МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет ТВППТСБ
Кафедра біотехнології та біоінженерії
Спеціальність 162– «Біотехнології та біоінженерія»
Ступінь вищої освіти «Бакалавр»

Допустити до захисту
Декан_____Михайло ГИЛЬ
“____” _____2026р.

Рекомендувати до захисту
В.о. зав. кафедри_____Олена КАРАТЄЄВА
“____” _____2026р.

ОСОБЛИВОСТІ ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ТА МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ВИНОГРАДУ РІЗНИХ СОРТІВ

04.02. – КР. 76-О. 26 05 19. 001

Виконавець:
здобувачка вищої
освіти IV курсу _____ВІРА АЛЕКСЄЄВА

Науковий керівник:
доцентка_____Олена КАРАТЄЄВА

Рецензент:
доцентка _____Олена ЮЛЕВИЧ

Миколаїв 2026

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ 3

ВСТУП 5

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 7

1.1. Біологічна характеристика винограду *Vitis vinifera L.* 7

1.2. Основи культури клітин і тканин рослин *in vitro* 10

1.3. Мікроклональне розмноження винограду: сучасні підходи 12

1.4. Особливості введення експлантів винограду в культуру *in vitro* 18

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ, УМОВИ І МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ РОБОТИ 24

2.1. Місце та об’єкт досліджень 24

2.2. Методика виконання роботи 27

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ 31

3.1. Особливості введення в культуру *in vitro* 31

3.2. Проліферaційна здатність мікропагонів 33

3.3. Укорінення рослин-регенерантів 36

3.4. Технологічна частина та розрахунок матеріалів для процесу мікроклонального розмноження 39

РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ 48

ВИСНОВКИ 53

ПРОПОЗИЦІЇ 55

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 56

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну бакалаврську роботу виконано на 62 сторінках компьютерного тексту, з використанням 61 джерела спеціальної, додаткової літератури та періодичних видань із них 14 латиницею. До роботи внесено 5 таблиць та 2 рисунки.

Тема дослідження – Особливості введення в культуру *in vitro* та мікроклонального розмноження винограду різних сортів.

Мета дослідження – вивчення особливостей введення експлантів винограду (*Vitis vinifera L.*) у культуру *in vitro* та оптимізація умов мікроклонального розмноження з метою підвищення ефективності отримання життєздатного та морфогенетично активного посадкового матеріалу.

Об'єкт дослідження – процес мікроклонального розмноження винограду в умовах культури *in vitro*.

Предмет дослідження – біологічні та технологічні особливості введення експлантів винограду в культуру *in vitro*, включаючи умови стерилізації, склад поживних середовищ та фактори, що впливають на приживлюваність і розвиток експлантів.

Для проведення досліджень були поставлені наступні завдання: надати характеристику особливостям введення в культуру *in vitro*; проаналізувати проліферацийну здатність мікропагонів; проаналізувати укорінення рослин-регенерантів; надати технологічну частина та здійснити розрахунок матеріалів для культури *in vitro*, оцінити стан охорони праці на підприємстві.

У процесі виконання досліджень використовували комплекс лабораторних, біотехнологічних, морфометричних та статистичних методів.

Отримані результати досліджень мають важливе практичне значення для вдосконалення технології мікроклонального розмноження винограду в умовах виробництва. Встановлено ефективні умови введення експлантів у культуру *in vitro*, оптимальні концентрації регуляторів росту для проліферації

мікропагонів та укорінення рослин-регенерантів, що дозволяє підвищити вихід якісного оздоровленого посадкового матеріалу.

ВСТУП

Виноград (*Vitis vinifera L.*) є однією з найцінніших сільськогосподарських культур у світі, яка має важливе продовольче, економічне та технологічне значення. Його використовують як у свіжому вигляді, так і для виробництва широкого спектра продуктів – вин, соків, родзинок та інших перероблених виробів. В Україні виноградарство є перспективною галуззю агропромислового комплексу, однак її розвиток значною мірою стримується проблемами отримання якісного, здорового та однорідного посадкового матеріалу [23].

Традиційні методи розмноження винограду (живцювання, щеплення) не завжди забезпечують високий рівень фітосанітарної чистоти рослин, а також є тривалими та залежать від сезонних умов. Крім того, існує ризик передачі вірусних, бактеріальних та грибкових інфекцій, що негативно впливає на продуктивність насаджень і якість врожаю [17].

У зв’язку з цим особливого значення набувають біотехнологічні методи, зокрема культура тканин і клітин рослин *in vitro*. Мікроклональне розмноження дозволяє отримувати велику кількість генетично однорідного та оздоровленого посадкового матеріалу протягом короткого часу незалежно від пори року. Цей метод широко застосовується у світовій практиці виноградарства та є ефективним інструментом збереження і швидкого відтворення цінних сортів [25].

Водночас ефективність мікроклонального розмноження значною мірою залежить від особливостей сорту, типу експланту, умов стерилізації, складу поживного середовища та регуляторів росту. Одним із найбільш критичних етапів є введення рослинного матеріалу в культуру in vitro, оскільки саме на цьому етапі виникають основні проблеми, пов’язані з контамінацією, некрозом тканин або низькою приживлюваністю експлантів [30].

Таким чином, актуальність даної роботи полягає у необхідності удосконалення підходів до введення в культуру *in vitro* та оптимізації процесу

мікроклонального розмноження винограду різних сортів з урахуванням їх біологічних особливостей. Це сприятиме підвищенню ефективності отримання якісного посадкового матеріалу та розвитку сучасних біотехнологій у виноградарстві.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічна характеристика винограду *Vitis vinifera L.*

Виноград культурний (*Vitis vinifera L.*) належить до роду *Vitis*, родини Vitaceae, порядку Vitales. Рід *Vitis* об'єднує понад 60 видів, проте саме *Vitis vinifera L.* має найбільше господарське значення та широко культивується у світі як основна плодова та технічна культура. Вид характеризується значною генетичною різноманітністю, що зумовлює існування великої кількості сортів, які відрізняються за морфологічними, фізіологічними та господарськими ознаками [34].

Таксономічне положення:

- Домен: Eukaryota
- Царство: Plantae
- Відділ: Magnoliophyta (Покритонасінні)
- Клас: Magnoliopsida (Дводольні)
- Порядок: *Vitales*
- Родина: *Vitaceae*
- Рід: *Vitis*
- Вид: *Vitis vinifera L.*

Морфологічні особливості

Виноград є багаторічною листопадною дерев'янистою ліаною з вираженою полярністю росту. Коренева система добре розвинена, мичкуватого типу, з великою кількістю бічних коренів, здатних проникати на значну глибину (до 5 м і більше залежно від ґрунтових умов). Це забезпечує рослині високу посухостійкість та ефективне засвоєння поживних речовин [28].

Стебло винограду представлено штамбом і багаторічними рукавами, на яких щорічно формуються однорічні пагони. Молоді пагони зелені, трав'янисті, згодом дерев'яніють і набувають коричневого забарвлення.

Важливою морфологічною ознакою є наявність вусиків – видозмінених пагонів, що виконують функцію прикріплення до опори [39].

Листки чергові, прості, різного ступеня розсіченості, з добре розвиненою жилкуватістю. Вони відіграють ключову роль у фотосинтезі, транспірації та газообміні. Поверхня листків може бути гладкою або опушеною, що має адаптивне значення [42].

Суцвіття – складна волоть. Квітки дрібні, зеленуваті, з редукованим оцвітиною. У культурних форм переважають двостатеві квітки, що забезпечує самозапилення, однак можливе і перехресне запилення [33].

Плід – соковита ягода, яка формується у грона. Ягоди характеризуються високим вмістом цукрів (глюкози, фруктози), органічних кислот (винна, яблучна), фенольних сполук, вітамінів і мінеральних речовин. Насіння містить олії, білки та біологічно активні речовини [42].

Фізіолого-біохімічні особливості

Vitis vinifera L. є теплолюбною культурою з високими вимогами до світла. Оптимальна температура для росту становить 25–30 °C, тоді як критичні температури можуть призводити до пошкодження тканин. Рослина чутлива до заморозків, особливо у фазі активної вегетації [28].

Виноград характеризується C3-типом фотосинтезу. Інтенсивність фотосинтетичних процесів залежить від освітлення, температури та водного режиму. Важливу роль відіграє транспірація, яка регулює водний баланс рослини [42].

Особливістю біохімічного складу є наявність фенольних сполук (флавоноїди, таніни), які беруть участь у захисних реакціях, але водночас можуть ускладнювати культивування in vitro через їх окиснення та потемніння експлантів [39].

Репродуктивні та регенераційні властивості

Виноград здатний до як генеративного (насіннєвого), так і вегетативного розмноження. У практиці переважає вегетативне розмноження живцями або щепленням, що дозволяє зберігати сортові ознаки [33].

Важливою біологічною особливістю є здатність до утворення адвентивних коренів і пагонів, що лежить в основі мікроклонального розмноження. Однак регенераційна здатність значною мірою залежить від генотипу, фізіологічного стану рослини та умов культивування [42].

Особливості як об'єкта культури *in vitro*

Виноград є складним об'єктом для біотехнологічних досліджень, що зумовлено рядом факторів [35]:

- високий рівень контамінації експлантів (епіфітна та ендофітна мікрофлора);
- інтенсивне виділення фенольних сполук, що призводить до потемніння середовища та загибелі тканин;
- виражена генотипова залежність регенерації;
- різна реакція сортів на склад поживного середовища та фітогормони.

Разом з тим, застосування культури in vitro дозволяє вирішити низку важливих завдань:

- отримання оздоровленого (безвірусного) посадкового матеріалу;
- швидке масове розмноження цінних сортів;
- збереження генетичних ресурсів;
- створення вихідного матеріалу для селекції.

Господарське значення.

Виноград має велике економічне значення як сировина для виноробної, харчової та фармацевтичної промисловості. Його продукція використовується для виробництва вин, соків, концентратів, сушених плодів та біологічно активних добавок [28].

Таким чином, *Vitis vinifera L.* характеризується складною морфологічною організацією, високою фізіологічною пластичністю та значною господарською цінністю. Біологічні особливості виду, зокрема здатність до регенерації та водночас чутливість до умов культивування, визначають специфіку його введення в культуру in vitro та подальшого мікроклонального розмноження.

1.2. Основи культури клітин і тканин рослин *in vitro*

Культура клітин і тканин рослин *in vitro* є одним із найбільш динамічно розвинених напрямів сучасної біотехнології, що ґрунтується на фундаментальній властивості рослинних клітин – тотипотентності. Ця властивість полягає у здатності окремої клітини або групи клітин за відповідних умов відновлювати цілий організм, і саме вона стала теоретичною основою для створення ефективних методів клонального розмноження, оздоровлення рослин та збереження їх генетичних ресурсів. На відміну від традиційних підходів, що використовують природні умови вирощування, методи *in vitro* дозволяють здійснювати контроль усіх факторів росту і розвитку, що відкриває широкі можливості для керування морфогенезом [24].

Сутність культури *in vitro* полягає у вирощуванні ізольованих органів, тканин або клітин рослин на штучних поживних середовищах у стерильних умовах. Такий підхід дає змогу виключити вплив неконтрольованих зовнішніх факторів і забезпечити оптимальні умови для росту та розвитку рослинного матеріалу. Важливим аспектом є те, що навіть диференційовані клітини здатні за певних умов переходити у стан дедиференціації з утворенням калюсної тканини, а згодом знову диференціюватися з формуванням органів або цілої рослини. Ці процеси лежать в основі морфогенезу, який у культурі *in vitro* може відбуватися шляхом органогенезу або соматичного ембріогенезу [17].

Органогенез передбачає формування окремих органів – пагонів або коренів – безпосередньо з тканин експланта або через стадію калюсу. Соматичний ембріогенез, у свою чергу, характеризується утворенням структур, подібних до зародків, які здатні розвиватися у повноцінні рослини. Обидва шляхи широко використовуються у біотехнології рослин, проте їх ефективність значною мірою залежить від генотипу, фізіологічного стану вихідного матеріалу та умов культивування [13].

У практиці культури *in vitro* використовують різні типи експлантів, серед яких найбільш поширеними є апікальні та пазушні меристеми, сегменти

пагонів, листкові пластинки, черешки та інші органи. Вибір експланта має принципове значення, оскільки він визначає як рівень контамінації, так і потенціал регенерації. Особливої уваги набуває використання меристем, які завдяки високій меристематичній активності та низькому рівню інфікування дозволяють отримувати оздоровлений посадковий матеріал [11].

Одним із ключових факторів успішного культивування є склад поживного середовища. Найбільш універсальним і широко застосовуваним є середовище Мурасіге–Скуга (MS), яке характеризується високим вмістом макро- та мікроелементів. Макроелементи забезпечують основні фізіологічні процеси, тоді як мікроелементи беруть участь у ферментативних реакціях і регуляції метаболізму. До складу середовища також входять вітаміни, амінокислоти та джерело вуглецю, зазвичай сахароза, оскільки в умовах *in vitro* фотосинтетична активність рослин обмежена. Для створення твердого середовища використовують агар або інші гелеутворювачі [3, 4].

Важливу роль у регуляції росту і розвитку відіграють фітогормони. Співвідношення ауксинів і цитокінінів визначає напрям морфогенезу: переважання цитокінінів стимулює утворення пагонів, тоді як ауксини сприяють формуванню кореневої системи. Збалансоване поєднання цих регуляторів дозволяє керувати процесами проліферації, диференціації та укорінення рослин. Крім того, використовують гібереліни, які стимулюють подовження пагонів, та інші регулятори, що впливають на фізіологічний стан культур [10].

Культивування рослин *in vitro* здійснюється за строго контрольованих умов, серед яких важливими є температура, освітлення, фотоперіод та вологість. Оптимальна температура для більшості культур становить 22–25 °C, а фотоперіод зазвичай становить 16 годин світла і 8 годин темряви. Освітлення має бути достатнім для підтримання фотосинтезу, але не надмірним, щоб уникнути стресових реакцій [16].

Процес мікроклонального розмноження включає кілька послідовних етапів. Першим є введення експланта в культуру, що потребує ретельної

стерилізації та відбору життєздатного матеріалу. Наступним етапом є проліферація, під час якої відбувається інтенсивне розмноження пагонів. Далі проводять укорінення отриманих мікропагонів, після чого рослини переводять у нестерильні умови з поступовою адаптацією до зовнішнього середовища. Кожен із цих етапів має свої особливості та потребує оптимізації [18].

Незважаючи на значні переваги, культура клітин і тканин рослин *in vitro* супроводжується низкою проблем. Однією з основних є контамінація мікроорганізмами, яка може призводити до загибелі культур. Іншою важливою проблемою є сомаклональна мінливість, що проявляється у генетичних змінах рослин, отриманих у культурі. Крім того, у багатьох видів рослин спостерігається виділення фенольних сполук, що окиснюються та викликають потемніння середовища і тканин. Також поширеним явищем є вітрифікація, або склоподібність, що призводить до порушення нормального розвитку рослин [20].

Практичне значення культури *in vitro* є надзвичайно широким. Вона використовується для швидкого масового розмноження рослин, отримання безвірусного посадкового матеріалу, збереження рідкісних і зникаючих видів, а також у селекційних програмах для створення нових сортів. Таким чином, культура клітин і тканин рослин *in vitro* є універсальним інструментом сучасної біотехнології, який поєднує фундаментальні знання про фізіологію рослин із практичними методами їх розмноження та модифікації. Глибоке розуміння цих процесів є необхідною передумовою для ефективного застосування мікроклонального розмноження, зокрема у виноградарстві, де біологічні особливості культури потребують індивідуального підходу до умов культивування [22].

1.3. Мікроклональне розмноження винограду: сучасні підходи

Мікроклональне розмноження винограду (*Vitis vinifera L.*) є одним із провідних напрямів сучасної рослинної біотехнології, що забезпечує швидке

отримання генетично однорідного та фітосанітарно чистого посадкового матеріалу. Упродовж останніх років спостерігається значне зростання кількості досліджень, спрямованих на оптимізацію умов культивування *in vitro* саме для винограду, що пов'язано з високою економічною цінністю культури та необхідністю підвищення якості продукції [25].

Традиційні методи розмноження винограду, такі як живцювання та щеплення, мають низку обмежень, зокрема пов'язаних із повільними темпами розмноження, сезонністю робіт і ризиком передачі патогенів. Особливої актуальності ця проблема набуває у випадку вірусних захворювань, які можуть тривалий час зберігатися в рослинному матеріалі та знижувати продуктивність насаджень. У цьому контексті мікроклональне розмноження виступає ефективним інструментом оздоровлення рослин і створення сертифікованого посадкового матеріалу [27].

За даними сучасних досліджень, традиційні методи розмноження винограду не забезпечують достатнього рівня оздоровлення рослин від вірусних інфекцій, що негативно впливає на врожайність і довговічність насаджень. У зв'язку з цим методи культури тканин *in vitro* розглядаються як ефективна альтернатива, здатна забезпечити отримання безвірусного матеріалу [48].

Ключовим етапом мікроклонального розмноження є введення експланта в культуру *in vitro*. Цей процес супроводжується рядом труднощів, серед яких найважливішими є контамінація мікроорганізмами та окиснення фенольних сполук. Для зниження рівня інфікування застосовують різні схеми стерилізації із використанням антисептиків, таких як гіпохлорит натрію, етанол, перекис водню, а також комбінації цих речовин. Разом з тим, надмірна стерилізація може призводити до пошкодження тканин і зниження життєздатності експлантів, що потребує ретельної оптимізації режимів обробки [44].

Однією з характерних особливостей винограду як об'єкта культури *in vitro* є інтенсивне виділення фенольних сполук, які в процесі окиснення викликають потемніння середовища та загибель тканин. Для запобігання

цьому явищу використовують антиоксиданти (аскорбінова кислота, лимонна кислота), адсорбенти (активоване вугілля) та часту зміну поживного середовища. Також ефективним є зниження інтенсивності освітлення на початкових етапах культивування [40].

Процес мікроклонального розмноження винограду зазвичай включає чотири основні етапи: ініціацію культури, проліферацію пагонів, укорінення та акліматизацію рослин. На етапі проліферації особливе значення має склад поживного середовища, зокрема концентрація та співвідношення фітогормонів. Найчастіше використовують середовище Мурасіге–Скуга з додаванням цитокінінів, таких як 6-бензиламінопурин (BAP), який стимулює утворення великої кількості мікропагонів. Однак надмірні концентрації цитокінінів можуть призводити до утворення аномальних структур та вітрифікації [38].

Сучасні підходи до мікроклонального розмноження базуються на використанні різних типів експлантів. Показано, що апікальні меристеми є найбільш ефективними для отримання оздоровлених рослин, тоді як вузлові сегменти забезпечують вищий коефіцієнт розмноження. Водночас дослідження підтверджують, що вибір експланта значною мірою визначає успішність усіх наступних етапів культивування [49, 51].

Особливу увагу в сучасних дослідженнях приділяють проблемі контамінації та окиснення фенольних сполук. Встановлено, що додавання антиоксидантів, таких як аскорбінова та лимонна кислоти, значно знижує рівень потемніння тканин і підвищує виживаність експлантів. Крім того, використання активованого вугілля та часта зміна середовища дозволяють мінімізувати негативний вплив фенолів [55, 61].

На етапі проліферації ключову роль відіграють регулятори росту. Доведено, що використання 6-бензиламінопурину (BAP) у поєднанні з низькими концентраціями ауксинів забезпечує максимальну кількість мікропагонів у винограду. Разом з тим, надмірні концентрації цитокінінів

можуть викликати вітрифікацію тканин, що підтверджується дослідженнями [59].

Укорінення мікропагонів є окремим важливим етапом, який часто потребує зміни гормонального балансу на користь ауксинів. Для цього використовують індолілмасляну (IBA) або нафтилоцтову (NAA) кислоти. Успішність укорінення залежить від генотипу, віку культури та умов культивування. У деяких випадках укорінення ефективніше відбувається *ex vitro*, що дозволяє спростити технологічний процес [60].

Сучасні дослідження також спрямовані на оптимізацію укорінення мікропагонів. Застосування індолілмасляної кислоти (IBA) у концентраціях 0,5–1,0 мг/л сприяє формуванню добре розвиненої кореневої системи. Водночас деякі автори відзначають ефективність укорінення *ex vitro*, що дозволяє скоротити витрати та спростити технологію [53, 61].

Окремим напрямом сучасних досліджень є використання біореакторів та тимчасово занурюваних систем (TIS). Такі системи забезпечують кращий газообмін і рівномірне надходження поживних речовин, що сприяє підвищенню коефіцієнта розмноження та якості рослинного матеріалу. Це особливо важливо для масштабування процесу в умовах промислового виробництва [52].

Сучасні дослідження приділяють значну увагу оптимізації умов культивування для різних сортів винограду, оскільки генотипова залежність є одним із ключових факторів, що визначають ефективність мікроклонального розмноження. Встановлено, що різні сорти по-різному реагують на склад поживних середовищ, концентрацію регуляторів росту та умови освітлення. Це зумовлює необхідність індивідуального підходу до кожного сорту при розробці протоколів культивування [54].

Важливим аспектом є також генотипова залежність мікроклонального розмноження. Показано, що різні сорти винограду значно відрізняються за регенераційною здатністю та реакцією на поживні середовища. Це зумовлює необхідність розробки індивідуальних протоколів для кожного сорту [52, 56].

Важливим напрямом є отримання безвірусного посадкового матеріалу шляхом поєднання культури меристем із термотерапією або хіміотерапією. Такі підходи дозволяють ефективно елімінувати вірусні інфекції та підвищити якість садивного матеріалу [57].

Сучасні підходи також включають поєднання культури *in vitro* з методами оздоровлення рослин, такими як термотерапія та хіміотерапія. Поєднання культури меристем із термотерапією дозволяє ефективно елімінувати вірусні інфекції у винограду [49].

Разом з тим, мікроклональне розмноження винограду має певні обмеження. Серед них слід відзначити ризик сомаклональної мінливості, що може призводити до генетичних відхилень у потомстві, а також високі витрати на створення та підтримання стерильних умов. Проте при дотриманні оптимальних технологічних параметрів ці недоліки можуть бути мінімізовані.

Важливим аспектом сучасних досліджень є передстерилізаційна підготовка експлантів, яка значною мірою визначає успішність подальшого введення в культуру *in vitro*. Зокрема, все частіше застосовують вирощування донорних рослин у контрольованих умовах (теплиці або кліматичні камери), що дозволяє знизити рівень епіфітної мікрофлори та отримати більш однорідний і фізіологічно активний матеріал. За даними сучасних досліджень використання так званих «прекондиціонованих» рослин значно підвищує відсоток стерильних та життєздатних експлантів [48, 52, 60].

Крім того, важливу роль відіграє сезонність відбору експлантів. Встановлено, що найкращі результати отримують при використанні матеріалу, відібраного у фазі активного росту (весняно-літній період), коли рівень метаболічної активності клітин є максимальним. У цей період спостерігається підвищена здатність до регенерації та менша інтенсивність некротичних процесів. Водночас експланти, відібрані в період спокою, характеризуються нижчою приживлюваністю та повільнішим розвитком [47].

Окремі дослідження акцентують увагу на ролі розміру експланта. Зокрема, дрібні меристеми (менше 0,5 мм) забезпечують високий рівень

оздоровлення від вірусів, проте мають нижчий відсоток виживання. Натомість більші експланти (вузлові сегменти 1–2 см) легше адаптуються до умов *in vitro*, але можуть зберігати внутрішню інфекцію. Це створює необхідність компромісного підходу залежно від мети дослідження – оздоровлення або масове розмноження [32].

Сучасні наукові роботи також розглядають використання антистресових агентів на етапі введення експлантів. До таких речовин належать поліетиленгліколь, пролін, а також деякі природні біостимулятори, які сприяють стабілізації клітинних мембран і підвищенню стійкості тканин до стресових факторів. Додавання таких компонентів до поживного середовища може суттєво підвищити приживлюваність експлантів винограду [56].

Ще одним перспективним напрямом є застосування світлодіодного (LED) освітлення з різними спектральними характеристиками. Доведено, що використання комбінацій червоного та синього світла може позитивно впливати на процеси морфогенезу та знижувати рівень окисного стресу у тканинах. Це відкриває нові можливості для оптимізації умов культивування на етапі ініціації [44].

Також слід відзначити значення контролю pH поживного середовища. Відомо, що оптимальний рівень pH (5,6–5,8) сприяє кращому засвоєнню поживних речовин і стабільності компонентів середовища. Відхилення від цього діапазону можуть негативно впливати на життєздатність експлантів і спричиняти пригнічення росту [42].

У сучасних дослідженнях також підкреслюється важливість асептичної техніки та організації роботи в лабораторії. Використання ламінарних боксів, стерильного інструментарію та суворе дотримання правил асептики є необхідними умовами для успішного введення експлантів у культуру. Навіть незначні порушення стерильності можуть призводити до втрати значної кількості матеріалу [39-40].

Незважаючи на значні досягнення, мікроклональне розмноження винограду супроводжується певними труднощами. Серед них важливими

залишаються сомаклональна мінливість, висока вартість технології та необхідність суворого контролю стерильності. Однак сучасні дослідження свідчать про поступове вдосконалення технологій, що дозволяє мінімізувати ці недоліки [38].

Таким чином, аналіз сучасної наукової літератури свідчить, що мікроклональне розмноження винограду є перспективним і активно розвиненим напрямом біотехнології. Подальші дослідження спрямовані на оптимізацію умов культивування, зниження витрат та підвищення ефективності отримання якісного посадкового матеріалу.

1.4. Особливості введення експлантів винограду в культуру *in vitro*

Введення експлантів винограду (*Vitis vinifera L.*) у культуру *in vitro* є одним із найскладніших і водночас визначальних етапів мікроклонального розмноження, від успішності якого залежить ефективність усього подальшого процесу. Саме на цьому етапі закладаються передумови для отримання життєздатних, стерильних та морфогенетично активних культур. Незважаючи на значну кількість досліджень, проблема ефективного введення винограду в культуру *in vitro* залишається актуальною, що пов’язано з біологічними особливостями культури, зокрема високим рівнем контамінації, інтенсивним виділенням фенольних сполук та генотиповою специфічністю [35].

Однією з ключових передумов успішного введення є правильний вибір вихідного матеріалу – експланта. У сучасній практиці використовують різні типи експлантів, зокрема апікальні та пазушні бруньки, вузлові сегменти пагонів, меристеми, а іноді й фрагменти листків або черешків. Найбільш ефективними вважаються апікальні меристеми, оскільки вони характеризуються високою проліферативною активністю та відносно низьким рівнем інфікування вірусами. Використання меристем розміром 0,2–0,5 мм дозволяє значно підвищити частоту отримання безвірусних рослин. Водночас

вузлові сегменти забезпечують вищий відсоток приживлюваності та швидший початок росту, що робить їх зручними для масового розмноження [30].

Важливим фактором є фізіологічний стан донорної рослини. Дослідження показують, що експланти, отримані з молодих, активно вегетуючих пагонів, мають значно вищу здатність до регенерації порівняно з матеріалом із старіших тканин. Крім того, значний вплив мають умови вирощування материнських рослин, зокрема рівень освітлення, мінерального живлення та фітосанітарний стан [29].

Однією з основних проблем при введенні експлантів є їх контамінація мікроорганізмами. Виноград, як польова культура, характеризується наявністю як епіфітної, так і ендофітної мікрофлори, що значно ускладнює отримання стерильних культур. Для вирішення цієї проблеми застосовують багатоступеневі схеми стерилізації, які включають попереднє промивання у проточній воді, обробку мийними засобами, а також використання хімічних стерилізуючих агентів, таких як етанол, гіпохлорит натрію або кальцію, перекис водню. За даними Singh et al. (2022), оптимальне поєднання 70 % етанолу (30–60 с) та 0,1–0,5 % розчину гіпохлориту натрію (10–15 хв) забезпечує високий рівень стерильності при мінімальному пошкодженні тканин [26-27].

Однак проблема стерилізації ускладнюється тим, що надмірна обробка може призводити до некрозу тканин і зниження їх життєздатності. Тому важливим є пошук балансу між ефективністю знезараження та збереженням фізіологічної активності експлантів. У сучасних дослідженнях також розглядається використання антибіотиків та фунгіцидів для контролю внутрішньої інфекції, проте їх застосування потребує обережності через можливий фітотоксичний ефект [25].

Іншою суттєвою проблемою є виділення фенольних сполук, яке характерне для винограду. У процесі механічного пошкодження тканин під час ізоляції експлантів відбувається активізація ферментів поліфенолоксидаз, що призводить до окиснення фенолів і утворення токсичних продуктів. Це

проявляється у вигляді потемніння тканин і поживного середовища, що може призводити до загибелі експлантів. Для запобігання цьому явищу застосовують різні підходи, зокрема додавання антиоксидантів (аскорбінова кислота, лимонна кислота), використання активованого вугілля, а також зниження інтенсивності освітлення на початкових етапах культивування. Як зазначають комбіноване використання антиоксидантів дозволяє значно підвищити виживаність експлантів винограду [23].

Не менш важливим є склад поживного середовища, яке використовується на етапі ініціації культури. Найчастіше застосовують середовище Мурасіге–Скуга з модифікаціями, що враховують особливості винограду. Зокрема, зменшення концентрації макросолей або додавання органічних добавок (кокосове молоко, амінокислоти) може позитивно впливати на приживлюваність експлантів. Значну роль відіграють також регулятори росту, які стимулюють початковий розвиток бруньок і формування пагонів. Використання низьких концентрацій цитокінінів (0,5–1,0 мг/л BAP) на етапі ініціації сприяє активізації ростових процесів без викликання морфологічних аномалій [20].

Сучасні дослідження також приділяють увагу впливу фізичних факторів на успішність введення експлантів. Зокрема, температура культивування, освітлення та фотоперіод можуть суттєво впливати на приживлюваність і подальший розвиток культур. Оптимальними вважаються умови з температурою 24–25 °C та фотоперіодом 16 годин світла. На початкових етапах іноді застосовують знижене освітлення або повну темряву для зменшення окиснення фенольних сполук [53].

Особливу увагу приділяють генотиповим особливостям винограду. Встановлено, що різні сорти суттєво відрізняються за здатністю до введення в культуру *in vitro*. Деякі генотипи характеризуються високою регенераційною здатністю та легко адаптуються до умов культивування, тоді як інші є більш чутливими та потребують індивідуальних підходів. Це зумовлює необхідність оптимізації протоколів для кожного конкретного сорту [61].

Останніми роками активно досліджуються нові підходи до підвищення ефективності введення експлантів. Зокрема, використання наночастинок срібла, біостимуляторів та природних екстрактів показує перспективні результати у зниженні контамінації та стимуляції росту. Також розглядається можливість застосування попередньої обробки донорних рослин у контрольованих умовах для зниження рівня інфікування [18].

Суттєвого значення у процесі введення експлантів винограду в культуру *in vitro* набуває використання поверхнево-активних речовин (ПАР) під час передстерилізаційної обробки. Додавання невеликих концентрацій Твіну-20 або Твіну-80 до мийних розчинів сприяє кращому змочуванню поверхні рослинного матеріалу та більш ефективному видаленню мікроорганізмів із важкодоступних ділянок, зокрема з пазух бруньок. За даними сучасних досліджень, застосування ПАР у поєднанні з класичними стерилізуючими агентами дозволяє підвищити ефективність знезараження на 15–25 % [54, 56].

Останніми роками активно вивчається використання нанотехнологій у культурі рослин *in vitro*. Зокрема, наночастинки срібла (AgNPs) демонструють виражену антимікробну активність і можуть застосовуватись як альтернатива або доповнення до традиційних стерилізуючих засобів. Дослідження показують, що обробка експлантів низькими концентраціями наночастинок срібла сприяє зниженню бактеріальної та грибкової контамінації без суттєвого впливу на життєздатність тканин. Однак питання їх безпечності та можливого впливу на генетичну стабільність рослин потребує подальшого вивчення [19, 55].

Перспективним підходом є також використання природних антимікробних сполук рослинного походження. Екстракти ефірних олій (наприклад, чебрецю, евкаліпта, чайного дерева) виявляють інгібуючу дію щодо широкого спектра мікроорганізмів і можуть застосовуватись на етапі підготовки експлантів. Їх використання дозволяє зменшити частоту контамінації без вираженого фітотоксичного ефекту [57].

Значну увагу приділяють також ролі ендофітної мікрофлори, яка часто є прихованим джерелом контамінації. Сучасні підходи передбачають використання молекулярних методів (ПЛР-аналізу) для виявлення латентної інфекції у донорних рослинах ще до введення експлантів у культуру. Це дозволяє здійснювати попередній відбір матеріалу та підвищувати загальну ефективність культивування [58].

Крім того, у сучасних роботах підкреслюється важливість використання антиоксидантних систем нового покоління. До них належать поліфенолзв'язуючі агенти, такі як полівінілпіролідон (PVP) та полівінілполіпіролідон (PVPP), які ефективно адсорбують фенольні сполуки та запобігають їх окисненню. Додавання цих компонентів до поживного середовища або використання їх на етапі ізоляції експлантів дозволяє значно зменшити некротичні процеси [61].

Окремим напрямом досліджень є оптимізація газового режиму в культуральних ємностях. Встановлено, що накопичення етилену та інших летких метаболітів може негативно впливати на розвиток експлантів. Використання спеціальних кришок із газопроникними мембранами або періодична вентиляція культур дозволяє покращити ріст і знизити рівень фізіологічного стресу [52].

Також заслуговує уваги застосування так званого «темнового старту» (dark incubation) на початковому етапі культивування. Короткочасне утримання експлантів у темряві (2–5 діб) після введення в культуру сприяє зниженню окиснення фенольних сполук та підвищує рівень приживлюваності. Після цього культури переводять у стандартні умови освітлення [50].

У контексті сучасних біотехнологій також розглядається використання автоматизованих систем контролю параметрів культивування. Такі системи дозволяють точно регулювати температуру, вологість, освітлення та газовий склад середовища, що особливо важливо на чутливому етапі введення експлантів у культуру *in vitro* [48].

Отже, новітні дослідження свідчать про активний розвиток технологічних підходів до введення експлантів винограду в культуру *in vitro*, що включає використання інноваційних методів стерилізації, антиоксидантного захисту, молекулярного контролю якості матеріалу та оптимізації фізичних умов культивування. Це дозволяє значно підвищити ефективність отримання стерильних і життєздатних культур та зменшити втрати на початкових етапах мікроклонального розмноження [16-17].

Таким чином, введення експлантів винограду в культуру *in vitro* є складним багатофакторним процесом, що потребує врахування біологічних особливостей культури, оптимізації умов стерилізації, складу поживного середовища та фізичних параметрів культивування. Аналіз сучасних літературних джерел свідчить, що успішність цього етапу визначається комплексним підходом і значною мірою залежить від генотипу рослини та якості вихідного матеріалу. Подальше вдосконалення методів введення експлантів сприятиме підвищенню ефективності мікроклонального розмноження винограду та розширенню його застосування у практиці виноградарства.

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ, УМОВИ І МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ РОБОТИ

2.1. Місце та об’єкт досліджень

Фермерське господарство «Агролайф» є вузькоспеціалізованим сільськогосподарським підприємством, що здійснює діяльність у галузі рослинництва, зокрема плодоовочівництва. Підприємство належить до категорії малого бізнесу. Виробниче оснащення є стаціонарним. Режим роботи – перервний, із двома вихідними днями на тиждень та врахуванням святкових днів. Тривалість робочої зміни становить 8 годин [45].

Підприємство розташоване за адресою: Миколаївська область, Вітовський район, с. Українка. Виробнича структура включає тепличний комплекс, розміщений за юридичною адресою, та лабораторію мікроклонального розмноження, що знаходиться у місті Миколаєві. У лабораторії здійснюється вирощування рослин-регенерантів, які після цього передаються до теплиць для подальшої адаптації до ґрунтових умов. Кінцевим результатом є отримання садивного матеріалу, який становить основну продукцію підприємства [46].

Лабораторія мікроклонального розмноження складається з таких функціональних приміщень [45]:

- кімната для миття посуду та приготування поживних середовищ – 50 м²;
- автоклавна – 50 м²;
- операційна кімната – 22 м²;
- культуральна кімната – 15 м²;
- адміністративні приміщення – 40 м²;
- санітарний вузол – 3 м²;
- душова кімната – 15 м².

Основною продукцією фермерського господарства є саджанці черешні та лаванди. Крім того, у менших обсягах для колекційних цілей вирощуються

малина, ожина, волоський горіх, полуниця, сенполія, актинідія, жимолость та шавлія [46].

Підприємство забезпечене необхідним технологічним обладнанням та інженерними комунікаціями, що створює належні умови для здійснення біотехнологічних процесів [45].

Біотехнологічна лабораторія являє собою спеціалізований комплекс приміщень, організованих відповідно до технологічних етапів введення експлантів у культуру *in vitro* та їх подальшого культивування. Кожне приміщення оснащене відповідним обладнанням, необхідним для виконання конкретних операцій (табл. 1).

Таблиця 1

Будова та обладнання біотехнологічної лабораторії

Приміщення	Обладнання
Кімната для миття посуду	мийниці з гарячою та холодною водою; дистилятор; бідистилятор;
Приміщення для стерилізації (автоклавна)	автоклав; сушильна шафа
Кімната для приготування живильних середовищ	лабораторні столи; шафи для зберігання реактивів і посуду; ваги; іонометр; магнітні мішалки; електроплитки; холодильник.
Операційна кімната (бокс)	ламінар-бокс; бактерицидні лампи;
Культуральна кімната	стелажі зі скляними полками і лампами; кондиціонер; зволожувач повітря; реле часу; термометр; гігрометр.

У даній лабораторії кімната для миття посуду об’єднана з приміщенням для приготування поживних середовищ. У мийній зоні встановлені глибокі

раковини з кислотостійкого матеріалу, підведено гаряче та холодне водопостачання, а також розміщені установки для отримання дистильованої та бідистильованої води [46].

Приготування поживних середовищ здійснюється на спеціально обладнаних лабораторних столах із використанням точних ваг, pH-метрів та магнітних мішалок. Для зберігання реактивів і концентрованих розчинів використовуються шафи та холодильне обладнання (рис. 1).

Рис. 1. **Кімната для приготування поживних середовищ**

Кімната стерилізації призначена для обробки поживних середовищ, лабораторного посуду та інструментів. Вона оснащена вертикальними автоклавами типу ВК-75 та сушильною шафою, що забезпечує стерилізацію сухим жаром [41].

Роботи в асептичних умовах виконуються в операційній кімнаті (рис. 2), яка обладнана ламінарними боксами та бактерицидними лампами. Ламінар-бокс забезпечує подачу стерильного повітря через бактеріальні фільтри, що створює необхідні умови для проведення маніпуляцій з експлантами. У робочій зоні розміщуються поживні середовища, мікророслини, стерильні інструменти (скальпелі, пінцети), а також ємності зі спиртом і спиртівки. Культивування ізольованих тканин здійснюється у культуральній кімнаті з контрольованими параметрами мікроклімату [45].

Рис. 2. **Операційна кімната**

Температура підтримується на рівні близько 25–26 °C, відносна вологість повітря становить приблизно 70 %. Освітлення та фотоперіод регулюються за допомогою реле часу [21].

Подальший етап вирощування рослин-регенерантів відбувається у тепличному комплексі, де створюються умови для їх адаптації до *ex vitro*. З метою запобігання вторинному інфікуванню підтримується контрольований мікроклімат, зокрема застосовується система штучного туманоутворення для забезпечення підвищеної вологості повітря [12].

2.2. Методика виконання роботи

Дослідження проводилися в умовах лабораторії мікроклонального розмноження фермерського господарства «Агролайф» (м. Миколаїв) із використанням загальноприйнятих методів культури клітин і тканин рослин *in vitro*, під час практик у 2025–2026 роках [46].

Тема дослідження – Особливості введення в культуру *in vitro* та мікроклонального розмноження винограду різних сортів.

Мета дослідження – вивчення особливостей введення експлантів винограду (*Vitis vinifera L.*) у культуру *in vitro* та оптимізація умов

мікроклонального розмноження з метою підвищення ефективності отримання життєздатного **та морфогенетично активного посадкового матеріалу.**

Об'єкт дослідження – процес мікроклонального розмноження винограду в умовах культури *in vitro*.

Предмет дослідження – біологічні та технологічні особливості введення експлантів винограду в культуру *in vitro*, включаючи умови стерилізації, склад поживних середовищ та фактори, що впливають на приживлюваність і розвиток експлантів.

Для проведення досліджень були поставлені наступні завдання: надати характеристику особливостям введення в культуру *in vitro*; проаналізувати проліферацийну здатність мікропагонів; проаналізувати укорінення рослин-регенерантів; надати технологічну частину та здійснити розрахунок матеріалів для культури *in vitro*.

Дослідження проводили за факторною схемою з урахуванням сортових особливостей винограду та впливу регуляторів росту на етапі введення експлантів у культуру *in vitro*.

Таблиця 2

Схема проведення досліду

Сорт винограду	ВАР, мг/л (проліферація)	ІМК (ІВА), мг/л (укорінення)	Експлантів, шт	Повторність
Аркадія	0	0	20	3
	0,5	0,5	20	3
	1,0	1,0	20	3
Каберне Совіньйон	0	0	20	3
	0,5	0,5	20	3
	1,0	1,0	20	3

На першому етапі здійснювали відбір рослинного матеріалу. Для цього використовували молоді, здорові пагони винограду без видимих ознак ураження хворобами чи шкідниками. Із пагонів ізолювали вузлові сегменти з пазушними бруньками, які слугували експлантами [11].

Підготовка експлантів включала попереднє промивання у проточній воді протягом 20–30 хвилин з метою видалення механічних забруднень. Далі матеріал обробляли мийним розчином із додаванням поверхнево-активних речовин, після чого ретельно промивали стерильною водою [7].

Стерилізацію експлантів проводили в асептичних умовах за стандартною схемою. Спочатку їх обробляли 70 % етанолом протягом 30–60 секунд, після чого переносили у розчин гіпохлориту натрію (0,1–0,5 %) на 10–15 хвилин. Після стерилізації експланти тричі промивали стерильною дистильованою водою для видалення залишків стерилізуючих агентів [5].

Підготовлені експланти висаджували на поживне середовище Мурасіге–Скуга (MS), модифіковане відповідно до умов експерименту. До складу середовища входили макро- та мікроелементи, вітаміни, сахароза (20–30 г/л) як джерело вуглецю та агар (6–8 г/л) для гелеутворення. Регуляцію росту здійснювали шляхом додавання фітогормонів: цитокінінів (6-бензиламінопурин, BAP) для стимуляції утворення пагонів та ауксинів (індолілмасляна кислота, IBA) для укорінення [10, 12].

Культивування експлантів проводили у культуральній кімнаті за контрольованих умов: температура 24–26 °C, відносна вологість повітря близько 70 %, фотоперіод 16 годин світла та 8 годин темряви. Освітлення забезпечувалося люмінесцентними лампами [15, 17].

У процесі досліджень оцінювали такі показники: відсоток стерильності експлантів, рівень їх приживлюваності, інтенсивність росту, кількість утворених пагонів, а також частоту некротичних змін і контамінації. Спостереження проводили через кожні 7–10 діб [22].

Отримані мікропагони після досягнення відповідного розвитку переносили на середовище для укорінення з підвищеним вмістом ауксинів. Після формування кореневої системи рослини-регенеранти адаптували до умов *ex vitro* у тепличному комплексі з підвищеною вологістю та поступовим зниженням стерильності середовища [27].

Усі дослідження проводили у трикратній повторності. Отримані результати піддавали статистичній обробці з використанням загальноприйнятих методів варіаційної статистики [1].

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Особливості введення в культуру *in vitro*

Процес введення рослинних об’єктів у культуру *in vitro* є фундаментальним етапом сучасної біотехнології, який базується на здатності окремих клітин до повного відновлення цілої рослини в контрольованих лабораторних умовах. Ця процедура вимагає суворого дотримання принципів асептики та стерильності, оскільки найменше мікробіологічне забруднення поживного середовища може зупинити розвиток біологічного матеріалу. Окрім технічної чистоти, критично важливим є правильний вибір експланту та розробка специфічного складу поживних середовищ, збагачених фітогормонами, що забезпечують ініціацію поділу клітин та подальший морфогенез. Опанування цих методів дозволяє не лише масово розмножувати цінні сорти рослин, а й проводити глибокі наукові дослідження, що стають основою для фахових робіт обсягом понад 70 сторінок із детальним описом експериментальних етапів [56].

Аналіз даних таблиці свідчить, що ефективність введення експлантів винограду в культуру *in vitro* значною мірою залежить від концентрації цитокініну ВАР та генотипових особливостей досліджуваних сортів (табл. 3). Встановлено, що у контрольних варіантах (без додавання регуляторів росту) обидва сорти характеризувалися відносно низькими показниками стерильності, життєздатності та регенераційної здатності. Зокрема, у сорту Аркадія стерильність становила 72,3 %, життєздатність – 65,4 %, а частка регенерованих експлантів – 48,6 %. Аналогічна тенденція спостерігалась і у сорту Каберне Совіньйон, де ці показники були дещо нижчими і становили відповідно 69,8 %, 62,7 % та 45,2 %. Це свідчить про недостатню активацію морфогенетичних процесів за відсутності екзогенних фітогормонів.

Введення до живильного середовища ВАР у концентрації 0,5 мг/л забезпечило суттєве покращення всіх досліджуваних показників.

Таблиця 3

Ефективність введення експлантів винограду в культуру *in vitro* залежно від концентрації ВАР

Сорт винограду	ВАР, мг/л	Стерильність, %	Життєздатність, %	Регенерація, %	Пагонів на експлант, шт
Аркадія	0	72,3 ± 2,1	65,4 ± 2,4	48,6 ± 2,2	1,2 ± 0,1
	0,5	81,2 ± 1,9*	75,1 ± 2,1*	63,4 ± 2,3*	2,5 ± 0,2*
	1,0	78,6 ± 2,0	71,2 ± 2,3	58,9 ± 2,1	2,1 ± 0,2
Каберне Совіньйон	0	69,8 ± 2,3	62,7 ± 2,5	45,2 ± 2,4	1,1 ± 0,1
	0,5	78,4 ± 2,0*	72,5 ± 2,2*	60,3 ± 2,2*	2,3 ± 0,2*
	1,0	75,1 ± 2,1	69,4 ± 2,3	56,1 ± 2,0	2,0 ± 0,2

* P≤0,05; ** P≤0,01; ***P≤0,001

Так, у сорту Аркадія стерильність підвищилася до 81,2 %, життєздатність – до 75,1 %, а частка регенерації – до 63,4 %, що є статистично достовірним порівняно з контролем ($p \leq 0,05$). Аналогічно, у сорту Каберне Совіньйон ці показники досягли 78,4 %, 72,5 % та 60,3 % відповідно, що також підтверджено статистичною вірогідністю. Крім того, спостерігалося істотне збільшення кількості пагонів на один експлант: у сорту Аркадія – до 2,5 шт., у сорту Каберне Совіньйон – до 2,3 шт., що свідчить про активізацію процесів проліферації.

Підвищення концентрації ВАР до 1,0 мг/л не сприяло подальшому покращенню показників. Навпаки, спостерігалася тенденція до їх зниження порівняно з варіантом 0,5 мг/л. Так, рівень регенерації у сорту Аркадія знизився до 58,9 %, а у сорту Каберне Совіньйон – до 56,1 %, при цьому різниця з контролем не завжди була статистично достовірною. Це може бути пов’язано з інгібуючим ефектом підвищених концентрацій цитокініну, що негативно впливає на морфогенез і фізіологічний стан експлантів.

Порівняльний аналіз між сортами показав, що сорт Аркадія в цілому характеризувався дещо вищими показниками стерильності, життєздатності та

регенераційної здатності, ніж Каберне Совіньйон, що свідчить про його кращу адаптованість до умов культивування *in vitro*.

Отримані результати свідчать, що ефективність введення експлантів винограду в культуру *in vitro* істотно залежить від концентрації цитокініну ВАР та генотипу досліджуваних сортів. Найбільш сприятливі умови для ініціації морфогенезу, підвищення життєздатності та регенераційної здатності експлантів створюються за використання 0,5 мг/л ВАР, що забезпечує максимальні значення стерильності, частки регенерованих експлантів та кількості утворених пагонів.

Встановлено, що саме за даної концентрації спостерігається найбільш ефективне введення експлантів у культуру *in vitro*, що проявляється у високому рівні їх приживлюваності, активному розвитку бруньок та інтенсивному формуванні пагонів. Це свідчить про оптимальний баланс між стимулюючим впливом цитокініну та відсутністю інгібуючого ефекту, який проявляється при підвищених концентраціях регулятора росту.

Таким чином, встановлено, що оптимізація концентрації ВАР є ключовим фактором підвищення ефективності введення експлантів винограду в культуру *in vitro*, що дозволяє забезпечити високий рівень регенерації рослин та підвищити результативність мікроклонального розмноження в цілому.

3.2. Проліферaційна здатність мікропагонів

Проліферaційна здатність мікропагонів є ключовим показником успішності етапу власне мікроклонального розмноження, оскільки вона визначає коефіцієнт репродукції цільової культури в контрольованих умовах. Цей процес базується на здатності меристемних тканин до активного поділу та формування нових вегетативних органів під впливом екзогенних регуляторів росту, насамперед цитокінінів. Інтенсивність пагоноутворення дозволяє встановити оптимальні концентрації фітогормонів, які забезпечують

максимальний вихід біомаси без ознак вітрифікації або генетичної нестабільності тканин [61].

Експериментальна оцінка проліферативної активності є обов'язковим елементом комплексних біотехнологічних досліджень, результати яких зазвичай становлять вагому частину наукових робіт, що включають детальний аналіз літератури та лабораторні протоколи. Отримані дані дозволяють систематизувати інформацію у формі таблиць та рисунків, що забезпечує наочність висновків щодо здатності досліджуваних об'єктів до регенерації. Такий підхід забезпечує високу точність прогнозування виходу безвірусного садивного матеріалу та оптимізацію витрат на його виробництво [53].

Аналіз даних таблиці свідчить, що проліферацийна здатність мікропагонів винограду істотно залежить від концентрації цитокініну ВАР у живильному середовищі та генотипу досліджуваних сортів (табл. 4).

Таблиця 4

Проліферацийна здатність мікропагонів винограду залежно від концентрації ВАР

Сорт винограду	ВАР, мг/л	Кількість експлантів, шт	Кількість мікропагонів на експлант, шт (M ± m)	Коефіцієнт проліферації
Аркадія	0	20	1,2 ± 0,10	1,0
	0,5	20	2,5 ± 0,20*	2,1
	1,0	20	2,1 ± 0,18	1,8
Каберне Совіньйон	0	20	1,1 ± 0,09	1,0
	0,5	20	2,3 ± 0,19*	2,0
	1,0	20	2,0 ± 0,17	1,7

* P≤0,05; ** P≤0,01; ***P≤0,001

У контрольних варіантах (без додавання ВАР) обидва сорти характеризувалися низькою регенераційною активністю. Так, у сорту Аркадія кількість мікропагонів на один експлант становила 1,2 ± 0,10 шт., тоді як у сорту Каберне Совіньйон – 1,1 ± 0,09 шт. Отримані значення відображають базовий рівень брунькування без стимулюючого впливу цитокінінів і

відповідають природній здатності експлантів до слабкої проліферації в умовах *in vitro*.

Введення до живильного середовища BAP у концентрації 0,5 мг/л сприяло істотному підвищенню проліферaційної активності мікропагонів. У сорту Аркадія кількість мікропагонів зросла до 2,5 ± 0,20 шт., що перевищувало контрольний варіант більш ніж у 2 рази. У сорту Каберне Совіньйон цей показник становив 2,3 ± 0,19 шт., що також суттєво перевищувало контроль. Різниця між контрольними та дослідними варіантами є статистично достовірною ($p \leq 0,05$), що підтверджує ефективність застосування даної концентрації цитокініну для індукції пагоноутворення.

Подальше підвищення концентрації BAP до 1,0 мг/л не забезпечувало додаткового збільшення кількості мікропагонів. У цьому варіанті показники дещо знижувалися порівняно з оптимальною концентрацією 0,5 мг/л і становили 2,1 ± 0,18 шт. у сорту Аркадія та 2,0 ± 0,17 шт. у сорту Каберне Совіньйон. Така тенденція може свідчити про прояв інгібуючого ефекту надлишкової концентрації цитокініну, який пригнічує нормальний морфогенез та знижує ефективність проліферaційних процесів.

Коефіцієнт проліферації повторює аналогічну динаміку: максимальні значення відмічені у варіанті з 0,5 мг/л BAP (2,1 для Аркадії та 2,0 для Каберне Совіньйон), тоді як у контрольних і висококонцентрованих варіантах він знижувався до 1,0–1,8.

Порівняльний аналіз сортів показав, що Аркадія має дещо вищу проліферaційну здатність мікропагонів у всіх варіантах досліду, що може свідчити про кращу генотипову реакцію на умови мікроклонального розмноження та більш високу морфогенетичну активність.

Встановлено, що проліферaційна здатність мікропагонів винограду суттєво залежить від концентрації цитокініну BAP та генотипу досліджуваних сортів. Найвищу ефективність пагоноутворення забезпечує концентрація 0,5 мг/л BAP, за якої кількість мікропагонів на один експлант становила 2,5 ± 0,20 шт. у сорту Аркадія та 2,3 ± 0,19 шт. у сорту Каберне Совіньйон, що більш ніж

у 2 рази перевищує контрольні значення (1,2 ± 0,10 та 1,1 ± 0,09 шт. відповідно).

Застосування підвищеної концентрації BAP (1,0 мг/л) не забезпечувало подальшого зростання проліферaційної активності, оскільки кількість мікропагонів знижувалася до 2,1 ± 0,18 шт. у сорту Аркадія та 2,0 ± 0,17 шт. у сорту Каберне Совіньйон, що свідчить про можливий інгібуючий вплив надлишку цитокініну.

Таким чином, оптимальні умови для індукції проліферації мікропагонів досягаються при використанні 0,5 мг/л BAP, що забезпечує підвищення коефіцієнта проліферації до 2,1 та 2,0 одиниць відповідно, тоді як у контрольних варіантах цей показник становив 1,0. Отримані результати підтверджують доцільність використання даної концентрації для ефективного мікроклонального розмноження винограду.

3.3. Укорінення рослин-регенерантів

Етап укорінення рослин-регенерантів є завершальною та однією з найбільш критичних фаз процесу мікроклонального розмноження, оскільки саме на цьому етапі відбувається перехід від гетеротрофного живлення до формування повноцінної кореневої системи. Успішна індукція ризогенезу забезпечує здатність рослини до подальшої адаптації в умовах *ex vitro* та її виживання у відкритому ґрунті. Основним чинником, що стимулює появу коренів, є зміна гормонального балансу в поживних середовищах, зокрема зниження концентрації цитокінінів та додавання ауксинів (ІОК, ІМК або НОК) у відповідних співвідношеннях [4, 28].

Для забезпечення ефективного вкорінення часто використовують середовища зі зменшеним вмістом мінеральних солей та цукрів, що стимулює рослину до активного пошуку поживних речовин через власну кореневу систему. Окрім хімічного складу середовища, на швидкість формування коренів суттєво впливають фізичні умови культивування, такі як інтенсивність

освітлення та температурний режим. Результати досліджень ризогенезу дозволяють сформувати цілісну картину розвитку регенерантів, що є невід'ємною частиною наукових робіт, обсяг яких становить понад 50 сторінок і включає аналіз десятків фахових джерел [30].

Результати досліджень свідчать, що ефективність укорінення рослин-регенерантів винограду істотно залежить від концентрації індолілмасляної кислоти (ІМК) у живильному середовищі та генотипу досліджуваних сортів (табл. 5).

Таблиця 5

Укорінення рослин-регенерантів винограду *in vitro* залежно від концентрації ІМК

Сорт винограду	ІМК, мг/л	Частка укорінених рослин, %	Кількість коренів, шт (M ± m)	Довжина коренів, см (M ± m)
Аркадія	0	42,3 ± 2,1	2,1 ± 0,2	1,8 ± 0,1
	0,5	78,6 ± 2,0*	5,4 ± 0,3*	4,2 ± 0,2*
	1,0	74,1 ± 2,2	4,8 ± 0,3	3,9 ± 0,2
Каберне Совіньйон	0	39,8 ± 2,3	1,9 ± 0,2	1,6 ± 0,1
	0,5	75,2 ± 2,1*	5,1 ± 0,3*	4,0 ± 0,2*
	1,0	70,5 ± 2,0	4,5 ± 0,2	3,7 ± 0,2

* P≤0,05; ** P≤0,01; ***P≤0,001

У контрольних варіантах (без додавання ІМК) спостерігалися найнижчі показники ризогенезу. Частка укорінених рослин становила 42,3 ± 2,1 % у сорту Аркадія та 39,8 ± 2,3 % у сорту Каберне Совіньйон. При цьому кількість коренів була мінімальною (2,1 ± 0,2 та 1,9 ± 0,2 шт. відповідно), а їх довжина не перевищувала 1,6–1,8 см. Це свідчить про недостатню ендогенну ауксинову активність для повноцінного формування кореневої системи в умовах *in vitro* без екзогенного стимулювання.

Додавання ІМК у концентрації 0,5 мг/л забезпечило істотне підвищення всіх досліджуваних показників. У сорту Аркадія частка укорінених рослин зросла до 78,6 ± 2,0 %, а у сорту Каберне Совіньйон – до 75,2 ± 2,1 %, що є статистично достовірним ($p \leq 0,05$) порівняно з контролем. Одночасно спостерігалося збільшення кількості коренів до 5,4 ± 0,3 шт. у сорту Аркадія

та 5,1 ± 0,3 шт. у Каберне Совіньйон, а також подовження коренів до 4,2 ± 0,2 см та 4,0 ± 0,2 см відповідно. Це свідчить про оптимальний стимулюючий вплив даної концентрації ауксину на процеси ризогенезу.

При підвищенні концентрації ІМК до 1,0 мг/л спостерігалася тенденція до зниження ефективності укорінення порівняно з оптимальним варіантом. Частка укорінених рослин становила 74,1 ± 2,2 % у сорту Аркадія та 70,5 ± 2,0 % у сорту Каберне Совіньйон, а кількість і довжина коренів також дещо зменшувалися. Це може свідчити про прояв інгібуючого ефекту підвищених концентрацій ауксину, що порушує нормальний баланс ростових процесів та гальмує формування кореневої системи.

Порівняльний аналіз сортів показав, що Аркадія характеризується дещо вищою регенераційною здатністю та ефективністю укорінення порівняно з Каберне Совіньйон у всіх варіантах досліду. Це може бути зумовлено генотиповими особливостями, які визначають вищу чутливість до дії ауксинів та кращу реалізацію морфогенетичного потенціалу.

Отримані результати підтверджують, що процес укорінення рослин-регенерантів винограду *in vitro* значною мірою визначається концентрацією індолілмасляної кислоти (ІМК) та генотипом досліджуваних сортів. Найбільш ефективним виявилося застосування ІМК у концентрації 0,5 мг/л, за якої спостерігали максимальні показники ризогенезу: частка укорінених рослин досягала 78,6 % у сорту Аркадія та 75,2 % у сорту Каберне Совіньйон, кількість коренів становила 5,4 та 5,1 шт., а їх довжина – 4,2 та 4,0 см відповідно.

Встановлено, що подальше підвищення концентрації ІМК до 1,0 мг/л не забезпечує суттєвого покращення показників укорінення, а навпаки призводить до їх незначного зниження, що може бути пов’язано з інгібуючим ефектом надлишкових доз ауксину та порушенням гормонального балансу в тканинах рослин.

Додатково підтверджено генотипову специфічність реакції рослин: сорт Аркадія у всіх варіантах досліду демонстрував дещо вищу інтенсивність

формування кореневої системи порівняно з Каберне Совіньйон, що свідчить про його кращу адаптацію до умов *in vitro* та вищий регенераційний потенціал.

Таким чином, встановлено, що оптимальною концентрацією ІМК для укорінення рослин-регенерантів винограду є 0,5 мг/л, яка забезпечує максимальну частку укорінених рослин (до 78,6 %), підвищену кількість коренів (до 5,4 шт.) та їх довжину (до 4,2 см), що свідчить про найбільш ефективне формування кореневої системи в умовах *in vitro*.

3.4. Технологічна частина та розрахунок матеріалів для процесу мікроклонального розмноження

Мікроклональне розмноження винограду здійснювали в умовах стерильної культури *in vitro* із дотриманням стандартної етапності технологічного процесу, що включає: відбір та стерилізацію експлантів, введення в культуру, проліферацію мікропагонів, укорінення регенерантів та адаптацію рослин до умов *ex vitro* [27].

Поетапна блок-схема процесу мікроклонального розмноження рослин, що включає стадії вибору експлантів, введення в культуру *in vitro*, проліферацію мікропагонів та їхнє подальше вкорінення, наведена у графічній частині проєкту на презентації та у форматі А1.

Ця схема візуалізує чітку послідовність біотехнологічних маніпуляцій, спрямованих на отримання генетично однорідного та вірусостійкого садивного матеріалу.

Допоміжні роботи (ДР)

ДР.1. Підготовка лабораторії та обладнання

Перед початком роботи проводили підготовку ламінарного боксу, стерилізацію інструментів (пінцети, скальпелі, чашки Петрі) та автоклавування поживних середовищ і води. Забезпечували асептичні умови для виключення мікробної контамінації експлантів.

ДР.2. Підготовка поживних середовищ

Підготовку живильних середовищ здійснювали на основі класичної прописи Мурасіге–Скуга (MS), яка забезпечує оптимальні умови для росту та розвитку рослинних клітин в умовах *in vitro*. Для приготування середовища використовували аналітично чисті реактиви та дистильовану воду.

Спочатку у визначеному об’ємі дистильованої води послідовно розчиняли макро- та мікросолі середовища MS, після чого додавали вітамінний комплекс і сахарозу у концентрації, що забезпечувала осмотичний баланс поживного середовища. Для етапів проліферації та укорінення вводили відповідні регулятори росту відповідно до схеми досліду: 6-бензиламінопурин (БАР) у концентрації 0–1,0 мг/л та індолілмасляну кислоту (ІМК) для ризогенезу.

Після повного розчинення компонентів pH середовища коригували до значення 5,6–5,8 за допомогою 0,1 н розчинів HCl або NaOH, що забезпечувало оптимальні умови для поглинання поживних речовин рослинними тканинами. Далі додавали агар у концентрації 7–8 г/л як гелеутворювач.

Отримане середовище розливали у культуральні посудини та стерилізували в автоклаві при температурі 121 °C і тиску 1,1 атм протягом 20 хвилин. Після стерилізації середовища охолоджували до кімнатної температури і зберігали до моменту використання в стерильних умовах.

ДР.3. Підготовка експлантів

Як вихідний рослинний матеріал використовували здорові, вегетативно активні рослини винограду сортів Аркадія та Каберне Совіньйон. Експлантами слугували верхівкові та пазушні бруньки, відібрані з молодих пагонів у період активного росту.

Перед стерилізацією рослинний матеріал промивали проточною водою з додаванням мийного засобу для видалення механічних забруднень та поверхневих домішок. Далі експланти піддавали попередній обробці 70 % етиловим спиртом протягом 30–60 секунд з метою зниження поверхневої мікрофлори.

Основну стерилізацію проводили у ламінарному боксі з використанням розчину гіпохлориту натрію (активного хлору 10–15 %) протягом 10–15 хвилин з періодичним перемішуванням. Після цього експланти тричі промивали стерильною дистильованою водою для повного видалення залишків дезінфікуючого агента, який міг би негативно впливати на життєздатність тканин.

Після завершення стерилізації експланти за допомогою стерильних інструментів (скальпеля та пінцета) асептично переносили на підготовлене поживне середовище MS для подальшого етапу введення в культуру *in vitro*. Увесь процес проводили в умовах ламінарного боксу для запобігання контамінації мікроорганізмами.

ДР.4. Стерилізація інструментів та матеріалів

Стерилізація інструментів та підтримання асептичних умов є ключовою передумовою успішного проведення мікроклонального розмноження *in vitro*, оскільки навіть незначна мікробна контамінація призводить до втрати експлантів та зниження ефективності всього технологічного процесу.

Стерилізацію металевих інструментів (скальпелі, пінцети, голки) здійснювали комбінованим способом залежно від етапу роботи. Основним методом була теплова стерилізація в сухожаровій шафі за температури 160–180 °C протягом 1,5–2 годин. У процесі роботи в ламінарному боксі додатково застосовували швидку термічну обробку (прожарювання в полум’ї спиртівки протягом 5–10 секунд) перед кожним контактом із рослинним матеріалом.

Робоча поверхня ламінарного боксу перед початком роботи оброблялася 70 % етиловим спиртом, а також додатково кварцувалася ультрафіолетовим випромінюванням протягом 20–30 хвилин. УФ-опромінення здійснювали лампою з довжиною хвилі 254 нм, що забезпечувало зниження мікробного навантаження на поверхні робочої зони.

Усі культуральні посудини (пробірки, колби, чашки Петрі) стерилізували в автоклаві при температурі 121 °C, тиску 1,1 атм протягом 20

хвилин. Після стерилізації їх зберігали в герметичних умовах до моменту використання.

Під час виконання маніпуляцій в умовах *in vitro* дотримувалися суворих асептичних правил: робота проводилася виключно в межах ламінарного потоку стерильного повітря, виключалося відкривання нестерильних поверхонь, а також мінімізувався контакт експлантів із зовнішнім середовищем.

Додатково контроль стерильності здійснювали шляхом візуального моніторингу культур протягом перших 7–10 діб культивування з метою виявлення можливих ознак бактеріального або грибкового зараження.

Основні технологічні операції (ОП)

ОП.1. Введення експлантів у культуру *in vitro*

Після завершення стерилізації експланти асептично переносили на стерильне живильне середовище Мурасіге–Скуга (MS), модифіковане відповідно до схеми досліду. Для індукції росту та активації меристем використовували 6-бензиламінопурин (BAP) у концентраціях 0; 0,5 та 1,0 мг/л.

Культивування здійснювали у культуральній кімнаті при температурі 24 ± 1 °C, відносній вологості 60–70 % та фотоперіоді 16 годин світла / 8 годин темряви. Освітлення забезпечували люмінесцентними лампами з інтенсивністю 2–3 тис. люкс.

Тривалість первинної культури становила 20–25 діб. Протягом цього періоду оцінювали приживлюваність експлантів, рівень контамінації та початкову індукцію бруньок.

ОП.2. Проліферація мікропагонів (детальний опис з розрахунками)

Етап проліферації мікропагонів є ключовою стадією мікроклонального розмноження винограду, оскільки саме на цьому етапі відбувається інтенсивне збільшення кількості вегетативних пагонів та формування коефіцієнта розмноження культури. Дослідження проводили на модифікованому середовищі Мурасіге–Скуга (MS) з додаванням 6-бензиламінопурину (BAP) у концентраціях 0; 0,5 та 1,0 мг/л.

Культивування здійснювали за температури 24 ± 1 °C, фотоперіоду 16/8 год (світло/темрява) та інтенсивності освітлення 2–3 тис. люкс. Пересадку експлантів на свіже середовище проводили кожні 25–30 діб.

Основним показником ефективності етапу є кількість мікропагонів на один експлант та коефіцієнт розмноження.

Коефіцієнт розмноження (K) визначали за формулою:

$$K = \frac{N_f}{N_i} \quad (1)$$

де:

K – коефіцієнт розмноження;

N_f – кількість отриманих мікропагонів;

N_i – кількість вихідних експлантів.

$$K = \frac{50}{20} = 2{,}5$$

ОП.3. Укорінення рослин-регенерантів

Для індукції ризогенезу сформовані мікропагінці переносили на модифіковане середовище MS із зниженою концентрацією макросолей (½ MS) та додаванням індолілмасляної кислоти (ІМК) у концентрації 0,5–1,0 мг/л.

Культивування проводили у тих самих температурних умовах, проте з поступовим зниженням інтенсивності освітлення до 1,5–2 тис. люкс для стимуляції коренеутворення.

Тривалість етапу укорінення становила 20–30 діб. Оцінювали: частку укорінених рослин; кількість коренів на одну рослину; середню довжину коренів; загальний стан кореневої системи.

ОП.4. Адаптація рослин до умов *ex vitro*

Укорінені рослини-регенеранти переносили з умов *in vitro* у нестерильний субстрат (торф : перліт = 1:1). Перед висаджуванням кореневу систему промивали стерильною водою для видалення залишків поживного середовища.

Адаптацію проводили у тепличних умовах при відносній вологості повітря 85–90 % з поступовим її зниженням до 60–70 % протягом 10–14 діб. Температурний режим підтримували на рівні 22–25 °С.

У цей період контролювали: виживаність рослин; інтенсивність росту; розвиток листкової поверхні.

ОП.5. Контроль та облік результатів

На всіх етапах технологічного процесу здійснювали систематичний облік біометричних показників із подальшою статистичною обробкою. Дані фіксували у вигляді середніх значень (M ± m), а достовірність різниць оцінювали за критерієм Ст'юдента при рівні значущості $p \leq 0{,}05$.

Середнє арифметичне визначали за формулою:

$$M = \frac{\sum x_i}{n} \quad (2)$$

де:

M – середнє значення ознаки;

x_i – окремі значення;

n – кількість спостережень.

Стандартне похибке розраховували за формулою:

$$m = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Достовірність різниць (t-критерій Стьюдента):

$$t = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}} \quad (4)$$

Розрахунок матеріалів для процесу мікроклонального розмноження

Загальний об'єм поживного середовища

Вихідні умови розрахунку. Для розрахунку прийнято такі базові параметри досліду:

- кількість експлантів: 60 шт. (3 варіанти × 20 експлантів);
- середня кількість пасажів: 3 цикли (введення → проліферація → укорінення);
- тривалість одного пасажу: 25–30 діб;

- коефіцієнт розмноження: 2,0–2,5.

1. *Розрахунок потреби в живильному середовищі MS* по етапах. Об’єм середовища на 1 експлант у середньому становить 25 мл.

Введення в культуру:

$$V_1 = N \times v \quad (5)$$

$$V_1 = 60 \times 25 = 1500 \text{ мл} = 1{,}5 \text{ л}$$

Проліферація (3 пасажі):

$$V_2 = N \times v \times k \quad (6)$$

$$V_2 = 60 \times 25 \times 3 = 4500 \text{ мл} = 4{,}5 \text{ л}$$

Укорінення:

$$V_1 = N \times v \times v_u \quad (7)$$

$$V_3 = 60 \times 20 = 1200 \text{ мл} = 1{,}2 \text{ л}$$

Загальна потреба середовища:

$$V_{\text{заг}} = \sum(N_i \times v) \quad (8)$$

$$V_{заг} = 1{,}5 + 4{,}5 + 1{,}2 = 7{,}2 \text{ л}$$

Загальна потреба поживного середовища MS ≈ 7,2 л

2. *Розрахунок компонентів середовища*

Сахароза:

$$M_{\text{сах}} = C_{\text{сах}} \times V_{\text{заг}} \quad (9)$$

$$M_{\text{сах}} = 30 \times 7{,}2 = 216 \text{ г}$$

Агар:

$$M_{\text{агар}} = C_{\text{агар}} \times V_{\text{заг}} \quad (10)$$

$$M_{\text{агар}} = 7 \times 7{,}2 = 216 \text{ г}$$

Регулятори росту:

$$M_{\text{ВАР}} = C_{\text{ВАР}} \times V_{\text{проліферації}} \quad (11)$$

$$M_{BAP} = 0{,}5 \times 7{,}2 = 3{,}6 \text{ мг}$$

$$M_{\text{ІМК}} = C_{\text{ІМК}} \times V_{\text{укорінення}} \quad (12)$$

$$M_{IMK} = 0{,}5 \times 1{,}2 = 0{,}6 \text{ мг}$$

Загальна маса компонента:

Сахароза: 216 г

Агар: 50,4 г

ВАР: 3,6 мг

ІМК: 0,6 мг

3. Врахування втрат експлантів

З урахуванням втрат (контамінація ~15 %):

$$N_{\text{факт}} = \frac{N}{1-p} \quad (13)$$

де:

p – частка втрат (контамінація), частки одиниці.

$$N_{\text{факт}} = \frac{60}{0.85} = 71$$

Проведені технологічні та розрахункові дослідження дозволили обґрунтувати матеріально-ресурсне забезпечення процесу мікроклонального розмноження винограду *in vitro*. Встановлено, що для забезпечення повного циклу культивування 60 експлантів необхідно близько 7,2 л живильного середовища MS, до складу якого входять основні компоненти у таких кількостях: сахароза – 216 г, агар – 50,4 г, 6-бензиламінопурин (ВАР) – 3,6 мг та індолілмасляна кислота (ІМК) – 0,6 мг.

Розрахунки показали, що найбільш матеріаломістким етапом є проліферація мікропагонів, на яку припадає основна частка витрат поживного середовища (понад 60 % загального об’єму). Це підтверджує доцільність оптимізації саме цього етапу з метою підвищення економічної ефективності технології.

Використання формульного підходу дозволило чітко визначити потребу в кожному компоненті середовища та врахувати технологічні втрати

експлантів (до 15 %), що забезпечує реалістичність планування виробничого процесу.

Отримані результати свідчать про можливість ефективного масштабування технології мікроклонального розмноження за умови точного дотримання розрахованих норм витрат, що є важливим для впровадження даної системи у виробничі умови.

РОЗДІЛ 4
ОХОРОНА ПРАЦІ

Охорона праці у лабораторії мікроклонального розмноження рослин є важливою складовою організації безпечного виробничого процесу та забезпечення стабільного функціонування біотехнологічного комплексу Ф/Г «Агролайф». Специфіка робіт, пов'язаних із культивуванням рослинних тканин *in vitro*, передбачає використання стерильних умов, хімічних реагентів, електричного обладнання, автоклавів, джерел ультрафіолетового випромінювання та поживних середовищ, що створює потенційний вплив небезпечних і шкідливих виробничих факторів на персонал лабораторії [2].

Основним завданням системи охорони праці є створення безпечних та нешкідливих умов праці, попередження виробничого травматизму, професійних захворювань, аварійних ситуацій та забезпечення високої ефективності технологічного процесу мікроклонального розмноження рослин. Організація роботи лабораторії повинна відповідати вимогам Закону України «Про охорону праці», Кодексу законів про працю України, санітарно-гігієнічним нормам, правилам пожежної безпеки та внутрішнім нормативним документам господарства [6, 9, 14].

Лабораторія мікроклонального розмноження Ф/Г «Агролайф» включає декілька функціональних приміщень: мийну кімнату, приміщення для приготування поживних середовищ, автоклавну, ламінарну кімнату, культуральне приміщення та кімнату адаптації рослин-регенерантів. Кожне з приміщень має відповідати встановленим вимогам щодо мікроклімату, освітлення, вентиляції та санітарного стану [45].

Особливу увагу в лабораторії приділяють підтриманню асептичних умов. Для цього регулярно проводять дезінфекцію робочих поверхонь, кварцування приміщень, стерилізацію інструментів та лабораторного посуду. Робота з рослинним матеріалом здійснюється виключно в умовах ламінарного

боксу, що забезпечує подачу стерильного повітря та мінімізує ризик мікробної контамінації [6].

У процесі виконання технологічних операцій працівники можуть зазнавати впливу хімічних, фізичних та біологічних факторів. До основних хімічних факторів належать етиловий спирт, гіпохлорит натрію, кислоти, луги, регулятори росту рослин (6-бензиламінопурин, індолілмасляна кислота) та інші реактиви, що використовуються при приготуванні поживних середовищ. Потрапляння таких речовин на шкіру або слизові оболонки може спричиняти подразнення, алергічні реакції чи хімічні опіки. Саме тому всі маніпуляції з реактивами проводять із використанням засобів індивідуального захисту [3].

До фізичних небезпечних факторів належать висока температура під час роботи автоклава та сушильної шафи, можливість ураження електричним струмом, дія ультрафіолетового випромінювання та ризик травмування скляним лабораторним посудом. Під час експлуатації автоклава особливу увагу приділяють контролю температури та тиску. Автоклавування здійснюють при температурі 121 °C та тиску 1,1 атм протягом 20 хвилин. Відкривання автоклава дозволяється лише після повного зниження тиску в камері [32].

Ламінарні бокси є одним із найважливіших елементів лабораторії. Перед початком роботи їх обробляють 70 % етиловим спиртом та опромінюють ультрафіолетовими лампами протягом 20–30 хвилин. Роботу в ламінарному боксі проводять у стерильних рукавичках, використовуючи попередньо стерилізовані інструменти [33].

Важливим аспектом охорони праці є забезпечення оптимальних параметрів мікроклімату. Температура у лабораторних приміщеннях підтримується в межах 20–24 °C, а відносна вологість повітря – 50–70 %. Для культуральних кімнат додатково контролюється режим освітлення, який становить 16 годин світла та 8 годин темряви. Інтенсивність освітлення підтримується на рівні 2–3 тис. люкс [6].

У лабораторії Ф/Г «Агролайф» працівники забезпечуються необхідними засобами індивідуального захисту: лабораторними халатами, одноразовими рукавичками, захисними окулярами, масками та термостійкими рукавицями. Використання засобів індивідуального захисту є обов’язковим під час роботи з хімічними реагентами, стерильними культурами та гарячим обладнанням [36].

Особливе значення має дотримання правил пожежної безпеки, оскільки у лабораторії використовуються легкозаймисті речовини, зокрема етиловий спирт. У приміщеннях повинні бути встановлені вуглекислотні або порошкові вогнегасники, система аварійного вимкнення електроенергії, аптечка першої допомоги та схема евакуації персоналу. Забороняється залишати без нагляду ввімкнене обладнання або зберігати легкозаймисті матеріали поблизу джерел тепла [2].

Значна кількість електроприладів у лабораторії обумовлює необхідність суворого дотримання правил електробезпеки. Усі прилади повинні бути заземленими та проходити регулярний технічний контроль [3].

Важливим елементом системи охорони праці є проведення інструктажів та навчання персоналу безпечним методам роботи. У Ф/Г «Агролайф» усі працівники лабораторії проходять вступний інструктаж з охорони праці при прийнятті на роботу, первинний інструктаж безпосередньо на робочому місці, а також повторний, позаплановий та цільовий інструктажі відповідно до характеру виконуваних робіт [9].

Вступний інструктаж проводиться спеціалістом з охорони праці та включає ознайомлення працівників із загальними правилами безпеки, діями у разі аварійних ситуацій, правилами пожежної безпеки та наданням першої домедичної допомоги. Первинний інструктаж здійснюється керівником лабораторії перед початком самостійної роботи та передбачає ознайомлення працівника з особливостями експлуатації лабораторного обладнання, правилами роботи в ламінарному боксі, використанням автоклава, хімічних реагентів та стерильних інструментів [36].

Повторний інструктаж проводиться не рідше одного разу на шість місяців з метою закріплення знань та контролю дотримання вимог безпеки праці. Позапланові інструктажі проводять у разі зміни технологічного процесу, введення нового обладнання, порушення працівниками вимог охорони праці або виникнення аварійних ситуацій [14].

До виконання робіт у лабораторії допускаються лише особи, які пройшли медичний огляд, навчання з охорони праці, перевірку знань та відповідні інструктажі. Працівники повинні володіти практичними навичками роботи зі стерильними культурами, хімічними речовинами та лабораторним обладнанням. Особи, які не пройшли інструктаж або порушують вимоги безпеки, до роботи не допускаються [9].

Особливу увагу приділяють контролю дотримання працівниками правил особистої гігієни та санітарного режиму. Після завершення роботи персонал зобов’язаний провести дезінфекцію робочого місця, вимкнути електроприлади та перевірити справність обладнання [9, 36].

На Ф/Г «Агролайф» загальну відповідальність за стан охорони праці несе керівник підприємства, який забезпечує організацію безпечних умов праці, контроль за дотриманням вимог законодавства та створення належного виробничого середовища. Безпосередній контроль за виконанням заходів з охорони праці в лабораторії мікроклонального розмноження здійснює завідувач лабораторії або відповідальна особа, призначена наказом по підприємству. До їх обов’язків входить проведення інструктажів, контроль технічного стану обладнання, забезпечення працівників засобами індивідуального захисту, організація медичних оглядів та моніторинг дотримання санітарно-гігієнічних вимог. Відповідальні особи також здійснюють контроль за веденням журналів інструктажів, справністю систем вентиляції, електрообладнання та дотриманням правил пожежної безпеки у виробничих приміщеннях лабораторії [36].

З метою покращення умов праці у лабораторії доцільно впроваджувати сучасні системи вентиляції, автоматичний контроль параметрів мікроклімату,

резервне електроживлення та постійний моніторинг мікробіологічної чистоти приміщень. Такі заходи дозволяють підвищити безпечність виробничого процесу, знизити ризик контамінації рослинного матеріалу та покращити ефективність мікроклонального розмноження [14].

Отже, дотримання вимог охорони праці у лабораторії мікроклонального розмноження рослин Ф/Г «Агролайф» є необхідною умовою забезпечення безпечної роботи персоналу, стабільного функціонування лабораторії та отримання якісного безвірусного посадкового матеріалу.

ВИСНОВКИ

1. Отримані результати свідчать, що ефективність введення експлантів винограду в культуру *in vitro* істотно залежить від концентрації цитокініну ВАР та генотипу досліджуваних сортів. Найбільш сприятливі умови для ініціації морфогенезу, підвищення життєздатності та регенераційної здатності експлантів створюються за використання 0,5 мг/л ВАР, що забезпечує максимальні значення стерильності, частки регенерованих експлантів та кількості утворених пагонів.

2. Встановлено, що оптимізація концентрації ВАР є ключовим фактором підвищення ефективності введення експлантів винограду в культуру in vitro, що дозволяє забезпечити високий рівень регенерації рослин та підвищити результативність мікроклонального розмноження в цілому.

3. Оптимальні умови для індукції проліферації мікропагонів досягаються при використанні 0,5 мг/л ВАР, що забезпечує підвищення коефіцієнта проліферації до 2,1 та 2,0 одиниць відповідно, тоді як у контрольних варіантах цей показник становив 1,0. Отримані результати підтверджують доцільність використання даної концентрації для ефективного мікроклонального розмноження винограду.

4. Підтверджено генотипову специфічність реакції рослин: сорт Аркадія у всіх варіантах досліду демонстрував дещо вищу інтенсивність формування кореневої системи порівняно з Каберне Совіньйон, що свідчить про його кращу адаптацію до умов *in vitro* та вищий регенераційний потенціал.

5. Встановлено, що оптимальною концентрацією ІМК для укорінення рослин-регенерантів винограду є 0,5 мг/л, яка забезпечує максимальну частку укорінених рослин (до 78,6 %), підвищену кількість коренів (до 5,4 шт.) та їх довжину (до 4,2 см), що свідчить про найбільш ефективне формування кореневої системи в умовах *in vitro*.

6. Підвищення концентрації ІМК до 1,0 мг/л не забезпечує суттєвого покращення показників укорінення, а навпаки призводить до їх незначного

зниження, що може бути пов’язано з інгібуючим ефектом надлишкових доз ауксину та порушенням гормонального балансу в тканинах рослин.

7. Проведені технологічні та розрахункові дослідження дозволили обґрунтувати матеріально-ресурсне забезпечення процесу мікроклонального розмноження винограду *in vitro*. Встановлено, що для забезпечення повного циклу культивування 60 експлантів необхідно близько 7,2 л живильного середовища MS, до складу якого входять основні компоненти у таких кількостях: сахароза – 216 г, агар – 50,4 г, 6-бензиламінопурин (ВАР) – 3,6 мг та індолілмасляна кислота (ІМК) – 0,6 мг.

8. Найбільш матеріаломістким етапом є проліферація мікропагонів, на яку припадає основна частка витрат поживного середовища (понад 60 % загального об’єму). Це підтверджує доцільність оптимізації саме цього етапу з метою підвищення економічної ефективності технології.

9. Отримані результати свідчать про можливість ефективного масштабування технології мікроклонального розмноження за умови точного дотримання розрахованих норм витрат, що є важливим для впровадження даної системи у виробничі умови.

10. Дотримання вимог охорони праці у лабораторії мікроклонального розмноження рослин Ф/Г «Агролайф» є необхідною умовою забезпечення безпечної роботи персоналу, стабільного функціонування лабораторії та отримання якісного безвірусного посадкового матеріалу.

ПРОПОЗИЦІЇ

1. Для підвищення ефективності укорінення рослин-регенерантів рекомендується застосовувати індолілмасляну кислоту (ІМК) у концентрації 0,5 мг/л, що забезпечує формування більш розвиненої кореневої системи та підвищує приживлюваність рослин під час адаптації.

2. У виробничих умовах доцільно використовувати сорти винограду з високим регенераційним потенціалом та стабільними показниками проліферації мікропагонів, що дозволить підвищити вихід оздоровленого посадкового матеріалу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аналіз біометричних даних у розведенні та селекції тварин : навчальний посібник / С. С. Крамаренко, С. І. Луговий, А. В. Лихач, О. С. Крамаренко. Миколаїв : МНАУ, 2019. 211 с.

2. Атаманчук П. С., Мендерецький В. В. Безпека життєдіяльності (теоретичні основи), Навчальний посібник, Каменець-Подільський: Центр навчальної літератури, 2017. 273 с.

3. Біобезпека використання біотехнологій : методичні рекомендації для виконання лабораторно-практичних робіт для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти / О. І. Юлевич, І. М. Люта. Миколаїв : МНАУ, 2024. 93 с.

4. Біотехнологія в рослинництві. Методичні вказівки, щодо виконання лабораторних робіт для студентів 5 курсу спеціальності 7.09010501 «Захист рослин», денної форми навчання / [авт. тексту В. О. Варавкін]. Суми: СНАУ, 2012. 58 с.

5. Бублик О.М. Чинники сомаклональної мінливості рослин О. М. Бублик // Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. 2011. Том 9. №1. С.49-54.

6. Богайчук Т. Загальна характеристика законодавства про охорону довкілля в сільському господарстві. 2018. URL: http://ena.lp.edu.ua:8080/bitstream/ntb/50186/2/2018 (дата звернення: 20.09.2024).

7. Власенко М.Ю. Фізіологія рослин з основами біотехнології / М. Ю. Власенко, Л. Д. Вельямінова-Зернова, В. В. Мацкевич. Біла Церква, 2006. 504 с.

8. Вишняков Д. С. Запобігання професійним захворюванням і виробничому травматизму – запорука підвищення конкурентоспроможності підприємства. Участь молоді у розбудові агропромислового 66 комплексу

України: 32-ї студентської науково-теоретичної конференції, 18-20 березня 2020 р., Миколаїв. Миколаїв : МНАУ, 2020, С. 71-74.

9. Войналович О. В., Марчишина Є. І., Білько Т. О. Охорона праці у сільському господарстві : навч. підруч.; Нац. ун-т біоресурсів і природокористування України. Київ : Центр учбової літератури, 2018. 690 с.

10. ДСП 9.9.5.-080-02 «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю»: Державні санітарні правила та норми,гігієнічні нормативи. Київ : Міністерство охорони здоров'я. 2002. 9 с.

11. ДСТУ 4390:2005. Саджанці винограду та чубуки виноградної лози. Технічні умови. З Поправкою (ІПС № 10-2005). Чинний від 2006-04-01. Київ : Держспоживстандарт України, 2006. (Національні стандарти України). URL : https://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id_doc=91479.

12. ДСТУ 4792:2007. Саджанці плодових культур. Методи визначення якості. Чинний від 2007-05-18. Київ : Держспоживстандарт України, 2007. (Національні стандарти України). URL : https://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id_doc=53821.

13. Завірюха П. Д. Сільськогосподарська біотехнологія: Клітинна та генетична інженерія рослин : термінологія для студ. агроном. ф-ту / П. Д. Завірюха [видання 2-ге доп.]. Львів, 2001. 20 с.

14. Закон України «Про охорону праці» затверджений Президентом України 21 листопада 2002 року, № 229 - ІУ, м. Київ.

15. Збарського В. К., Мацибора В. І. Економіка сільськогосподарського підприємства. Київ : Каравеллов, 2019. 319 с.

16. Зеленянська Н. М. Антитранспіранти для успішної адаптації мікроклонів винограду [Електронний ресурс] / Н. М. Зеленянська // Наукові доповіді НУБіП України. 2013. 2 (38). С. 1-12.

17. Зеленянська Н. М. Біологічно активні препарати для підвищення коренеутворення підщепних чубуків винограду. Зб. тез. Всеукр. наук.-практ. 67 конф., 4-5 вересня 2013 р. Велика Бакта, 2013. С. 70-71.

18. Зеленянська Н. М. Економічна ефективність окремих прийомів виробництва щеплених саджанців винограду / Н. М. Зеленянська // Аграрний вісник Причорномор'я : зб. наук. праць. Одеса, 2014. Вип. 71. С. 32-38.

19. Зеленянська Н. М.; Самофалов М. О. Підвищення адаптивності мікроклонів винограду в умовах in vitro. Аграрні інновації, 2022, 11: 25-31.

20. Зеленянська Н. М., та ін. Розробка структурованого поживного середовища для адаптації вегетативної маси і кореневої системи мікроклонів винограду до умов *in vivo*. Таврійський науковий вісник. 2020. 116 (1). С. 64-75.

21. Екологічний паспорт Миколаївської області / Управляння екології та природних ресурсів Миколаївської облдержадміністрації. URL : https:// www.dueomk.gov.ua (дата звернення: 02.08.2024).

22. Єщенко В. О. Основи наукових досліджень в агрономії : підруч. Для студ. вищ. навч. закл. / В. О. Єщенко, П. Г. Копитко, П. В. Костогриз. Київ : Дія, 2005. 186 с.

23. Іванова С. О. Залежність деяких показників якості виноградних саджанців від способу ізоляції місця щеплення. Виноградарство 432 і виноробство : між від. темат. наук. зб. Одеса : ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова», 2009. Вип. 46 (1). С. 41-43.

24. Ільницька Н. Оптимізація процесу мікроклонального розмноження суниці садової в умовах ФГ «Агролайф» : кваліфікаційна робота на здобуття першого (бакалаврського) рівня вищої освіти за спеціальністю 162 – «Біотехнології та біоінженерія» / наук. керівн. О. Юлевич, І. Люта. Миколаїв : МНАУ, 2024. 56 с.

25. Костенко В. М. Шляхи розвитку вітчизняного садівництва у новій ситуації. Що маємо на сьогодні і що слід зробити для вирішення існуючих проблем галузі / В. М. Костенко // Сад, виноград і вино України. 2009. № 7-9. С. 5-10.

26. Кушнір Г. П., Сарнавська В. В. Мікроклональне розмноження рослин. 68 Київ : Наукова думка, 2005. 272 с.

27. Лобова О. В., Пилипчук О. О. Сільськогосподарська біотехнологія. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 6.051401 «Екобіотехнологія». Київ, 2014. 20 с.

28. Люта І. Вплив складу живильних середовищ на ріст і розвиток експлантів винограду, отриманих в умовах *in vitro*. International Science Journal of Engineering & Agriculture. Vol. 3, No.6, 2024, pp.107-116. https://doi.org/10.46299/j.isjea.20240306.11.

29. Макрушин М.М. Фізіологія рослин. / М.М. Макрушин, Є.М, Макрушина, Н.В. Петерсон, М.М. Мельников. Вінниця: Нова книга, 2006. 413 с.

30. Мацкевич. В.В. Основи біотехнології рослин: навчальний посібник / В.В. Мацкевич, С.В. Роговський, М.Ю. Власенко, В.М. Черняк. Біла Церква: БНАУ, 2010. 156 с. Вип.80, частина 1, Агрономія. Умань. 2012 р. С. 129-137.

31. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин. Підручник. Киев: Поліграфконсалтинг, 2003. 520 с.

32. Методичні вказівки до проведення практичного заняття «Розробка інструкції з охорони праці» для студентів спеціальностей 201 «Агрономія» і 206 «Садово-паркове господарство» ОС магістр: /Дніпропетровський держ. агр.-ек. ун-т.: Дніпро, 2017, 20 с.

33. Методичні вказівки для лабораторних занять студентів з дисципліни «Основи біотехнології в рослинництві» зі спеціальностей 201 «Агрономія», 202 «Захист і карантин рослин», 203 «Садівництво та виноградарство» вищих аграрних закладів освіти III-IV рівнів акредитації. Умань: УНУС, 2019. 16 с.

34. Моніторинг довкілля : підручник за ред. В. М. Боголюбова, Т. А. Сафранова. Херсон : Грінь Д. С., 2011. 530 с.

35. Небиков М. В. Удосконалення методики стерилізації експлантів унаслідок введення у культуру *in vitro Castanta sativa Mill*. Науковий вісник НЛТУ України. 2011. Вип. 21. С. 30-34.

36. Основи охорони праці: змістовий модуль № 4. «Основи пожежної 69 безпеки». Тема № 10. «Основи пожежної профілактики на виробничих об’єктах»: конспект лекції / уклад. В. М. Курепін. Миколаїв : МНАУ, 2021. 45 с.

37. Охорона праці на підприємстві. Кузнецов В. 2-ге вид., перероб. і доп. Харків: Фактор, 2005. 428 с.

38. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні: за станом на 03 березня 2021 р. [Електронний ресурс] Документ Департаменту екологічної безпеки Міністерства захисту довкілля та природних ресурсів України. Режим доступу: https://mepr.gov.ua/content/derzhavniy-reestr-pesticidiviagrohimikativdozvolenih-do-vikoristannya-v-ukraini-dopovnennya-z-01012017-zgidno-vimogpostanovi-kabinetu-ministriv-ukraini-vid-21112007--1328.html

39. Подгаєцький А.А., Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., КравченкоН.В., Гнітецький М.О. Адаптивність рослин на етапі *in vitro-ex vitro*. East Europen Science Journal. 2020. 4 (56). Part 2. P. 25-33.

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

41. Регіональна доповідь про стан навколишнього природного середовища в Миколаївській області. Режим доступу : URL : www.dueomk.gov.ua (дата звернення : 05.08.2024).

42. Саджанці винограду та чубуки виноградної лози: ДСТУ ISO 4390:2005. Технічні умови. [Чинний від 2005-04-01]. Київ: Держспоживстандарт України, 2006. 18 с. (Національні стандарти України).

43. Теслюк, Наталія Іванівна. Утворення множинних пагонів винограду в культурі in vitro на різних живильних середовищах. Мікробіологія і біотехнологія. (41), 2018 : 66-75.

44. Титаренко Н.В., Теслюк Н.І., Іваниця В.О. Перспективи використання бактерій у культурі клітин та тканин рослин // Мікробіологія та біотехнологія. 2020. № 3. С. 6-31.

45. ФГ «Агролайф». [Електронний ресурс] Бізнес-каталог. Режим доступу: https://www.ua-region.com.ua/33976214 (дата звернення: 14.10.2024 р.).

46. ФГ «Агролайф». [Електронний ресурс] Досьє компанії. Режим доступу: https://youcontrol.com.ua/catalog/company_details/33976214/ (дата звернення: 14.10.2024 р.).

47. Федоренко В. П. Шкідники сільськогосподарських культур / В. П. Федоренко, Й. Т. Покозій, М. В. Круть. Ніжин: Аспект-Поліграф, 2004. 367 с.

48. Aremu A. O., Fawole O.A., Makunga N. P, Nqobile A. Masondo, Moyo M., Buthelez N.M. D., Amoo S.O., Spíchal L., Doležal K. Applications of Cytokinins in Horticultural Fruit Crops: Trends and Future Prospects Biomolecules. 2020. 10 (9). 1222.

49. Arya A., Sharma V., Tyagi P.K., Gola D., Husen A. Role of cytokinins in adventitious root formation / Environmental, Physiological and Chemical Controls of Adventitious Rooting in Cuttings. Plant Biology, Sustainability and Climate Change. 2022. 239-249. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90636-4.00017-9.

50. Azuara M., González M.-R., Mangas R., Martín P. Effects of the application of forchlorfenuron (CPPU) on the composition of verdejo grapes BIO 43rd World Congress of Vine and Wine Web of Conferences 56. 2023. https://doi.org/10.1051/bioconf/20235601022.

51. Banilas G. Rapid microprapagation of grapevine CV: Agiorgitiko through lateral bud development. Journal of Science & Technology. 2007. V. 3. P. 31-38.

52. Biswal A., Rout Ch. K. Effect of Cytokinin on Fruit Crops Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2020. 9 (11). 2896-2903. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.911.351.

53. Kieber J. J., Schaller G.E. Cytokinin Signaling in Plant Development. Development, 2018. 145 (4), 7. doi:10.1242/dev.149344.

54. Kumar K. Morphophysiologicals problems in acclimatization of micropropagated plants in - ex vitro conditions- A Reviews / K. Kumar, I.U. Rao // 71 J. Ornamental and Horticultural Plants. 2012. №2. P. 271-283.

55. Nadra Khan, Maqsood Ahmed, Ishfaq Hafiz, Nadeem Abbasi, Shaghef Ejaz and Muhammad Anjum. Optimizing the concentrations of plant growth regulators for in vitroshoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes. Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France) J. Int. Sci. Vigne Vin, 2015, 49, 37-45.

56. Naila A. Micropropaganation and acclimatization of European varieties of grapes (*Vitis vinifera L*). International Journal of Advances in Biology (IJAB). 2017. №4. C. 1-11.

57. Mariane Ruzza Schuck et al. Acclimatization of micropropagated plants of fox grape cv. Bordo (*Vitis labrusca L.*) in different substrates. Journal of Biotechnology and Biodiversity. 2012. Vol. 3 (4). P. 206-212.

58. Melyan G. Micropropagation of grapevine (*Vitis vinifera L.*) seedless cultivar 'Parvana' through lateral bud development. *Vitis*. 2015. V. 54 (Special Issue). P. 253-255.

59. Mok D.W.S., Мок M.C. Cytokinin metabolism and action // Annu. Rev. Plant Physiol, and Plant Mol. Biol. 2001. Vol. 52. P. 89-118.

60. Prasad R. Cytokinin and Its Key Role to Enrich the Plant Nutrients and Growth Under Adverse Conditions-An Update Frontiers in Genetics. 2022. 13. doi:10.3389/fgene.2022.883924.

61. Tesliuk NI, Kichmarenko OD. Optimization of induction process of multiple grape shoots in culture in vitro. Vynogradarstvo i vynorobstvo. 2006. (43):158-167.