МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07. – МР. 1764 «С». 2020.11.12. 04 ПЗ

ШЕВЧУК ІВАННИ ЮРІЇВНИ

2021

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України

НУБіП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСТИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет (ННІ) захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 604.7:582.929.4

ПОГОДЖЕНО	**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**
Декан факультету (Директор ННІ)	**Завідувач кафедри**
захисту рослин, біотехнологій та екології	Екобіотехнології та біорізноманіття
(назва факультету (ННІ))	(назва кафедри)
_____ Коломієць Ю. В.	_____ Кваско О. Ю.
(підпис) (ПІБ)	(підпис) (ПІБ)
"___" _____ 20__ р.	"___" _____ 20__ р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему Біотехнологічні особливості *Salvia hispanica L.*

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»
(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми

_____ _____ _____
(науковий ступінь та вчене звання) (підпис) (ПІБ)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

Доктор с.-г. наук, професор _____ Коломієць Ю. В.
(науковий ступінь та вчене звання) (підпис) (ПІБ)

Виконав _____ Шевчук І.Ю.
(підпис) (ПІБ студента)

КИЇВ – 2021

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСТИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет (ННІ) захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
Екобіотехнології та біорізноманіття
кандидат біол. наук _____ Кваско О. Ю.
(науковий ступінь, вчене звання) (підпис) (ПІБ)
“___” _____ 20____ року

З А В Д А Н Н Я

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Шевчук Іванна Юріївна
(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»
(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи Біотехнологічні особливості *Salvia hispanica L.*
затверджена наказом ректора НУБіП України від “12”листопада 2020 р. № 1764 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 22 листопада 2021р.
(рік, місяць, число)

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи: процес культивування чіа (*Salvia hispanica L.*) в умовах *in vitro* та відкритого грунту, вплив мікроклонального розмноження рослини на господарсько-цінні показники насіння *Salvia hispanica L.*, морфогенез, калюсогенез, ограногенез, ризогенез.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Удосконалити методику стерилізації, підібрати склад живильного середовища для введення в культуру *in vitro* та індукції морфогенезу ізольованих меристем;
2. Систематизувати інформацію за основними етапами культивування;
3. Оцінити ефективність вирощування чіа для отримання садивного матеріалу, оздоровлення в культурі *in vitro*.

Перелік графічного матеріалу (за потреби) _____
_____

Дата видачі завдання “1” жовтня 2020 р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи _____ Коломієць Ю.В.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання _____ Шевчук І.Ю.
(підпис) (прізвище та ініціали студента)

НУБіП України

НУБіП України

РЕФЕРАТ

Тема роботи- «Біотехнологічні особливості *Salvia hispanica L.*».

Пояснювальна записка до дипломної роботи містить 63 сторінки, 3 розділи, 3 таблиці, 12 рисунків, висновки та 49 джерел використаної літератури.

Об'єкт дослідження – процес культивування чіа (*Salvia hispanica L.*) в умовах *in vitro* та відкритого грунту.

Предмет дослідження – вплив мікроклонального розмноження рослини на господарсько-цінні показники насіння *Salvia hispanica L.*

Метою даної роботи є оптимізація технології клонального мікророзмноження *in vitro* рослин та оцінка якісних властивостей рослинної сировини за умов вирощування рослин-регенерантів у відкритому грунті. Вивчення індукції калюсогенезу і мікророзмноження насіння чіа, ініціація калюсогенезу та отримання калюсу, дослідження фізіологічних властивостей рослини *Salvia hispanica L.*, яке дозволить зробити комплексну оцінку потенціалу використання рослини чіа в харчовій і біотехнологічної галузях України, систематизувати інформацію за основними етапами культивування, розробити практичні пропозиції для оптимізації і вдосконалення лабораторного розмноження рослини.

Ключові слова: *Salvia hispanica L.*, калюсогенез, мікроклональне розмноження, стерилізація, живильні середовища, шавлія ісланська, морфогенез, органогенез, калус, експлантат.

НУБіП України

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 8

ВСТУП 9

РОЗДІЛ 1. Огляд літератури 13

1.1. Загальна характеристика родини *Lamiaceae* 13

1.2. Морфологічні особливості *Salvia hispanica L.* 16

1.3. Лікарські властивості чіа 18

1.4. Фітохімічні речовини в насінні 20

1.5. Ринковий потенціал та комерційне застосування насіння чіа 21

1.6 Метод мікроклонального розмноження 23

1.7 Біотехнологічні дослідження у видів роду *Labiateae* 26

РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи дослідження 30

2.1. Об'єкт дослідження. Рослинний матеріал 30

2.2. Місце проведення дослідження та обладнання лабораторії 31

2.3. Методика стерилізації насіння 34

2.4. Живильні середовища для культивування, оздоровлення, мікроклонального розмноження та ризогенезу *Salvia hispanica L. (chia)* 37

2.5. Одержання калусу 38

2.6. Методика клонального мікророзмноження *in vitro* 40

2.7. Приготування регенераційного середовища для індукції калюсної культури *Salvia hispanica L.* 42

2.8. Одержання рослин-регенерантів 43

2.9. Адаптація рослини до умов *in vivo* 44

РОЗДІЛ 3. Результати досліджень 45

3.1. Особливості калюсогенезу різних генотипів і первинних експлантатів чіа 45

3.2 Вивчення складу живильного середовища на морфологічні процеси *S. Hispanica* в культурі *in vitro* 52

3.3 Індукція органогенезу чіа в культурі *in vitro* 53

3.4 Мікроклональне розмноження і збереження селекційного матеріалу чіа в культурі *in vitro* 55

3.5 Ризогенез *Salvia hispanica* 56

3.6 Пристосування рослини чіа до грунту після стерильних умов 57

3.7 Оптимізація умов тривалого культивування калюсу 58

ВИСНОВКИ 61

ЛІТЕРАТУРА 63

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України

НУБіП України

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

2,4-Д - 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота

6-БАП - 6-бензиламінопурин

ІМК - індолілмасляна кислота

ІОК - β-індолілоцтова кислота

ГК – гіберелова кислота

МС – Мурасіге-Скуга

in vitro – «у склі»; вирощування клітин, тканин, органів, організмів в асептичних умовах на штучних живильних середовищах

НОК - α-нафтилоцтова кислота.

НУБіП України

ВСТУП

Активація сільськогосподарського виробництва, збільшення чисельності населення на планеті, зміни клімату інтенсифікують створення нових високопродуктивних, стресостійких сортів рослин. Зараз в селекції багатьох сільськогосподарських культур, крім традиційних методів використовуються біотехнологічні. Це методи клітинної інженерії (отримання сомаклональних варіантів, клітинна селекція і мутагенез *in vitro* та інші) – отримання цінних генотипів, які є вихідним матеріалом для селекції. Метод мікроклонального розмноження рослин – швидке розмноження цінних генотипів, отримання оздоровленого посадкового матеріалу.

Доцільність вибраної теми дипломного дослідження, а саме "Біотехнологічні особливості *Salvia hispanica L.*", полягає у тому, що культура чіа не достатньо вивчена, не розкриті основні біологічні характеристики, не досліджено переваги отримання асептичних рослин в умовах *in vitro*. У сучасному світі особлива увага приділяється рослинам, що містять корисні речовини для організму людини.

Родина *Lamiaceae Lindl*., або *Labiatae Juss*, включає 250 родів і майже 7,9 тисяч видів, з яких значна кількість видів вирощуються як культурні рослини.

Основні дослідження, присвячені даній тематиці проводилися в Торонто, Італії, Канаді, США та інших країнах. При вивченні корисних властивостей іспанської шавлії доведено такі: потужний профілактичний засіб при лікуванні депресії, бронхіальній астмі, хворобі Альцгеймера, епілепеії, ревматизмі; це ефективний харчовий продукт з величезним потенціалом у харчовій промисловості і лікувальній профілактиці серцево-судинних захворювань. Зерно чіа, на відміну від інших продуктів що містять у собі омега-3 жирних кислот, не накопичує у собі токсичних речовин і є гіпоалергенним. Дана рослина вирощується в екологічно чистих районах. У листках чіа міститься

НУБіП України

велика кількість антиоксидантів, які створюють природний захист рослини від шкідників.

В основному чіа розмножується насінням, але і використовуються способи розподілу і живцювання.

Дослідженнями з вивчення морфогенетичних реакцій рослин родини *Lamiaceae* у культурі *in vitro* та розробки прийомів клонального мікророзмноження займаються такі вчені, як: Л. О. Бугаєнко, І. О. Бугара, Н. О. Єгорова, І. Р. Зільберварг, Г. Г. Кривохатко, І. В. Ставцева, C. Cavaleiro, A. M. Dinis, J. Grzegorczyk, A. M. Hamza, M. M. Kasem, M. Abd El-Ka e Omaima, H. Wysokinska, M. R. Zuzarte та ін. Більшість робіт присвячено оптимізації складу живильних середовищ на окремих етапах культивування та вивченню морфогенезу *in vitro*.

Актуальність дослідження. У насінні чіа були виявлені різні активні компоненти, включаючи незамінні жирні кислоти та фенольні сполуки.

Існує багато факторів, які можуть викликати коливання концентрацій діючих речовин у насінні чіа. Один з них - площа вирощування самої рослини. Відмінності в навколишньому середовищі, кліматичні зміни, доступність поживних речовин, час вирощування або ґрунтові умови, які також відіграють вирішальну роль для мінливості.

За своїми корисними властивостями насіння чіа стало популярним у харчуванні вегетаріанців – як джерело кальцію. Насіння здобуло популярність у всіх країнах світу і було визнаним перспективним продуктом харчування. Корисні властивості чіа використовують проти захворювання шлунково-кишкового тракту, налагоджують роботу серцево-судинної системи, при правильному харчуванні допомагають регулювати масу тіла, зміцнює кістки та покращує стан зубів, підтримує рівень цукру в крові.

Насіння чіа містить рослинний білок, харчові волокна і велику кількість пектинових речовин, які стимулюють роботу кишківника, сприяючи

НУБіП України

зв'язуванню і виведенню шкідливих речовин з організму. Велика кількість поліненасичених жирних кислот групи ω-3 позитивно впливає на стан нервової системи, оскільки беруть участь у формуванні мієлінової оболонки, яка покриває нервові волокна та ізолює їх один від одного, сприяє проведенню нервових імпульсів. Руйнування мієлінової оболонки нервових волокон призводить до погіршення роботи мозку.

Окрім цього, насіння чіа характеризується високим вмістом вітамінів – групи РР, В6, В5, В2, В1, С,Е; мікроелементів – калію, кальцію, натрію, фосфору, мікроелементів – марганцю, міді, цинку [9]. Вище враховані переваги хімічного складу насіння чіа, дають можливість збагатити хлібні цінними макро- та мікронутрієнтами з повним збереженням їх вмісту та природнього співвідношення.

Споживання насіння чіа знижує базові та похідні кардіоваскулярні фактори ризику при діабеті II типу. Дане твердження обґрунтоване дослідженнями стану здоров'я групи діабетиків як чоловіків, так і жінок [10].

Дослідженнями І.Я. Конь і І.Я. Алєксєєвої та іншими науковцями [8] доведено високі споживчі властивості насіння чіа, їх добру засвоюваність. Енергетична цінність насіння чіа складає 486 ккал в тому числі: білки 16,54 г, жири 30,74 г, вуглеводи 42,12 г.

Об'єкт дослідження – процес культивування чіа (*Salvia hispanica L.*) в умовах *in vitro* та відкритого ґрунту.

Предмет дослідження – вплив мікроклонального розмноження рослини на господарсько-цінні показники насіння *Salvia hispanica L.*

Метою даної роботи є оптимізація технології клонального мікророзмноження *in vitro* рослин та оцінка якісних властивостей рослинної сировини за умов вирощування рослин-регенерантів у відкритому ґрунті. Вивчення індукції калюсогенезу і мікророзмноження насіння чіа, ініціація

НУБіП України

калюсогенезу та отримання калюсу, дослідження фізіологічних властивостей рослини *Salvia hispanica L.*, яке дозволить зробити комплексну оцінку потенціалу використання рослини чіа в харчовій і біотехнологічної галузях України, систематизувати інформацію за основними етапами культивування, розробити практичні пропозиції для оптимізації і вдосконалення лабораторного розмноження рослини.

Для досягнення мети дипломної роботи було поставлено такі завдання:

4. Детальний аналіз індукції калюсогенезу і мікророзмноження насіння чіа;
5. Охарактеризувати ініціацію калюсогенезу і отримання калюсу;
6. Дослідження фізіологічних властивостей шавлії іспанської;
7. Удосконалити методику стерилізації, підібрати склад живильного середовища для введення в культуру *in vitro* та індукції морфогенезу ізольованих меристем;
8. Систематизувати інформацію за основними етапами культивування;
9. Розробити практичні пропозиції для оптимізації і вдосконалення лабораторного розмноження рослини;
10. Оцінити ефективність вирощування чіа для отримання садивного матеріалу, оздоровлення в культурі *in vitro*.

НУБіП України

РОЗДІЛ 1. Огляд літератури

1.1. Загальна характеристика родини *Lamiaceae*

Родина *Lamiaceae* (Губоцвіті або Глухокропивові) – досить велика, налічує близько 3500 видів, що об'єднуються у 200 родів і поширені у всіх кліматичних зонах та на всіх континентах. У рослинному царстві України представлено 230 видів.

Глухокропивові (або Губоцвіті) - це трав'янисті рослини, кущі та напівкущі. Щоб віднести рослину до певного роду потрібно співставляти ряд ознак: стебла чотиригранні, листки навхрест супротивні, прості без прилистків. Квітки-двостатеві з подвійною оцвітиною, зигоморфні. Чашечка трубчаста з п'ятьма зубцями, часто двогуба. Віночок двогубий, верхня губа утворена двома зрослими пелюстками, нижня – трьома пелюстками. Нижні, зрослі пелюстки утворюють трубочку віночка. Тичинки зрослися з трубочкою віночка (з чотирьох тичинок дві нижні довші, ніж дві верхні). Інколи тичинок всього дві. Маточка утворена двома плодовими листками, чотири гнізда з чотирьох лопатевою зав'яззю. Плід збірний, з чотирьох горішків.

Формула квітки шавлії - **↑Ca(5)Co(5)A2G(2).**

В чашечці п'ять зрослих листочків. У віночку п'ять зрослих пелюстків, які утворюють дві губи – верхню та нижню. Нижня має три лопасті. Дві тичинки. Маточка довга і виглядає з віночка. Рильце має дві лопасті.

Андроцей – двосильний, складається з 4 тичинок (2 довші і 2 коротші), іноді 2 тичинки перетворюються в стамінодії.

Гінецей – ценокарпний, складається з двох плодолистків.

Зав'язь – верхня, біля основи зав'язі нектарний диск.

Плід – ценобій, який розпадається на 4 ереми (однонасінні горішки).

Виділяють основні особливості анатомічної будови:

- Провідні пучки - колатеральні;
- Листки- біфаціальні;

НУБіП України

- Продиховий комплекс – диацидний, рідше аномоцитний;
- Волоски – прості, лінійні, розчленовані, вкриті бородавчастою, штрихуватою або гладкою кутикулою;
- Ефірноолійні залозки типу ясноткових: мають парну кількість видільних клітин, розташовані на короткій одноклітинній ніжці [34].

Наземні частини рослин роду *Lamiaceae* містять ефірну олію, яку застосовують у фармацевтичній, харчовій і парфумерній промисловості.

Дуже багато рослин з представленого роду поширюються за допомогою вітру (анемохорія).

У таких рослин стебла зберігаються в сухому вигляді, плоди розсіюються поступово (навіть узимку). Якщо розглядати інші випадки, то розгалужені стебла з плодоносними суцвіттями легко обломлюються біля своєї основи і перекручуються вітром по степу, поступово розкидаючи плоди. Такими є деякі види шавлії, кулівниці і ін. Чим довше плоди не випадуть із чашечок, тим дальше вони перенесуться. Тому у багатьох губоцвітих є пристосування для утримання плодів в чашечці: кільце волосків в горловині або загнуті всередину зубці. У багатьох анемохорних губоцвітих плоди відпадають разом з чашечкою. Швидкість в цих випадках досягається за рахунок відносно довгих і часто війчастих зубчиків чашечки (наприклад у кмину), або за рахунок сильного розростання трубки чашечки і її зубчиків [42].

Серед Глухокропивових (*Lamiaceae*) багато видів, які поширюються з допомогою тварин. Багато з них мають дольки плодів, які облизуються при змочуванні і можуть поширюватися як ендозоохорно (з допомогою тварин, які їх поїдають), так і епізоохорно (на шерсті, шкірі, а також на ногах тварин і людини). Велика ефективність ендозоохорії одержується шляхом утворення кісточковидних долько плоду з соковитою м'ясистою оболонкою. Епізоохорно розповсюджуються види з клейкими або волосистими дольками плоду. В

НУБіП України

багатьох випадках для епізоохорного розповсюдження служать також чашечки, які опадають разом з плодами, тверді волоски і тверді відтягнуті в боки зубчики, якими вони добре прикріплюються до шерсті тварин [41].

Види губоцвітих, які живуть біля берегів водоймищ і на болотах (види м'яти, щоломниці), мають плаваючі долі плоду, пристосування до розповсюдження водними потоками і водяними тваринами.

Система губоцвітих ще далека від досконалості і перебуває в стадії розробки. Перш за все, ще не повністю відокремлено губоцвіті від близького, але більш примітивного роду вербенових. Деякі автори пропонують до вербенових відносити 2 родини Губоцвітих, подібні за будовою гінецею з багатьма родинами вербенових - простантерові і горлянкові, інші навпаки, пропонують перенести до губоцвітих значну частину родини вербенових [43].

В Україні шавлію вирощують з 1929 р. Основні площі розміщені в Запорізькій області і Криму. Середній урожай сухівіть шавлії в Україні становить 35 – 40 ц/га.

Залежно від спеціалізації лабораторії або потреб виробництва застосовують різні методи для мікроклонального розмноження родини Глухокропивові. Найбільш важливим факторами, що впливають на розвиток регенерантів є: фотоперіод, тип експланта, умови культивування, склад живильних середовищ.

У культурі *in vitro* можна виділити 4 важливих етапи:

1-відбір і підготовка експлантатів, отримання стерильної культури;

2- прискорене розмноження *in vitro;*

3- індукція ризогенезу;

4 – адаптація в умовах *in vivo*.

За допомогою культури *in vitro* можна розмножувати різні частини рослини в штучних умовах. Цими частинами можуть бути кінчики стебел,

молоді листки, суцвіття, черешки, верхівкові меристеми, меристематичні тканини, зародки тощо [38].

Для введення в культуру *in vitro* Губоцвітих відбираються молоді листки, черешки, кінчики стебел, верхівкові меристеми які не мають симптомів ураження хворобами і характеризуються як розвинені органи.

Щоб успішно провести мікроклональне розмноження потрібно дотримуватися умов стерильності матеріалу і дотримання умов асептики при культивуванні [16].

1.2. Морфологічні особливості *Salvia hispanica L.*

Чіа, *Salvia hispanica L.* - лікарський та дієтичний вид рослин з високим вмістом сполук, що мають промисловий та фармацевтичний інтерес.

Salvia hispanica L.(Labiateae), широко відома як чіа, - однорічний трав'янистий вид, що походить з півдня Мексики та північної Гватемали. Ця рослина була важливим основним продуктом харчування, джерелом олії та ліками для мезоамериканців у до колумбійські часи. Чіа культивували та споживали американські тубільці з району, що простягався від південного заходу Сполучених Штатів Америки та Мексики до Центральної Америки. В даний час він досі використовується в деяких громадах у виробництві напоїв та продуктів харчування. Тим не менш, чіа майже зник з ринків протягом 500 років, спочатку, імовірно, через релігійні переслідування і, нарешті, через труднощі із вирощуванням культури чіа в Америці [12].

Рід *Salvia* описаний К. Ліннеєм (*Linnaeus*, 1753). Сучасні систематики, розуміючи рід в широкому сенсі, включають в нього види, описані в складі самостійних родів *Schraderia Medik*, *Covola Medik.*, *Horminum Moench*, *Sclarea Moench*, *Jungia Moench*, *Stenarrhena D.Don*, *Leonia La Llav. Et Lex.*, *Audibertia Benth.*, *Rhodochlamys Schau.*, *Salviastrum Scheele*, *Polakia Stapf*, *Ramon aGreene.* Монографічну обробку роду в світовому масштабі виконав G. Bentham (1833), йому ж належить система роду, вдосконалена J. Briquet (1897). Bentham виділив

НУБіП України

14 секцій, об'єднаних їм згодом в 4 підроди (Bentham, 1876). У класифікації Briquet наведено 8 підродів і 17 секцій. Автори регіональних монографічних обробок (Bunge, 1873; Boissier, 1879; Maximowicz, 1881; Kudo, 1929; Stibal, 1934; Peter-Stibal, 1936; Epling, 1938, 1939; Murata, 1952; Победімова 1954 1972; Hedge, 1972a, 1972b, 1974,1981,1982; Камелін, Махмед, 1980; Махмед, 1984; Santos, 1991, 1996) досліджували різноманітність роду Шавлія в різних частинах його ареалу, описали внутрішньородові групи різного рангу, переглянули і уточнили таксономічне положення багатьох видів.

Системи Bentham і Briquet (l.c.), що відображають надвидову структуру роду в його повному обсязі, в значній мірі застаріли. Результати наступних таксономічних ревізій творчо узагальнені в класифікації А.М. Махмедова (1984), проте, вона не включає американські групи - підрід *Calosphace* (Benth.) Benth. і секцію *Audibertia* (Benth.) Epl. Таким чином, сучасної системи роду в світовому масштабі до цього часу не існує. Її розробка ускладняється великим об'ємом роду, майже космополітичним розповсюдженням і величезною різноманітністю форм (Hedge, 1974) [1].

Salvia hispanica L., рослина родини Глухокропивові, вид роду шавлія.

Біологічна класифікація

Домен: Еукаріоти (*Eukaryota*)

Царство: Зелені рослини (*Viridiplantae*)

Відділ: Вищі рослини (*Streptophyta*)

Надклас: Покритонасінні *(Magnoliophyta)*

Клас: Евдікоти

Підклас: Айстериди

Порядок: Губоцвіті *(Lamiales*)

Родина: Глухокропивові **(***Lamiaceae***)**

Підродина: *Nepetoideae*

Рід: Шавлія (*Salvia*)

НУБіП України

Вид: Шавлія іспанська

Salvia hispanica L. швидко вирощується для насіння, дає білого або фіолетового кольору квітки. Насіння містить від 25% до 40% олії, 60% її містить (омега) ω-3 альфа-ліноленова кислота та 20% (омега) ω-6 лінолевої кислоти. Обидві жирні кислоти незамінні і потрібні людському організму для міцного здоров'я, і їх неможливо синтезувати штучно [15].

Чіа може виростати до 1 метра у висоту, листя супротивне 4—8 см довжиною і 3—5 см шириною. Квіти чіа - це маленька квітка (3-4 мм) з невеликими вінчиками і зрощеними частинами квітки, які сприяють високій швидкості самозапилення.

Колір насіння варіюється від чорного, сірого та чорного плямистого до білого, а форма овальна розміром від 1 до 2 мм. Дикий і одомашнений чіа майже не відрізняється.

Для запобігання неправильної ідентифікації *Salvia hispanica* та інших видів, чітке розуміння морфології як рішення були запропоновані генотипові відмінності між ними. Рослина відома своїми лікарськими властивостями, *Salvia hispanica L.* отримала загальну назву чіа від корінних жителів Південної Америки до колумбійського та ацтекського періодів. Завдяки тому, що рослина може рости в посушливих умовах, його настійно рекомендують як альтернативну культуру для галузі польових культур [20].

1.3. Лікарські властивості чіа

Насіння *S. Hispanica* є цінною лікарською сировиною завдяки його унікальному хімічному складу: 16–26 % білка, 31–34 % жирних кислот, 37–45 % вуглеводів, 23–35 % харчових волокон. Крім цього вони є джерелом мінералів (кальцію, фосфору, калію і магнію), вітамінів (тіаміну, рибофлавіну, ніацину, фолієвої й аскорбінової кислот і вітаміну А). Не менш важливим є вміст антиоксидантних речовин, зокрема фенольних сполук.

НУБіП України

Встановлено, що насіння чіа містить розмаринову, кавову, саліцилову кислоти, а також флавоноїди (міріцетин і кверцетин). Аналіз важких металів показав, що насіння містить їх у безпечних рівнях, не перевищуючи максимальний вміст металів для харчової безпеки, також насіння не містить мікотоксинів. Ще одна ключова особливість насіння чіа - це те, що воно не містить глютену. Останні дослідження насіння чіа зосередили увагу на фітохімічних елементах та їх вилучення з насіння. Лише дуже мало досліджень зосереджувались на *in vivo* або клінічній біологічної активності та аспектах безпеки насіння чіа. З'явився інтерес до цієї рослини, оскільки дослідники виявили його надзвичайний склад та потенційну корисну дію на здоров'я [5].

Фактори навколишнього середовища, такі як зміна клімату, добових параметрів, температури, ґрунтових умов та площі вирощування, відіграють надзвичайно важливу роль у вмісті біологічно активних сполук, присутніх у *S. hispanica L.*. Крім того, на якість насіння також впливають такі фактори, які не бажані для комерційного виробництва.

Техніка, заснована на культурі тканин, є доповненням не тільки до звичайної селекції, але і для розмноження та генетичного вдосконалення рослин.Таким чином, існує гостра потреба у розробці високоефективного протоколу регенерації комерційного виробництва *S. hispanica L.*

Індукована культура тканин, диференціація створює послідовну та компетентну заміну масовому розмноженню для досягнення світових потреб. В даний час методи культури тканин широко використовуються як засіб для масового розмноження та збереження зародкових меристем багатьох рослин.

Основна мета культури тканин полягає у досягненні генетично ідентичних рослин для підтримки зародкової плазми, але під час цієї методики існує можливість генетичної зміни в регенерованих рослинах, відомих як "сомаклональна мінливість". Тому необхідно обов'язково визначати генетичну стійкість рослин, що проростають в умовах *in vitro*.

Набір генетичних маркерів, таких як поліморфізм довжини фрагмента рестрикції, випадкова ампліфікована поліморфна ДНК, ампліфікований фрагмент довжини поліморфізму, позначений послідовністю сайт, однонуклеотидний поліморфізм, маркери повторення між простими послідовностями (ISSR) використовуються з метою дослідження властивостей насіння чіа [8].

Нинішній рівень розвитку біотехнології рослин дозволяє використовувати для отримання біоактивних речовин сировину не лише з дикорослих чи вирощених у штучних умовах рослин, але і з отриманих методами культури рослинних тканин і органів *in vitro*, застосування яких відкриває можливості регулювання синтезу біологічно активних вторинних метаболітів і цільового отримання їх у більших кількостях, ніж із традиційного рослинного матеріалу. Крім того, методи асептичної культури широко застосовують для масового мікроклонального розмноження цінних генотипів рослин, відбору продуктивних ліній, створення генетично модифікованих організмів.

Біотехнологічні методи були застосовані і для розмноження та дослідження рослин *S. hispanica*.

1.4. Фітохімічні речовини в насінні

У насінні чіа були виявлені різні активні компоненти, включаючи незамінні жирні кислоти та фенольні сполуки. Ці активні сполуки, що сприяють корисні властивості для здоров'я насіння чіа.

Існує багато факторів, які можуть спричинити зміни в концентрації діючих речовин у насінні чіа. Один з них - площа вирощування самої рослини. Відмінності в навколишньому середовищі, зміни клімату, доступність поживних речовин, рік вирощування або ґрунтові умови відіграють вирішальну роль у мінливості.

НУБіП України

НУБіП України

Наприклад, тенденція до вмісту білка зменшується у міру підвищення температури. Крім того, зворотна залежність спостерігалася між висотою та вмістом насичених жирних кислот (SFAs), що при незначному підвищенні помітно збільшилась насиченість жирними кислотами в районах, де температура була високою. Ще один фактор, який може сприяти відмінностям у хімічному складі насіння чіа є стадія розвитку рослини. Встановлено, що вміст α-ліноленової кислоти зменшився на 23% від ранньої стадії до дозрілої стадії насіння. Це одночасно призводить до збільшення вмісту ліноленової кислоти та лігніну [TL].

Зважаючи на її економічний потенціал у хімічній промисловості та харчовій промисловості, створення культур *in vitro* виявилося цікавою альтернативою для отримання єдиної біомаси (щодо генотипу, вмісту білка та олії та жирних кислот) у контрольованих умовах екологічних та харчових середовищах.

В даний час актуальним напрямком використання насіння шавлії є отримання калюсу. Сьогодні широко вивчається використання паростків рослин в складі продуктів функціонального призначення, здатних надавати терапевтичний вплив як на стан шлунково-кишкового тракту, так і на організм в цілому [3].

Визначення оптимальних параметрів може бути використано при подальшому культивуванні рослини *Salvia hispanica L.* з точки зору використання зеленої маси як біологічно активного компонента.

Світловий фактор не впливає на насіння, але саджанці краще накопичують суху речовину в присутності світла. Насіння чіа помірно толерантні до певних рівнях солоності, однак більш високі або низькі значення можуть бути згубними, особливо на ранніх стадіях розвитку рослини [3].

НУБіП України

В рамках цієї роботи проведено дослідження можливості отримання калюсу *Salvia hispanica L.* в контрольованих умовах лабораторії Національного університету біоресурсів і природокористування України.

1.5. Ринковий потенціал та комерційне застосування насіння чіа

Функціональні продукти харчування здобули величезну увагу у всьому світі за останні кілька років через хвилю змін до здорового способу життя. Одна з причин зацікавленості перейти до більш здорового способу життя - це зростаюча кількість людей, які страждають серцево-судинними захворюваннями, високий кров'яний тиск, ожиріння, діабет та інші супутні захворювання. Ці захворювання зазвичай пов'язані з неактивним способом життя, погане харчування, де їжа, яка вживається щодня, містить велику кількість насичених жирних кислот. Тепер функціональні продукти харчування споживаються на основі їх доступності як щоденний основний продукт.

В даний час було проведено багато досліджень для підвищення функціональності харчових добавок з високою поживністю. Переваги функціональних продуктів харчування в першу чергу виявляються із наявності активних інгредієнтів та біологічно активних сполук, спочатку присутніх у рослині, потім у харчових продуктах після їх переробки, щоб зробити їх придатними для споживання людиною.

В наш час насіння чіа використовується як корисна добавка олії для людей і тварин. Споживання людиною чіа в раціоні в основному відбувається за рахунок видобутої олії через кондитерські вироби або добавки. У 2000 р. американські дієтологи рекомендують насіння чіа вживати як основну їжу, прийом повинен не перевищувати 48 г / добу. Чіа зазвичай вживають як салат із паростка чіа, в напої, крупи та салат із насіння, або його їдять сирим. Європейська комісія схвалила використання насіння чіа в хлібних виробах з обмеженням не більше 5%. Окрім хліба, харчова промисловість різних країн світу, включаючи США, Канаду, Чилі, Австралію, Нову Зеландію та Мексику,

широко використовувала насіння чіа або його олію для різних застосувань, таких як крупи для сніданку, батончики, закусочні закуски, фруктові соки , торти та йогурти [21].

Незважаючи на відому антиоксидантну активність та здоровівластивості жирних кислот, споживачі сучасності не дуже обізнані про користь чіа.Виробництво насіння чіа є головним фактором для економіки Аргентини (відповідає за 24% сільськогосподарської галузі). У 2008 році Аргентина зробила близько 4% світового виробництва зерна шавлії [21] .

Сучасне виробництво олії, насіння чіа ще не повністю задовольняють попит на світовому ринку [9].

1.6 Метод мікроклонального розмноження

Мікроклональне розмноження – розмноження рослин в культурі *in vitro,* отримання великої кількості генетично однорідних трансплантатів вихідної рослини і ці клони будуть без патогенів. Такий матеріал кращої якості від батьківської рослини. Має кращу силу росту, високу продуктивність, стійкість до хвороби [35].

Це єдиний спосіб регенерації генетично-модифікованих рослин. Використовується при створенні нових сортів і видів рослин. Такий спосіб розмноження ефективний для рослин із дуже дрібним насінням або нежиттєздатним насінням. Мікроклональне розмноження сприяє збереженню генетично однорідного посадкового матеріалу. Цей метод має ряд переваг у порівнянні з широко застосовуваними способами вегетативного розмноження.

Переваги мікроклонального розмноження:

- Швидкість отримання значної кількості однакових рослин. З однієї рослини можна отримати до декількох мільйонів однакових рослин;
- Незалежно від сезону представлена можливість розмножувати рослини протягом цілого року;

НУБіП України

НУБіП України

— Використання групи меристематичних клітин для досягнення оздоровлення вихідного садивного матеріалу;

— Для ініціації стерильної рослини потрібна невелика кількість вихідного рослинного матеріалу;

— Успішне розмножування екзотичних рослин, через незалежність від погодно-кліматичних умов;

— Розмноження рослин, які складно розмножуються в природі;

— Для отримання, відбору і вирощування рослин на початкових етапах потрібні малі площі;

— Легка можливість зміни та оптимізації контрольованих умов вирощування;

— Збереження цінних сортових якостей і генетична ідентичність отриманої рослини.

Технології мікроклонального розмноження у теперішній час розроблено для численних сільськогосподарських і дикорослих видів рослин. Особливо важливим використання мікроклонального розмноження є для масового отримання садивного матеріалу нових, щойно створених сортів і особливо гібридів рослин, які для збереження сортових якостей необхідно розмножувати виключно вегетативним (безстатевим), а не насіннєвим (статевим) шляхом.

Мікроклональне розмноження є необхідним етапом мультиплікації безвірусного садивного матеріалу рослин, що вегетативно розмножуються, отриманого безпосередньо в культурі меристем *in vitro*. Зникаючі та рідкісні види рослин, старовинні сорти та окремі унікальні рослинні особини, які з певних причин не розмножуються ні насінням, ні вегетативно в природніх умовах, можуть бути відтворені за принципами мікроклонального розмноження *in vitro*, збережені і повернуті у колекції та природне середовище.

Для мікроклонального розмноження використовуються різні джерела тотипотентних клітин рослинного організму, але переваги надаються тим, які

можуть забезпечити швидке і якісне відновлення рослинного організму в значній кількості генетично ідентичних копій. Найпоширенішим способом мікроклонального розмноження є активація пазушних (латеральних) та верхівкових (апікальних) бруньок, в тому числі і розщеплення пагонових апексів та утворення багатьох пагонів з однієї бруньки.

Калюсогенез – основа створення клітинних культур. Важливі для сільського господарства технології *in vitro* розроблені з використанням об'єктів різної складності організації, починаючи з ізольованих протопластів, закінчуючи ізольованими зародками. Культивовані клітини відіграють при цьому головну роль, як безпосередній об'єкт генетичних маніпуляцій або обов'язковий етап створених на основі інших об'єктів технологій.

Основним типом для культивування рослинної клітини є калюсна. Калюсні клітини в пересаджуваній культурі можуть спонтанно набути здатність до росту на середовищі без стимуляторів росту.

Калюсна клітина, в результаті ділення якої виникає калюсна тканина або калюс, являє собою один з типів клітинної диференціації, що властиво вищій рослині. Для рослини калус є тканиною, яка виникає при виключених умовах і функціонує недовготривало. Ця тканина захищає місце поранення, накопичує поживні речовини для регенерації анатомічних структур або втраченого органа.

Калюс як джерело біологічно активних речовин. В рослині певні вторинні метаболіти можуть синтезуватися в невеликих кількостях, а за використання культури *in vitro* з отриманого калюсу можна проводити промислове культивування і отримувати досить великі об'єми біологічно активних речовин.

Для отримання культивованих калюсних клітин частини тканин різних органів вищих рослин (експлантати) поміщають на штучні поживні середовища. Процес отримання первинного калюса і підтримання пересадкової

культури потребує абсолютної асептики. Для цього за допомогою різних стерилізуючих розчинів стерилізують експлантати.

Експлант, який використовується для отримання калюса є частиною органа і включає тканини, клітини яких різно диференційовані. Різне тканинне походження первинних калюсних клітин є однією з причин гетерогенності культури калусної тканини [29].

1.7 Біотехнологічні дослідження у видів роду *Labiateae*

Більшість видів родини *Labiateae* вирощують в культурі, зокрема, лаванду, м'яту, шавлію, монарду, ісопу, котовник, тім'ян, материнку, мелісу і інші. Інтерес до цих рослин досить високий в зв'язку з їх широким народно-господарським значенням, різноманітністю хімічного складу. Надземна частина цих рослин багата ефірними маслами, сапонінами, кумаринами, флавоноїдами і дубильними речовинами.

Ефірні масла широко використовують в медицині, харчовій, парфюмерно-косметичної промисловості, а також вони можуть служити джерелами отримання цінних компонентів вторинного синтезу (тимолу, карвакрола, ліналоола, цитраля і ін.). Висока практична цінність цих рослин обумовлює інтерес до них з точки зору селекції і насінництва. Розробка біотехнологічних підходів для отримання і прискореного розмноження цінних генотипів дозволить швидко вирішити багато прикладних завдань селекції. Судячи з наявних у вітчизняній і зарубіжній літературі даних, ефіроолійні та лікарські рослини в порівнянні з традиційними сільськогосподарськими культурами з точки зору біотехнології вивчені недостатньо.

Значна частина наявних публікацій присвячена вивченню впливу різних чинників (генотипу, гормонального складу живильного середовища і типу експлантів) на процеси каллусогенеза. В результаті були оптимізовані умови отримання калусних культур, які в подальшому використовували для індукції морфогенезу, розробки прийомів клітинної селекції на стійкість до

НУБіП України

осмотичного або низькотемпературного стресу *Salvia* і ін., а також для отримання продуктів вторинного метаболізму в умовах *in vitro*.

У багатьох представників родини *Lamiaceae* дослідниками описані різні типи морфогенезу і фактори, що впливають на його індукцію. Були отримані сомаклональні варіанти в калусних культурах лаванди і шавлії. Частота регенерації з каллуса залежала від типу експлантів, генотипу, складу живильного середовища. У цих дослідженнях було показано, що індукція морфогенезу у більшості генотипів обмежувалася 3-4 пасажами каллуса. Але у деяких штамів лаванди здатність до регенерації зберігалася протягом 1,5-2,5 років. Є дані про отримання сомаклонів меліси лікарської шляхом непрямого органогенезу з каллусів гіпокотилю. Максимальний індекс регенерації пагонів (до 1,08) при цьому відзначали на живильному середовищі МС, доповненої 1,0 мг / л кінетина, або 3,0 мг / л БАП і 0,5 мг / л НУК. М.А. Мубарак повідомляє про пряму регенерації пагонів деяких генотипів м'яти болотної з експлантів листа, черешка, стебла і кореня. Є відомості про непряму індукцію морфогенезу (у 85% трансплантатів) *in vitro* материнки звичайної на живильному середовищі, що містить 8,88 μM БАП і 2,26 μM 2,4-Д. В іншій роботі у експлантів гіпокотилю *Origanum majorana* спостерігали високу частоту соматичного ембріогенезу на середовищах з НОК і БАП, проте в цих дослідженнях вчені підкреслили, що морфогенна активність калусів була тільки в 1-2 пасажах.

Є дані про розробку селективних систем *in vitro* для отримання форм рослин, стійких до стресових факторів. Так проведена оптимізація режимів низькотемпературного стресу і обробки колхіцином у морфогенних і неморфогенних калусів лаванди з метою отримання форм, стійких до низькотемпературного стресу. Зокрема, були визначені сублетальні режими: промороження калусів до -14°С протягом 16 діб, обробка колхіцином в різній концентрації протягом 14 діб. Є дослідження, що стосуються клітинної селекції

на стійкість до осмотичного стресу. Деякі роботи присвячені вивченню цитофізіологічних змін при тривалому культивуванні калуса.

Одним з перспективних напрямків біотехнології є отримання вторинних метаболітів *in vitro*. У культурі тканин різних родів родини *Lamiaceae* можливе отримання широкого спектру речовин вторинного метаболізму, включаючи виділення окремих компонентів ефірних масел. Так, для *Mentha pulegium* показано наявність фенольних сполук. Bajaj Y.P.S. з співавторами виділили деякі продукти вторинного метаболізму з клітинних суспензій меліси лікарської. Вчені виявили взаємозв'язок між цитофізіологічними характеристиками клітин (кількістю клітин, сирої маси і ін.) і рівнем синтезу метаболітів. R.M. Arafeh з колегами відзначали наявність ефірного масла в калусних і суспензійних культурах деяких родів *Origanum*. Вчені повідомили, що з калусів і клітинних суспензій *O. vulgare* і *O. syriacum* було виділено від 0,04 до 0,11% ефірного масла, проте в його складі був відсутній тимол, на відміну від масел, отриманих з рослин *in vitro* і в теплиці. В іншій роботі при культивуванні калусних тканин материнки звичайної вчені додавали до складу живильного середовища пролін в різної концентрації, що сприяло підвищенню рівня тимолу в складі ефірної олії, що виділяється з калуса. У дослідженнях E. Darwesh виявлено позитивний вплив тіаміну в складі середовища на накопичення в калусі материнки хлорофілів А і В, а також каротиноїдів.

Значна кількість досліджень присвячена розробці методів клонального мікророзмноження. У біотехнологічної практиці методики мікророзмноження *in vitro* застосовують при розмноженні цінних селекційних зразків і нових сортів, оздоровленні посадкового матеріалу від бактеріальних, вірусних і грибних інфекцій, а також для збереження рідкісних і зникаючих видів рослин.

Таким чином, широке коло досліджуваних питань з використанням різних біотехнологій дозволяє використовувати їх в селекційногенетичних дослідженнях, а також для вирішення інших питань, пов'язаних зі скороченням

НУБіП України

біорізноманіття, зміною клімату на планеті і ін. У порівнянні з основними оброблюваними сільськогосподарськими культурами для рослин роду *Lamiaceae* клітинні технології *in vitro* залишаються мало розробленими. Дані щодо впливу поживних середовищ, типу експлантів, генотипу, умов культивування мікрочастинок на різних етапах мікророзмноження *in vitro* часом дуже суперечливі, а фактори, що лімітують процеси калусо- і морфогенезу, вивчені не повною мірою. Відсутність єдиних методичних підходів і недостатність знань про ці технології ускладнюють і обмежують використання біотехнологічних методів при роботі з новими селекційними зразками і сортами. У зв'язку з цим є актуальним вивчення процесів індукції калусо- і морфогенезу, а також розробка методик клонального мікророзмноження у цих перспективних ефіроолійних, лікарських та пряно-ароматичних рослин, що сприятиме підвищенню ефективності селекції і насінництва цих видів.

НУБіП України

РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи дослідження

2.1. Об'єкт дослідження. Рослинний матеріал

Для отримання калюсних асептичних проростків було використано насіння чіа торгової марки "Букет Меню" (рис.2.1.).

Рис.2.1. Насіння, яке використовувалося для дослідження

Властивості – без ГМО, без консервантів, без ароматизаторів, без барвників, без підсилювачів смаку.

Країна виробник товару – Перу.

Незалежно від того, якого кольору насіння, вони мають однакові властивості. Насіння чіа можна добавляти у різні страви. Не рекомендується піддавати насіння чіа термічній обробці, так як зникає велика кількість корисних властивостей. Загальна рекомендаційна доза чіа - 20 грамів (біля 1,5 ложки) двічі в день.

НУБіП України

Насіння пророщували *in vitro* за температури 20–24 °С та освітленні 3000лк. і 16-годинному фотоперіоді.

Salvia hispanica L. (chia) Lamiaceae - однорічна трав'яниста рослина, що родом з південної Мексики та північної Гватемали, але культивується в Аргентині, Австралії, Болівії, Колумбії, Гватемалі, Мексиці, Перу, Південно - Східній Азії та натуралізована в Карибському басейні. Висока харчова та фармакологічна цінність насіння чіа викликає інтерес до вивчення можливостей вирощування виду за межами цих територій. Важливою проблемою є те, що у вищих широтах рослина не може дати насіння.

Попереднє дослідження показало, що рослина чіа успішно вирощується в Болгарії, але основним обмеженням є виробництво насіння. Однак рослини виробляють велику кількість листя, яке можна використовувати як джерело біологічно активних речовин. На відміну від насіння, листя *Salvia hispanica* погано вивчені за хімічним складом та фармакологією діяльність. Основні компоненти ефірної олії листя та метаболіти листя, включають флавоноїди та фенольні кислоти *Salvia hispanica*. Як відомо, фенольні сполуки мають здатність діяти як антиоксиданти. Хоча насіння чіа широко вивчено щодо антиоксидантної активності, але немає даних про антиоксидантну дію листя.

2.2. Місце проведення дослідження та обладнання лабораторії

Дослідження проводилося в біотехнологічній лабораторії Національного університету біоресурсів і природокористування України на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття.

Для культивування рослинних клітин, органів і тканин потрібні умови стерильності. Це є основною технологічною вимогою, яка визначає особливості організації та оснащення лабораторії для проведення досліджень.

Лабораторія містить у собі основні складові для проведення таких операцій:

НУБіП України

— Приготування, стерилізації та зберігання штучних живильних середовищ;

— Миття і стерилізації лабораторного посуду;

— Ізоляція культур в асептичних умовах;

— Вирощування культур в термостаті;

— Мікроскопіювання клітин і тканин;

— Біохімічного аналізу;

— Кількісного обліку результатів дослідження.

Для миття і стерилізації посуду наявні глибокі раковини з кислотостійкого матеріалу, крани з холодною та гарячою водою, шафи для зберігання посуду, стелажі для сушіння посуду, апарати для дистиляції води.

Живильні середовища готуються на лабораторних столах, наявні шафи для реактивів, аналітичні ваги, електричні плити, водяна баня, магнітний змішувач, холодильники для зберігання концентрованих розчинів живильних середовищ.

Для стерилізації посуду, середовищ, інструментів наявний автоклав і сушильна шафа для стерилізації сухим жаром.

Щоб всі дослідження були в асептичних умовах потрібно використовувати ламінарний бокс, у якому стерильне повітря, яке проходить через бактеріальні фільтри. У боксі також є бактерицидні лампи.

Ізольовані тканини культивують в термостаті з регульованою температурою і вологістю.

У лабораторії наявне обладнання, яке необхідне для досліджень, пов'язаних з рослинами.

При роботі з культурою ізольованих тканин необхідний посуд, який можна поділити на 3 групи:

НУБіП України

1) Для приготування і зберігання живильних середовищ, а саме: колби, хімічні стакани, мірні циліндри, піпетки, скляні палички, фільтри Зейтца, скляні та мембранні фільтри;

2) Для вирощування ізольованих тканин: колби, чашки Петрі, пробірки біологічні, предметні скельця, покривні скельця;

3) Для пересаджування тканин: стакани з кришкою, чашки Петрі, колби, піпетки, фарфорові стакани для стерилізації інструментів.

Для пересадки та ізолювання тканин на середовища використовують скальпелі, пінцети, ножиці, леза, металічні петлі, анатомічні голки.

Ряд допоміжних матеріалів, який потрібен для роботи з культурою тканин: обгортковий папір, марля, вата, фольга, фільтрувальний і пергаментний папір.

Вату використовують для виготовлення ватних пробок, тампонів для піпеток, протирання робочих поверхонь. Марля використовується при обгортанні ватних пробок, виготовленні мішечків, фільтрування середовищ. Алюмінієвою фольгою зручно закривати культуральні посудини замість ватних пробок. Для загортання посуду в автоклаві при стерилізації потрібен обгортковий або пергаментний папір. На фільтрувальному папері після стерилізації підсушують рослинний матеріал.

Обов'язковою умовою культивування рослинних тканин є чистий посуд.

Методи стерилізації посуду:

Стерилізація сухим паром – автоклавування при 2 атм (133^0C) 30-40 хв в залежності від заповнення автоклава.

Посуд загорнутий в папір або з ватними тампонами стерилізують автоклавуванням. При автоклавуванні піпеток верхню частину закривають ватним тампоном (приблизно на 2 см) і кожну окремо загортають в папір. Піпетки зручно стерилізувати в скляних пеналах, на дно яких слід покласти вату, щоб запобігти обламуванню носиків піпеток.

НУБіП України

Стерилізація сухим жаром - культуральний посуд (колби, пробірки, чашки Петрі тощо) перед наповненням живильним середовищем попередньо стерилізують сухим жаром в сушильній шафі. Тривалість стерилізації: при 150^{0}С - 2,5 год, при 160^{0}С - 2 год, при 170^{0}С - 1 год. Слід пам'ятати, що до цього часу стерилізації необхідно додавати час, який потрібний для нагріву завантажених в шафу предметів до заданої температури [36].

Методи стерилізації інструментів

Стерилізація сухим жаром - інструменти попередньо стерилізують сухим жаром в сушильній шафі. Тривалість стерилізації: при 150^{0}С - 2,5 год, при 160^{0}С - 2 год, при 170^{0}С - 1 год.

Стерилізація полум'ям. В боксі безпосередньо перед роботою інструменти занурюють у фарфоровий стакан з 96^0 спиртом і стерилізують обпалюванням у полум'ї спиртівки. Стерильний інструмент використовують тільки для одноразової маніпуляції. Перед повторним використанням його слід знову простерилізувати спиртом і обпалити.

Допоміжні матеріали: вату, пробки, марлю, папір, целофан, фольгу стерилізують автоклавуванням.

Перед початком операцій у ламінарному боксі необхідно його підготувати до роботи. Для цього використовують стерилізацію ультрафіолетовим випромінюванням 30 хв з послідуючим протиранням робочої поверхні 70-96^0 спиртом. Іноді досить продування боксу 30 хв стерильним повітрям і протирання спиртом [30].

2.3. Методика стерилізації насіння

Стерилізацію насіння проводили за допомогою розчину "Білизни". Для забезпечення ефективної стерилізації насіння чіа потрібно попередньо помістити у дистильовану воду на 20 хвилин. Це забезпечить очищення поверхні насіння від явища міксоспермії (здатність до ослизлення плодів і насіння рослин при зволоженні). Тому що слиз, що з'являється на поверхні

НУБіП України

насіння містить у своєму складі багато вуглеводів і є субстратом для розвитку бактерій. Це могло спричинити ускладнення під час стерилізації насіння [27].

Розчин для стерилізації складався з 1 частини "Білизни" та 2 частин дистильованої води. Приготований розчин використовується одноразово відразу (рис.2.2).

Рис.2.2. Стерилізація насіння в ламінарному боксі

Щоб не виникало проблем із промиванням насіння, потрібно його помістити у марлеві мішечки по 10 штучок. Промите насіння поміщали в стакан із 70% етанолом. Всі наступні дії потрібно проводити у ламінарному боксі. Стерильним пінцетом переносимо мішечки з насінням до стаканчиків з раніше приготовленим розчином "Білизни". Витримувати потрібно відповідно 15 хвилин.

Об'єм із насінням повинен займати ¼ об'єму стерилізуючого розчину. Мішечки треба перевертати кожні 2 хвилини, щоб розчин оптимально змочував усе насіння.

Асептичне насіння промивали тричі по 10 хвилин у стерильній дистильованій воді. Для цього простерилізованим пінцетом переносимо мішечки із склянки зі стерилізуючим розчином у склянку із стерильною водою. Потрібно витримати 10 хвилин. При кожному промиванні використовуємо нову порцію води (Рис. 2.3.).

Рис. 2.3. Промивання насіння у дистильованій воді

Щоб забрати надлишок води з простерилізованого насіння його стерильним пінцетом переносимо у стерильну чашку Петрі з проавтоклавованим фільтрувальним папером.

Стерильним пінцетом переносимо насіння чіа на безгормональне живильне середовище у пеніцилінку.

Щоб запобігти контамінації насіння потрібно відкрити пеніцилінку, обпалити горло пеніцилінки у полум'ї спиртівки, стерильним пінцетом помістити насінинку на середовище, знову обпалили горло пеніцилінки і її обгортку, після чого закрити.

Пеніцилінки з насінням поміщаємо у термостат при температурі 20–24 °С.

НУБіП України

Через тиждень можна спостерігати схожість насіння та чистоту посіву. Після проростання насіння пеніцилінки необхідно перенести у світлову кімнату. Ефективність стерилізації становила – 93% (з 15 дослідних пеніцилінок зараженою виявилася 1, отже 14×100/15= 93%) [38].

2.4. Живильні середовища для культивування, оздоровлення, мікроклонального розмноження та ризогенезу *Salvia hispanica L. (chia)*

Послідовність та терміни проходження морфогенезу в культурі *in vitro,* для контрольного варіанту чіа відзначали на безгормональному живильному середовищі Мурасіге-Скуга на 30 добу.

Для подальшої роботи по мікроклоиальному розмноженні у рослин-регенерантів *Salvia hispanica* зрізали апікальні меристеми та пасажували на живильні середовища з регуляторами росту для розвитку рослини.

Розмноження рослини в культурі *in vitro* проводили шляхом культивування мікроживців на живильному середовищі МС з додавання агару, 3 % цукрози, регуляторів росту. Живильне середовище для ризогенезу містило половинну концентрацію мікроелементів і макросолей, 2% цукрози та регулятори росту ауксинової природи.

Таблиця 2.1

Варіанти складу поживного середовища для введення, культивування експлантів, коренеутворення *Salvia hispanica*

Варіант	Вміст регуляторів росту, мг/л						
	6-БАП	Аденін	2,4-Д	НОК	ІОК	ІМК	ГК
	Живильні середовища для мікроклонального розмноження						
МС1	0,5	0,1	-	-	-	-	1,0
МС2	0,75	0,1	0,01	-	0,05	-	1,0
МС3	1,25	-	0,01	-	0,1	-	0,5
	Живильні середовища для ризогенезу						
$^{1/2}$МС4	-	-	-	0,5	-	-	-

НУБіП України

$^{1/2}$МС5	-	-	-	-	0,2	0,2	-
$^{1/2}$МС6	-	-	-	0,5	-	-	0,1

Фіксацію показників рослин-регенерантів проводили на 27-31 добу культивування. Коефіцієнт розвитку розраховували як кількість мікроживців, що можна отримати за одне субкультивування.

Рослини-регенеранти вирощували у культуральному посуді.

2.5. Одержання калусу

Стерильні проростки вирощують з метою одержання експлантів для введення в калусну або пухлинну культуру. Стерильні проростки можуть бути використані у двох напрямах:

1) як джерело одержання експлантів з диференційованих тканин, які при перенесенні на живильне середовище з наявністю у ньому фітогормонів дедиференціюються і в результаті інтенсивної проліферації утворюють калусну тканину;

2) для одержання первинного калусу безпосередньо на паростках, який може бути ізольований і перенесений у стерильних умовах на живильне середовище, що містить фітогормони з метою подальшого культивування.

Калус – тканина, що виникла в результаті дедиференціювання й проліферації клітин тканин і органів рослин.

Для рослини *in vivo* калус – це група клітин, що виникає при травмах і захищає місця поранення (ранева паренхіма). У ньому накопичуються живильні речовини для регенерації анатомічних структур або втраченого органа.

В біотехнології культура калусної тканини використовується для цитологічних досліджень, одержання біологічно активних речовин, сомаклональних варіантів, клітинної селекції, мутагенезу *in vitro*, регенерації рослин шляхом органогенезу або соматичного ембріогенезу.

Диференційовані клітини поєднуються у рослині в тканини й відрізняються за морфологічною будовою та функціями. На живильних

середовищах з великим змістом ауксинів клітини експлантату дедиференціюються і переходять до проліферації, втрачають колишні функції і морфологію. У клітині, що готується до поділу, стимулюється синтез усіх форм РНК, починається реплікація ДНК, зникають специфічні тканинні білки-антигени, синтезуються нові, специфічні для калусних клітин. Змінюється активність структурних генів і білкового апарату клітин. Дедиференціація спеціалізованих клітин починається зі збагачення їхніми елементами цитоплазми: мікротрубочками, мембранами ЕПС і комплексу Гольджі, рибосомами. Зникають хлоропласти і хромопласти, продукти їхньої діяльності; може утворюватися багато ядер або збільшитися число хромосом; укрупнюються вакуолі.

Калус, що вирощується поверхневим способом, являє собою аморфну масу тонкостінних паренхімних клітин, що не мають точно визначеної структури. Культури калусів можуть бути отримані з різних органів рослин – коренів, пагонів, листків, суцвіть. Ефективність одержання калусної тканини залежить від правильного підбору типу експлантату, способу стерилізації, складу живильного середовища, умов культивування [29].

Проведення дослідження

1. Підготувати рослинний матеріал, який проростав з насіння чіа. Пагони дослідної рослини витримати в мильному розчині 20 хв, потім промити проточною водою 8 разів, нарізати на сегменти довжиною 3-5 мм. Нарізані пагони загорнути в марлю.

2. Провести стерилізацію рослинного матеріалу за схемою:

1) 70 %-ний етанол – 55 секунд;

2) промити стерильною дистильованою водою – 3 рази по 5 хв.

3. Стерильний рослинний матеріал покласти в стерильну чашку Петрі.

НУБіП України

4. Підготувати робоче місце – ламінарний бокс. Робочу поверхню обробити етанолом. Інструменти помістити в посуд з 96 %-ним етанолом. Запалити спиртівку.

5. Провести введення експланту в культуру *in vitro*. Краї пеніцилінки та інструменти обпалити в полум'ї спиртівки. Від рослинного матеріалу за допомогою скальпеля відрізати сегмент розміром 0,5 х 0,5 см і помістити його на поверхню живильного середовища, злегка вдавлюючи. Обпалити краї пеніцилінки та закрити її.

6. Культивування експланту. Пробірки з експлантами розмістити в культуральній кімнаті за температури 25-28 ° С, відносної вологості повітря 60-70 % і 16-годинного фотоперіоду.

7. Аналіз результатів. Провести лабораторне дослідження експлантів через 2 тижні. Вибракувати інфіковані експланти. Виявити ознаки калусогенезу. Дослідження проводити через 7-10 днів.

2.6. Методика клонального мікророзмноження *in vitro*

Як експланти для клонального мікророзмноження використовували сегменти стебла з одним вузлом, пазушні меристеми з 2-ма листовими зародками (розміром 0,2-0,5 мм, залежно від аналізованої культури), а також мікрочеренки пробіркових рослин (сегменти стебла з вузлом розміром) 5-8 мм і двома пазушними бруньками). Меристеми вичленовали за допомогою скальпеля та препарувальної голки ланцетоподібної форми з ріжучими краями в асептичних умовах ламінарного боксу. Експланти поміщали на поверхню агаризованого живильного середовища Мурасіге та Скуга, модифікованого регуляторами росту різного типу дії. На різних етапах мікророзмноження *in vitro* експланти та мікрочеренки культивували в пробірках (150×16 мм), колбах (об'ємом 100 мл) або банках (об'ємом 200 мл) закритих ватно-марлевими пробками або фольгою. Мікрочеренкування пагонів здійснювали кожні 35-40 діб. Наприкінці циклу вирощування проводили оцінку морфометричних

показників: частоту експлантів, що розвиваються (%), кількість пагонів, частоту множинного пагоноутворення (%), кількість вузлів, довжину пагонів (мм), частоту вкорінення (%), а в деяких варіантах дослідів та частоту вітрифікації (обводненості) пагонів (%).

На третьому етапі клонального мікророзмноження пагони укоріняли протягом чотирьох тижнів на різних модифікаціях живильного середовища МС, доповненого регуляторами росту ауксинового типу дії. Після чого визначали частоту ризогенезу (%), як співвідношення вкорінених пагонів до їх загального числа, а також кількість коренів, що утворилися на одній пагоні, середню довжину кореня.

Експланти вирощували в культуральній кімнаті при 26±2°С, відносній вологості повітря 70%, освітленості 2-3 тис. люкс та фотоперіоді 16 годин.

Отримані в культурі тканин мікропагони довжиною 40-80 мм з добре розвиненою кореневою системою висаджували в пластикові склянки (об'ємом 200 мл), наповнені різними адаптаційними сумішами. У період акліматизації рослини культивували в адаптаційній кімнаті при вологості 70%, температурі 24±2°С, освітленості 2-3 тис. люкс та 16-годинним фотоперіодом.

Адаптацію рослин проводили у два етапи. Тривалість першого етапу адаптації – 10-14 діб. На другому етапі з рослин знімали пластикові склянки, проте їх обприскували кожні 1-2 години відстояною водопровідною водою протягом 7-10 діб. Через 35-40 діб підраховували частоту приживаності мікропагонів, як співвідношення числа адаптованих рослин до загальної кількості висаджених (%).

НУБіП України

НУБіП України

2.7. Приготування регенераційного середовища для індукції калюсної культури *Salvia hispanica L.*

Базовим для усіх експериментів було агаризоване живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС) з половинною концентрацією макро- та мікроелементів (МС/2).

Для того щоб приготувати середовище Мурасіге і Скуга потрібно мати маточні розчини макро- і мікросолей, сахароза, агар, вітаміни, Fe-хелат, ваги, магнітний змішувач, шпателі, мірні циліндри по 500 мл, колба об'ємом 1 л, мірні піпетки. Для зручності в роботі макроелементи по Мурасіге-Скуга (МС) готували у вигляді маточних розчинів в 10 раз більш концентровані, ніж необхідно для культури і зберігали в холодильнику при температурі 4 ± 1°С протягом 1 − 2 місяців. Розчини мікроелементів МС готували в 100 разів більш концентровані. Всі компоненти середовища готували на дистильованій воді [8].

Склад поживного середовища Мурасіге і Скуга

Макроелементи, г/л	
KNO3	19.0
MgSO4•7H2O	3,7
CaCl2 безводний	3,3
NH4NO3	16,5
FeSO4• 7H2O	0,28
Na2ЕДТА	0,37
KH2PO4	1,7
Мікроелементи, мг/100 мл	
H3BO3	620
MnSO4•4H2O	2230
ZnSO4•4H2O	860
KI	83

НУБіП України

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 25

$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 2,5

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2,5

Вітаміни, мг/л

Нікотинова к-та 50

Піродиксин HCl 50

Тіамін HCl 10

Для приготування 1л середовища використовують:

1) Макроелементи МС – 100 мл/л;

2) Мікроелементи МС – 1 мл/л;

3) Вітаміни МС – 1мл/л;

4) Fe – хелат - 5 мл/л;

5) Сахароза – 20 г

6) Агар – 8г

Для дослідження калюсогенезу використовували живильне середовище, модифіковане додаванням регуляторів росту: 6-бензиламінопурину (БАП) і 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) у різних поєднаннях їхніх концентрацій. Концентрації регуляторів росту в живильному середовищі для ініціації калюсогенезу (мг/л): 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 мг/л 2,4-Д у присутності 0,2 мг/л БАП.

2.8. Одержання рослин-регенерантів

Для одержання рослин-регенерантів калюс переносили на середовище для ущільнення і органогенезу.

Калюсну тканину культивували при температурі 25 ± 1°С на світлі (5000±500 лк) і 16-годинному фотоперіоді. Спостерігався швидкий ріст і розвиток проростків — на 30-у добу висота проростків становила 5–7 см, у них утворилася перша пара справжніх листків і спостерігалися ознаки утворення другої. Вузол зі справжніми листками використали для дослідження

мікроклонального розмноження, а частини гіпокотиля, коренів та сім'ядольні листки — для ініціації калюсогенезу. Здатність до калюсогенезу виявили всі типи експлантів, але їхній морфогенетичний потенціал суттєво відрізнявся.

Найраніше ознаки калюсогенезу були відмічені у гіпокотилів (на 6-ту добу після початку культивування) навіть на середовищі, доповненому 2,4-Д у найнижчій концентрації (0,25 мг/л). Експланти з сім'ядольних листків на тому ж середовищі почали утворювати калюс лише на 10–12 добу, а кореневі експланти — лише на 20-ту. Такі результати дозволяють стверджувати, що найвищий морфогенетичний потенціал мають експланти, виділені з гіпокотиля. Також нами встановлено, що ініціація калюсогенезу залежить не лише від типу експланта, а й від вмісту 2,4-Д у живильному середовищі.

2.9. Адаптація рослини до умов *in vivo*

Адаптація ріа до умов *in vivo* є необхідним етапом клонального мікророзмноження, тому що умови *in vitro* мають підвищену вологість, присутність додаткового вуглецю, та відсутність шкідливої мікрофлори. Отримані молоді рослини пересаджували в стерилізований ґрунт, який заселяється мікрофлорою поступово, щоб рослина звикла до нових умов росту, а також поступово зменшували вологість повітря за допомогою спеціального укриття. Починаючи з першої доби дослідження і до 30-ї доби поступово збільшували час для адаптації. Рослину поливали розчином, приготованим за прописом МС, розведеним дистильованою водою. Через два тижні з субстрату знімали укриття. На 30 добу можна визначити ефективність адаптації, висадити рослину у відкритий ґрунт.

НУБіП України

НУБіП України

РОЗДІЛ 3. Результати досліджень

3.1. Особливості калюсогенезу різних генотипів і первинних експлантатів чіа

Клітинна і тканинна селекція рослин базується на культивуванні в стресових умовах *in vitro* калюсних і суспензійних клітин. Але клітини, які пройшли цикл селекції *in vitro*, як правило, частково або повністю втрачають здатність до морфогенезу. Тому вивчення впливу генотипу, стану первинного експлантата і гормонального складу поживного середовища на процес калюсогенезу і органогенезу є першочерговим завданням при проведенні робіт з клітинної селекції. Для чіа ці роботи є особливо актуальними, це пояснюється тим, що існує велика залежність регенераційного потенціалу його клітин і тканин від генотипу, експлантата і тривалості їхнього культивування *in vitro*.

Мутагенез і клітинна селекція як у випадку соматичних, так і у статевих клітин є ефективним способом отримання генетично змінених форм і нових сортів рослин.

З рослини, що вирощувалася в асептичних умовах брали сегменти стебла, листків, черешків і висаджували їх в пробірки з поживним середовищем для калюсоутворення [25].

Було вирощено культури рослин чіа з низьким рівнем мікробного забруднення. Для отримання асептичних рослин було використано насіння *Salvia hispanica L.* овальної форми, коричневого і сіруватого кольору, поверхня яких була вкрита рельєфним малюнком (рис.3.1.)

Рис. 3.1. Насіння *S. Hispanica* (Chia). Морфологічні показникинасінин: середні довжина 2 0 ± 0,1 мм, ширина 1,2 ± 0,06 мм,товщина 1 ± 0,05 мм, маса 1000 насінин — 16| 2,8 мг

За умов пророщування *in vitro* схожість насінин становила 85 %. 90 % проростків з'явилися впродовж 4–7-і діб з часу внесення. Спостерігався швидкий ріст і розвиток проростків — на 30-у добу висота проростків становила 5–7 см, у них утворилася перша пара справжніх молодих листків і спостерігалися ознаки утворення другої. Вузол зі справжніми листками використали для дослідження мікроклонального розмноження, а частини меристем — для ініціації калюсогенезу (рис.3.2.).

Рис.3.2. Ріст і розвиток проростків чіа

НУБіП України

Завдяки успішній стерилізації бактеріального та грибкового забруднення культивованих *in vitro* насіння *S. hispanica* не спостерігалося. Зазвичай після нанесення стерилізуючих засобів вихідний рослинний матеріал промивали тричі кожні 15 хв у стерильній дистильованій воді, але ці маленькі насіння чіа легко покривалися липким гелем, коли їх замочували у воді, тому тривалість зменшувалася до 5 хв. Результати показали, що схожість насіння залежить від складу живильного середовища.

Здатність до калюсогенезу виявили всі типи експлантів (рис. 3.3.), але їхній морфогенетичний потенціал суттєво відрізнявся.

Рис. 3.3. Калюсогенез на стадії ініціації у експлантатів на живильному середовищі

За походженням експлантатів було розроблено поживне середовище для калусоутворення. Для ініціації калюсогенезу було використано ауксини і цитокініни.

НУБіП України

Ауксини, які застосовують для підтримки і одержання культур тканин: індолілмасляна кислота (ІМК), α-нафтилоцтова кислота (НОК), β-індолілоцтова кислота (ІОК), 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д), піклорам.

Цитокініни, які застосовують в культурі *in vitro* для стимулювання росту і розвитку органів і клітин рослин: зеатин, кінетин, 6-бензиламінопурин (6-БАП).

Ауксином виступала α-нафтилоцтова кислота, а цитокініном – 6-бензиламінопурин. В основі було безгормональне живильне середовище (МС) у різних відношеннях фітогормонів. Аналіз приросту сирої маси калюсу і частоти калюсоутворення в залежності від вмісту цитокініна і аукеина в поживному середовищі дозволив зробити висновок, що лише поєднання 6-БАП і НОК в певних концентраціях призводить до утворення рихлого світло зеленого добре розвиненого калюсу з високим значенням вказаних параметрів. При варіюванні вмісту цих регуляторів росту в поживному середовищі були підібрані дві комбінації, які включали:

1) 0,4 мг/л 6-БАП і 2,0 мг/л НОК;

2) 0,02 мг/л 6-БАП і 0,1 мг/л НОК.

В асептичних умовах (в ламінарному боксі) на стерильне поживне середовище МС, яке містило 6-БАП та НОК в підібраних концентраціях, висаджували сегменти стебла, листків, сім'ядольних листків, живців чіа. Пробірки з висадженими експлантатами протягом 14 діб культивували в темряві при температурі 25°С. Час, необхідний для калюсогенезу від 3 тижнів до 2 місяців.

Найраніше ознаки калюсогенезу були відмічені у черешків (на 6-ту добу після початку культивування) навіть на середовищі, доповненому 6-БАП у концентрації 0,4 мг/л і НОК у концентрації 2,0 мг/л. Експланти з молодих листків на тому ж середовищі почали утворювати калюс лише на 10–12 добу, а кореневі експланти – лише на 20-ту. Такі результати дозволяють

НУБіП України

стверджувати, що найвищий морфогенетичний потенціал мають експлантати, виділені з черешків.

Також було встановлено, що ініціація калюсогенезу залежить не лише від типу експланта, а й від вмісту 6-БАП і НОК у живильному середовищі.

Рис.3.4. Отримані калуси

При подальшому культивуванні першого типу калюсу спостерігалось формування меристематичних ділянок, розвиток яких йшов за різними шляхами морфогенезу.

В результаті проведених досліджень підібрані оптимальні концентрації регуляторів росту для одержання рихлого калюсу 6-БАП і НОК та встановлено, що активність калюсоутворення в основному залежить від вихідного генотипу і типу первинного експлантата.

НУБіП України

Таблиця 3.1.

Частота калюсогенезу (%) у різних типів експлантів *S. hispanica* за різної концентрації

6-БАП, НОК, 2,4-Д у живильному середовищі

Тип експланта	**Концентрація 6-БАП, мг/л**		**Концентрація НОК, мг/л**		**Концентрація 2,4-Д, мг/л**		
	0,4	*2,0*	*0,02*	*0,1*	*0,25*	*0,5*	*1*
Гіпокотиль	72,7 ± 3 %	81,8 ± 2,8%	90,9 ± 3 %	91 ± 3,7 %	72,7±3,6 %	81,8±4%	90,9±4,5 %
Корені	50 ± 2,5 %	50 ± 2,5 %	66,7 ± 3,3 %	66 ± 3,3 %	50±2,5%	50±2,5%	66,7±3,3 %
Черешки	60 ± 3 %	87,1 ± 2,8%	60 ± 3 %	75 ± 3,7 %	60±3%	87,1±2,8 %	60±3%

Висока концентрація 6-БАП у живильному середовищі прискорювала не лише початок утворення первинного калюсу, а й швидкість його наростання. Отриманий на середовищах з підвищеним (0,4–2,0 мг/л) вмістом 6-БАП калюс виявив здатність до морфогенезу. Активацією такого явища є регенеративна здатність калюсу високими концентраціями 6-БАП. У калюсі, отриманому на середовищах із 0,4–2,0 мг/л 6-БАП, спостерігалася спонтанна регенерація черешків — яка означає на менш токсичну дію цього регулятора росту при застосуванні його у вищих концентраціях.

Концентрація НОК з підвищенням майже не змінила швидкість утворення калюсу.

НУБіП України

Отже, можна рекомендувати обидві комбінації як для черешків, так і для молодого листя. Калюс, який утворився на частинах листка, був рихлий світло зеленого кольору, на черешках калюс мав менші розміри і був значно твердіший (рис.3.1.).

Рис. 3.1. Індукція калюсу на різних експлантатах чіа:
1 – молоді листки, 2 – черешки.

При культивуванні експлантатів на поверхні поживного середовища протягом перших трьох днів значно набухав первинний експлантат, більшість експлантатів втратили зелене забарвлення, частина з них деформувалась. На шостий день культивування у 40% первинних експлантатів почали калюсоутворення, а до 14 дня калюс утворювався вже у 75 – 100% експлантатів.

Частота утворення калюсу із молодих листкових пластинок (тобто відношення кількості експлантатів, що утворили калюс, до загальної кількості експлантатів) на середовищі МС1- 68-89%.

На середовищі МС1 приріст калюсів із листкових експлантатів калусу з чіа був на 8 – 11% вище, ніж на середовищі МС2.

Калюси, які були отримані - морфологічно неоднорідні:

1) калюс мав глобулярну структуру, щільний, світло-зеленого кольору, місцями були ще більш щільні ділянки;

2) калюс мав рихлу консистенцію, аморфний водянистий, часто прозорий і блискучий.

НУБіП України

При подальшому культивуванні першого типу калюсу спостерігалось формування меристематичних ділянок, розвиток яких йшов за різними шляхами морфогенезу.

В результаті проведених досліджень підібрані оптимальні концентрації регуляторів росту для одержання рихлого калюсу 6-БАП і НОК та встановлено, що активність калюсоутворення в основному залежить від вихідного генотипу і типу первинного експлантата.

3.2 Вивчення складу живильного середовища на морфологічні процеси *S. Hispanica* в культурі *in vitro*

Асептичні рослини-регенеранти введені в культуру *in vitro* на безгормональне живильне середовище МС на 30 добу проводили калюсогенез та пересаджували на модифіковані регуляторами росту живильні середовища МС: 6-БАП, 2,4-Д, аденін, ІОК, ІМК, НОК, ГК.

На 5-7-му добу було виявлено перші ознаки росту основного стебла у рослини чіа, у вигляді розгортання першої пари листків. Найінтенсивніше морфогенетичні процеси прискорювали на живильному середовищі з регуляторами росту з концентраціями 6-БАП - 0,75 мг/л, аденіну – 0,1 мг/л, 2,4-Д – 0,01 мг/л, ІОК – 0,05 мг/л, ГК – 0,5 мг/л. На сьому добу висота основного стебла становила – 1,2 см.

Через два тижні висота основного стебла становила 1,8-3,5 см. Також в цей час відбувався розвиток листків. На 30-ту добу довжина стебла коливалась у межах 3,4-6,7 см.

За умов культивування апікальних меристем іспанської шавлії найінтенсивніший ріст та ростові процеси спостерігали на модифікованому середовищі МС2.

Рис.3.2 Рослина шавлії іспанської на чотирнадцяту добу культивування на живильному середовищі МС2.

Під час процесу культивування експлантів чіа на модифікованих живильних середовищах спостерігали різну морфогенетичну активність.

Для тривалого культивування рослини використали середовище МС з половинною концентрацією макросолей, мікросолей, регуляторами росту 6-БАП – 0,75 мг/л, аденіном – 0,1 мг/л, ГК – 0,5 мг/л.

При культивуванні шавлії іспанської на усіх варіантах дослідних живильних середовищ з регуляторами росту морфогенез не порушений, отримані рослини-регенеранти різнилися за біометричними показниками та коефіцієнтом розмноження.

3.3 Індукція органогенезу чіа в культурі *in vitro*

Однією із важливих і складних проблем сучасної біотехнології є регенерація цілих рослин із ізольованих клітин, яким властива тотипотентність (здатність однієї клітини багатоклітинного організму давати початок цілому новому організму шляхом поділу).

НУБіП України

НУБіП України

В основі тотипотентності лежать процеси морфогенезу, показники якого визначаються темпом і орієнтацією клітинного ділення, блокуванням клітинного циклу, ростом клітин і їх диференціацією. Процеси морфогенезу індукуються змінами в експресії генів і закріпленням цієї епігенетичної мінливості клонуванням перепрограмованої ініціальної клітини [48].

Цінність клітинних технологій, в першу чергу, визначається можливістю відновлення цілої рослини. Регенерація пагонів, коренів та інших органів в культурі *in vitro* є необхідною і важливою умовою успішного проведення різноманітних клітинних експериментів. Новоутворення рослин в калюсних культурах в значному ступені визначається генотипом і фізіологічним станом експлантата.

Аналіз численних даних про вплив екзогенних регуляторів росту та складу поживних середовищ на індукцію калюсу у шавлії іспанської і регенераційну здатність, показав що вони дуже розрізнені. Це пояснюється складністю культивування шавлії в умовах *in vitro* і генотиповою залежністю процесу індукції морфогенних калюсів.

Для індукції соматичного ембріогенезу в калюсній тканині чіа змінювали концентрацію екзогенних гормонів в поживному середовищі. Калюси висаджували на поживне середовище МС, яке містило 6-БАП, ІМК, ГК в різних концентраціях. Пробірки переміщували в світлову кімнату з заданими умовами: температура 25°С, 16-годинний фотоперіод, освітлення 3000 – 4000 лк. Було використано три варіанти поживного середовища МС, на яких спостерігали утворення морфогенних структур із калюсів. Окремі морфогенетичні калюси у всіх досліджуваних генотипів були здатні до регенерації рослин.

НУБіП України

Частота регенерації рослин (тобто відношення числа одержаних регенерантів до кількості індукованих калюсів) залежала від генотипу досліджуваної рослини.

Регенераційна здатність калюсу залежить від його віку, вихідного генотипу, середовища і умов культивування. З віком регенераційна здатність калюсу знижується. Причиною цього можуть бути цитогенетичні і фізіологічні зміни в клітинах, що культивуються, які призводять до порушення внутрішньоклітинного метаболізму, числа хромосом та до хромосомних аберацій [13].

3.4 Мікроклональне розмноження і збереження селекційного матеріалу чіа в культурі *in vitro*

Використання культури ізольованих меристем, протопластів дає можливість значно прискорити селекційний процес і одержувати генетично ідентичний матеріал. Але в селекційному процесі *S. hispanica* зустрічаються значні труднощі, пов'язані з розмноженням і збереженням селекційного матеріалу. Достатньо велика кількість літературних даних вказує на регенерацію як складний для відтворення, непередбачуваний і генотип залежний процес.

Основна частина рослин-регенерантів підтверджує переваги мікророзмноження перед звичайним розмноженням, оскільки із одержаних клонів можна отримати необмежену кількість посадкового матеріалу і пересаджуючи їх на нове поживне середовище.

Важливим етапом в одержанні рослин, готових для висадки в грунт, є процес вкорінення проростків, що розвиваються із ізоляту. Для укорінення відбирали рослини з розвинутими листками, одного розміру і їх потрібно висаджувати на поживне середовище.

НУБіП України

Таким чином, в результаті проведених досліджень запропоновані модифікації середовища Мурасіге-Скуга для індукції морфогенезу і калюсогенезу *S. hispanica in vitro* з метою створення вихідного селекційного матеріалу, розроблено практичні пропозиції для оптимізації і вдосконалення лабораторного розмноження рослини [16].

3.5 Ризогенез *Savia hispanica*

Для ініціації ризогенезу на 30-ту добу культивування живці іспанської шавлії пересаджували на живильні середовища МС з ауксинами, що містили половинну концентрацію мікросолей, макросолей та 2% цукрози. Перевірено ІОК, НОК, ІМК різної концентрації та їх співвідношення на процес ризогенезу.

Усі експланти на живильних середовищах $^{1/2}$МС4, $^{1/2}$МС5, $^{1/2}$МС6, що містили НОК та ГК формували незначну кількість коренів 2-4 шт та пухкий калюс в основі стебла, що ускладнило їх перенесення на субстрат, тому надалі НОК не використовували для ризогенезу.

Рис.3.3 *Savia hispanica* на живильних середовищах з НОК

Середня кількість коренів складала 2-4 шт, їх довжина коливалась у межах 2,2-2,8 см, що ускладнило пересадку на грунт.

Живильне середовище МС з 1,0 мг/л ІМК ініціювало розвиток кількості коренів (3-5 коренів), але їх довжина не перевищувала 1,0 см. Отже, ІОК, ІМК

впливає на показники ризогенезу (довжина і кількість коренів), тому необхідно встановити оптимальні концентрації цих ауксинів для активного коренеутворення.

Рис.3.4 *Savia hispanica* на живильних середовищах з ІМК

Частота ризогенезу на експерементальних середовищах з ауксинами становила 85-100%. Перші корені почали з'являтись на сьому добу після пересаджування на середовища з регуляторами росту. Ефективність ризогенезу залежить від складу ауксинів у живильному середовищі.

3.6 Пристосування рослин на до ґрунту після стерильних умов

Адаптація рослин-регенерантів є дуже стресовим для рослини, під час відмивання коренів від живильного середовища, тому що можна механічно пошкодити кореневі волоски, через що може знизитись інтенсивність поглинання води.

Уже з 28-ї доби культивування рослини мали сформовані корені і були готові до адаптації.

Використання культури ізольованих меристем, протопластів дає можливість значно прискорити селекційний процес і одержувати генетично ідентичний матеріал. Але в селекційному процесі *S. hispanica* зустрінаються

значні труднощі, пов'язані з розмноженням і збереженням селекційного матеріалу. Достатньо велика кількість літературних даних вказує на регенерацію як складний для відтворення, непередбачуваний і генотип залежний процес.

Основна частина рослин-регенерантів підтверджує переваги мікророзмноження перед звичайним розмноженням, оскільки із одержаних клонів можна отримати необмежену кількість посадкового матеріалу і пересаджуючи їх на нове поживне середовище.

Важливим етапом в одержанні рослин, готових для висадки в грунт, є процес вкорінення проростків, що розвиваються із ізоляту. Для укорінення відбирали рослини з розвинутими листками, одного розміру і їх потрібно висаджувати на поживне середовище.

Таким чином, в результаті проведених досліджень запропоновані модифікації середовища Мурасіге-Скута для індукції морфогенезу і калюсогенезу *S. hispanica in vitro* з метою створення вихідного селекційного матеріалу, розроблено практичні пропозиції для оптимізації і вдосконалення лабораторного розмноження рослини.

3.7 Оптимізація умов тривалого культивування калюсу

Важливим етапом розробки багатьох клітинних технологій є оптимізація умов тривалого пасажування калусних культур, які забезпечують стабільний приріст біомаси калуса. Відомо, що отримання тривалого культивування калусних тканин є складним процесом. Це обумовлено адаптацією клітин до умов живильного середовища, а також формуванням нових систем, клітини яких починають виконувати функції цілих організмів, здатних до автономного розвитку. Як відомо, калусні і суспензійні культури мають високий рівень гетерогенності клітин, а при збільшенні пасажу клітинних культур підвищується ймовірність виникнення сомаклональних варіантів. У зв'язку з

НУБіП України

цим розробка методики тривалого культивування калюсу є важливим аспектом створення біотехнологій, що дозволяють розширити генетичну різноманітність. На сьогоднішній день відомо, що на зростання клітинних популяцій при пасажуванні впливає ряд факторів: гормональний склад живильного середовища, тип первинного експланту, вік та генотип материнської рослини та інші. Проведено дослідження з оптимізації живильного середовища для стабільного приросту маси калюсу шавлії іспанської при тривалому культивуванні. Пасажування калюсу було зроблено на трьох модифікаціях середовища МС, включаючи середовища з цитокінінами, які зазвичай використовуються в літературі для індукції морфогенезу. У дослідах використовували калюс, отриманий з експлантів стебла і черешка третього пасажу. При культивуванні трансплантатів початок проліферації калюсу відзначали на 10-12 добу культивування. З даних видно, що на більшості випробуваних варіантів живильного середовища, до складу яких входили регулятори росту ауксинового або цитокінінового типу дії, трансплянти не розвивалися. На середовищі МС3, частота трансплантів, що розвиваються, не перевищувала 25%, хоча на цьому середовищі спостерігали максимальний приріст калюсу стеблового походження. Спільне використання ауксинів та цитокінінів у складі живильного середовища сприяло стимуляції ростової активності калусної тканини.

У дослідженні було виявлено відмінності приросту маси калюсу з різних типів експлантів. Показано, що на живильному середовищі МС3, доповненому БАП інтенсивність приросту калюсу стеблового походження була в 10 разів вищою, ніж з черешкового, а на середовищі з НОК та БАП – у 1,4 раза. На оптимальному для калусогенезу живильному середовищі відмінності були не достовірними.

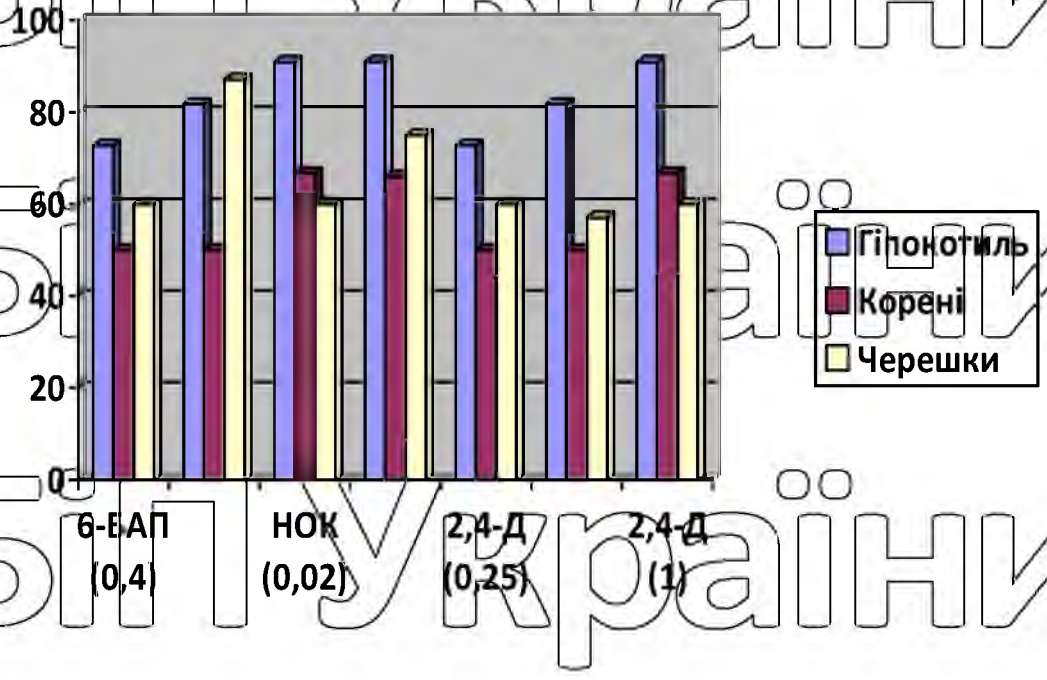

Рис. 3.2. Вплив складу живильного середовища та типу експланту на приріст калусної тканини чіа

Відомо, що калусні культури в умовах *in vitro* можна вирощувати досить довго, пересаджуючи їх на свіже живильне середовище раз на 3-5 тижнів.

Для успішної розробки більшості клітинних технологій необхідно мати дані про характер ростових процесів та цитофізіологічні зміни, що відбуваються в калюсних тканинах за цикл вирощування.

Подібні дослідження є важливим етапом, оскільки дозволяють встановити механізми калюсогенезу, уточнити методичні питання культивування калюсу (у тому числі визначити максимальну тривалість циклу вирощування). У зв'язку з цим нами були проведені дослідження у цьому напрямку.

НУБіП України

НУБіП України

ВИСНОВКИ

За результатами дослідження біотехнологічних особливостей оздоровлення та культивування *Savia hispanica* можна зробити наступні висновки:

1. Для введення в культуру *in vitro S. hispanica* застосовано стерилізуючий розчин "Білизни" в такій концентрації – 1 частина "Білизни" і 2 частини дистильованої води, ефективність стерилізації становила 93%.

2. Для мікроклонального розмноження *Savia hispanica* можна використовуваги живильне середовище МС з регуляторами росту 0,75 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л аденіну, 0,05 мг/л ІОК, 0,5 мг/л ГК, а для розвитку рослини 0,75 мг/л 6-БАП, 0,01 мг/л 2,4-Д, ,1 мг/л аденіну, 0,1 мг/л ІОК, 0,5 мг/л ГК.

3. Оздоровлення рослини при введені в культуру *in vitro* дозволяє отримати очищені від хвороб рослини-регенерайти, підвищити життєздатність рослинних експлантів, отримати якісний, очищений від вірусів посадковий матеріал (культура апікальних меристем).

4. В результаті проведених досліджень підібрані оптимальні концентрації регуляторів росту для одержання рихлого калюсу 6-БАП і НОК та встановлено, що активність калюсоутворення в основному залежить від вихідного генотипу і типу первинного експлантата. Частота калюсогенезу на живильному середовищі МС доповненому 6-БАП і НОК, становила 68-89%. Калюси, що були отримані – морфологічно неоднорідні. Регенераційна здатність калюсу залежить від його віку, вихідного генотипу, середовища і умов культивування. З віком регенераційна здатність калюсу знижується. Причиною цього можуть бути цитогенетичні і фізіологічні зміни в клітинах, що культивуються, які призводять до порушення внутрішньоклітинного метаболізму, числа хромосом та до хромосомних аберацій.

НУБіП України

5. Встановлено, що ефективність ризогенезу чіа залежить від складу ауксинів у живильному середовищі.

В селекційному процесі *S. hispanica* зустрічаються значні труднощі, пов'язані з розмноженням і збереженням селекційного матеріалу.

В результаті проведених досліджень запропоновані модифікації середовища Мурасіге-Скута для індукції морфогенезу і калюсогенезу *S. hispanica in vitro* з метою створення вихідного селекційного матеріалу, забезпечення схожості насіння в лабораторних умовах. Якщо калюсогенез ініціюється з метою отримання великої маси неморфогенного калюсу (наприклад, для використання його як джерела вторинних метаболітів), доцільно використовувати середовища з підвищеним вмістом 2,4-Д. Якщо ж метою ініціації калюсу є, у подальшому, отримання регенерантів з нього, потрібно стимулювати утворення калюсу нижчими концентраціями 2,4-Д. Найбільш ефективна концентрація 2,4-Д у живильному середовищі для ініціації утворення неморфогенного калюсу та його проліферації становить 1–1,5 мг/л, для морфогенного — до 0,5 мг/л, оскільки висока концентрація 2,4-Д у середовищі стимулює проліферацію калюсу *S. hispanica*, але пригнічує його здатність до морфогенезу.

НУБіП України

ЛІТЕРАТУРА

1. A. Reales, D. Rivera, J. A. Palaz ´ on, and C. Ob´ on, "Numerical taxonomy study of Salvia sect. Salvia (Labiatae)," Botanical Journal of the Linnean Society, vol. 145, no. 3, pp. 353–371, 2004.
2. Amato M., Caruso M.C., Guzzo F., Commisso M., Bochicchio R., Galgano F., Labella R., Favati F., 2015. Nutritional quality of seeds and leaf metabolites of Chia (*Salvia hispanica* L.) from Southern Italy. European Food Research and Technology, 241, p. 615-625.
3. Ayerza (H), R, Coates W (2009) Influence of environment on growing period and yield, protein, oil and _-linolenic content of three chia (*Salvia hispanica* L.) selections. Ind. Crops Prod. 30: 321–324
4. Ayerza R, Coates W (2005) The renaissance of Chia. In: Chia: rediscovering a forgotten crop of the Aztecs. The University of Arizona Press, Tucson
5. Ayerza R. Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica L.*) from five northwestern locations in Argentina. J Am Oil Chem Soc 1995;72:1079-81.
6. Bueno M. et. al. In vitro response of different Salvia hispanica L. (*Lamiaceae*) explants. Molecular Medicinal Chemistry. 2010. Vol. 21. P. 125–126.
7. Bueno, M, Di Sapio O, Barolo M, Vilkalonga ME, Busilacchi H, Severin C (2010) In vitro response of different Salvia hispanica L. (Lamiaceae) explants. Mol. Med. Chem. 21: 125-126
8. Craig R, Sons M. Application for approval of whole chia (*Salvia hispanica* L.) seed and ground whole chia as novel food ingredients. Advisory Committee for Novel Foods and Processes. Ireland: Company David Armstrong; 2004. p. 1-29.
9. Cuenca S., Amo-Marco J.B., 2000. In vitro propagation of two Spanish endemic species of Salvia throught bud proliferation. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 36, p. 225-229.

НУБіП України

10. G. Meineri, P. Cornale, S. Tassone, and P. G. Peiretti, “Effects of chia (Salvia hispanica L.) seed supplementation on rabbit meat quality, oxidative stability and sensory traits,” Italian Journal of Animal Science, vol. 9, no. 10, pp. 45–49, 2009.

11. Ixtaina, VY, Nolasco SM, Tomás MC (2008) Pysicalproperties of Chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. Ind. Crops Prods. 28: 2866-293

12. J. P. Cahill and M. C. Provance, “Genetics of qualitative traits in domesticated chia (Salvia hispanica L.),” Journal of Heredity, vol. 93, no. 1, pp. 52–55, 2002.

13. M. Bueno, O. di Sapio, M. Barolo, H. Busilacchi, M. Quiroga, and C. Severin, “Quality tests of Salvia hispanica L. (Lamiaceae) fruits marketed in the city of Rosario (Santa Fe province, Argentina),” Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Arom´aticas, vol. 9, no. 3, pp. 221–227, 2010.

14. Manual of industrial microbiology and biotechnology. 2nd ed. — Wash., 1999.

15. P. G. Peiretti and F. Gai, “Fatty acid and nutritive quality of chia (Salvia hispanica L.) seeds and plant during growth,” Animal Feed Science and Technology, vol. 148, no. 2–4, pp. 267–275, 2009.

16. Plants from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation, 4th Edition (2013), by H Scoggins & M Bridgen, Timber Press; ISBN-10: 1604692065, ISBN-13: 978-1604692068

17. R. Borneo, A. Aguirre, and A. E. Leon, “Chia (´ Salvia hispanica L) gel can be used as egg or oil replacer in cake formulations,” Journal of the American Dietetic Association, vol. 110, no. 6, pp. 946–949, 2010.

18. The Chia Company, “Request for scientific evaluation of substantial equivalence application for the approval of Chia seeds (Salvia hispanicaL.)

from the Chia Company for use in bread," Food Law Consultants, 2010, http://www.food.gov.uk/ multimedia/pdfs/thechiacompany.pdf

19. V. Y. Ixtaina, A. Vega, S. M. Nolasco et al., "Supercritical carbon dioxide extraction of oil from Mexican chia seed (Salvia hispanica L.): characterization and process optimization," Journal of Supercritical Fluids, vol. 55, no. 1, pp. 192–199, 2010.

20. V. Y. Ixtaina, S. M. Nolasco, and M. C. Tom´as, "Physical properties of chia (Salvia hispanica L.) seeds," Industrial Crops and Products, vol. 28, no. 3, pp. 286–293, 2008.

21. W. Coates and R. Ayerza, "Production potential of chia in northwestern Argentina," *Industrial Crops and Products*, vol. 5, no. 3, pp. 229–233, 1996.

22. W. Jamboonsri, T. D. Phillips, R. L. Geneve, J. P. Cahill, and D. F. Hildebrand, "Extending the range of an ancient crop, Salvia hispanica L.—a new ω3 source," Genetic Resources and Crop Evolution, vol. 59, no. 2, pp. 171–178, 2012.

23. Бернардіно де Саагун, Куприенко С.А. Общая история о делах Новой Испании. Книги X-XI: Познания астеков в медицине и ботанике / Ред. и пер. С. А. Куприенко. — К. : Видавець Купрієнко С.А, 2013. — 218 с. — (Месоамерика. Источники. История. Человек) — ISBN 978-617-7085-07-1.

24. Букасов С. М. Возделываемые растения Мексики, Гватемалы и Колумбии. — Всесоюзный институт растениеводства ВАСХНИЛ, 1930. — С. 332-334.

25. Войтенко В. Ф. и др. Методические указания по семеноведению интродуцентов / Отв. ред. Н. В. Цицин. Гл. ботан. сад им. Н. В. Цицина. Москва : Наука, 1980. 62 с.

26. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 596 с.

НУБіП України

НУБіП України

27. Егорова Т. А., Клунова С. М., Живу хин Е. А. Основы биотехнологии. — М., 2003.

28. Егорова, Н.А. Использование сомаклональной изменчивости в культуре *in vitro* для создания исходного селекционного материала у эфиромасличных растений / Н.А. Егорова, И.В. Ставцева, А.А. Лолойко и др. // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2011. – Т. 11. – С. 252–257.

29. Загричук О. М. Калюсогенез та регенерація рослин у культурі in vitro / О. М. Загричук, А. Т. Герц, Н. М. Дробик, В. А. Кунах // Biotechnologia Acta. - 2013. - Т. 6, № 6. - С. 77-85.

30. Задерей Н. С. Біотехнологія рослин : навч.-метод. посібн. / Н. С. Задерей. – Одеса: Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2015. – 84 с.

31. Игнатова С. А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса: Астропринт, 2011.

32. Івченко Т. В., Корнієнко С. І., Віценя Т. І. Клітинні технології створення вихідного селекційного матеріалу основних овочевих рослин в культурі in vitro. Харків: Плеяда, 2013.

33. Конь І.Я. Медико-біологічне означення можливості використання борошна із насіння чіа в харчуванні дітей старших 3 років. І.Я. Конь, І.А. Алєксєєва. – М.: 2012

34. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіологічно-біохімічні основи. Монографія. К. : Логос, 2005. 730 с.

35. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження рослин. К. : Наукова думка, 2005. 270 с.

36. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин. – К.: Поліграфконсалтинг, 2003. – 520 с.

37. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Левенко Б.О. Основи біотехнології рослин. – К., 2000. – 248 с.

38. Методы культивирования растительных объектов in vitro. – К., 1988. – 37 с.

39. Митрофанова, О.В. Применение биотехнологических методов в оздоровлении растений и размножении безвирусного посадочного материала перспективных цветочно-декоративных культур / О.В. Митрофанова, И.В. Митрофанова, Н.П. Лесникова-Седошенко [и др.] // Сборник научных трудов ГНБС. – 2014. – Т. 138. – С. 5–56.

40. Міністерство аграрної політики та продовольства України, Державний реєстр сортів рослин, придатних до поширення в Україні, Київ, 2020

41. Нечитайло В. А. Ботаніка. Вищі рослини / В. А. Нечитайло, Л. Ф. Кучерява. - Київ: Фітосоціоцентр, 2001. - 432 с.

42. Нечитайло В. А. Систематика вищих рослин / В. А. Нечитайло. - Київ: Фітосоціоцентр, 1997. - 271 с.

43. Носаль І. В. Від рослини до людини / І. В. Носаль. - Київ: Веселка, 1992. - 605 с.

44. Патрушев Л. И. Экспрессия генов. — М.: Наука, 2000. — ISBN 5-02-001890-2.

45. Плаксина, Т.В. Биотехнологиия в селекции, размножении и сохранении растений / Т.В. Плаксина, Г.Н. Пищева // Бюллетень ботанического сада-института ДВО РАН. – 2014. – Вып. 12. – С. 22–30.

46. Подгаєцький А. А., Мацкевич В. В., Подгаєцький А. А. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин: монографія / Біла Церква: БНАЦ, 2018. – 209 с.

47. Рудік Г. О., Меншова В. О., Березкіна В. І. Насіннєва продуктивність *Salvia hispanica L.* (*Lamiaceae*) у Ботанічному саду ім.

НУБіП України

акад. О. В. Фоміна. «Лікарське рослинництво: від досвіду минулого до новітніх технологій»: матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції (м. Полтава, 26–27 груд. 2017 р.). Полтава. 2017. С. 100–102.

48. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. — М.: Мир, 1987. — 60 000 экз.

49. Шевелуха, В. С., Калашникова, Е. А., Дегтярев, С. В. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. — М., 1998. — 416 с. — ISBN 5-06-003535-2.

НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України
НУБіП України