].

Сьогодні на півдні України з'являються невеликі підприємства, які освоюють цей напрям. Одне таке виробництво є на кордоні Херсонської та Миколаївської областей [2].

Лаванда вузьколиста є однією з найбільш поширених ефіроолійних культур, що вирощуються на півдні України. Широке застосування цієї рослини пов'язане з наявністю в її суцвіттях ефірного масла, кумаринів, дубильних і інших речовин. Підвищення ефективності селекційної і насінницької роботи у лаванди в значній мірі може бути досягнуто за рахунок впровадження біотехнологічних прийомів створення і розмноження нового селекційного матеріалу.

Насінневий спосіб розмноження лаванди в насінництві і виробництві практично не використовується в зв'язку з тим, що в насінному потомстві спостерігається розщеплення. Константність господарсько-цінних ознак не зберігається, а в потомстві спостерігається велика різноманітність форм, як по олійності, так і за складом ефірної олії.

Що стосується вегетативного розмноження лаванди, то зберегти господарські ознаки сортів-клонів можливо тільки при вегетативному розмноженні, яке здійснюється шляхом живцювання, відводками і діленням куща [2].

Однією з найбільш перспективних клітинних технологій є клональне мікророзмноження, яке може використовуватися для отримання якісного

оздоровленого посадкового матеріалу, створення колекцій генетичної плазми, швидкого розмноження цінних селекційних зразків і форм, створених із застосуванням методів культури тканин. У якості експлантів найчастіше використовуються меристеми з пазушних і апікальних бруньок або сегменти стебла з вузлом. У деяких роботах для розмноження застосовували індукцію адвентивних пагоноутворень з листя або інших органів [4, 5].

Відомо, що, незважаючи на широке практичне застосування технологій мікророзмноження у багатьох видів рослин, є ряд проблем, що знижують їх ефективність. Це висока генотипическая залежність процесів морфогенезу, утворення калюсу при культивуванні меристем, вітрифікація пагонів, низька частота адаптації та інші. Більшість перерахованих проблем, таких як багатоетапність і велика трудомісткість процесу розмноження в культурі тканин зумовлюють високу вартість отриманих рослин. Подальше вдосконалення технологій розмноження в ізольованій культурі пов'язано з дослідженнями, спрямованими на підвищення коефіцієнта розмноження, скорочення етапів розмноження, розробку методів культивування в рідкому середовищі в біореакторах та інших прийомів. Досить важливим питанням є спрощення складу живильного середовища і зниження його вартості, що в кінцевому підсумку сприятиме підвищенню ефективності біотехнології і зниження собівартості пробіркових рослин. Тому вивчення впливу різних компонентів живильного середовища на розвиток меристемних культур лаванди на різних етапах мікророзмноження є актуальним.

У працях [3, 23] показано можливість і доцільність виключення зі складу середовища MS на етапі мікророзмноження *L. angustifolia* окремих компонентів (гліцину, інозиту) і зниження вдвічі концентрації макро- і мікроелементів, сахарози і вітамінів, що дозволяє без істотної зміни основних показників розвитку меристемних культур зменшити вартість живильного середовища.

В'єтнамськими вченими було встановлено, що середовище WPM (Lloyd & McCown, 1980) є кращим для росту та розвитку лавандових пагонів [27]. В ході дослідів єгипетських вчених [28] було встановлено, що найсприятливішим

на етапі розмноження буде повне середовище MS з додаванням сахарози у концентрації 30 г/л і тидіазурону у концентрації 0,20 мг/л.

Отже, основною проблемою розмноження ожини та лаванди *in vitro* є визначення складу живильних середовищ, а саме оптимальної концентрації ауксинів і цитокінінів для нормального росту і розвитку регенерантів. Ця проблема є дуже важливою як і з наукової, так і з практичної точки зору і вимагає детального вивчення.

РОЗДІЛ 2

Матеріал, умови і методика виконання роботи

2.1. Місце та об'єкт досліджень

Фермерське господарство «Агролайф» засноване на підставі Закону України «Про фермерське господарство» від 19.06.2003 у лютому 2007 року згідно з рішенням засновників і діє на підставі статуту, Господарського кодексу України та інших законодавчих та нормативних актів. Головою фермерського господарства є Хомут Володимир Петрович. Фермерське господарство виступає у якості товаровиробника сільськогосподарської продукції. Метою його діяльності є вдосконалення виробничо-господарської діяльності в агропромисловій сфері, направленої на одержання прибутку, а також задоволення за рахунок одержаного прибутку соціально-економічних потреб трудового колективу господарства. Фермерське господарство є самостійною ланкою сільського господарства та діє на принципах самоуправління (самостійно визначає напрям своєї діяльності, об'єми виробництва, форми реалізації продукції).

Підприємство складається з біотехнологічної лабораторії, розташованої у місті Миколаєві, вул. В. Чорновола, 14, і теплиць у селі Українка Вітовського району Миколаївської області.

Згідно зі статутом фермерське господарство може займатися різними видами діяльності, але основним напрямком діяльності ФГ «Агролайф» є рослинництво із застосуванням технології мікроклонального розмноження. У лабораторії отримують мікросаджанці, які адаптуються до умов навколишнього середовища у теплицях. Налагоджено отримання мікросаджанців плодово-ягідних культур – ожини, малини, полуниці, жимолості, черешні, смородини, актинідії. Проводяться експериментальні роботи з отримання лаванди, мигдалю, арахісу та злакових культур.

Об'єктами для проведення досліджень виступали рослини лаванди вузьколистої (*Lavandula angustifolia* Mill.) сорту «Каховка» і ожини (*Rubus fruticosus* L.) сорту «Торнфрі». Донорні рослини вирощували в умовах закритого ґрунту. У якості експлантів використовували апікальні меристеми висотою 0,3-1,0 мм, які виділяли з верхівкових та пазушних бруньок стебла однорічних рослин.

Живці лаванди сорту «Каховка» досліджувалися для встановлення ефективності процесів укорінення.

Пагони ожини сорту «Торнфрі», висаджені на різних поживних середовищах, оцінювалися для визначення оптимального підбору компонентів і покращення процесу укорінення.

2.2. Методика виконання роботи

Апікальні меристеми висотою 0,2-1,0 мм, які виділяли з верхівкових та пазушних бруньок стебла однорічних рослин, використовували в якості експлантів лаванди сорту «Каховка».

Стерилізацію експлантів лаванди проводили послідовним витримуванням фрагментів пагонів у 70% етанолі 40 секунд, 50% розчині препарату «Брадофен» 12 хвилин, і тричі промивали дистильованою водою [3]. Ступінчата стерилізація рослинного матеріалу лаванди забезпечувала вихід стерильних меристем на рівні 92,0%, зі 120 зразків неінфікованими і життєздатними було отримано 110 експлантів, які в подальшому використовувалися для проведення досліджень.

В якості первинних експлантів ожини були використані меристеми розміром 0,8-1,0 мм. Латеральні бруньки ожини поверхнево були простерилізовані у 0,1% розчині сулеми протягом 3-ох хвилин, потім тричі промиті дистильованою водою [7]. Зі 130-ти введених експлантів-меристем неінфікованими і життєздатними виявилися 120 шт, що свідчить про достатню ефективність проведеної стерилізації вихідного матеріалу.

Для мікророзмноження лаванди сорту «Каховка» використовувалось середовище MS [23] , доповнене кінетином (1,0 мг/л) і ГК (1,0 мг/л). Експланти культивували в термостатованій культуральній кімнаті при температурі 25-26°C, освітленості 2-3 кЛк, відносній вологості повітря 60-70%. Для аналізу враховувались такі дані: частота регенерації (%); висота основного пагону (мм); кількість пар листків (шт); коефіцієнт розмноження.

Виділені меристеми ожини культивувалися на середовищі Гамборга [22], з додаванням цитокініну 6-бензиламінопурина (6-БАП) в концентрації від 0,5 до 10,0 мкМ. Пасаж тривав 25 діб. Фотоперіод при культивуванні складав 16:8 годин світло/темрява при 25°C. Наприкінці пасажу здійснювалась оцінка показників росту і розвитку мікропагонів ожини.

Для укорінення лаванди сорту «Каховка» використовувалося середовище $\frac{1}{2}$ MS доповнене індолілоцтовою кислотою (ІОК), індолілмасляною кислотою (ІМК) у концентрації по 0,5 мг/л. Для аналізу враховувались такі дані: вкорінення (%); число коренів; довжина коріння (мм).

Живці лаванди сорту «Каховка» довжиною 4-5 см висаджували на укорінення в теплицю. Живці вкорінювалися в субстраті, що складався з суміші – торф : перліт: ґрунт : пісок 2 : 1 : 1 : 1.

Полив живців проводився за допомогою автоматичної туманоутворюючої установки. Перші 25-30 днів дрібнодисперсний розпил води проводився протягом 30 секунд з інтервалом 5 хвилин. Після утворення коренів інтервал між зволоженнями збільшували.

Пагони ожини, що розвинулися на середовищі з 0,5 мкМ 6-БАП, використовувалися на етапі укорінення. До укорінення допускалися рослини вільні від уражень грибковими і бактеріальними інфекціями. Кількість мікропагонів у кущиках – 10-15 шт, листя зелене, довжина листя коливалася від 3 мм до 12 мм, ширина – 1-9 мм. Було відібрано 60 мікрокущиків, по 15 для укорінення на наступних середовищах: Мурасіге та Скуга (МС), модифіковане за кількісним та якісним складом вітамінів, фітогормонів, цукрози;

безгормональні поживні середовища з концентрацією сахарози 20 г/л і 25 г/л, ідентичні за своїм складом середовищу за іншими компонентами.

Пасаж тривав 30 діб. Фотоперіод при культивуванні складав 16:8 годин світло/темрява при 25°С.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили з використанням пакета програм Excel 7.0 для Microsoft Windows. У таблицях наведено середні значення та їх стандартні помилки.

РОЗДІЛ 3

Результати досліджень

3.1. Оцінка складу середовищ для мікроклонального розмноження лаванди сорту «Каховка»

Дослідження процесів росту і розвитку лаванди сорту «Каховка» *in vitro* проводилося в три етапи. На першому – мікророзмноженні, було перевірено ефективність використання середовищ, запропонованих Латушкіною Т. М. На другому – здійснювалась оцінка придатності середовищ різного складу для укорінення зразків, отриманих в процесі мікророзмноження. На третьому – визначалась результативність укорінення живців у субстраті.

Під час першого досліду виявилось, що на етапі мікророзмноження середовище MS, доповнене кінетином (1,0 мг/л) і гібереловою кислотою (ГК) (1,0 мг/л) є придатним для лаванди сорту «Каховка» (табл. 1).

Розвиток різних сортів лаванди на даному середовищі відбувається не однаково, але в усіх випадках отримано позитивні результати. Відповідно до коефіцієнту розмноження, лаванда сорту Каховка (рис. 1) поступається сортам Синєва та Степова.

Таблиця 1

Залежність розвитку меристемних рослин лаванди від сорту

Сорт, зразок	Частота регенерації, %	Висота основного пагону, мм	Кількість пар листків, шт.	Коефіцієнт розмноження
Синєва*	100,0	19,33±2,05	4,64±0,58	1:12,42
Степова*	100,0	42,98±4,23	7,03±0,82	1:10,06
Каховка	100,0	35,5±5,50	6,5±1,50	1:7,50

*- За даними Латушкіної Т.М.

У другому досліді середовище для укорінення за прописом Латушкіної Т.М. [3] для лаванди сорту Каховка не дало бажаного результату. Було з'ясовано, що додавання ІОК у кількості 0,5 мг/л провокує калусоутворення, а концентрація Fe-халату (10 мг/л) сприяє швидкому росту пагонів, що не є вигідним, оскільки коріння з'являється тільки через 2,5 місяці, а пагони заповнюють всю висоту банки для культивування значно раніше. При використанні цього середовища коріння майже не утворювалось.



Рис. 1. Регенеранти лаванди сорту Каховка на етапі мікророзмноження

З метою підвищення ефективності технології мікроклонування лаванди була досліджена можливість спрощення складу живильного середовища Мурасіге і Скуга для етапу мікророзмноження за рахунок зниження концентрацій або виключення окремих компонентів. Для проведення експериментів мікрочеренки пересаджували на живильне середовище зміненого складу. В якості контролю було використано розроблене раніше оптимальне для цього етапу живильне середовище MS. Було запропоновано нове середовище: макросолі – 25 мг/л; мікросолі – 1 мг/л; вітаміни – 1 мг/л; Fe-хелат – 5 мг/л; аскорбінова кислота – 1 мг/л; агар – 6,5 г/л; сахароза – 20 г/л; гліцин – 100 мкг/л; ІМК – 1,5 мг/л; мезоінозит – 0,1 г/л. Тип і концентрація ауксину були підібрані на основі досліджень іноземних вчених [23, 28].

В'єтнамськими вченими було показано, що індолілмасляна кислота (ІМК) та нафтілоцтова кислота (НОК), не придатні для індукції коренеутворення. При концентрації індолілоцтової кислоти (ІОК) 0,5 мг/л коренева індукція була найкращою – 2,60 коренів з довжиною 1,65 см [28]. Аналіз даних досліджень єгипетських вчених [23] показав, що для укорінення лаванди вузьколистої *in vitro* доцільно застосовувати ½MS середовище з ІМК у концентрації 2 мг/л (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив типу середовища і концентрації ауксину на розвиток коренів лаванди різних сортів

Тип середовища	Тип ауксинів	Концентрація ауксину (мг/л)									
		0,00	0,50	1,00	1,50	2,00	0,00	0,50	1,00	1,50	2,00
		Число коренів					Довжина коренів (мм)				
МС повне*	НОК	0,00	9,43 ±0,8	15,54 ±0,5	-	7,22 ±0,4	0,00	5,1 ±0,3	9,04 ±0,4	-	3,13 ±0,8
	ІМК	0,00	4,47 ±0,3	5,61 ±0,4	-	6,53 ±0,5	0,00	17,42 ±0,5	32,11 ±1,7	-	51,14 ±1,5
½ МС*	НОК	2,17 ±0,2	12,05 ±0,5	21,25 ±0,9	-	15,26 ±0,8	6,43 ±0,5	8,23 ±0,4	15,76 ±0,6	-	8,54 ±0,7
	ІМК	2,17 ±0,1	6,24 ±0,4	8,03 ±0,5		11,86 ±0,7	6,43 ±0,1	25,34 ±1,8	45,74 ±1,9		60,63 ±2,9
½ МС**	ІМК	-	-	-	9,5 ±0,3	-	-	-	-	46,8 ±0,6	-

* - За даними Namza A. M. для лаванди сорту Манстед

** - За результатами власних досліджень для лаванди сорту Каховка

Скореговане середовище містило в 2 рази менше Fe-хелату, концентрація сахарози була збільшена на 5 г/л, ІОК була виключена із складу середовища, а концентрація ІМК була збільшена на 1мг/л. Через фітонцидні властивості лавандової олії, мікроживці практично не уражались грибковими інфекціями. На скорегованому середовищі утворювалось коріння з довжиною 4-5 см (рис. 2).

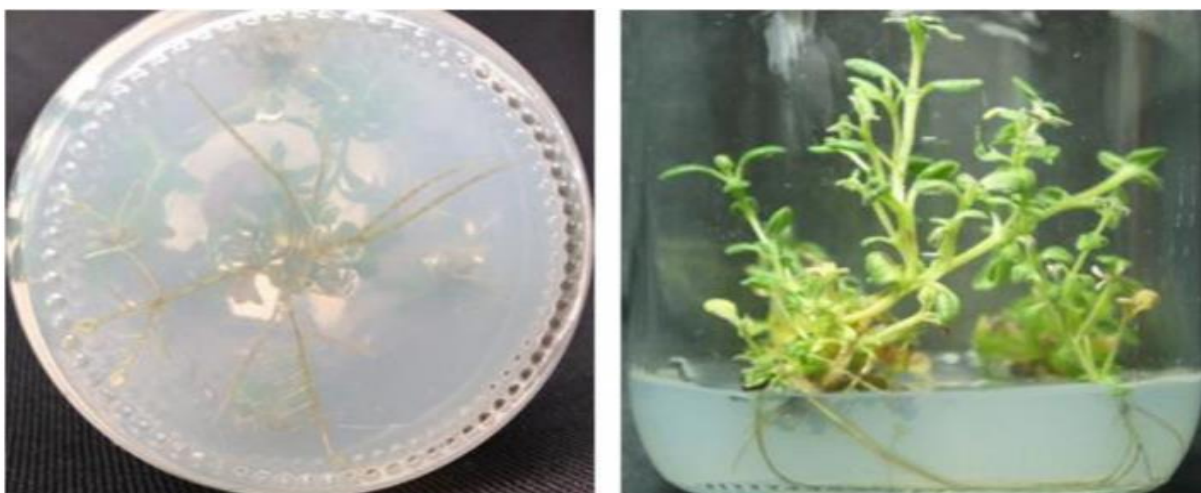


Рис.2. Укорінення регенерантів лаванди сорту Каховка

Під час третього етапу досліджень живці довжиною 4-5 см висаджували на укорінення в теплицю. Живці вкорінюються в субстраті, що складається з суміші – торф : перліт: ґрунт : пісок 2 : 1 :1 : 1.

Полив живців проводився за допомогою автоматичної туманоутворюючої установки.

Перші 25-30 днів дрібнодисперсний розпил води проводився протягом 30 секунд з інтервалом 5 хвилин. Після утворення коренів інтервал між зволоженнями збільшували.

Адаптація регенерантів з розвиненими коренями становила 85%. Дана властивість мікроживців лаванди сорту «Каховка» ще досконало не вивчена. Однак, подальші дослідження щодо вдосконалення складу субстрату і покращення процесів адаптації й укорінення живців без коренів надасть можливість зберегти цінні зразки, збільшити кількість адаптованих рослин та зменшити витрати при мікроклональному розмноженні лаванди.

3.2. Оцінка складу середовищ для мікроклонального розмноження ожини сорту «Торнфрі»

У процесі мікроклонального розмноження ожини сорту «Торнфрі» на першому етапі досліджувався вплив концентрації 6-бензиламінопурину (6-

БАП). В якості первинних експлантів було використано меристеми розміром 0,8-1,0 мм. Виділені меристеми культивувалися на середовищі Гамборга [22], з додаванням цитокініну 6-бензиламінопурину (6-БАП) в концентрації від 0,5 до 10,0 мкМ. Пасаж тривав 25 діб. Фотоперіод при культивуванні становив 16/8 годин світло/темрява при 25°C. Наприкінці пасажу здійснювалась оцінка показників росту і розвитку мікропагонів ожини (табл. 3).

Таблиця 3

**Вплив концентрації цитокініна 6-БАП на показники розвитку ожини
в умовах культивування *in vitro* (n = 10)**

Показник	Концентрація 6-БАП, мкМ					
	0,5	1,0	2,0	2,5	5,0	10,0
Кількість бруньок, шт	1,8 ±0,2	5,0 ±0,8	8,3±0,5	9,7±0,8	11,3±1,1	15,5±1,4
Висота мікропагонів, мм	2,2±0,11	1,5±0,51	0,7±0,52	0,5±0,28	0,3±0,05	0,2±0,07
Калус, +/-	-	-	-	-	+	+

Як свідчать отримані дані збільшення концентрації 6-БАП у середовищі призводить до росту більшої кількості регенованих бруньок, однак через явище апікального домінування вони не розвиваються. При культивуванні пазушних бруньок ожини на середовищі, що містить невисокі концентрації БАП (0,5 мкМ), регенерували 1,8-2,0 погонів, тоді як збільшення концентрації цитокініну призводило до регенерації великої кількості бруньок, але вони, як правило, не розвивалися в пагони внаслідок явища апікального домінування.

Імовірно, для ожини концентрації цитокініну (5-10 мкМ) є високими. Використовувати БАП вище 5 мкМ виявилось недоцільно, оскільки, не зважаючи на те, що коефіцієнт розмноження на цьому середовищі найвищий (15,5), бруньки були гіпергідратовані і більшість із них не розвивалися в нормальні пагони. Крім того, при відносно високій концентрації цитокініну відбувалося формування калусної маси на базальній частині експлантів.

На рис. 3 наведено вплив концентрації 6-БАП на мікророзмноження ожини «Торнфрі».

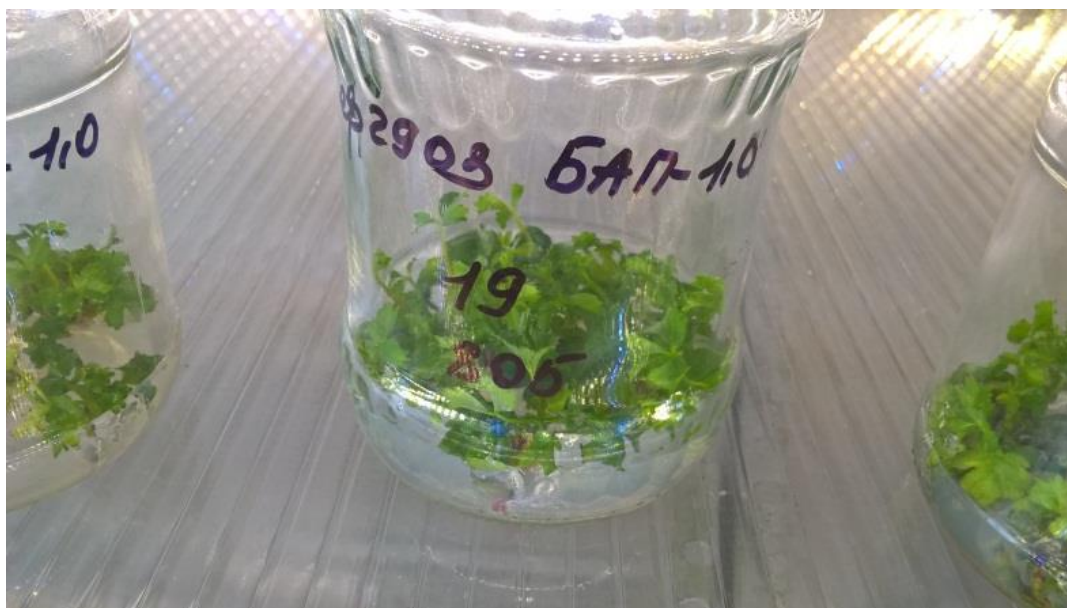


Рис.3. Вирощування ожини сорту «Торнфрі» на середовищі Гамборга з 6-БАП у концентрації 1,0 мкМ

Пагони, що розвинулися на середовищі з 0,5 мкМ 6-БАП, використовувалися на етапі укорінення, зважаючи на оптимальні результати у першому досліді як за кількістю бруньок, так і за висотою мікропагонів.

Під час другого досліді вивчався вплив наявності індолілмасляної кислоти та вмісту сахарози на укорінення. Було відібрано 60 мікрокущиків, по 15 штук для укорінення на наступних середовищах: Мурасіге та Скуга (МС), відмінною рисою якого є наявність ІМК у концентрації 0,9-1,1 мг/л і 0,5-1,0 мг/л галової кислоти, модифіковане за кількісним та якісним складом вітамінів, фітогормонів, цукрози; безгормональні поживні середовища з концентрацією сахарози 15 г/л, 20 г/л і 25 г/л, ідентичні за своїм складом середовищу за іншими компонентами.

Результати, що були отримані при культивуванні зразків ожини на різних середовищах наведено у таблиці 4.

**Вплив середовищ різного складу на коренеутворення ожини
сорту «Торнфрі»**

Показник	Середовище			
	Мурасіге та Скуга	безгормональне з концентрацією сахарози 15 г/л	безгормональне з концентрацією сахарози 20 г/л	безгормональне з концентрацією сахарози 25 г/л
Наявність коренів, %	76	79	100	100
Середня кількість коренів, шт	5,6±0,6	4,8±0,5	8,7±1,1	8,5±0,8
Середня довжина коренів, мм	34,7±0,9	38,7±0,4	41,3±1,4	52,4±1,1
Утворення калусу, %	24	0	0	0

У досліді використовувалися мікропагони з першого досліді, що вирощені на середовищі з 0,5 мкМ 6-БАП. До укорінення допускалися рослини вільні від уражень грибковими і бактеріальними інфекціями. Кількість мікропагонів у кущиках – 10-15 шт, листя зелене, довжина листя коливається від 3 мм до 12 мм, ширина – 1-9 мм.

Пасаж тривав 30 діб. Фотоперіод при культивуванні становив 16/8 годин світло/темрява при 25°С.

На рисунках 4 та 5 наведено результати культивування ожини на різних середовищах для укорінення.

Середовище Мурасіге та Скуга, у 24% випадків викликає утворення калусу, на середовищах без гормонів калус не утворювався.

Відсутність гормонів чинить сприятливий вплив на ризогенез, про що свідчить 100 відсоткова наявність коренів. Довжина коренів у зразках, отриманих на безгормональних середовищах, на 11-51% більша, порівняно з пагонами, що культивувалися на середовищі Мурасіге та Скуга.



Рис. 4. Ризогенез ожини на середовищі Мурасіге та Скуга на 15 день культивування



Рис. 5. Корені ожини сорту «Торнфрі» на безгормональному середовищі із концентрацією сахарози 20 г/л на 30 день культивування

Суттєвий вплив на процеси коренеутворення здійснює концентрація цукрів. Як свідчать отримані результати підвищення вмісту сахарози на 5 г/л збільшує кількість коренів, що створюються, майже на 55%.

Варто зазначити, що кількість коренів у пагонів, вирощених на безгормональному середовищі з концентрацією сахарози 20 г/л дещо більша, але їх довжина значно менша (на 26,9%) за довжину коренів зразків, що отримані на середовищі з 25 г/л сахарози.

Таким чином показано, що безгормональне середовище з концентрацією сахарози 25 г/л, ідентичне за концентрацією інших компонентів середовищу Мурасіге та Скуга, є найсприятливішим для укорінення ожини сорту «Торнфрі».

3.3. Схема мікроклонального розмноження рослин

Кінцевим продуктом біотехнологічної лабораторії є мікросаджанці у банках (рис. 6) на поживному середовищі, що далі проходять процес адаптації до умов навколишнього середовища.



Рис. 6. Мікросаджанці у банці – кінцевий продукт лабораторії мікроклонального розмноження

До асортименту продукції лабораторії входять:

1. Ожина сортів: Рубен, Орегон, Торнфрі, Блек Бат Блекбері, Тріпл Кроун.

2. Малина сортів: Саня, Гусар, ГленАмпл, Жовтий Гігант, Жар-птиця, Феномен.

3. Полуниця сортів: Еві 2, Хоней, Королева Єлизавета, Альба, Альбїон, Мармелада, Клері.

4. Лаванда Каховка, Лаванда FLP.

5. Підщепи для вишень і черешень Гізела 5 та ВСЛ.

Кінцевим продуктом виробництва всього підприємства є адаптовані саджанці, які залежно від виду, відповідають:

- ДСТУ 4813:2007 Живці малини. Мікроклональне розмноження. Загальні вимоги;
- ДСТУ 4390:2005 Саджанці винограду та чубуки виноградної лози. Технічні умови;
- ДСТУ 6008:2008 Томат. Технологія вирощування. Загальні вимоги;
- ДСТУ 4263:2003 Саджанці чорної, золотистої смородини, порічок червоних і білих та йошти. Загальні технічні умови;
- ДСТУ 4720:2007. Саджанці малини і ожини. Технічні умови;
- ДСТУ 4792:2007. Саджанці плодових культур. Методи визначення якості тощо.

Отримання зазначеної продукції здійснюється за стандартною схемою для методу мікроклонального розмноження з урахуванням особливостей вирощуваної рослини (рис. 7).

Для культивування тканин на кожному з чотирьох етапів застосовується поживне середовище певного складу.

Призначенням продукції є вирощування сортових дерев і кущів у промислових масштабах.

Зберігання і транспортування саджанців проводять в умовах, що забезпечують їх повний захист від псування та змішування з іншими сортами.

Садібний матеріал плодових, ягідних, горіхоплідних та інших культур транспортують певними видами транспорту відповідно до правил перевезення вантажів. При перевезенні садібного матеріалу грузовими автівками з часом в

дорозі не більше однієї доби допускається нагромадження рослин у контейнери з обов'язковим захистом від підсушування шляхом покриття волого-утримуючим матеріалом.

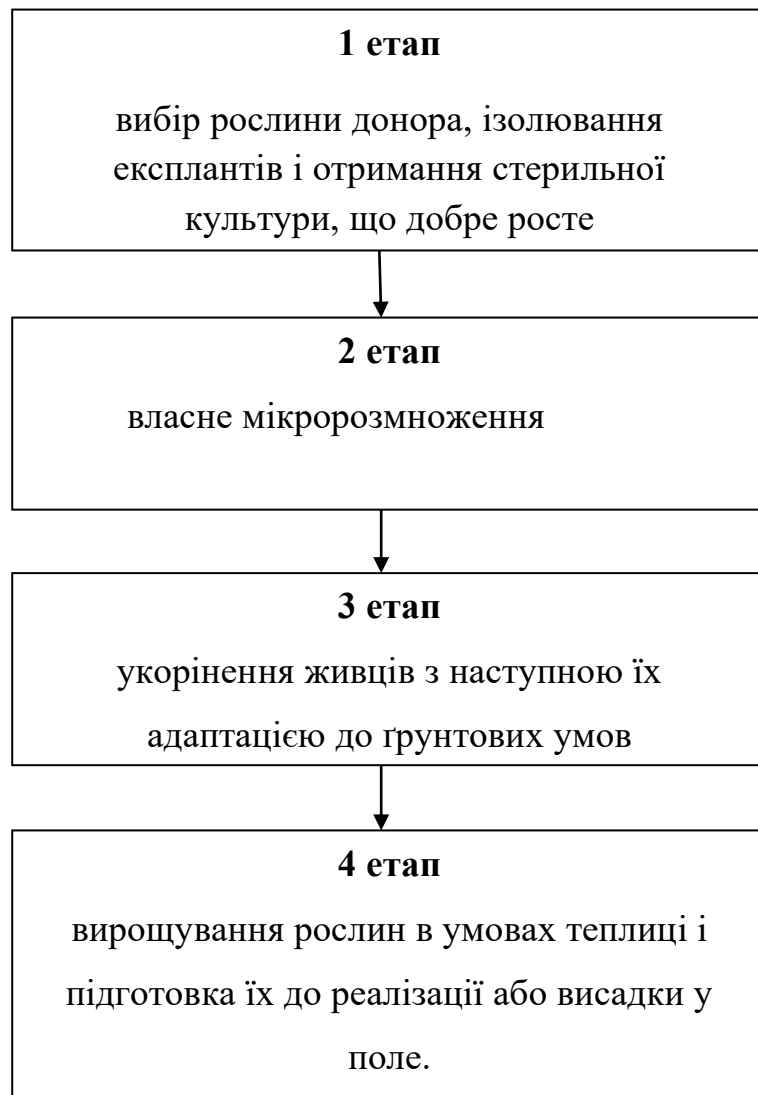


Рис. 7. Схема мікроклонального розмноження рослин на виробництві

Для перевезення залізничним, водним і повітряним транспортом на великі відстані з часом перевезення більше однієї доби саджанці упаковують у тюки роздільно за ботанічним сортом. При цьому використовують транспортні засоби, обладнані холодильними установками, що забезпечують постійну температуру від 0°C до 5°C включно.

Підщепи плодових культур розміром партії більше 10000 шт. дозволяється перевозити в залізничних вагонах без упаковки, але при обов'язковій укладці зв'язаних у пучки рослин на попередньо вкритих вологою соломною чи тирсою підлогу вагону. Кожний шар підщеп перестилають вологоутримуючим матеріалом.

Свіжовикопану розсаду, підготовлену для термінової реалізації, тимчасово зберігають укладеною у ящиках за умов, що виключають підсихання коренів і в'янення листя. Тривале зберігання розсади здійснюють в холодильних камерах при постійній температурі від $-1,5^{\circ}\text{C}$ до $-2,0^{\circ}\text{C}$ включно і вологості 88-97%. Попереднє відтаювання розсади допускається лише за домовленості із замовником. Термін зберігання після відтаювання не перевищує 3-5 днів.

4. ОХОРОНА ПРАЦІ

Однією з функцій сучасної держави є проведення соціальної політики, спрямованої на підвищення безпеки праці. Здійснення цієї функції неможливе без відповідного управління охороною праці, як у державі так і на підприємстві. Реалізація державної політики в галузі охорони праці, спрямовує і координує діяльність керівників підприємств щодо створення безпечних і здорових умов праці та нагляду за охороною праці на кожному підприємстві [1].

Безпека є основною потребою людини, які сьогодні добре вивчені і класифіковані. Збереження здоров'я та життя людини, захист її від небезпек будь-якого походження та створення комфортних умов життєдіяльності є базовою потребою людини. Без реалізації потреб базового рівня, якою є потреба в безпеці, людина не зможе задовольнити соціальні потреби, потреби в признанні та у самовираженні. Це можливо тільки за допомогою складного біологічного процесу, що відбувається в організмі людини та дозволяє підтримувати гарне здоров'я та працездатність – життєдіяльності.

Джерелами техногенних небезпек є відповідні об'єкти техносфери, пов'язані з впливом на людину об'єктів матеріально-культурного середовища. Техносфера – частина біосфери, перетворена людьми за допомогою прямої або непрямой дії технічних засобів з метою якнайкращої відповідності своїм матеріальним і соціально-економічним потребам.

На Всесвітньому форумі в Ріо-де-Жанейро у 1992 році відбулася конференція ООН, присвячена Концепції сталого розвитку світового співтовариства для досягнення стабільного соціального, економічного та екологічного розвитку суспільства. Конференція прийняла документ щодо дій в області безпечної діяльності людства «Порядок денний XXI сторіччя» та зробила висновок, що єдиний спосіб забезпечити безпечне майбутнє – сумісне вирішення проблеми розвитку економіки та збереження навколишнього середовища. Наша країна заявила про підтримку Концепції ООН «Про сталий людський розвиток». Законодавчою базою для реалізації цих завдань є низка

нових законів, що стосуються захисту населення від надзвичайних ситуацій природного і техногенного характеру.

До факторів небезпеки в техногенній сфері належать технічні, санітарно-гігієнічні, організаційні та психофізіологічні чинники. Безпека праці аналізує та вивчає умови праці на об'єктах матеріального виробництва, що виключають вплив небезпечних і шкідливих факторів виробничого середовища на працюючих. Виробниче середовище – простір, у якому відбувається трудова діяльність людини. Це сукупність фізичних, хімічних, біологічних, соціальних та інших факторів, які впливають на людину під час виконання трудових обов'язків. Безпека праці підтримується шляхом виконання комплексу заходів щодо запобігання травматизму, захворювань і аварій.

Кожний фахівець, кожна людина повинна передбачати і підготуватися заздалегідь, бути готовою протистояти будь-якій небезпеці і дотримуватися елементарних правил безпеки життєдіяльності:

1. Передбачати і усвідомлювати небезпеку і уникати її.
2. Бути в курсі загроз, які оточують нас і в курсі наших власних можливостей.
3. Діяти швидко і грамотно.

Негативні зміни середовища визначають необхідність того, що сучасний фахівець повинен бути достатньо підготовлений до успішного рішення задач, що виникають з забезпечення безпеки працюючих та населення, а також з ліквідації наслідків стихійних явищ, аварій та катастроф [12].

Під час роботи на виробництві на людину можуть впливати один, або низка небезпечних та шкідливих виробничих факторів. Безпека праці на виробництві визначається ступенем безпеки окремих технологічних процесів.

В процесі роботи на даному підприємстві на працівника можуть впливати такі небезпечні й шкідливі виробничі фактори:

- ударна хвиля (вибух посудини, що працює під тиском пари рідини);

- підвищена температура поверхонь обладнання, посуду й матеріалів (можливість отримати опік при роботі з автоклавом, сухожаром, електроплиткою та гарячим поживним середовищем);
- хімічні речовини (реагенти для приготування поживного середовища, що можуть викликати хімічні опіки, чи алергію);
- ураження струмом (у разі роботи з несправними електричними приладами).

Задля уникнення небезпечних ситуацій на виробництві усі працівники при прийнятті на роботу, а також в процесі роботи проходять на підприємстві навчання і інструктажі з питань охорони праці, надання першої медичної допомоги, правил поведінки при виникненні аварій. Під час роботи необхідно постійно виконувати правила техніки безпеки.

Забороняється працювати з пошкодженими електроприладами та залишати їх без нагляду. При роботі з нагрівальними електроприладами необхідно поводитись обережно через небезпеку отримати опік. Неможна користуватись пошкодженим хімічним посудом. Реагенти слід зберігати у спеціально відведених місцях, у посудинах з етикетками. До обслуговування автоклава допускаються особи, що пройшли спеціальне навчання та інструктаж.

Приміщення лабораторії обладнане загально-обмінною примусовою вентиляцією, а місця можливого накопичення шкідливих хімічних речовин – місцевими відсмоктувачами. Приміщення лабораторії забезпечене природним, штучним та суміщеним освітленням. Рівень шуму не перевищує норм (60 дБА). Усе електрообладнання, електроінструмент надійно заземляється. У лабораторії знаходяться первинні засоби пожежогасіння (ящики з сухим піском, вогнегасники, пожежні покривала з негорючого теплоізоляційного матеріалу тощо). У кожному приміщенні лабораторії знаходяться аптечки.

Засоби забезпечення безпеки мають забезпечувати нормальні умови для діяльності людини. Ця вимога має бути в першу чергу врахована в ході створення засобів безпеки, оскільки багато з них створюють суттєві незручності

і найчастіше різко знижують працездатність людини. Саме через це від засобів безпеки часто відмовляються, що збільшує ймовірність шкоди, адже вони мають застосовуватися в тих випадках, коли безпека не досягається за допомогою інших засобів – організаційних, технічних та управлінських методів.

Основним питанням теорії і практики безпеки життєдіяльності є питання підвищення рівня безпеки. Безпека – це збалансований стан людини, соціуму, держави, природних, антропогенних систем тощо. Безпека людини – невід'ємна складова характеристика стратегічного напрямку людства, що визначений ООН як «сталий людський розвиток», який веде не тільки до економічного, а й до соціального, культурного, духовного зростання, що сприяє гуманізації менталітету громадян і збагачення позитивного загальнолюдського досвіду.

ВИСНОВКИ

1. В результаті досліджень процесів розмноження лаванди сорту Каховка *in vitro*, було встановлено концентрації ауксинів і цитокінінів у живильних середовищах для власне мікророзмноження і укорінення. Оптимальним середовищем для мікророзмноження є агаризоване живильне середовище MS, доповнене кінетином (1,0 мг/л) і гібереловою кислотою (1,0 мг/л).

2. Оптимальним середовищем для укорінення мікроживців лаванди сорту Каховка є середовище $\frac{1}{2}$ MS з концентрацією Fe-хелату – 5 мг/л, сахарози – 20 г/л, ІМК – 1,5 мг/л.

3. Вигідною особливістю при адаптації живців лаванди сорту Каховка до умов *in vivo* виявилась приживаність їх при відсутності коренів у 50% випадків, та утворення коренів у субстраті, що складається з суміші – торф : перліт: ґрунт : пісок 2 : 1 : 1 : 1.

4. Вивчено регенераційну здатність бічних бруньок ожини сорту «Торнфрі» й встановлено доцільність використання невисоких концентрацій цитокініну 6-БАП (0,5-1,0 мкМ).

5. Досліджено коренеутворювальну здатність ожини сорту «Торнфрі» й проведено порівнювальну роботу з укорінення мікрокущиків на середовищі Мурасіге та Скуга, безгормональних середовищах з концентрацією сахарози 15, 20 і 25 г/л. Встановлено доцільність використання безгормональних середовищ для ризогенезу мікрокущиків ожини зазначеного сорту.

ПРОПОЗИЦІЇ

1. Для мікророзмноження лаванди сорту Каховка *in vitro*, пропонуємо застосовувати агаризоване живильне середовище MS, доповнене кінетином (1,0 мг/л) і гібереловою кислотою (1,0 мг/л).

2. Для укорінення мікроживців лаванди сорту Каховка слід використовувати середовище $\frac{1}{2}$ MS з концентрацією Fe-хелату – 5 мг/л, сахарози – 20 г/л, ІМК – 1,5 мг/л.

3. Для укорінення мікрокущиків ожини сорту «Торнфрі» у поживне середовище доцільно додавати сахарозу у концентрації 25 г/л, що сприятиме утворенню довших і міцніших коренів.

4. Для покращення регенераційної здатності бічних бруньок ожини сорту «Торнфрі» доцільно використання невисоких концентрацій цитокініну 6-БАП (0,5-1,0 мкМ).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гандзюк М.П., Желібо Є.П., Халімовський М.О. Основи охорони праці: Підручник. 5-е вид. / За ред. М.П. Гандзюка. Київ : Каравела, 2011. 384 с.
2. Георгієва Є. І. Вплив концентрації цитокінінів і ауксинів на ріст і розвиток лаванди (*Lavandula angustifolia* Mill.) в умовах *in vitro* // *Студентський науковий вісник МНАУ. Сільськогосподарські науки*. 2018. Вип. 1 (11). С. 46-53.
3. Латушкіна Т. М. Клональне мікророзмноження і оздоровлення лаванди *in vitro* : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук : спец. 06.01.14 «Насінництво». – Сімферополь, 2006. 24 с.
4. Латушкіна Т. М., Дробітько А. В. Перспективи використання та особливості розмноження в культурі *in vitro* *Lavandula angustifolia* Mill. // *Вісник аграрної науки Причорномор'я*. 2007. Вип. 2. С. 223-227.
5. Манушкіна Т. М. Морфогенетичні реакції *Lavandula angustifolia* Mill. у культурі ізольованих апікальних меристем *in vitro* // *Вісник Уманського національного університету садівництва*. 2014. № 2. С. 95-99.
6. Мацкевич О. В., Кімейчук І .В., Мацкевич В. В., Трофічні та фітогормональні детермінанти онтогенезу *in vitro* // *Вісник Сумського національного аграрного університету. Сер. Агронія і біологія*. – Вип. 2 (48). –2022. – С. 111–123.
7. Мацкевич О. В., Корж В. В. Особливості деконтамінації та культивування експлантів ожини // «Новітні технології в рослинництві»: Тези доповідей державної студентської наукової конференції. Біла Церква, 2015. С. 53-54.
8. Мацкевич О.В., Андрієвський В. В., Філіпова Л. М. Вплив 6–бензиламінопурину на гіпергідратацію регенерантів *Rubus fruticosus* L. та *Rubus idaeus* L. // *Матеріали IV Всеукраїнської науково–практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених, «Біотехнологія: звершення та надії» 21–22 травня 2015. Київ. С. 143-144.*

9. Мікроклональне розмноження рослин / Мацкевич В. В., Кравченко Н. В., Подгаєцький А. А. та ін. Суми, 2023. 215 с.

10. Олімпієва О. К. Вплив складу поживного середовища на ріст і розвиток ожини сорту «торнфрі» в умовах *in vitro* // *Студентський науковий вісник МНАУ. Сільськогосподарські науки*. 2018. Вип. 1 (11). С. 197-204.

11. Подгаєцький А. А., Мацкевич В. В., Подгаєцький А. Ан. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин : монографія. Біла Церква : БНАУ, 2018. 209 с.

12. Стиценко Т.Є., Пронюк Г.В., Сердюк Н.М., Хондак І.І. «Безпека життєдіяльності»: навч. посібник. – Харків : ХНУРЕ, 2018. – 336 с.

13. Титаренко Н. В., Теслюк Н. І. Удосконалення процесів мікроклонального розмноження ожини звичайної *Rubus caesius L.* сорту Торнфрі. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2020. № 2. С. 72-84

14. Чорнобров О. Ю. Біотехнологічні особливості мікроклонального розмноження рослин роду *Salix L.* *Науковий вісник НЛТУ України*. 2016. – Вип. 26.7. С. 171-179.

15. Шляхтун С. І. Особливості регенерації лаванди в умовах *in vitro*. Сучасні напрями досліджень у сфері агрономії, тваринництва, рибного та лісового господарства: матеріали I Міжнародної спеціалізованої наукової конференції, м. Полтава, 30 квітня, 2021 р. / Міжнародний центр наукових досліджень. Вінниця : Європейська наукова платформа, 2021. С. 8-12.

16. AbdAlla M. M., R. A. A. Mostafa In Vitro Propagation of Blackberry (*Rubusfruticosus L.*) // *Assiut J. Agric. Sci.* 2015. № 3 (46). P. 88-99.

17. Benson E. E. Plant Conservation Biotechnology. London, University of Abertay, UK: Taylor and Francis Group, 1999. 309 p.

18. Bobrowski V. L., Mello-Farias P. C. , Peters J. A. Micropropagation of blackberries (*Rubus sp.*) cultivars // *Rev. Bras. de Agrociência*. 1996. Vol. 2. № 1. P. 17-20.

19. Finne Åke. Micropropagation of *Rubus spp.* // *Journal of agricultural science in finland*. 1986. Vol. 58. P. 193-196.

20. Fira A., Clapa D., Plopa C. New Aspects Regarding the Micropropagation of Blackberry Cultivar «Thornless evergreen» // Bulletin UASVM Horticulture. 2010. № 67 (1). P. 106-114.
21. Fira A., Clapa D., Simu M. Studies Regarding the Micropropagation of Some Blackberry Cultivars // Bulletin UASVM Horticulture. 2014. № 71 (1). P. 29-37.
22. Gamborg O. L., Miller R. A. , Ojima K. Nutrient requirement of suspension culcultures of soybean root cells // Exp. Cell Res. 1968. № 50 P. 598-600.
23. Hamza A. M., Omaima M. A., Kasem M. M. Direct micropropagation of English lavender (*Lavandula angustifolia* Munstead) plant // J. Plant Production. 2011. Vol. 2 (1) C. 81-96.
24. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. № 15. P. 473-497.
25. Najaf-Abadi A. Jafari, Hamidoghli Y. Micropropagation of thornless trailing blackberry (*Rubus sp.*) by axillary bud explants // Australian Journal of Crop Science. 2009. № 4. P.191-194.
26. Pelizza T. R., Silveira F. N. , Ribeiro R. S., Machado B. D. In vitro establishment of blackberry (*Rubus sp.*) cultivar «Xavante» // Ciência Rural. 2016. Vol. 46. № 9. P. 1542-1545.
27. Prusinowska R., Śmigielski K. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.). a review // Herba polonica. 2014. Vol. 60. № 2. C. 56-66.
28. Tran Van Minh, Tien D., ThiPhuon M., Cao P., Van T. Micropropagation of lavender (*Lavandula angustifolia*) // JIPBS. 2017. Vol 4 (2). C. 7-11.
29. Vescan L. A., Clapa D., Fira A., Pamfil D. Micropropagation of Cold Resistant Blackberry Cultivar «Gazda» // Bulletin USAMV Animal Sciences and Biotechnologies. 2012. № 69 (1-2). P. 282-289.