

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет ТВПШТСБ**

**Кафедра біотехнології та біоінженерії  
Спеціальність G21 – «Біотехнології та біоінженерія»  
Ступінь вищої освіти «Бакалавр»**

«Допустити до захисту»

Декан \_\_\_\_\_ Михайло ГИЛЬ

“ \_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2026 р.

«Рекомендувати до захисту»

В.о. зав. кафедри \_\_\_\_\_ Олена КАРАТЄЄВА

“ \_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2026 р.

**БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ДО ЗБЕРЕЖЕННЯ  
ВУЗЬКОЛОКАЛЬНИХ ЕНДЕМІКІВ *MOENHRINGIA HYPANICA***

**04.02. – КР. 76-О. 26 05 19. 002**

**Виконавець:**

**здобувачка вищої**

**освіти IV курсу \_\_\_\_\_ Андрій ГАВРИЛЮК**

**Науковий керівник:**

**доцентка \_\_\_\_\_ Олена ЮЛЕВИЧ,**

**асистентка \_\_\_\_\_ Ірина ЛЮТА**

**Рецензентка:**

**доцентка \_\_\_\_\_ Олена КАРАТЄЄВА**

**Миколаїв – 2026**

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Біорізноманіття вузьколокальних ендеміків та загальна характеристика <i>Moehringia hupanica</i>	7
1.2. Сучасні біотехнологічні методи збереження рідкісних рослин та особливості введення їх у культуру <i>in vitro</i>	10
1.3. Обґрунтування використання біотехнологічних методів для збереження <i>Moehringia hupanica</i>	14
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ, УМОВИ І МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ РОБОТИ	
2.1. Місце та об'єкт досліджень	18
2.2. Методика виконання роботи	21
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	
3.1. Таксономічна характеристика <i>Moehringia hupanica</i> , її морфологічні особливості та умови існування	24
3.2. Отримання рослинного матеріалу <i>Moehringia hupanica</i> методом мікроклонального розмноження	26
3.3. Особливості культивування <i>Moehringia hupanica</i> в умовах <i>in vitro</i> та застосування біотехнологічних методів для її збереження	32
3.4. Технологічні особливості мікроклонального розмноження <i>Moehringia hupanica</i> та розрахунок необхідних матеріалів	38
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ	45
ВИСНОВКИ	49
ПРОПОЗИЦІЇ	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	52

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота виконана на 57 сторінках друкованого тексту, з використанням 46 бібліографічних джерел, додаткової літератури та періодичних видань; 10 рисунків та 6 таблиць. Робота включає такі структурні елементи як реферат, список умовних позначень, вступ, огляд літератури, опис матеріалів, умов і методики дослідження, розрахункову частину, охорона праці, висновки й пропозиції.

Мета дослідження – дослідити та обґрунтувати ефективність біотехнологічних підходів до збереження вузьколокального ендеміка *Moehringia huynica* шляхом вивчення особливостей, умов існування та можливостей застосування методів культури *in vitro* для збереження і відтворення виду.

Предмет дослідження – біотехнологічні підходи до збереження виду *Moehringia huynica*, зокрема методи мікроклонального розмноження, культивування *in vitro* та збереження рослинного матеріалу.

Питання, які підлягали дослідженню:

1. Таксономічна характеристика *Moehringia huynica*, її морфо-біологічні особливості та умови існування.
2. Отримання рослинного матеріалу *Moehringia huynica* методом мікроклонального розмноження.
3. Особливості культивування *Moehringia huynica* в умовах *in vitro* та застосування біотехнологічних методів для її збереження.
4. Технологічні особливості мікроклонального розмноження *Moehringia huynica* та розрахунок необхідних матеріалів.

Розроблена біотехнологічна схема мікроклонального розмноження *Moehringia huynica* є ефективним методом масового отримання рослинного матеріалу та збереження виду *in vitro*. Використання оптимізованих поживних середовищ забезпечує отримання життєздатних рослин-регенерантів, придатних для адаптації *ex vitro* та відновлення природних популяцій.

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

6-БАП – 6-бензинамінопурин

$\beta$ -ІОК – індоліл-3-оцтова кислота

$\beta$ -ІМК – індоліл-3-масляна кислота

НОК –  $\alpha$ -нафталоцитова кислота

НДП – Національний дендрологічний парк

НАН (У) – Національна академія наук (України)

НПП – Національний природний парк

## ВСТУП

Рід Мерингія – (*Moehringia* L.) – належить до родини *Caryophyllaceae*, що складається з групи трав'янистих одно-, дво-, та багаторічних рослин, поширених переважно у помірних регіонах Європи, Азії та Північної Америки. Представники роду відомі своєю високою екологічною пластичністю та здатністю зростати на кам'янистих, вапнякових і скельних субстратах. У сучасній систематиці рід *Moehringia* виявлений як серед представників триби *Arenarieae* родини *Caryophyllaceae*. Рід налічує близько 25-30 видів, частина яких є вузькими ендеміками, що зростають на окремих гірських або степових територіях [44].

Назва роду була введена Карлом Ліннеєм у 1753 році на честь німецького ботаніка і натураліста Пауля Генріха Меринга [4]. Мерингія характеризується тонкими прямостоячими або повзучими стеблами з супротивними листками та мініатюрними білими квітками, кожна з яких має п'ять пелюсток. Характерною ознакою мерингії є плід-коробочка, який розкривається шістьма зубцями, а також наявність насіння зі спеціальними виростами – строфіолями, що спричиняють поширенню насінню мурахами. Ці морфологічні особливості дозволяють відмежувати рід *Moehringia* від споріднених родів *Arenaria* та *Minuartia* [30].

На території України рід *Moehringia* представлений ключовим видом, серед яких особливе значення має мерингія бузька – (*Moehringia hypanica* Grynj et Klokov). Цей вид є вузьколокальним ендеміком Гранітно-степового Побужжя та зростає переважно на скельних гранітних відсолоненнях долини річки Південний Буг. Унікальність мерингії бузької полягає у її пристосованості до екстремальних умов існування дефіциту ґрунту, високої інсоляції, нестачі вологи та температурних коливань. Через обмежений ареал та антропогенний вплив вид занесений до Червоної книги України та перебуває під охороною міжнародних природоохоронних організацій [11, 21].

Важливим напрямком сучасних досліджень є використання методів

культури тканин і мікроклонального розмноження для збереження рідкісних видів роду *Moehringia*. Біотехнологічні методи дозволяють створювати колекції рослин *in vitro*, підтримувати генетичне різноманіття та здійснювати відновлення природних популяцій. Для мерингії бузької це особливо актуально через обмеженість природних місцезростань і чутливість виду до змін навколишнього середовища. У зв'язку з цим рід *Moehringia* є перспективним об'єктом не лише ботанічних і екологічних, а й біотехнологічних досліджень, спрямованих на збереження біорізноманіття та охорону рідкісних ендемічних рослин України.

Саме цим обумовлена актуальність кваліфікаційної роботи, що спрямована на забезпечення потреб охорони біорізноманіття та розробки ефективних способів збереження рідкісних рослин в умовах антропогенного впливу та скорочення природних місць існування.

Мета дослідження – дослідити та обґрунтувати ефективність біотехнологічних підходів до збереження вузьколокального ендеміка *Moehringia hupanica* шляхом вивчення особливостей, умов існування та можливостей застосування методів культури *in vitro* для збереження і відтворення виду.

Питання, які підлягали дослідженню:

1. Таксономічна характеристика *Moehringia hupanica*, її морфо-біологічні особливості та умови існування.
2. Отримання рослинного матеріалу *Moehringia hupanica* методом мікроклонального розмноження.
3. Особливості культивування *Moehringia hupanica* в умовах *in vitro* та застосування біотехнологічних методів для її збереження.
4. Технологічні особливості мікроклонального розмноження *Moehringia hupanica* та розрахунок необхідних матеріалів.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Біорізноманіття вузьколокальних ендеміків та загальна характеристика *Moehringia huyanica*

Збереження біорізноманіття є одним із пріоритетних напрямів сучасної природоохоронної діяльності, оскільки зникнення окремих видів призводить до порушення екологічної рівноваги та втрати генетичного фонду флори. Особливу цінність становлять вузьколокальні ендеміки – види, поширення яких обмежене невеликою територією та специфічними екологічними умовами. Такі рослини характеризуються високою чутливістю до змін навколишнього середовища, антропогенного навантаження та кліматичних факторів, тому потребують особливих заходів охорони [31].

Ендемічними вважаються види рослин, що виникають і існують у природних умовах лише в межах конкретної території та не трапляються в інших частинах світу. До вузьколокальних ендеміків, або стеноендеміків, належать організми з надзвичайно малим ареалом: нерідко їхнє існування обмежується лише одним гірським масивом, долиною, печерою або невеликою ділянкою кам'янистого субстрату [23, 5, 6].

Найбільша кількість вузьколокальних ендемічних форм властива ізольованим екосистемам, зокрема островам, гірським масивам, печерам, каньонам і скельних утворень. На території України осередки ендемізму зосереджені в українських Карпатах, Кримських горах, на подільській височині, а також у степових регіонах Північного Причорномор'я [6].

Серед представників рослинного світу вирізняється *Moehringia huyanica* – багаторічна трав'яниста рослина, що належить до родини *Caryophyllaceae* *Juss.* Згаданий вид був уперше описаний Гринем і Клоковим у 1951 році та характеризується як вузьколокальний південнобузький ендемік. Його природне поширення зосереджене виключно в межах долини річки Південний Буг на

території Миколаївської області, головним чином у районі Національного природного парку «Бузький Гард» [30].

*Moehringia huranica* відноситься до рідкісних петрофітних видів, які успішно адаптувалися до життя в особливих екологічних умовах. Ця рослина знаходиться у щілинах гранітних брил, на кам'янистих уступах, карнизах, а також у невеликих заглибленнях (мікронішах) на оголених гранітних породах (рис.1). Досить часто рослинні угруповання цього виду приурочені до схилів, що орієнтовані на південь, південний схід або північний схід, і мають виражену крутизну. Ґрунтовий покрив на ділянках, де зростає ця рослина є вкрай тонким, а в деяких випадках практично відсутній [30].



**Рис. 1. Генеративний індивід *M. huranica* у тріщині, знайдений у Актовському каньйоні**

Згідно з останніми науковими дослідженнями, ґрунт, де виявлено цей вид вирізняється значною кількістю органічної речовини (гумусу) та високими показниками вмісту кальцію, магнію й фосфатів. Ґрунтовий покрив позбавлений солей і має кисле середовище. Поєднання цих факторів створює специфічні, доволі обмежені екологічні умови, до яких вид успішно пристосувався протягом тривалого періоду еволюційного розвитку.

Рослина утворює компактні кущики, досягаючи в довжину 12 см і в висоту 5 см. Пагони тонкі, сланкі або підняті, рясно галузяться, без наявності ворсинок. Листя розташовані супротивно, має цілісні краї та лінійну форму.

Квіти дрібні, правильної (актиморфні), білі, складаються з п'яти пелюсток і десяти тичинок. Плід представлений маленькою коробочкою сферичної форми, в якій міститься 4-7 насіння [30].



*Рис. 2. Загальний вигляд квітки *M. huynica**

Капсули плодів досліджуваних таксонів мають сферичну морфологію, із середнім діаметром 2,5 мм. Їхня дегісценція відбувається за рахунок розкриття 6 овальних стулок. Ці стулки характеризуються розширеною базальною частиною та загостреною верхівкою. Максимальна ширина стулок становить 1,08 мм, а їхня довжина – 2,2 мм. У розкритому стані стулки плоду відгинаються назовні (рис. 3).



А

Б

*Рис. 3. Плоди *M. huynica*. Закрита капсула (А), відкрита капсула (Б)*

Популяції *Moehringia huynica* відзначаються малою кількістю особин та їхньої відокремленістю. Згідно з результатами досліджень, в природному

середовищі домінує молодь генеративного віку та рослини середнього репродуктивного віку, тоді як кількість старших генеративних екземплярів та прегенеративних стадій спостерігається лише в незначній кількості. Це вказує на нестійкість популяцій та значну вразливість виду до трансформацій кліматичних умов. Першочерговими ризиками для цього виду є знищення виходів гранітних порід, антропогенний вплив, зміни гідрологічного режиму та зростання температурного стресу у контексті кліматичних змін [30].

Представник цього виду занесений до Червоної книги України, а сам вид має статус рідкісного. *Moehringia hyspanica* вважається цінною складовою флори гранітно-степових ландшафтів нашої держави та значним об'єктом для наукових досліджень, спрямованих на збереження рослинного багатства [24].

В актуальних реаліях вагомого значення набувають біотехнологічні способи збереження рідкісних видів рослин. Зокрема, це стосується культури *in vitro* та мікроклонального розмноження. Застосування побідних методів відкриває змогу зберігати генетичну інформацію рідкісних видів, вирощувати значну кількість життєздатних рослин-регенератів, а також формувати сприятливі умови для їх подальшого повернення до природного середовища існування [30].

## **1.2. Сучасні біотехнологічні методи збереження рідкісних рослин та особливості введення їх у культуру *in vitro***

Серед ключових біотехнологічних методик провідну роль відіграє культура тканин і клітин рослин. Дана методика ґрунтується на фундаментальній властивості рослинних клітин, а саме тотипотентності, що передбачає їхню здатність до регенерації цілісного організму навіть з мінімального фрагмента тканини або експланта. Застосування методів *in vitro* культивування сприяє оперативному отриманню численних регенератів, які є вільними від патогенів і адаптовані для акліматизації та подальшої культивуації в умовах *ex vitro* [11, 5].

Процес мікроклонального розмноження охоплює чотири ключові фази. Початковий етап передбачає підготовку експлантів: здійснюється виділення фрагментів тканини або органів від материнської рослини, їх поверхнева стерилізація та подальше культивування на спеціально підготовленому поживному середовищі.

На фазі мультиплікації (мікророзмноження) відбувається багаторазова субкультивування новоутворених меристемних структур в асептичному середовищі. Шляхом послідовного перенесення їх на свіже поживне середовище забезпечується інтенсивна проліферація та формування численних пагонів-регенерантів.

Третій етап зосереджений на індукції ризогенезу: пагони-регенеранти переміщують на поживне середовище, оптимізоване для стимуляції коренеутворення. На цьому субстраті відбувається інтенсивний розвиток кореневої системи без значної подальшої проліферації вегетативних частин.

Завершальною фазою є акліматизація до *ex vitro* умов (*in vivo*). На цьому етапі сформовані мікророслини ретельно очищають від залишків поживного субстрату, обробляють стимуляторами коренеутворення та пересаджують у відповідний субстрат, такий як торф'яні брикети або кокосові волокна. Послідовно їх переміщують у ємності більшого об'єму, з подальшим перенесенням у контрольовані умови теплиці, і, зрештою, у природне середовище (відкритий ґрунт) [18].

Індукція рослинної культури *in vitro* є принциповим етапом, оскільки результативність подальшого культивування детермінується ретельним відбором та належною попередньою обробкою експлантів. В якості експлантів можуть застосовуватися верхівкові та пазушні меристеми, фрагменти пагонів, листові пластинки, або інші специфічні ділянки рослинного організму. З метою мінімізації ризику мікробної контамінації, експланти піддаються багатоступінчастій процедурі стерилізації із застосуванням спиртовмісних розчинів, гіпохлоритів та інших антимікробних агентів. Надмірна експозиція до стерилізуючих реагентів здатна спричинити ушкодження тканин, відтак,

оптимальні концентрації дезінфікуючих засобів та тривалість їх дії встановлюються персоніфіковано для кожного біологічного виду [11].

Особливість культури *in vitro* полягає у можливості застосування широкого спектру рослинних частин для їх клонального розмноження в контрольованих умовах. До цих елементів належать апікальні меристеми пагонів, бруньки різного генезу, ембріони та інші меристематичні тканини, а в окремих випадках – молоді листки, черешки, суцвіття та подібні структури. Ефективність практичного використання отриманого таким чином матеріалу в культурі *in vitro* значною мірою залежить від ретельного відбору вихідних тканин для подальшої ізоляції експлантів [18].

Під час культивування суттєве значення мають фізичні параметри довкілля, такі як температура, освітлення, фотоперіод та вологість повітря. Для більшості культур «*in vitro*» оптимальними показниками є температурний режим у діапазоні 22-25°C та тривалість світлового періоду, що становить 16 год. Спектральний склад освітлення здатен впливати на інтенсивність фотоморфогенезу, формування пагонів та розвиток асиміляційного апарату [22].

З'ясовано, що різновид вихідного матеріалу впливає на рівень забруднення регенерованих культур. Найвищий показник інфікованих зразків спостерігався при введенні в культуру *in vitro* стеблових живців. Це, ймовірно, обумовлено глибоким проникненням забруднювальних агентів у тканини експлантів. Застосування насіння зменшує рівень забруднення з 82,3% до 67,8% порівняно із живцями. Серед усіх вивчених експлантів, найбільша частка асептичних зразків була отримана при використанні пагонів проростків [22].

В основі культури тканин лежить явище тотипотентності рослинних клітин. Суть цього феномену полягає у спроможності однієї клітини або обмеженої групи клітин за належних умов вирощування утворити цілісний рослинний організм. Завдяки тотипотентності стало можливим розроблення сучасних технологій, таких як мікроклональне розмноження, соматичний ембріогенез та кріоконсервація рослинного матеріалу [32, 27].

Для зберігання рослинного матеріалу на помірний термін використовують спосіб уповільненого розвитку. Його суть полягає у зниженні темпу розвитку рослин за рахунок зміни температури, освітлення, вологості оточуючого середовища або концентрації речовин, що регулюють ріст. Такий підхід дає змогу суттєво подовжити проміжки між пересадками та зберігати спадковий матеріал протягом кількох років без втрати життєздатності [26].

Метод повільнорослого зберігання є підходом, що застосовується для середньострокового забезпечення життєдіяльності культур *in vitro*. Його ключова мета – суттєво уповільнити ріст рослинних тканин (експлантів) без втрати їхньої життєздатності. Це досягається за рахунок зменшення температури вирощування, зниження інтенсивності освітлення, зміни концентрації поживних компонентів, а також застосування речовин, що впливають на осмотичний тиск, та регуляторів розвитку.

Як наслідок, рослинний матеріал може зберігатися на одному живильному середовищі від кількох місяців до кількох років без потреби в частих пересадках. Цей підхід дає змогу суттєво скоротити затрати праці та мінімізувати ризик втрати цінних колекційних зразків. Для багатьох рослинних видів утримання культур відбувається при температурі 2-15 °С, що істотно збільшує проміжок між необхідними пересадками [40, 28].

Кріоконсервація розглядається як оптимальний метод тривалого зберігання генетичного матеріалу рослин. Принцип цього методу базується на зберіганні різноманітних рослинних структур, таких як клітини, меристеми, ембріоїди, пилок або насіння, в рідкому азоті за наднизької температури (-196°C). За цих умов біохімічні процеси в матеріалі практично повністю зупиняються, що дає змогу підтримувати його життєздатність протягом багатьох років [40].

Перед процесом заморожування біологічний матеріал (експланти) потребує попередньої підготовки, яка передбачає зневоднення та обробку спеціальними речовинами – кріопротекторами. Ця процедура є обов'язковою для уникнення формування кристалів льоду всередині клітин, що здатні їх

пошкодити. Після успішного розморожування матеріал розміщується на спеціальному поживному середовищі для забезпечення його регенерації та подальшого розвитку [29].

Саме тому кріоконсервація розглядається як найбільш перспективний метод для довгострокового збереження рідкісних та зникаючих видів рослин [40, 28].

Сучасна система збереження флори ґрунтується на двох взаємопов'язаних методах: збереженні видів у їхніх природних ареалах (*in situ*) та за межами їхнього природного оточення (*ex situ*). Для рідкісних видів, що мають обмежений ареал (вузьколокальних ендеміків), особливу важливість має стратегія *ex situ*, що охоплює створення колекцій живих рослин, сховищ насіння, тканинних культур та кріоколекцій [34].

Однією з ключових проблем для більшості рослинних видів під час переходу від умов *in vivo* до культури *in vitro* є фенольна інтоксикація експлантів. Після перенесення до культури *in vitro*, експланти виділяють у поживне середовище продукти вторинного метаболізму, які надалі пригнічують їхній ріст та розвиток.

Шляхи подолання проблеми самоотруєння фенолами в умовах *in vitro* включають додавання до поживного середовища різноманітних речовин, зокрема збільшення концентрації гліцину. Рекомендується застосовувати підвищені концентрації гліцину (50,6-63,2 мкМ) як при культивуванні проростків, так і органів дорослих рослин. Найкращі результати коренеутворення були відзначені при використанні індолілмасляної кислоти (ІМК) та нафтилоцтової кислоти (НОК) у концентраціях 2,46 мкМ та 2,69 мкМ відповідно [18].

### **1.3. Обґрунтування використання біотехнологічних методів для збереження *Moehringia huynica***

*Moehringia huynica* – вузьколокальний південнобузький вид родини

Гвоздичні (*Caryophyllaceae*), занесений до Червоної книги України зі статусом «Рідкісний» та до Червоного списку Міжнародного союзу охорони природи зі статусом «Вразливий» [24, 39]. За наявними оцінками загальна чисельність виду не перевищує 250-300 дорослих особин, розподілених між п'ятьма ізольованими локальними популяціями, приуроченими до гранітних відслонень каньонів річки Південний Буг та Мертвовод у Миколаївській області. Такий обмежений ареал, критично мала чисельність і виражена фрагментованість популяцій роблять вид надзвичайно вразливим до будь-яких антропогенних впливів та ставить питання розробки ефективних програм його збереження у першочергових завдань природоохоронної науки [32, 11]

Традиційні методи охорони рідкісних видів рослин поділяються на: *in situ* (збереження у природних місцезростаннях) та *ex situ* (збереження поза природним середовищем) [33]. Для *M. hupanic* заходи *in situ* реалізуються у межах ННП «Гранітно-степове Побужжя» та зповідного урочища «Лабіринт», проте вони мають обмежену ефективність через незначну площу придатних петрофітних оселищ, реліктовий характер виду, генетичне старіння популяцій та прогресуючу ксерофітизацію клімату [11]. За таких умов методи збереження *ex situ*, з використанням біотехнологічних підходів набувають особливого значення як необхідне доповнення до природоохоронних заходів *in situ* [33, 43].

Основу біотехнологічного збереження рослин складають методи культури тканин і органів *in vitro*, серед яких провідне місце посідає мікроклональне розмноження [33, 43]. Дана технологія дає отримати необмежену кількість генетично однорідних рослин-регенератів від незначної кількості вихідного матеріалу в контрольованих стерильних умовах, що є принципово важливим для видів із малою чисельністю, до яких належить *M. hupanic* [43].

Багатьом рідкісним видам рослин притаманна низька здатність до утворення насіння або утруднене природне поновлення. Стосовно *Moehringia hupanic*, застосування звичних способів розмноження може бути

малоефективним через невелику чисельність його природних угруповань та необхідність мінімізувати вплив на навколишнє середовище. Саме тому біотехнологічні підходи розглядаються як перспективна заміна традиційним методам відтворення цього виду [27, 35].

Мікроклональне розмноження рідкісних рослин включає чотири основні етапи: 1) введення в асептичну культуру експлант; 2) розмноження (мультифікація пагонів); 3) укорінення мікропагонів; 4) адаптація до умов відкритого ґрунту [12, 42]. На кожному з етапів підбирають специфічні для виду склади поживних середовищ, передусім за вмістом регуляторів росту (ауксинів та цитокінінів), що дозволяє оптимізувати ефективність розмноження [35].

У науковій праці І. Лютої (2024) було вивчено вплив складу живильних середовищ та регуляторів розвитку на ріст і формування експлантів винограду в умовах культури *in vitro*. Автором встановлено, що середовище Мурасіге-Скуга (MS) забезпечує інтенсивніший розвиток експлантів порівняно із середовищем Уайта. Це пояснюється його збалансованим мінеральним складом та підвищеним вмістом макро- і мікроелементів, необхідних для активної життєдіяльності рослинних тканин.

У дослідженні також розглянуто вплив різних регуляторів розвитку на морфогенез експлантів. Виявлено, що додавання до живильного середовища 6-бензиламінопурину (6-БАП) у концентрації 1,0 мг/л сприяло активному утворенню пагонів, їх видовженню та збільшенню кількості міжвузлів. Застосування гіберелінової кислоти (GA<sub>3</sub>) у концентрації 1,0 мг/л позитивно позначалося на видовженні пагонів і стимулювало їхній подальший ріст. Для індукції ризогенезу найефективнішою виявилася індоліл-3-оцтова кислота (ІОК) у концентрації 0,5 мг/л, яка забезпечувала формування добре розвиненої кореневої системи [10].

Обґрунтованість застосування біотехнологічних методів для збереження *M. hupanica*, підтверджується успішним досвідом роботи з філогенетично близькими видами роду *Moehringia*. Зокрема, для вразливого

ендемичного виду *Moehringia jankae*, з Балканського півострова розроблено та запроваджено протокол мікроклонального розмноження з метою збереження *ex situ*: встановлено ефективні схеми поверхневої стерилізації насіння, оптимальні склади поживних середовищ та концентрації регуляторів росту. Найкращі результати регенерації показало середовище MS із додаванням 4,4 мкМ БАП + 0,49 мкМ ІОК, що забезпечило розвиток у середньому 14 пагонів на один експлант. Цей прецедент свідчить про принципову можливість застосування аналогічних підходів і для *M. hupanica*, адже обидва види об'єднують схожі морфологічні риси (хамеліфіт-напівкущик, облігатний петрофіт, невисокий коефіцієнт розмноження) та природоохоронний статус [35].

Оцінку ефективності використаних живильних середовищ автор здійснював за такими морфометричними параметрами, як висота пагонів, чисельність листків, кількість міжвузлів, довжина коренів та загальний стан експлантів. Отримані результати підтверджують, що склад живильного середовища та співвідношення регуляторів розвитку є ключовими факторами успішного культивування рослин *in vitro*.

Незважаючи на те, що дослідження виконано на винограді, його висновки мають важливе методичне значення для розробки протоколів мікроклонального розмноження інших видів рослин, зокрема *Moehringia hupanica*. Вони підтверджують доцільність застосування середовища MS як базового для культивування експлантів та свідчать про необхідність індивідуального підбору концентрацій фітогормонів залежно від біологічних особливостей конкретного виду [10].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ, УМОВИ І МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ РОБОТИ

#### 2.1. Місце та об'єкт дослідження

Дослідження виконувалося в лабораторії мікроклонального розмноження, розташованій на території Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України, у місті Умань Черкаської області.

Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України здійснює діяльність із чітко визначеною науковою спрямованістю. У межах своєї роботи працівники парку проводять фундаментальні та прикладні дослідження, зосереджені на біотехнології, паркобудівництві, біології та інших суміжних науково-технічних напрямках. Пріоритетним завданням наукового напрямку є всебічне дослідження актуальних проблем зазначених галузей і подальше практичне застосування результатів, що формуються в процесі цих досліджень [13, 17].

Науково-дослідний інститут Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України здійснює прогностичні дослідження та проводить наукову експертизу в межах установлених напрямів діяльності. Також установа організовує конференції, симпозіуми, наради, виставкові заходи й наукові школи, включно з ініціативами міжнародного рівня.

Окрім цього, інститут здійснює інтенсивну наукову, освітню та просвітницьку діяльність: він публікує результати власних досліджень у наукових виданнях, журналах та інших форматах друкованої продукції. Водночас парк надає платні послуги в межах, визначених законодавством для державних наукових установ і для територій чи об'єктів природно-заповідного фонду [13, 17].

Науково-дослідний інститут охоплює три відділи:

1. Відділ дендрології та паркобудівництва:

- лабораторію ландшафтного дизайну і проектування;

- насінневу лабораторію;
- підрозділ дендрологів.

## 2. Відділ генетики, селекції та репродуктивної біології рослин:

- лабораторії мікроклонального розмноження;
- лабораторії захисту рослин.

## 3. Відділ трав'янистих рослин:

- Науковий гербарій Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України (SOF).

Основна місія відділу декоративних і плодкових рослин полягає у здійсненні фундаментальних та прикладних досліджень у галузях генетики, селекції, репродуктивної біології та біотехнології рослин. Відділ також відповідає за збереження та актуалізацію колекційного фонду, а також за оптимізацію технологій розмноження та культивування посадкового матеріалу, призначеного для озеленення.

Ключові напрями наукової діяльності охоплюють:

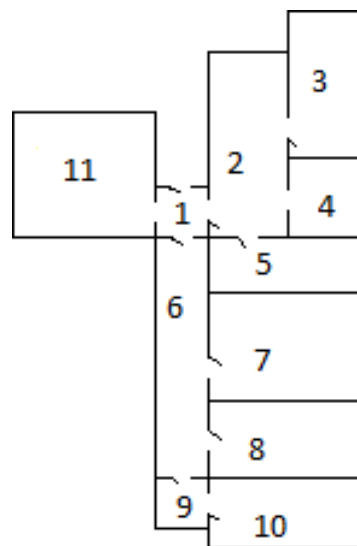
- Створення нових генотипів рослин, що характеризуються високими декоративними, науковими та екологічними характеристиками.
- Розробку, зокрема біотехнологічних, методів швидкісного мікророзмноження цінних видів деревно-чагарникової флори, які є критично важливими для декоративного садівництва, сільського господарства та фармації, задля продукування здорового елітного посадкового матеріалу.
- Вдосконалення технологій розмноження, культивування та інтродукції як інтродукованих, так і аборигенних декоративних і плодкових рослин.
- Моніторинг ринкових тенденцій та збагачення видового розмаїття інтродукованих і аборигенних видів, придатних для потреб міського озеленення та приватного садівництва, а також збереження рідкісних та зникаючих видів.
- Розробку та впровадження методик оздоровлення посадкового матеріалу за авторськими технологіями.

– Захист рослин від шкідників і патогенів.

У структурі відділу функціонують науково-дослідні лабораторії мікроклонального розмноження та захисту рослин, а також дослідно-виробнича ділянка завбільшки близько 20 гектарів та плантація фундука площею 10 гектарів.

Лабораторія мікроклонального розмноження спрямовує свою діяльність на вирішення пріоритетних завдань, зокрема на оптимізацію живильних середовищ для *in vitro* розмноження різних рослинних видів, визначення оптимальних умов культивування та вкорінення, адаптацію рослин до *ex vitro* умов та їх подальше дорощування до комерційних параметрів. Крім того, лабораторія відіграє важливу роль у збереженні генофонду рідкісних та зникаючих видів шляхом розробки ефективних методик, орієнтованих на їх відтворення з метою збереження та реставрації природних популяцій.

Структура лабораторії включає бокс для приготування живильних розчинів, секцію для стерилізації та зберігання лабораторного інвентарю, асептичний бокс, дві культуральні кімнати та автоклавну (рис.4).



**Рис. 4. Схема лабораторії мікроклонального розмноження НДП «Софіївка» НАН України**

(1-коридор,2-автоклавна кімната,3-кімната для миття та зберігання посуду,4-кімната для приготування середовищ,5-кімната для зберігання документів,6-коридор,7-8- культуральні кімнати,9-коридор,10-операційна кімната,11-адаптаційна)оптимальні

Лабораторія оснащена сучасним високотехнологічним обладнанням,

призначеним для реалізації процесу мікроклонального розмноження рослин. До складу її оснащення входять асептичні бокси для маніпуляцій з культурами *in vitro*, автоклави для термічної стерилізації поживних середовищ та лабораторного інвентарю, а також інкубаційні та кліматичні системи, що забезпечують підтримання оптимальних мікрокліматичних умов для культивування рослинного матеріалу. Додатково застосовуються системи ламінарного потоку, мікроскопічні комплекси та спеціалізовані прилади для підготовки поживних субстратів та контролю їхніх фізико-хімічних властивостей, що гарантує високу ефективність та прецизійність на всіх етапах дослідницьких робіт.

Після етапу формування високоякісних рослин-регенерантів здійснюється їхнє переведення з умов *in vitro* до умов *ex vitro*, де відбувається їхня поступова акліматизація. Цей процес починається у спеціалізованих акліматизаційних камерах, продовжується в оранжерейних умовах, а згодом завершується висадкою на розсадник. Надалі ці рослини можуть бути використані для потреб озеленення або для комерційної реалізації. Методами *in vitro* в лабораторії продукуються мікросаджанці плодкових та декоративних дерев, плодово-ягідних культур і квіткових рослин, які демонструють високу адаптивність до зовнішніх умов [17].

Об'єктом дослідження – вузьколокальний ендемічний вид *Moehringia huypanica* – рідкісна рослина флори України, що перебуває під загрозою зникнення та потребує збереження із застосуванням сучасних біотехнологічних методів (зокрема *in vitro* культури, мікроклонального розмноження та *ex situ* збереження).

## 2.2. Методика виконання роботи

Дослідження виконувалося в лабораторії мікроклонального розмноження, розташованій на території Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України, у місті Умань Черкаської області. Мета

дослідження – дослідити та обґрунтувати ефективність біотехнологічних підходів до збереження вузьколокального ендеміка *Moehringia huypanica* шляхом вивчення особливостей, умов існування та можливостей застосування методів культури *in vitro* для збереження і відтворення виду.

Предмет дослідження – біотехнологічні підходи до збереження виду *Moehringia huypanica*, зокрема методи мікроклонального розмноження, культивування *in vitro* та збереження рослинного матеріалу.

Дослідження було проведено в лабораторних умовах, а саме в лабораторії культури тканин і клітин рослин. Основними етапами роботи були: введення рослинного матеріалу в культуру *in vitro*, оптимізація поживних середовищ, мікроклональне розмноження, етап укорінення та подальша адаптація рослин-регенерантів до умов *ex vitro*.

Під час дослідження були використані загальноприйняті методи культури ізольованих тканин і органів рослин. Культивування *in vitro* передбачало вирощування експлантів у стерильному середовищі на штучних поживних субстратах.

Для ініціації культури *in vitro* використовувалися насіння, апікальні та пазушні бруньки, а також сегменти пагонів, отримані від рослин-донорів. Початковий рослинний матеріал спочатку промивали проточною водою протягом 15-20 хвилин, після чого проводили поверхневу стерилізацію. Як стерилізуючі засоби застосовували 70% етиловий спирт (30-60 с) та розчин гіпохлориту натрію або дихлороізоціанурату натрію протягом 10-15 хвилин. Після цього матеріал тричі промивали стерильною дистильованою водою. Подібні протоколи стерилізації є стандартними при введенні рідкісних видів у культуру *in vitro*.

Експланти розміщували на поживне середовище Мурасіге-Скуга (MS), до складу якого входили макро- та мікроелементи, вітаміни, сахароза (20-30 г/л) та агар-агар (6-8 г/л). Для стимуляції морфогенезу та активації ростових процесів до середовища додавали регулятори росту рослин, такі як 6-бензиламінопурин (БАП), кінетин, індоліл-3-оцтова кислота (ІОК) та індоліл-

3-масляна кислота (ІМК), у різних концентраціях.

Культивування проводилося за температури 22-25°C, зі світловим режимом 16 годин світла / 8 годин темряви та інтенсивністю освітлення 2-3 тис. люкс. У ході культивування оцінювали відсоток стерильних експлантів, частоту регенерації, кількість утворених пагонів, довжину мікропагонів та коефіцієнт розмноження.

На етапі мікроклонального розмноження мікропагони багаторазово пересаджували на свіже поживне середовище, що містило різні співвідношення цитокинінів та ауксинів. Для стимулювання утворення коренів (ризогенезу) використовували середовища з додаванням ІМК або  $\alpha$ -нафтолоцітової кислоти (НОК). Найбільш ефективні концентрації ауксинів для укорінення експлантів визначалися експериментальним шляхом.

Після формування кореневої системи рослини-регенеранти пересаджували у стерильний субстрат, який складався з торфу, перліту та піску у співвідношенні 2:1:1. Адаптація до умов *ex vitro* здійснювалася за умов підвищеної вологості, яка поступово знижувалася, а інтенсивність освітлення збільшувалася. Приживлюваність рослин оцінювали через 20-30 діб після висаджування.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1. Таксономічна характеристика *Moehringia huynica*, її морфологічні особливості та умови існування

*Moehringia huynica* (мерингія бузька) – вузькоареальний ендемічний вид рослини таксоном родини *Caryophyllaceae*. Поширення цього виду обмежене виключно каньйоноподібною морфоструктурою долини річки Південний Буг, зокрема територією Національного природного парку «Бузький Гард». Цей таксон віднесено до категорії рідкісних петрофільних рослин, які виявляють адаптації до зростання на кам'янистих субстратах [30].

*Moehringia huynica* представляє собою багаторічний трав'янистий вид, що досягає висоти від 5-20 см. Коренева система представлена стрижневим типом, вирізняється значним розвитком, що забезпечує надійну фіксацію рослин у тріщинах скельних утворень та доступ до лімітованих ресурсів гідратації [21].

Стебла численні, грацильні, мають висхідну або прямостоячу форму, нерідко формують компактні дернини. Поверхня стеблових пагонів гладка або зі слабким опушенням.

Листкові пластинки розташовуються супротивно, є сидячими, вузьколанцетної або лінійно-ланцетної морфології, з цілісними краями та загостреною верхівкою. Невеликі розміри листової пластинки є еколого-морфологічною адаптацією, спрямованою на мінімізацію транспірації в умовах дефіциту зволоження.

Квітки двостатеві, актиноморфні, білого забарвлення, розташовані поодинокі або зібрані в малочисельні суцвіття. Оцвітина подвійного типу, складається з п'яти чашолистків та п'яти білих пелюсток, що незначно перевищують чашолистки за довжиною. Андроцей представлений, як правило, десятьма тичинками. Гінецей сформований трьома плодолистками.

Плід є багатонасінною коробочкою, яка розкривається за допомогою зубців. Насіння дрібне, темно-коричневого забарвлення, має округло-ниркоподібну форму [30].

Вид *Moehringia huynica* класифікується як геліофільний ксеромезофітний таксон. Він відрізняється повільною швидкістю вегетативного розвитку та низькою конкурентоспроможністю, що зумовлює його переважне заселення специфічних екологічних ніш, які є малоприсадибними для більшості інших видів флори.

Фенологічний період цвітіння припадає переважно на травень-червень, тоді як плодоношення відбувається у червні-липні. Генеративне розмноження здійснюється насіннєвим шляхом. Дисемінація насіння відбувається головним чином під дією гравітації та гідрохорії [30].

Цей вид демонструє високий рівень пристосованості до:

- суттєвих добових температурних амплітуд;
- недостатнього вмісту ґрунтової вологи;
- підвищеної сонячної інсоляції;
- обмеженого об'єму субстрату для формування кореневої системи.

Морфологічні особливості, зокрема невеликі габарити рослин, компактна архітектоніка пагонів та здатність до утворення дернин, інтерпретуються як ключові адаптивні механізми для виживання в умовах гранітних відслонень.

Природні популяції *Moehringia huynica* асоційовані з гранітними відслоненнями докембрійського періоду Українського кристалічного щита. Зростання цього виду переважно спостерігається у розщелинах гірських порід, на скельних терасах та в незначних акумуляціях едафічного матеріалу між гранітними блоками. Ключові екологічні умови, що визначають існування таксона, включають:

- інтенсивне сонячне опромінення;
- неглибокі літогенні або рудеральні ґрунти;
- обмежене зволоження;
- ефективний дренаж субстрату;

- відсутність суттєвого затінення з боку деревної та чагарникової рослинності.



**Рис. 5. Загальний вигляд рослин *Moehringia hupanica* у природному середовищі**

Вид належить до петрофітних рослинних спільнот на гранітних відслоненнях у долині річки Південний Буг, поруч із такими характерними видами, як *Jurinea brachycephala*, *Potentilla incana* та *Sedum borissovae*.

У зв'язку з екстремально обмеженим ареалом поширення, низькою чисельністю ценопопуляцій та антропогенною трансформацією середовища (що проявляється через рекреаційний вплив, інженерно-гідротехнічні проєкти та деградацію природних біоценозів), *Moehringia hupanica* класифікується як рідкісний таксон флори України. Це вимагає невідкладних природоохоронних заходів, зокрема впровадження методів культивування *in vitro* та формування *ex situ* колекцій.

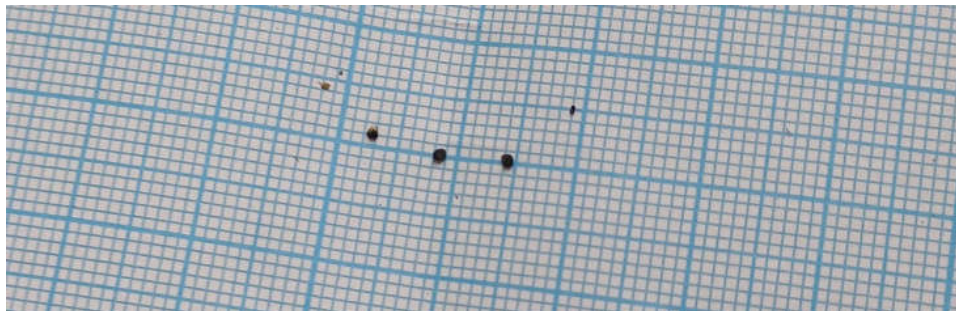
### **3.2. Отримання рослинного матеріалу *Moehringia hupanica* методом мікроклонального розмноження**

З метою консервації унікального рідкісного вузьколокального ендеміка *Moehringia hupanica*, а також для нарощення адекватного обсягу рослинного

матеріалу, було застосовано методику мікроклонального культивування *in vitro*. Використання даного підходу дозволяє забезпечити оперативне продукування значної кількості генетично гомогенних клонів без спричинення деструктивного впливу на природні популяції таксона.

Мікроклональне розмноження є одним із найефективніших сучасних методів отримання великої кількості генетично однорідного рослинного матеріалу, особливо для рідкісних, ендемічних і зникаючих видів рослин. Для *Moehringia huynica*, яка характеризується вузькою екологічною приуроченістю, низькою насінневою продуктивністю та високою чутливістю до змін умов навколишнього середовища, використання культури тканин стало перспективним способом не лише масового розмноження, але й тривалого збереження генофонду виду в умовах *in vitro*.

Для збереження природних популяцій *Moehringia huynica*, яка є рідкісним місцевим ендеміком, отримання початкового рослинного матеріалу проводили без вилучення дорослих рослин з їх природного середовища. Як основний біологічний матеріал було використано насіння, зібране в період повного дозрівання від генеративних рослин у природних умовах їх зростання.



*Рис. 6. Насіння Moehringia huynica*

Отримане насіння спочатку проходило очищення від рослинних домішок та відбір повноцінних, добре сформованих зерен. Для зменшення ризику мікробного забруднення та підвищення ефективності подальшого введення в культуру *in vitro*, посівний матеріал підлягав поверхневій стерилізації.

Процедура стерилізації насіння проводилася в асептичних умовах ламінарного боксу відповідно до наступної схеми:

- Попереднє промивання насіннєвого матеріалу у проточній воді протягом 20 хвилин.
- Обробка 70% етиловим спиртом тривалістю 30-40 секунд.
- Дезінфекція у розчині гіпохлориту натрію (NaOCl, із вмістом активного хлору 2,5-3,0 %) протягом 12-15 хвилин.
- Введення 1-2 крапель змочувального агента Tween-20 для підвищення ефективності знезараження.
- Триразове промивання стерильною дистильованою водою, причому кожен етап тривав 3-5 хвилин.

По завершенні стерилізаційного процесу насіння висаджували на живильне середовище з метою ініціації проростання.

Одним із найважливіших етапів мікроклонального розмноження рослин є підбір оптимального поживного середовища, яке забезпечує активний ріст експлантів, стимулює процеси морфогенезу та сприяє формуванню значної кількості життєздатних мікропагонів. Для рідкісних і зникаючих видів рослин, до яких належить *Moehringia huynica*, правильний вибір компонентів поживного середовища має особливе значення, оскільки від цього залежить не лише ефективність мікроклонального розмноження, а й можливість довготривалого збереження виду в асептичній культурі.

У проведених дослідженнях культивування експлантів здійснювали на агаризованих живильних середовищах Мурасіге і Скуга, модифікованих різними концентраціями регуляторів росту. Саме середовище Мурасіге і Скуга є одним із найбільш універсальних для вирощування рослинних тканин, оскільки містить збалансований комплекс макро- і мікроелементів, необхідних для забезпечення фізіологічних процесів у клітинах (табл.1)

Проте ефективність розвитку експлантів значною мірою визначається не лише мінеральним складом середовища, а й співвідношенням екзогенних фітогормонів (табл.2).

З метою визначення оптимальних умов культивування було випробувано шість варіантів поживних середовищ. Контрольний варіант не

містив регуляторів росту, тоді як інші варіанти відрізнялися концентраціями 6-бензиламінопурину (6-БАП) та  $\beta$ -індолілоктової кислоти ( $\beta$ -ІОК). До складу середовищ також вводили комплекс вітамінів групи В, аскорбінову кислоту, вітамін РР, амінокислоти аденін і гліцин, мезоінозит у концентрації 100 мг/л, 3% сахарози та підтримували кислотність середовища на рівні рН 5,66-5,75.

Таблиця 1

### Склад базового поживного середовища MS

Компонент	Концентрація
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 мг/л
KNO <sub>3</sub>	1900 мг/л
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440 мг/л
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370 мг/л
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 мг/л
Fe-EDTA	36,7 мг/л
Мікроелементи	за стандартом MS
Сахароза	30 г/л
Агар	7-8 г/л
рН	5,7-5,8

Таблиця 2

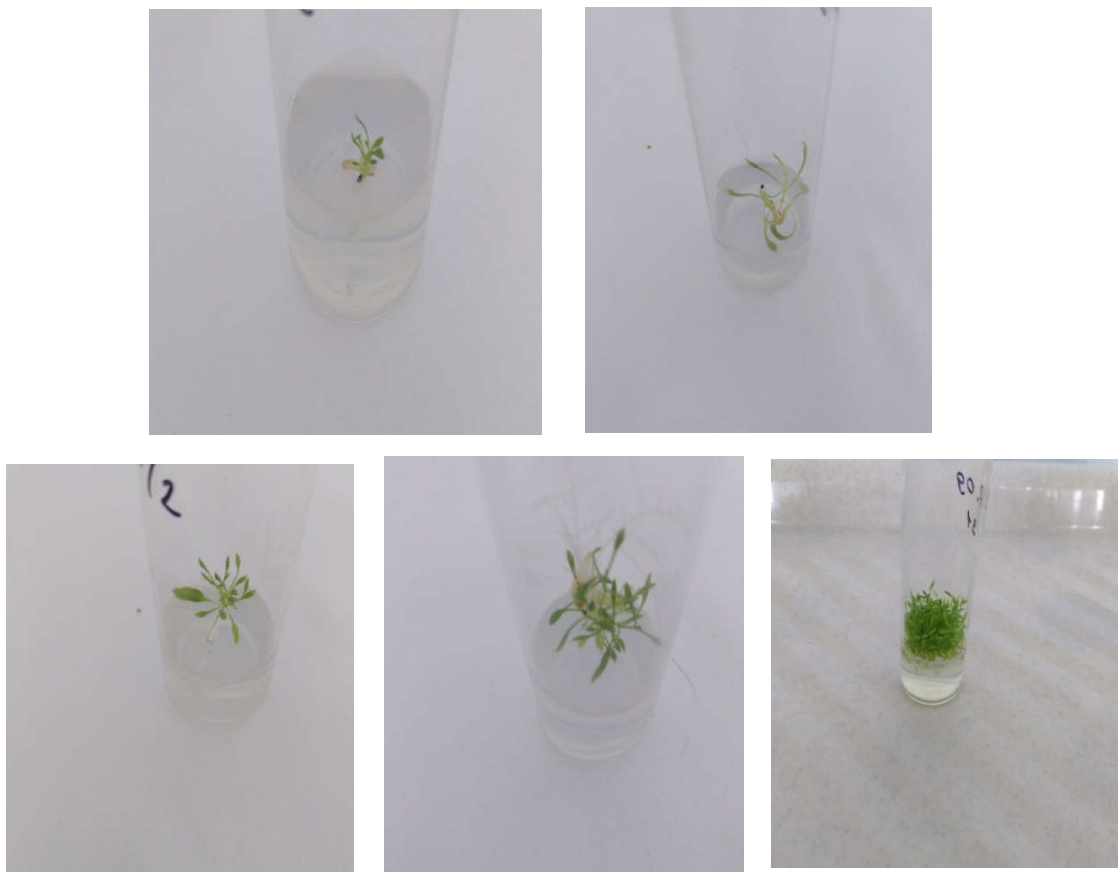
### Фітогормональний склад живильних середовищ

Варіанти	Фітогормони, мл/л	
	6-БАР	$\beta$ -ІОК
I (контроль)	–	–
II	0,10	0,05
III	0,30	0,07
IV	0,50-	0,10
V	0,70	0,12
VI	0,90	0,14

Введення до поживного середовища вітамінів і амінокислот було спрямоване на підтримання фізіологічної активності клітин та покращення перебігу процесів росту. Вітаміни групи В, С і РР брали участь у ферментативних реакціях, сприяли нормальному функціонуванню клітинного

метаболізму та забезпечували більш активне проходження морфогенетичних процесів. Амінокислоти аденін і гліцин виконували роль додаткових факторів росту, позитивно впливаючи на поділ клітин і розвиток меристематичних тканин. Важливим компонентом поживного середовища був мезоінозит, який стимулював інтенсивність окисно-відновних процесів і сприяв нормальному перебігу морфогенезу.

Після перенесення експлантів на поживні середовища вже впродовж перших 14-18 діб культивування спостерігали початкові ознаки прямого морфогенезу. Формування нових органів відбувалося без стадії калусоутворення. Безпосередньо на поверхні експлантів активувалися меристематичні клітини, які інтенсивно ділилися, утворюючи компактні конгломерати адвентивних бруньок. Надалі із цих бруньок формувалися численні дрібні пагони, які поступово збільшувалися у розмірах (рис.7).



**Рис. 7. Динаміка морфогенного розвитку пагонів *M. huynica* на живильних середовищах Мурасіге і Скуга, модифікованих вмістом фітогормонів**

Прямий морфогенез мав важливе значення для успішного мікроклонального розмноження *Moehringia huyanica*. Відсутність стадії калусоутворення дозволяла мінімізувати ризик виникнення соматоклональної мінливості та забезпечувала отримання генетично стабільного рослинного матеріалу. Це особливо важливо для рідкісних видів рослин, оскільки збереження їхнього природного генотипу є одним із головних завдань культури тканин.

У процесі культивування було встановлено, що реакція експлантів істотно залежала від концентрації фітогормонів у поживному середовищі. На контрольному середовищі, яке не містило регуляторів росту, розвиток рослин відбувався дуже повільно. Кількість сформованих пагонів становила лише 1,34 шт, середня довжина пагонів дорівнювала 0,82 см, а коефіцієнт розмноження не перевищував 1,41. Такі результати свідчать про недостатню активність ендогенних гормонів для забезпечення інтенсивного пагоноутворення.

Після внесення до поживного середовища 0,10 мг/л 6-БАП та 0,05 мг/л  $\beta$ -ІОК показники росту значно покращувалися. Кількість сформованих пагонів зростала до 12,11 шт., а коефіцієнт розмноження досягав 12,31. Незважаючи на істотне покращення порівняно з контролем, інтенсивність морфогенезу ще залишалася недостатньою для отримання максимальної кількості рослинного матеріалу.

Подальше підвищення концентрації регуляторів росту до 0,30 мг/л 6-БАП та 0,07 мг/л  $\beta$ -ІОК призвело до різкого збільшення морфогенетичної активності експлантів. У цьому варіанті середня кількість сформованих пагонів уже становила 63,62 шт., довжина пагонів збільшувалася до 1,50 см, а коефіцієнт розмноження досягав 68,66. Отримані результати свідчили про високу ефективність даного співвідношення цитокиніну та ауксину щодо стимуляції адвентивного пагоноутворення.

Найкращі результати були отримані під час культивування експлантів на поживному середовищі, що містило 0,50 мг/л 6-БАП та 0,10 мг/л  $\beta$ -ІОК.

Саме за таких умов у рослин формувалася найбільша кількість пагонів – 96,22 шт., середня довжина яких становила 2,93 см. При цьому коефіцієнт розмноження досягав 102,56, що було найвищим показником серед усіх досліджених варіантів (табл.3).

Таблиця 3

**Ефективність розмноження *M. hupanic* залежно вмісту фітогормонів у живильних середовищах (середнє за три пасажі)**

Середовище	Кількість утворених пагонів, шт.	Довжина пагонів, см	Коефіцієнт розмноження
I (контроль)	1,34±0,08	0,82±0,09	1,41±0,08
II	12,11±0,16	1,12±0,18	12,31±0,18
III	63,62±0,21	1,50±0,07	68,66±0,18
IV	96,22±0,26	2,93±0,31	102,56±0,22
V	83,36±0,11	2,09±0,17	80,12±0,16
VI	44,15±0,018	1,16±0,22	45,07±0,09

Висока ефективність цього варіанта середовища пояснювалася оптимальним співвідношенням цитокініну та ауксину, яке забезпечувало інтенсивний поділ клітин апікальних і латеральних меристем, активне формування адвентивних бруньок та подальший розвиток численних мікропагонів. Утворені пагони характеризувалися доброю життєздатністю, інтенсивним ростом та були придатними для наступного субкультивування.

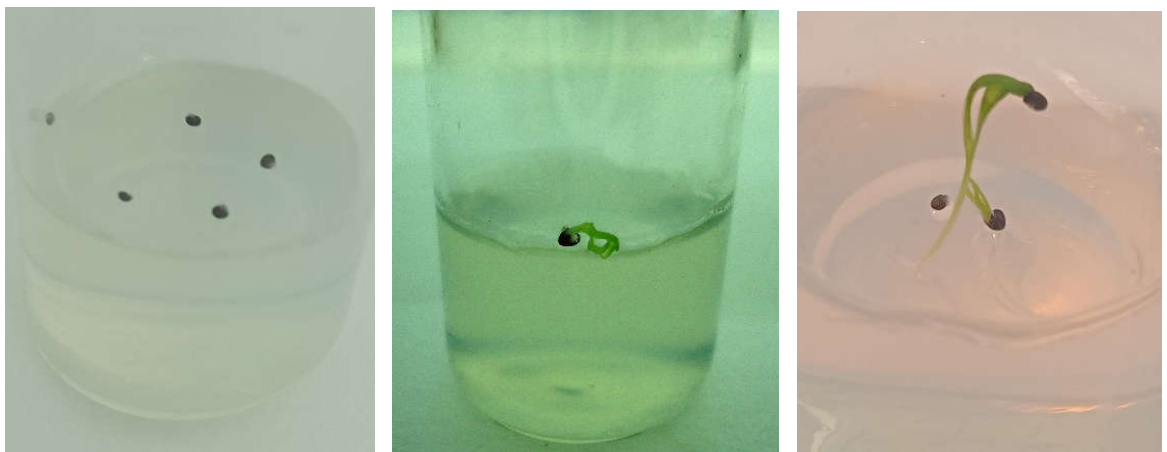
**3.3. Особливості культивування *Moehringia hupanic* в умовах *in vitro* та застосування біотехнологічних методів для її збереження**

У ході проведених досліджень було застосовано метод насінного та подальшого мікроклонального розмноження *in vitro*, що дозволило отримати стерильні експланти, придатні для багаторазового культивування. Такий

підхід був обраний, оскільки *Moehringia huynica* занесена до Червоної книги України, вилучення дорослих рослин із природних популяцій заборонено. Саме тому вихідним матеріалом для введення культури в асептичні умови слугувало насіння, зібране у природних місцях зростання виду.

Першим етапом мікроклонального розмноження було отримання асептичної культури із насіння. Після проведення стерилізації насіння висівали на агаризовані живильні середовища, де відбувалося його проростання. За результатами досліджень встановлено, що період проростання тривав від 10 до 56 діб. Така різниця у строках появи проростків свідчила про неоднорідність фізіологічного стану насіння та особливості його біології.

У процесі проростання спостерігалось поступове формування первинних проростків, які характеризувалися високою життєздатністю та були повністю стерильними. Саме отримання асептичних проростків мало визначальне значення для подальшого культивування, оскільки будь-яке мікробне забруднення унеможливило б тривале підтримання культури *in vitro* (рис.8).



**Рис. 8. Насінне розмноження *Moehringia huynica in vitro*: проростання насіння та отримання проростків**

Отримані стерильні проростки використовували як первинні експланти для подальшого мікроклонального розмноження. Після перенесення на

живильні середовища вже через два тижні культивування розпочиналися процеси прямого морфогенезу. На поверхні експлантів активувалися меристематичні тканини, внаслідок чого формувалися численні адвентивні бруньки. Надалі вони інтенсивно розросталися та утворювали значну кількість молодих пагонів.

Важливою особливістю розмноження *Moehringia huynica* було те, що розвиток нових пагонів відбувався без стадії калусоутворення. Такий тип морфогенезу значно зменшує ризик виникнення соматональної мінливості та забезпечує генетичну стабільність отриманих рослин. Для рідкісних ендемічних видів це має особливе значення, адже дозволяє максимально зберегти природні властивості вихідного матеріалу.

Після другого-третього пасажу інтенсивність морфогенетичних процесів істотно зростала. На основі пересаджених експлантів формувалися щільні подушкоподібні конгломерати, що склалися з великої кількості пагонів різного ступеня розвитку. Основна маса мікропагонів мала довжину від 1,5 до 2,0 см. Одночасно серед них виділялися окремі добре сформовані пагони завдовжки до 2-3 см із 3-5 парами тонких лінійних листків.

Саме такі пагони відзначалися найкращими морфологічними показниками і були придатними для наступного етапу мікроклонального розмноження – індукції ризогенезу. Формування подушкоподібних конгломератів свідчило про високий регенераційний потенціал культури та можливість отримання значної кількості посадкового матеріалу без повторного введення рослин у культуру.

Після завершення етапу мультиплікації добре розвинені мікропагони переносили на живильні середовища, призначені для стимуляції коренеутворення. Для цього використовували середовище Мурасіге і Скуга із половинною концентрацією макро- та мікроелементів, зменшеним до 2% вмістом сахарози та різними концентраціями  $\beta$ -індолілмасляної кислоти ( $\beta$ -ІМК) (табл. 4). Зниження концентрації мінеральних солей сприяло ефективнішому формуванню кореневої системи та забезпечувало поступову

підготовку рослин до наступного етапу культивування.

Таблиця 4

**Морфометричні показники розвитку регенерантів *Moehringia huynica* за укорінення *in vitro* на живильному середовищі МС**

β-ІМК, мг/л	Частота ризогенезу, %	Середні показники		
		кількість коренів, шт.	довжина коренів, см	висота рослин- регенерантів, см
0 (контроль)	-	-	-	-
0,1	12,31±0,08	1,90±0,14	1,21±0,13	1,86±0,17
0,3	21,14 ±0,17	1,92±0,15	1,73±0,12	2,63±0,11
0,5	81,03±0,12	36,11±0,18	3,36±0,9	4,62±0,21
0,7	58,07±0,90	16,22±0,17	2,87±0,12	3,13±0,23
0,9	8,18±0,14	3,12±0,15	1,34±0,11	3,16±0,13

Через 28-30 діб після перенесення на середовище для ризогенезу у рослин відзначали появу перших корневих зачатків, з яких поступово формувалися тонкі білуваті корені. Надалі спостерігалось інтенсивне наростання кореневої системи, що супроводжувалося утворенням численних бічних коренів та великої кількості корневих волосків. Сформована коренева система мала добре розвинену мичкувату будову, що забезпечувало ефективне поглинання поживних речовин та створювало передумови для успішної адаптації рослин після перенесення у нестерильні умови.

Заключним етапом технології мікроклонального розмноження *Moehringia huynica* є перенесення рослин-регенерантів із стерильних умов культури *in vitro* до нестерильного середовища *ex vitro*. Саме цей етап визначає ефективність усієї розробленої технології, оскільки отримані в культурі тканини рослини повинні успішно перейти до самостійного росту в природних умовах або в умовах подальшого культивування.

Після завершення етапу ризогенезу рослини *Moehringia huyanica* характеризувалися добре сформованою надземною та підземною частинами. До моменту перенесення з асептичної культури вони мали розвинені мікропагони, сформовану кореневу систему та достатній рівень морфологічного розвитку, що забезпечувало можливість їх подальшої адаптації (рис.9).



**Рис. 9. Сформувані рослин-регенерантів *Moehringia huyanica***

Важливою передумовою успішного перенесення рослин у нестерильні умови було формування повноцінної кореневої системи. У ході проведених досліджень встановлено, що після культивування на живильних середовищах із додаванням  $\beta$ -індолілмасляної кислоти відбувалося інтенсивне утворення коренів, які характеризувалися значною кількістю бічних відгалужень та добре розвиненими корневими волосками. Така будова кореневої системи створювала необхідні передумови для ефективного поглинання води та поживних речовин після перенесення рослин у нестерильне середовище.

У процесі культивування було встановлено, що розвиток кореневої системи відбувався одночасно з інтенсивним ростом надземної частини рослин. Після появи перших корневих зачатків спостерігалось поступове

збільшення їх довжини, формування численних бічних коренів та активний розвиток кореневих волосків. Одночасно продовжувався ріст пагонів, які досягали висоти 3,67-4,48 см, що свідчило про гармонійний розвиток усіх органів рослини.

Результати проведених досліджень показали, що інтенсивність росту регенерантів безпосередньо залежала від концентрації  $\beta$ -ІМК у поживному середовищі. Найбільш ефективно формування кореневої системи спостерігалось у варіантах із концентраціями 0,5 та 0,7 мг/л  $\beta$ -ІМК. Саме за цих умов відзначали найбільшу частоту ризогенезу, значну кількість сформованих коренів та найкращий розвиток надземної частини рослин. Отримані показники свідчили про високу життєздатність сформованих регенерантів та їх готовність до наступного етапу культивування.

Особливістю сформованої кореневої системи було утворення великої кількості тонких коренів, густо вкритих кореневими волосками. що вони утворювали своєрідну павутиноподібну масу, яка значно збільшувала поглинальну поверхню коренів (рис.10).



**Рис. 10. Сформована коренева система у *Moehringia hypanica***

Така особливість морфологічної будови є важливою для рослин на початкових етапах адаптації, оскільки забезпечує ефективніше забезпечення

водою та мінеральними речовинами після перенесення із стерильних умов.

### **3.4. Технологічні особливості мікроклонального розмноження *Moehringia hupanica* та розрахунок необхідних матеріалів**

Мікроклональне культивування *Moehringia hupanica* є однією з найбільш оптимальних стратегій для *ex situ* збереження цього рідкісного локального ендемічного таксону. На противагу конвенційним методам насінневого відтворення, біотехнологія тканинних культур уможливує продукування значного обсягу рослинних регенерантів за відносно стислий часовий проміжок, не спричиняючи при цьому деструктивного впливу на аборигенні популяції.

Дана методика передбачає низку послідовних стадій: індукцію асептичних культур, стимуляцію росту, розмноження пагонів, ризогенез та акліматизацію отриманих рослинних регенерантів до *ex vitro* середовища.

Поетапна блок-схема мікроклонального розмноження *Moehringia hupanica* наведена у графічній частині проєкту на презентації та у форматі А1.

Початковий етап введення в культуру передбачав використання насінневого матеріалу *Moehringia hupanica*, який підлягав попередній поверхневій стерилізації та подальшому висіванню на поживне середовище Мурасіге-Скуга (MS). Проростання насіння фіксувалося у проміжку 7-14 діб. Отримані асептичні сіянці слугували вихідним матеріалом для експлантатів, призначених для подальшої проліферації.

Фаза мультиплікації є центральною у технології мікроклонального культивування. Для індукції формування пагонів було задіяне середовище MS, доповнене цитокініном БАП та ауксином ІОК.

Максимальний коефіцієнт проліферації було досягнуто на поживному субстраті, що містив 1,5 мг/л ВАР та 0,1 мг/л ІОК. У зазначених умовах від кожного експланта в середньому формувалося 4-6 новоутворених пагонів протягом одного субкультивування.

Субкультивування проводили з інтервалом 28-35 діб. Під час культивування підтримувалися температурні параметри  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , фотоперіод 16/8 годин та інтенсивність освітлення в діапазоні 2500-3000 лк.

З метою стимуляції ризогенезу сформовані пагони розміщували на середовищі зі зменшеним рівнем цитокінінів та збагаченому індоліл-3-оцтовою кислотою (ІОК) у концентрації 0,5 мг/л. Утворення кореневої системи фіксувалося через 2-3 тижні культивування.

По завершенні етапу укорінення рослинні об'єкти були переміщені до акліматизаційного субстрату, який складався з торфу та перліту у пропорції 2:1. На початковій стадії адаптації забезпечувалася висока відносна вологість повітря (80-90%), котра послідовно зменшувалася протягом 2-3 тижнів.

Завдяки застосуванню даної розробленої методики було успішно одержано життєздатні рослинні регенеранти, придатні для подальшого культивування в *ex situ* колекціях та інтеграції у програми консервації виду.

Контроль технологічного процесу мікроклонального розмноження *Moehringia huynica* здійснюється на всіх основних стадіях виробництва та спрямований на забезпечення стерильності, стабільності умов культивування та отримання життєздатних рослин-регенерантів.

Кожна контрольна точка відповідає конкретному етапу технологічного процесу та дозволяє своєчасно виявити відхилення від встановлених параметрів (табл. 5).

На етапі відбору рослинного матеріалу (Кх1.1) здійснюється візуальний контроль якості експлантів. Оцінюється їх фізіологічний стан, відсутність механічних пошкоджень, ознак ураження хворобами або некрозу. Використання здорового вихідного матеріалу є критично важливим для успішного введення культури *in vitro*.

Під час попереднього промивання (Кх1.2) контролюється тривалість обробки рослинного матеріалу під проточною водою (15-20 хв). Метою є видалення поверхневих забруднень і зниження мікробного навантаження, що підвищує ефективність подальшої стерилізації.

**Перелік контрольних точок процесу мікроклонального  
розмноження *Moehringia huynica***

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
ДР 1.1. Відбір рослинного матеріалу (Кх1.1)	Якість експлантів (насіння, бруньки, пагони), відсутність механічних пошкоджень	Візуальний контроль	Кожна партія	Здоровий, неушкоджений рослинний матеріал
ДР 1.2. Попереднє промивання (Кх1.2)	Тривалість промивання, чистота поверхні експлантів	Візуально, контроль часу	Кожна операція	15-20 хв під проточною водою
ДР 1.3. Стерилізація експлантів (Кх1.3)	Концентрація стерилізуючого агента (70% етанол / NaOCl / NaDCC), час експозиції	Візуально, таймер	Кожна операція	70% етанол 30-60 с або NaOCl 10-15 хв
ДР 1.4. Промивання стерильною водою (Кх1.4)	Кількість промивань, залишки дезінфектанта	Візуально	Кожна операція	3-5 разів стерильною дистильованою водою
ТП 2.1. Приготування живильного середовища MS (Кт2.1)	Склад середовища (макро-, мікроелементи, сахароза, агар), рН	рН-метр, ваги, мірний посуд	Кожна партія	рН 5,6-5,8; сахароза 20-30 г/л; агар 7-8 г/л
ТП 2.2. Стерилізація середовища та посуду (Кт2.2)	Стерильність середовища	Автоклавування, індикатори стерильності	Кожна партія	121°C, 1,1 атм, 15-20 хв
ТП 3.1. Введення в культуру <i>in vitro</i> (Кт3.1)	Асептичність операцій	Робота в ламінарному боксі	Кожна операція	Повна відсутність контамінації
ТП 3.2. Ініціація культури (Кт3.2)	Приживлюваність експлантів	Візуальний контроль	Через 7-14 діб	≥60-80% живих експлантів
ТП 4.1. Проліферація пагонів (Кт4.1)	Кількість мікропагонів, коефіцієнт розмноження	Морфометричний аналіз	Кожні 3-4 тижні	3-5 пагонів/експлант
ТП 4.2. Гормональний склад середовища (Кт4.2)	Концентрація 6-БАП, НОК, β-ІОК	Рецептурний контроль	Кожна зміна середовища	відповідно до протоколу
ТП 5.1. Укорінення мікропагонів (Кт5.1)	Формування коренів, довжина кореневої системи	Візуально, лінійка	Через 2-4 тижні	≥70% укорінених рослин
ТП 6.1. Адаптація <i>ex vitro</i> (Кт6.1)	Вологість, освітлення, приживлюваність	Візуальний контроль	Щоденно (перші 10 днів)	Вологість 80-90%, поступове зниження
ТП 6.2. Приживлюваність рослин (Кт6.2)	Відсоток виживання після пересадки	Підрахунок рослин	Через 20-30 діб	≥80-90% життєздатних рослин

На стадії стерилізації експлантів (Кх1.3) контролюється концентрація та експозиція стерилізуючих агентів (70% етанол або розчини гіпохлориту натрію / дихлорізоціанурату натрію). Чітке дотримання часу обробки (30-60 секунд для спирту або 10-15 хвилин для гіпохлориту) забезпечує баланс між стерильністю та збереженням життєздатності тканин.

Етап промивання стерильною водою (Кх1.4) передбачає багаторазове (3-5 разів) видалення залишків дезінфікуючих розчинів. Контроль спрямований на запобігання токсичному впливу стерилізуючих агентів на експланти, що може негативно вплинути на їх регенераційний потенціал.

На стадії приготування живильного середовища MS (Кт2.1) контролюється точність рецептури, включаючи концентрації макро- та мікроелементів, сахарози (20-30 г/л), агар-агару (7-8 г/л), а також значення рН (5,6-5,8).

Під час стерилізації живильного середовища та інструментів (Кт2.2) контролюється режим автоклавування (121°C, 1,1 атм, 15-20 хв). Дотримання параметрів гарантує повну стерильність матеріалів і запобігає контамінації культур.

На етапі введення в культуру *in vitro* (Кт3.1) основним об'єктом контролю є асептичність роботи. Усі маніпуляції проводяться у ламінарному боксі, що забезпечує стерильні умови та мінімізує ризик зараження.

Під час ініціації культури (Кт3.2) контролюється приживлюваність експлантів через 7-14 діб. Нормативним показником є 60-80% життєздатних експлантів без ознак контамінації.

На стадії проліферації пагонів (Кт4.1) оцінюється кількість мікропагонів та коефіцієнт розмноження. Контроль дозволяє визначити ефективність гормональних середовищ та оптимізувати умови культивування.

Паралельно здійснюється контроль гормонального складу середовища (Кт4.2), зокрема концентрацій 6-БАП, НОК та  $\beta$ -ІОК, оскільки вони безпосередньо впливають на інтенсивність морфогенезу.

На етапі укорінення мікропагонів (Кт5.1) контролюється формування та

розвиток кореневої системи. Нормативним показником є укорінення не менше 70% рослин.

Під час адаптації *ex vitro* (Ктб.1) контролюються умови вологості та освітлення. Поступове зниження вологості є необхідним для запобігання стресу рослин при переході до нестерильних умов.

Завершальним етапом є контроль приживлюваності рослин (Ктб.2), який проводять через 20-30 діб після пересадки. Нормативним є збереження 80-90% рослин, що свідчить про ефективність технологічного процесу.

Матеріальний баланс складено на умовну серію – 100 експлантів (кінцева продукція: 100 рослин-регенерантів) (табл. 6).

Таблиця 6

**Матеріальний баланс виробничої серії для культивування  
*Moehringia huyanica***

№	Використано (сировина, матеріали)	Кількість	Отримано (продукти, напівпродукти)	Кількість
1	Рослинний матеріал (експланти)	100 шт.	Стерильні експланти	~70-80 шт.
2	Протічна вода	5-10 л	Очищений рослинний матеріал	100 шт.
3	70% етиловий спирт	0,2-0,5 л	Стерильні експланти	~70 шт.
4	Розчин NaOCl/ NaDCC	0,3-0,5 л	Введені в культуру експланти	~65-75 шт.
5	Стерильна дистильована вода	2-3 л	Промиті експланти	~65-75 шт.
6	Поживне середовище MS	10 л (на серію)	Мікропагоні	300-500 шт.
7	Сахароза	200-300 г	Укорінені рослини	~150-200 шт.
8	Агар-агар	70-80 г	Регенеранти після акліматизації	~100 шт.
9	Регулятори росту (6-БАП, НОК, β-ІОК)	мікродози	Життєздатні рослини	100 шт.
10	Субстрат (торф/перліт/пісок)	10-15 л	Адаптовані рослини	~90-100 шт.

Матеріальний баланс виробничої серії свідчить, що процес

мікроклонального розмноження рослини *Moehringia hupanica* є високоефективним та забезпечує значне збільшення кількості рослинного матеріалу в умовах культури *in vitro*. На початковому етапі для введення в культуру використовують 100 експлантів, які проходять попереднє очищення проточною водою, що дозволяє видалити механічні забруднення та знизити початкове мікробне навантаження.

Стерилізація рослинного матеріалу проводиться із застосуванням 70% етилового спирту та розчину гіпохлориту натрію (NaOCl) або натрієвої солі дихлорізоціанурової кислоти (NaDCC). У результаті стерилізаційної обробки вдається отримати близько 70-80 стерильних експлантів, що становить 70-80% від початкової кількості. Основними причинами втрат на цьому етапі є мікробна контамінація та пошкодження тканин під час стерилізації.

Після промивання стерильною дистильованою водою життєздатні експланти переносять на поживне середовище *Murashige and Skoog medium* (MS), збагачене сахарозою, агар-агаром та регуляторами росту, зокрема 6-бензиламінопурином (6-БАП), нафтилоцтовою кислотою (НОК) і β-індолілоктовою кислотою (β-ІОК). Саме збалансоване поєднання макро- і мікроелементів, джерела вуглецю та фітогормонів забезпечує активний морфогенез і проліферацію пагонів.

На стадії мультиплікації від 65-75 введених у культуру експлантів отримують приблизно 300-500 мікропагонів, що свідчить про високий коефіцієнт розмноження – у середньому 4-7 пагонів з одного експланта. Це підтверджує ефективність використаної гормональної композиції для стимуляції утворення нових пагонів.

Під час укорінення мікропагонів формується близько 150-200 повноцінних рослин із розвинутою кореневою системою. Надалі рослини-регенеранти переносять у субстрат на основі торфу, перліту та піску для акліматизації в умовах *ex vitro*. На етапі адаптації частина рослин втрачається через стрес, зміну вологості та освітлення, однак приблизно 90-100 рослин успішно приживаються.

Таким чином, матеріальний баланс демонструє, що зі 100 початкових експлантів можна отримати близько 100 життєздатних адаптованих рослин, а також 300-500 мікропагонів на проміжних етапах культивування. Це підтверджує високу результативність технології мікроклонального розмноження для масового відтворення та збереження рідкісного ендемічного виду *Moehringia huynica*.

Отже, застосування культури *in vitro* є багатообіцяючим методом збереження *Moehringia huynica*, що забезпечує створення резервних колекцій, підтримку генетичного фонду виду та отримання достатньої кількості рослин-регенерантів для майбутніх досліджень і програм відновлення в природі.

## РОЗДІЛ 4

### ОХОРОНА ПРАЦІ

В умовах проведення біотехнологічних досліджень, зосереджених на вирощуванні рослинних тканин поза організмом (*in vitro*), ключову роль відіграють спеціалізовані лабораторії. Тут активно застосовуються як стерильні апарати й матеріали, так і хімічні речовини, спеціальні поживні середовища, а також різноманітні фактори фізичного впливу [7].

Для успішного мікроклонального розмноження рослин у лабораторних умовах життєво важливо забезпечити належні показники мікроклімату. Зокрема, йдеться про підтримання температури повітря в діапазоні від 20 до 25°C, встановлення відносної вологості на позначці 60-70%, а також забезпечення адекватного повітрообміну [15].

Планування робочої зони має на меті чітке розділення підрозділів: секції для очищення лабораторного посуду, приміщення для приготування живильного середовища, стерильного комплексу, приміщення для культивування та відділення для адаптації. Таке зонування мінімізує ймовірність забруднення культур та формує безпечне робоче середовище для співробітників [2].

Дозвіл на роботу у лабораторії надається лише тим, хто успішно пройшов вступний та первинний інструктаж з охорони праці. Крім того, ці особи повинні бути ознайомлені з нормами техніки безпеки та отримати необхідні засоби індивідуального захисту. Персонал зобов'язаний використовувати лабораторний одяг, захисні рукавички, маску, а у випадках, коли це вимагається, - захисні окуляри [9].

Автоклави та шафи для сушіння, що функціонують під впливом високих температур і тиску, є джерелом підвищеної небезпеки. Перед тим, як розпочати експлуатацію, слід ретельно перевірити працездатність апаратури, цілісність герметизуючих елементів системи, а також переконатися у наявності належного заземлення. Здійснювати відкриття автоклава дозволено

виключно після гарантованого досягнення повного спаду тиску [7].

При культивуванні рослинних клітинних культур та тканин необхідним є використання різноманітних хімічних реагентів, які включають поживні компоненти (неорганічні солі, органічні кофактори), регулятори росту (фітогормони), засоби для корекції кислотності (кислотні та лужні розчини), а також стерилізуючі/дезінфікуючі агенти. Порушення регламенту поводження з такими субстанціями несе потенційну загрозу хімічних уражень шкірних покривів, іритації мукозних мембран або розвитку системної інтоксикації організму [14].

Під час роботи з поживними середовищами, персонал зобов'язаний застосовувати індивідуальні засоби захисту: халат, робочі рукавички та захисні окуляри [7].

Для знезараження поживного середовища та інструменти використовують сушильну шафу та автоклав. При маніпуляціях з гарячими посудинами слід користуватися жаростійкими рукавичками або спеціальними захватами. Не допускається робота з тріснутим скляним посудом чи електроприладами з ушкодженою ізоляцією [14].

Працюючи зі спиртами та подібними речовинами, категоричного заборонено використовувати відкритий вогонь, адже це неминуче призведе до займання. Найкраще проводити будь-які маніпуляції з легкозаймистими реагентами у спеціальних витяжних шафах або у добре провітрюваних приміщеннях [16].

Використане поживне середовище й залишки реагентів повинні бути знезаражені та утилізовані з дотриманням санітарно-гігієнічних норм. Категорично заборонено скидати концентровані хімікати або забруднені відходи до каналізаційної системи без належної попередньої обробки (нейтралізації) [22].

Розведення рослинних експлантів та вирощування їх *in vitro* вимагає неухильного дотримання стерильних умов та належної біобезпеки. Запорукою успішного вирощування є підтримування чистоти на всіх етапах процесу,

оскільки потрапляння сторонньої мікрофлори призводить до інфікування культур та, як наслідок, втрати цінного матеріалу [9].

Усі операції з експлантами виконують у ламінарних боксах із застосуванням стерильних інструментів. До початку робіт персонал має дезінфікувати руки антисептичним засобом та надягти стерильні рукавички. Інструментарій підлягає стерилізації в полум'ї спиртової лампи або в автоклаві. Робоча поверхня перед початком та після завершення роботи дезінфікують розчином етанолу [15].

Одним з основних етапів підготовки є знезараження рослинних зразків перед ініціацією культури *in vitro*. Для цього застосовують етанол, розчини гіпохлориду натрію або інші дезінфікуючі реагенти. Слід враховувати, що надмірна концентрація стерилізуючих агентів може призвести до пошкодження тканин експланта, тому протоколи стерилізації оптимізуються індивідуально для кожного виду рослин [22].

Під час вирощування культур важливо систематично контролювати їхній стан та своєчасно видаляти забруднені зразки. Приміщення для роботи з культурами слід регулярно знезаражувати, а показники температури, вологості та освітлення підтримувати на постійному рівні [2].

Відпрацьовані біологічні матеріали, такі як культури, рослинні залишки та забруднені живильні середовища, необхідно збирати у спеціальні ємкості та знезаражувати перед їхньою утилізацією. Неухильне дотримання вимог біологічної безпеки дозволяє запобігти розповсюдженню мікроорганізмів та забезпечує безпечні умови праці в лабораторії [1].

Дотримання санітарно-гігієнічних стандартів у лабораторному середовищі є фундаментальною передумовою забезпечення безпеки персоналу та успішної реалізації біотехнологічних досліджень. в умовах функціонування лабораторних комплексів є обов'язковим систематичне здійснення вологої деконтамінації із використанням спеціалізованих дезінфікуючих засобів, а також ретельний контроль за гігієнічним станом обладнання та підтримання асептичних умов лабораторного інвентарю [7].

Для персоналу встановлюється заборона на вживання їжі, зберіганні особистих речей, а також використання у побутових цілях. Після завершення професійної діяльності необхідно здійснити гігієнічну обробку рук та дезінфекцію робочої зони. Спеціалізований одяг слід зберігати відокремлено від особистих предметів та регулярно від особистих предметів та регулярно піддавати дезінфекції [9].

Зважаючи на експлуатацію електричного обладнання, нагрівальних елементів та легкозаймистих речовин у лабораторному середовищі, дотримання норм пожежної безпеки набуває першочергового значення. Електротехнічне устаткування має перебувати у належному технічному стані, бути обладнаним ефективною системою заземлення та підлягати періодичному контролю. Залишення активних пристроїв без належного нагляду є категорично неприпустимим [14].

Обов'язковим є оснащення лабораторного простору відповідними засобами протипожежної безпеки, актуальними схемами евакуації та комплектами надання домедичної допомоги. Персонал, залучений до роботи, має бути належним чином проінформований щодо алгоритмів дій у разі виникнення загоряння або іншої аварійної ситуації, а також володіти практичними навичками застосування первинних засобів пожежогасіння [16].

## ВИСНОВКИ

1. Підтверджено, що *Moehringia huyanica* є вузьколокальним ендемічним видом із обмеженим ареалом поширення та специфічними екологічними умовами існування, що зумовлює його високу вразливість до антропогенних і природних факторів та обґрунтовує необхідність застосування сучасних біотехнологічних методів для збереження виду.

2. Встановлено особливості росту, розвитку та мікроклонального розмноження *Moehringia huyanica* в умовах *in vitro* і визначено оптимальні умови отримання життєздатних рослин-регенерантів для подальшого перенесення в умови *ex vitro*.

3. Підтверджено можливість успішного введення виду в асептичну культуру з використанням насіннєвого матеріалу, що дозволяє зберігати природні популяції без вилучення дорослих рослин із природного середовища.

4. Найвищу ефективність мікроклонального розмноження забезпечили середовища *Murashige and Skoog medium* з 0,50 мг/л 6-БАП + 0,10 мг/л  $\beta$ -ІОК та 0,70 мг/л 6-БАП + 0,12 мг/л  $\beta$ -ІОК, за яких максимальний коефіцієнт розмноження становив 102,56.

5. Встановлено, що через 14-18 днів культивування формуються адвентивні бруньки та молоді пагони, а багаторазове субкультивування забезпечує швидке накопичення значної кількості рослинного матеріалу.

6. Найефективніше укорінення відбувалося на середовищі *Murashige and Skoog medium* ( $\frac{1}{2}$  концентрації) з  $\beta$ -ІМК у концентрації 0,50-0,70 мг/л, що забезпечувало високу частоту ризогенезу та формування розвиненої кореневої системи.

7. Сформовані регенеранти характеризувалися добре розвиненою кореневою системою та пагонами висотою 3,67-4,48 см, що забезпечувало їх високу життєздатність і придатність до подальшої адаптації.

8. Повний цикл мікроклонального розмноження тривав 160-180 днів і дозволяв отримувати значну кількість рослинного матеріалу без необхідності

частих субкультивувань.

9. Проведений матеріальний баланс показав, що зі 100 вихідних експлантів можливо отримати 300-500 мікропагонів і близько 90-100 адаптованих рослин, що підтверджує високу ефективність розробленої технології та раціональність використання матеріальних ресурсів.

10. Отримані рослини-регенеранти придатні для адаптації в умовах *ex vitro*, використання у колекціях *ex situ* та проведення подальших інтродукційних досліджень.

11. Розроблена біотехнологічна схема мікроклонального розмноження є ефективним методом масового розмноження та збереження *Moehringia huynica* і може бути рекомендована для практичного використання в природоохоронних програмах.

## ПРОПОЗИЦІЇ

Для збереження вузьколокальних ендеміків *Moehringia huyanica* пропонуємо:

1. Для масового отримання рослинного матеріалу *Moehringia huyanica* доцільно використовувати розроблену схему мікроклонального розмноження в умовах *in vitro*.

2. Для індукції морфогенезу рекомендується застосовувати поживне середовище *Murashige and Skoog medium* з додаванням 0,50 мг/л 6-БАП та 0,10 мг/л  $\beta$ -ІОК, що забезпечує найвищий коефіцієнт розмноження.

3. Для ефективного укорінення мікропагонів доцільно використовувати середовище *Murashige and Skoog medium* ( $\frac{1}{2}$  концентрації) з додаванням 0,50 мг/л  $\beta$ -ІМК, що сприяє активному ризогенезу та формуванню розвиненої кореневої системи.

4. Отримані рослини-регенеранти рекомендовано використовувати для створення та підтримання колекцій рідкісних видів *in vitro* і *ex situ*, а також для відновлення природних популяцій.

5. Перспективним напрямом подальших досліджень є удосконалення етапу адаптації рослин до умов *ex vitro* та оцінка їх приживлюваності в природних умовах.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Безпечна робота у клінічній лабораторії – запорука здоров'я працівників – Північно-Східне міжрегіональне управління Державної служби з питань праці. *Північно-Східне міжрегіональне управління Державної служби з питань праці*. URL:<https://pns.dsp.gov.ua/news/bezpechna-robota-u-klinichnii-laboratorii-zaporuka-zdorov-ia-pratsivnykiv/>
2. Джус Л., Ковальчук Т., & Діденко, І. (2022). БИОМОРФОЛОГОЧНІ ОЗНАКИ ПЛОДІВ ТА НАСІННЯ МОЕHRINGIA HYRANICA GRYNJ ET KLOK. *Матеріали конференцій МЦНД*, (21.10.2022; Дніпро, Україна), 102-105. <https://archive.mcnd.org.ua/index.php/conference-proceeding/article/view/300>
3. 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.
4. Вікімедіа У.п. Мерингія - Вікіпедія. *Вікіпедія*. URL:[https://uk.wikipedia.org/wiki/Мерингія#cite\\_ref-fior2007\\_5-0](https://uk.wikipedia.org/wiki/Мерингія#cite_ref-fior2007_5-0).
5. ЕНДЕМІК(И) - Довідник з екології. *Освіта*. URL: <https://osvita.ukr-lit.com/endemik-i/>.
6. Ендеміки, Ендеми. *Енциклопедія сучасної України*. URL: <https://esu.com.ua/article-17869>.
7. Загальні правила роботи в біохімічній лабораторії. URL: [https://studopedia.com.ua/1\\_20169\\_zagalni-pravila-roboti-v-biohimichniiy-laboratorii.html](https://studopedia.com.ua/1_20169_zagalni-pravila-roboti-v-biohimichniiy-laboratorii.html)
8. Іншина Н. М. І74 Біотехнологія : навч. посіб. - Суми : Видавництво СумДПУ ім. А.С.Макаренка, 2009.172 с.
9. ІНСТРУКЦІЯ З ОХОРОНИ ПРАЦІ ДЛЯ ПРАЦІВНИКІВ випробувальних лабораторій - Мої статті - Інструкції з охорони праці - Інструкції з охорони праці.*Інструкції з охорони праці - Інструкції з охорони праці*.

URL:[https://instruktor.ucoz.net/publ/instrukcija\\_z\\_okhoroni\\_praci\\_dlja\\_pracivniki\\_v\\_viprobuvajnikh\\_laboratorij/1-1-0-1029](https://instruktor.ucoz.net/publ/instrukcija_z_okhoroni_praci_dlja_pracivniki_v_viprobuvajnikh_laboratorij/1-1-0-1029).

10. Люта І. Вплив складу живильних середовищ на ріст і розвиток експлантів винограду, отриманих в умовах *in vitro*. *International Science Journal of Engineering & Agriculture*. 2024. Vol. 3, No.6. p. 107-116. doi: 10.46299/j.isjea.20240306.11.
11. Мерингія бузька *Moehringia huynica* Grynj et Klokov // Червона книга України - URL: <https://redbook-ua.org/item/moehringia-huynica-grynj-et-klokov/>
12. Мікроклональне розмноження рослин // Вікіпедія — URL: [https://uk.wikipedia.org/wiki/Мікроклональне\\_розмноження\\_рослин](https://uk.wikipedia.org/wiki/Мікроклональне_розмноження_рослин)
13. Науково дослідний інститут. *Національний дендрологічний парк "Софіївка" НАН України*. URL: <https://sofievka.org/ndi/>.
14. НПАОП 73. 1-1.11-12. Правила охорони праці під час роботи в хімічній лабораторії.
15. О. В. Кеца. БІОБЕЗПЕКА ЯК СКЛАДОВА ОХОРОНИ ПРАЦІ У БІОХІМІЧНИХ ЛАБОРАТОРІЯХ. *Науковий вісник Чернівецького університету*. 2025. Т. 17, вип. 1 : БІОХІМІЯ, БІОТЕХНОЛОГІЯ, МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА. С. 78-86. URL: <https://doi.org/10.31861/biosystems2025.01.078..>
16. Охорона праці в галузі та цивільний захист : навчальний посібник / В. В. Березуцький та ін. Харків : Факт, 2021. 528 с.
17. Попова Л. О. Фотоморфогенез у культурі *in vitro* троянд групи *Radio* за вплив спектрального складу освітлення, фітогормонального фону та антистресових факторів: кваліфікаційна робота магістра : спец. 162 "Біотехнології та Біоінженерія" / Л. О. Попова. Миколаїв, 2025. 75 с.
18. Подгаєцький А.А. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин : монографія / А.А. Подгаєцький, В. В. Мацкевич, А.Ан. Подгаєцький. - Біла Церква : БНАУ, 2018. - 209 с.
19. Романова С.В., Гонтова Т.М. ЕНДЕМІКИ. *Фармацевтична*

<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/5803/endemiki>.

20. Рибальченко А. М., Криворучко Л. М. Мікроклональне розмноження в культурі *in vitro*: можливості та переваги використання. Український журнал природничих наук. 2024. Вип. 10. С. 150-157. DOI: <https://doi.org/10.32782/naturaljournal.10.2024.14>

21. Рідкісні рослини національного природного парку “Бузький Гард”. Атлас довідник / Ширяєва Д. В., Коломієць Г. В., Деркач О. М., Винокуров Д. С., Мой сієнко І. І., Драбинюк Г. В., Овсієнко Я. В., Артамонова С. П., Куземко А. А. – К.: ПАЛИВОДА А.В., 2022. – 72 с.

22. Сірик, А. О. Принципи охорони праці при роботі з біологічними матеріалами під час проведення наукових досліджень в лабораторіях Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України / А. О. Сірик, А. Р. Скороход // Наукові здобутки молоді - вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті : Матеріали 83 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів, 5-6 квітня 2017 р. К. : НУХТ, 2017 р. - Ч.2. - С. 321.

23. Стаценко Я. Ендеміки: унікальні перлини обмежених земель. *Wem.ua*. 01.03.2026. URL: <https://wem.ua/endemiku-unikalni-perlyny-obmezhenyh-zemel/>.

24. Червона книга України. Рослинний світ / за ред. Я. П. Дідуха. - Київ : Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.

25. Alyson M. DeNittis, Joseph M. Larson, Olga Ruiz Kopp. Micropropagation of *Lepidium ostleri* (Brassicaceae), a native endemic plant species. *SPRINGER NATURE Link*. 2023. Т. 59. С. 684-691. URL: <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10376-y>.

26. Behzad Kaviani, Dariusz Kulus. Cryopreservation of Endangered Ornamental Plants and Fruit Crops from Tropical and Subtropical Regions. *Pub Medical Central*. 2022. Т. 11, вип. 6. С. 847. URL: <https://doi.org/10.3390/biology11060847>.

27. Bhojwani, S.S. and Dantu, P.K. (2013) *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer, London.  
<https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>
28. Carlos Alberto Cruz-Cruz, María Teresa González-Arno, Florent Engelmann. *Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity*. *MDPI*. 2013. T. 2. URL: <https://doi.org/10.3390/resources2020073>.
29. Chokheli V. A., Dmitriev P. A., Rajput V. D., Bakulin S. D., Azarov A. S., Varduni T. V., Stepanenko V. V., Tarigholizadeh S., Singh R. K., Verma K. K. et al. Recent development in micropropagation techniques for rare plant species. *Plants*. 2020. Vol. 9, № 12. Art. 1733. DOI: 10.3390/plants9121733.
30. Dzhus L., Kovalchuk T., Didenko I., Parubok M., Rozborska L. Morphostructure of *Moehringia hypanica* Gryn & Klovov in the Buzky Gard National Nature Park, Ukraine // *Trakya University Journal of Natural Sciences*. 2024. Vol. 25, № 1. P. 29–40. DOI: 10.23902/trkjnat.1315772.
31. Dariia Shyriaieva. *Rare Plant Species and Habitats of the National Nature Park “Buzkyi Gard”: Diversity, Conservation and Management Planning*. *The Ruffod Fondation*. 25.06.2019. URL: <https://www.rufford.org/projects/dariia-shyriaieva/rare-plant-species-and-habitats-of-the-national-nature-park-buzkyi-gard-diversity-conservation-and-management-planning/>
32. E. F. George, M. A. Hall, and G.-J. De Klerk (eds), *Plant propagation by tissue culture*. Volume 1. The background. 3rd edn 2008/ [Plant Cell Tissue and Organ Culture](https://doi.org/10.1007/s11240-008-9357-1) 93(3):353-355 DOI:10.1007/s11240-008-9357-1
33. Florent Engelmann. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *SPRINGER NATURE Link*. 2011. T. 47 : *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. C. 5-16. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-010-9327-2>.
34. F. Engelmann. In vitro conservation of tropical plant germplasm - a review. *ResergeGate*. 1991. T. 57, вип. 3 : *Euphytica*. C. 227–243. URL: <https://doi.org/10.1007/BF00039669>.
35. Holobiuc I., Catană R., Cogălniceanu G., Cristea V. *Biotechnological*

approach for ex situ conservation of the vulnerable species *Moehringia jankae* // Romanian Biotechnological Letters. 2018. Vol. 23, № 5. P. 13954-13963.

36. Morphostructure of *Moehringia hypanica* Gryn & Klokov in the Buzky Gard National Nature Park, Ukraine / Liudmyla Dzhus та ін. *Trakya University Journal of Natural Sciences*. 2024. Т. 25, вип. 1. С. 29–40. ISSN 2528-9691. URL: <https://doi.org/10.23902/trkjnat.1315772>.

37. *Moehringia* - Earthpedia plant. *Earthpedia*. URL: <https://earthpedia.earth.com/plant-encyclopedia/angiosperms/caryophyllaceae/moehringia/>.

38. *Moehringia* L. (genus) – species list & taxonomy | PlantaeDB. *Scientifically-proven Collaborative Database*. URL: <https://plantaedb.com/taxa/phylum/angiosperms/order/caryophyllales/family/caryophyllaceae/tribe/arenarieae/genus/moehringia>.

39. Melnyk, V.2011. *Moehringia hypanica*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2011: e.T165168A5985606. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-1.RLTS.T165168A5985606.en>.

40. Natacha Coelho, Sandra Gonçalves, Anabela Romano. Endemic Plant Species Conservation: Biotechnological Approaches. *PubMed Central*. 2020. Т. 9, вип. 3. С. 345. URL: <https://doi.org/10.3390/plants9030345>.

41. POWO. *Moehringia hypanica* Grin & Klokov // Plants of the World Online. Kew Science. URL: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:155725-1>

42. Puskareva Ya. Biotechnological approaches for conservation of rare and endangered species of genus L. in Ukraine : avtoref. dys. kand. biol. nauk. - Kyiv : ICBGE NAS of Ukraine, 2020. - 24 p.

43. Rani G., Virk G. S., Nagpal A. In vitro conservation methods // In vitro conservation of horticultural genetic resources / ed. by E. Duval et al. - Rome : FAO, 2013. -P. 119-162.

44. Richard K. Rabeler, Ronald L. Hartman. *Moehringia* [family

CARYOPHYLLACEAE]. *Global Plants*. T. 5. C. 359. URL: <https://plants.jstor.org/stable/10.5555/al.ap.flora.fna005000150>.

45. Thoyajaksha, and V. Ravishankar Rai. 2001. "In Vitro Micropropagation of *Dictyospermum Ovalifolium* Wight. A Rare and Endemic Plant in Western Ghats, India". *PLANT CELL BIOTECHNOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY* (1-2):57-62. <https://ikprress.org/index.php/PCBMB/article/view/2683>.

46. Valerie C. Pence A , Daniel Ballesteros B , Christina Walters C , Barbara M. Reed D 1, Megan Philpott A , Kingsley W. Dixon E, Hugh W. Pritchard B, Theresa M. Culley F , Anne-Catherine Vanhove. Cryobiotechnologies: Tools for expanding long-term ex situ conservation to all plant species. *Saving all the plants: plant conservation in a changing world*. 2020. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108736>.