

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 606:631.528:635

**ПОГОДЖЕНО**  
Декан факультету

захисту рослин, біотехнологій та екології  
біорізноманіття

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**  
Завідувач кафедри

екобіотехнології та

Коломієць Ю.В.

(підпис)

2022 р.

Квасько О. Ю.

(підпис)

2022 р.

**МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА**

на тему «Отримання асептичних рослин *Crambe steyeriana*»

Спеціальність 162 Біотехнологій 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**

Проф., д. с-г. наук

(науковий ступінь та вчене звання)

**Керівник магістерської роботи**  
Доцент, кандидат с.-г. наук

(науковий ступінь та вчене звання)

Лісовий М.М.

(підпис)

(ПІБ)

Лобова О.В.

(підпис)

(ПІБ)

**Виконала**

(підпис)

ПлющакOVA К.А.

(ПІБ студента)

КИЇВ – 2022

# НУБІП України

## РЕФЕРАТ

Дипломна робота на тему «Отримання асептичних рослин *Crambe steveniana*» виконана на 55 сторінках друкованого тексту та містить 2 інформаційну таблицю та 11 рисунків.

Складається з таких розділів: короткий огляд наукової літератури; умови, вихідний матеріал та методика дослідження; експериментальна частинка; висновки; список використаної літератури.

Дослідження проводились в лабораторії біотехнології рослин кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБІП.

Метою роботи було встановити особливості введення та початковий розвиток *Crambe steveniana* в умовах асептичної культури.

Об'єктом дослідження був процес отримання стерильних рослин *Crambe steveniana*.

Для отримання стерильних проростків Катрану Стевена використано метод культури *in vitro*. Використовували класичне середовище Мурасіге-Скуга.

На основі проведених досліджень отримано стерильні проростки *Crambe steveniana*.

# НУБІП України

# НУБІП України

# НУБІП України

ЗМІСТ

ВСТУП

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Ботанічна характеристика і біологічні особливості *Crambe steveniana*1.2 Хімічний склад Катрану Стевена (*Crambe steveniana*)

1.3 Використання Катрану у народній медицині та різних галузях господарства

1.3.1. Використання катрану у народній медицині

1.3.2. Використання катрану, як сировини для виробництва кормів

1.3.3. Використання рослин родини *Brassicaceae*, як сировини для виробництва біопалива

1.4 Біорізноманіття та проблеми його збереження

1.5 Шляхи збереження видового різноманіття

2. Методи збереження видового різноманіття *in situ*3. Методи збереження видового різноманіття *ex situ*4. Шляхи збереження рослин *in vitro*

4.1 Збереження рослин в умовах активного росту

4.2 Збереження рослин в умовах уповільненого росту

4.3 Зберігання методом сушіння

4.4 Кріоконсервація рослинного матеріалу

4.5 Збереження рослин у кріобанках

5. Живі колекції рослин

РОЗДІЛ II МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Морфогенез в культурі *in vitro*

2. Фактори, що впливають на морфогенез в умовах <i>in vitro</i> рослин роду <i>Crambe</i> L. ....	29
2.1 Вибір експланту при мікроклональному розмноженні в культурі <i>in vitro</i> . ....	30
2.2 Регулятори росту при мікроклональному розмноженні в культурі <i>in vitro</i> ....	32
2.3 Фізичні фактори, що впливають на морфогенез в культурі <i>in vitro</i> ....	33
3. Методи стерилізації .....	34
4. Методика приготування живильного середовища Мурасіге - Скуга ....	37
РОЗДІЛ III РЕЗУЛЬТАТИ ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНИХ ПРОРОСТКІВ	
CRAMBE STEVENIANA .....	
1. Отримання стерильних проростків <i>Crambe steveniana</i> з насіння .....	42
2. Вплив скарифікації насіння на її ефективність проростання .....	46
ВИСНОВКИ .....	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	50

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

**ВСТУП**

Актуальність. До Червоної книги України занесено 8 видів роду *Crambe* L. з різним природоохоронним статусом: *C. koktebelica*, *C. buschii*, *C. tatarica*, *C. aspera*, *C. mitridatis*, *C. steveniana*, *C. maritima*, *C. Grandifolia*. Деякі з перелічених видів включено до світових та європейських Червоних списків [62].

Рід *Crambe* L. також занесено до списку дикорослих рослин, що можуть бути генетичним матеріалом для покращення цінних сільськогосподарських культур.

Катран Стевена вважається невибагливою рослиною щодо навколишніх умов. Витримує заморозки до  $-7^{\circ}\text{C}$ . Також слід відзначити кормові властивості рослини. Катран має високі кормові властивості у якості зеленого корму. Такі властивості, як морозостікість, невибагливість до навколишніх умов, кормові властивості, робить *Crambe steveniana* цінним генетичним матеріалом.

Об'єкт дослідження - процес отримання стерильних рослин *Crambe steveniana*

Предмет дослідження - *Crambe steveniana* в умовах *in vitro*.

Мета дослідження - встановити особливості введення та початковий розвиток *Crambe steveniana* в умовах асептичної культури.

Завдання дослідження:

- проаналізувавши літературні джерела визначити біологічні особливості отримання асептичних проростків *Crambe steveniana*;
- визначити схему стерилізації насіння *Crambe steveniana*;
- підібрати поживне середовище для отримання стерильних проростків рослин *Crambe steveniana* ;
- отримати асептичні проростки з наступним укоріненням та адаптацією до умов *in vivo*.

## РОЗДІЛ. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

# НУБІП України

## 1.1 Ботанічна характеристика і біологічні особливості *Crambe steveniana*

Рід *Crambe* L. (Катран) належить до родини Хрестоцвітих (*Brassicaceae*) і налічує 44 види. Катран Стевена (*Crambe steveniana*) - багаторічна трав'яниста рослина. Стебло пряmostояче, зовсім голе, сизувате, напіврозетковий трав'яний монокарпик (інколи полікарпик), 60 -100 см заввишки. Листки тонкі, голі, двічіперистороздільні, з вузькими гострими частками товсті, м'ясисті, розеткові, черешкові, з віддаленозубчастим або надрізаним краєм та притупленою верхівкою, 18 - 30 см завдовжки. Суцвіття пухкі, розлогі, зібрані по 10-20 квіток. Квітки двостатеві, правильні, 4 -пелюсткові, зібрані в складну китицю; пелюстки білі, 5-5,5 мм завдовжки і близько 4 мм завширшки. Запилюються перехресно.

Плід - голий, нерозкривний, двочленний стручечок; його верхній членик округлий, чотирьохгранний, сітчастий, коричневий (зрілий), 6 - 8 мм завдовжки і 6 - 7 мм завширшки. До другого року кількість листя збільшується до 14 - 17 шт., а коренеплід досягає значних розмірів (до 4 - 7 см в діаметрі та до 0,3 - 0,6 м у довжину). Він має рівну, циліндричну форму, може вирости на глибину до 1 м,

зверху вкритий тонкою брунатною шкіркою, під якою знаходиться біла, соковита, гостра, з ледь солодкуватим присмаком м'якоть. На смак нагадує хрін, тому його застосовують як заміник останньому. Вага повностиглого

коренеплоду становить 1 кг, а то й більше. Потужна коренева система. Цвіте у травні, червні [19]

# НУБІП України

# НУБІП України



Рис. 1.1. Катран Стевена (*Crambe stevensiana*)

Катран Стевена має короткий цикл росту. Збирання врожаю відбувається через 90-110 днів після посіву [63]. У Середньоморському регіоні тривалість циклу може бути довшою, якщо висівати рослини як однорічну озимую культуру, досягаючи 180 днів [38]. Висота рослини залежить від таких умов вирощування: сезон, густина рослин та родючість ґрунту. Цвітіння може тривати більше ніж 2 місяці.

Рослини у перший рік зростають повільно, формуючи кореневу систему, що досягає глибини 2 м. Генеративні стебла з'являються в середні травня і дуже швидко ростуть (10-15 см на добу), досягаючи 2,0- 2,5 м. [8].

На третій рік рослина утворює квітконосний пагір і після дозрівання насіння відмирає з коренем [19].

Назва роду *Crambe* в перекладі з тюрського означає «смолистий фанел», це пов'язано з тим, що рослина гарно горить. Це вказує на наявність в ній значного вмісту ефірних олій [13].

Поширений катран Стевена в дикому стані на степах і глинистих схилах у передгірних районах Криму і на Керченському півострові. Трапляється поодинці і невеликими групами. Численність незначна і різко зменшується. *Crambe*

*steveniana* вважається невибагливою рослиною, проте найкраще зростає на некісліх суглинках, піщаних та супіщаних ґрунтах. Гарно росте в різних кліматичних умовах, переносить посуху і надмірне зволоження, спеку та холод.

Витримує заморозки до  $-5-7^{\circ}\text{C}$  [4]. Погано ж зростає на ділянках, де ґрунтові води підходять близько до поверхні. В закислених ґрунтах поражається грибовими захворюваннями [31].

До біологічної особливості катрану Стевена можна віднести низьку насінєву схожість. Саме тому мікроклональне розмноження є ефективним методом для збереження та розповсюдження даної рослини.

Охороняється у заказнику загальнодержавного значення «Ак-Кая»

## 1.2 Хімічний склад Катрану Стевена (*Crambe steveniana*)

Катран Стевена є перспективною кормовою культурою та сировинною базою для вироблення біогазу. Це пояснюється наявністю в рослині ефірних олій, вітамінів та високою поживністю для великої та дрібної рогатої худоби. Зелена маса у фазі цвітіння містить 82-85% вологи, 12-13% органічних речовин, до складу яких входить 2,5-3,5% сирого протеїну, 5,5 - 6,0% БЕР, 0,35% жиру, і

3,8 - 4,2% клітковини. У фазі бутонізації і на початку цвітіння в зеленій масі міститься близько 10-11% цукрів, що позитивно впливає на процес силосування та процес утворення молочної кислоти. Кількість органічних кислот у силосі складає 1,04-1,12%, з яких молочної кислоти - 0,34-0,36% і оцтової - 0,7-0,79%

[31].

У насінні катрану містяться від 14% до 45% жирних олій, багатих олеїновою, лінолевою, ліноленовою та стеариновою кислотами. У коренях міститься – крохмаль, гірчична олія, ефірна олія, білок, до 12% цукрів та такі елементи як фосфор і калій а також фітонциди [54].

Дослідники вказують, що листя і корені катрану багаті вітаміном С, Р, А, РР і вітамінами групи В. У пагонах виявлені амінокислоти валін і гістидин,

кальцій та фолієва кислота (вітамін B<sub>9</sub>) [49]. Корені містять крохмаль і цукри та гірчичні глікозиди [19].

### 1.3 Використання Катрану у народній медицині та різних галузях господарства

#### 1.3.1. Використання катрану у народній медицині

Рослини роду Катран не використовуються для приготування ліків у офіційній медицині, проте їх широко використовують у народній. Традиційно катран використовують для покращення апетиту, листя ж катрану вживають як тонізуючий засіб при втомі або нервовому напруженні. Завдяки вмісту в коренях рослини гірчичних глікозидів, терті коренеплоди використовують як гірчичники при бронхітах, плевритах, сухому та вологому кашлі, невралгії, радикулітах та міозитах. Відвар з подрібнених коренів, змішаний з медом, приймають в середину для виведення солей з організму. Олія з насіння катранів використовується для загоєння виразок і лікування гастриту [9].

Катран рекомендують вживати в їжу для профілактики захворювання та підтримки загального стану здоров'я. Багаті ефірними оліями, вітамінами і амінокислотами листки і корені забезпечують наступні ефекти:

- укріплюють стінки маленьких і великих кровоносних судин;
- прискорюють обмін речовин;
- підвищують рівень гемоглобіну в крові;
- чистять судини від холестерину;
- підвищують імунітет;
- покращують секреторну активність кишечника;
- регулюють ліпідний обмін;
- покращують кровообіг;
- прискорюють процес відновлення слизової оболонки, ураженої дріжджеподібними грибами [26].

### 1.3.2. Використання катрану, як сировини для виробництва кормів

Кормові властивості катрану, як раннього зеленого корму, високі: в 100 кг міститься 13 к. од. і 1,9 кг перетравного протеїну (в сухій речовині 20 - 22 % білка), багато зольних речовин, каротину та вітаміну С. Для білка катрану характерний високий вміст лізину, триптофану та інших незамінних амінокислот. Облісненість 60 - 70 %. У ранні фази зелену масу катрану добре поїдають тварини, особливо вівці і свині, тоді як велика рогата худоба через специфічну гіркоту, особливо в період цвітіння, поїдає його гірше.

Найприйнятніший для всіх видів тварин силос із катрану в суміщі з гичкою буряків, кукурудзою та іншими культурами. Урожайність зеленої маси в середньому становить 50,0-80,0 т/га, насіння - 2,0 - 2,5 ц/га [9].

Білок катрану за складом близький до білка бобових культур. Існують неперевірені відомості про те, що значна масова частка катрану в раціоні може негативно позначитися на заплідненості тварин та підвищувати рівень яловості корів у стаді. Тому для широкого впровадження її необхідно ретельно досліджувати.

Під плантації катрану слід відводити ділянки поза сівозмінами поблизу тваринницьких ферм. Оптимальні попередники - картопля, кукурудза на зелений корм і силос, а також однорічні трави. Оранку виконують на глибину 23-25 см. Попередньо розкидають органічні та мінеральні добрива - 50-60 т/га гною та  $P_{60-90}K_{90}$ . За достатнього забезпечення господарства мінеральними добривами їх вносять про запас на кілька років. Вапнування здійснюють у повній нормі за гідролітичною кислотністю.

До настання оптимальних строків сівби рілля обробляють за типом націвпару, щоб знищити якомога більше бур'янів. Передпосівний обробіток ґрунту включає культивуацію, ретельне вирівнювання поверхні для рівномірного загорання насіння за глибиною і одержання повних сходів. Найприйнятніші строки сівби для катрану - восени. Насіння стратифікується в природних умовах і навесні забезпечує дружні сходи. Для весняної сівби його потрібно стратифікувати, витримуючи протягом 80-90 днів при температурі 2 - 40С в

ящиках з піском або тирсою чи під снігом. Сіють широкорядним з міжряддями 70 см або квадратно-гніздовим способами, використовуючи овочеві чи кукурудзяні сівалки. Норма висіву насіння 10-15 кг/га, глибина загортання 2-3 см

Догляд за посівами складається із боронування посівів рано весною або обробітку міжрядь ротатійними мотиками, під час вегетації - культиваторами з внесенням добрив. Для отримання врожайності зеленої маси 70 т/га або сухої речовини 9 т/га необхідно під основний обробіток (перед закладанням плантації) вносити 60 т/га органічних добрив і щорічно застосовувати навесні  $N_{90}P_{60}K_{90}$  та підживлення (після першого укосу)  $N_{60}$ . Особливість догляду за посівами полягає у скошуванні в перший рік використання травостою один раз якомога пізніше восени, щоб рослини «набрали силу» для багаторічного використання. Такого ж принципу дотримуються й на травостоях старшого віку. У разі збирання отави (другий укіс) у серпні більшість бруньок відновлення не утворюють генеративних органів і наступного року рослини не сформують квітконосні стебла, травостій виявиться зрідженим.

Урожайність катрану наступного року при пізніх строках збирання може досягати 70 т/га, тоді як при ранніх (у серпні) - лише 40 т/га. Збирають зелену масу кормозбиральними комбайнами. У зв'язку із тим, що рослини катрану формують основну масу врожаю за рахунок листків прикореневої розетки, а не стебел, їх слід ретельно підбирати і не втрачати під час збирання. Зелені стебла на силос необхідно подрібнювати на фракції довжиною не більше 8-10 см, оскільки вологість листків дуже висока (85-88%). Зелена маса у фазі цвітіння містить, %: води 85,7, сухих речовин 14,3, органічних речовин 12,6. У складі останніх 2,8 % сирого протеїну, 5,6 БЕР, 0,35 жиру, 3,85 % клітковини. Для маси характерний специфічний запах, тому худобу треба привчати до її згодовування [9].

### 1.3.3. Використання рослин родини *Brassicaceae*, як сировини для виробництва біопалива

Капран Стевена входить до родини *Brassicaceae* (Капустяні), а види даної родини відіграють ключову роль у світовому виробництві біопалива та масла. Рослини олійних культур *Brassicaceae* стали третім за значенням джерелом харчових рослинних олій у світі. Хоча в даний час саме харчова олія є найбільшим ринком для олійних культур, поширеність сільськогосподарських надлишків змусила багатьох розвинених країн зосередити увагу на можливому промисловому використанні олії з насіння родини Капустяних. Якісні і кількісні характеристики олій насіння визначаються співвідношенням основних жирних кислот, що входять до його складу [70].

Використання викопних ресурсів, як джерело енергії є не лише не екологічним, але й нестабільним. Запасів нафти та газу у світі з сучасними темпами споживання та видобутку залишилося на 50 років. Вугілля ж залишилось більш ніж на 1000 років. Але вже зараз потреба у біопаливі відчувається. Особливо це актуально для країн, які не мають власних запасів та видобутку горючих копалин.

Країнами-лідерами з виробництва електроенергії з біопалива стали: США (деревина та відходи сільськогосподарського виробництва), Німеччина (тверда біомаса, біогаз, біометан), Китай (біопаливо з сільськогосподарської та лісової продукції, а також із твердих побутових та промислових відходів), Бразилія (цукрова тростина, макуха) та Японія (тверда біомаса, біогаз) [12].

До альтернативних палив з біомаси відносять:

- Біодизельне паливо - паливо, синтезоване з рослинних олій, містить багато жирів, що забезпечує високу теплоту згорання. Це екологічно чистий вид біопалива, а також паливна добавка, яке отримують із рослинної олії чи тваринного жиру і використовується для заміни нафтового дизельного палива. З хімічної точки зору, це паливо являє собою суміш метилових та або етилових моноалкілових естерів довголанцюжкових жирних кислот (насичених і ненасичених).

- Біогаз - суміш газів, яка містить метан – 55-70 %, вуглекислий газ - 28-43 %, а також дуже малі кількості інших газів, наприклад - сірководню. 1 м<sup>3</sup> біогазу еквівалентний 0,6.. 0,8 м<sup>3</sup> природного газу, або 0,74 л нафти, або 0,66 л дизельного палива.

- Біоетанол визначається як спирт етиловий зневоднений, виготовлений зі спирту етилового сирцю для використання як біопаливо [12].

Типовим представником родини *Brassicaceae*, який використовують як сировину для біопалива є ріпак. Біопаливо з ріпаку виробляють в багатьох країнах Європи. Проте більшу частину сировини вони закупають саме в Україні.

Виробництво екологічно чистого біопалива з олії ріпаку в Україні набуває важливого значення.

Існує кілька шляхів використання ріпаку для виробництва біодизеля:

- отримання олії, фільтрація і додавання 20-50% її у традиційне паливо, при цьому не потрібно створювати спеціальні двигуни;
- отримання олії, фільтрація і робота на чистій ріпаковій олії. Для такого типу використання потрібні спеціальні двигуни;
- отримання ріпаково-метилового ефіру - продукт переробки ріпакової олії, що не потребує спеціальних двигунів [1].

Насіння ріпаку містить 48-52% олії, натомість насіння катрану Стевена містить 15-45% олії. Отже, для видобутку з нього біопалива, самої олії потрібно буде більше, але вона може стати аналогом ріпакової олії для технічного застосування. Досліди з використання катранової олії для виробництва біопалива не проводились.

#### 1.4 Біорізноманіття та проблеми його збереження

Протягом останніх десятиліть спостерігається стрімке зниження біологічного різноманіття внаслідок вимирання дикорослих видів рослин. При цьому знання людства про стан видового різноманіття рослинного світу є неповним. Людству відомо 10,916 видів рослин, з них по критеріям зміни

чисельності рослин оцінюється лише 5%. Тому такі неповні дані можуть мати лише приблизну картину реальної чисельності рослин у світі, особливо це стосується тих місцевостей, в яких дані про видовий і кількісний склад флори є неповним [40]. Варто пам'ятати, що при зниженні хоча б одного таксона втрачається не лише елемент світової флори, а й потенційно цінний генетичний ресурс, який при належному вивченні і збереженні міг би покращити існуючі сільськогосподарські культури.

Для запобігання та відстежування стану біорізноманіття існує міжнародно-правове урегулювання проблеми скорочення біорізноманіття. Національною спілкою збереження природи IUCN (International Union for Conservation of Nature) були створені так звані червоні списки, що регулярно оновлюються. Дані списки дають реальну картину кількості видів, які знаходяться під загрозою вимирання. Також, були розроблені міжнародні правові документи - конвенції та угоди, і започатковано їх впровадження.

Міжнародні правові конвенції з проблем скорочення біорізноманіття:

- Конвенція про біорізноманіття;
- Конвенція про збереження дикої флори і фауни та природних середовищ існування в Європі;
- Конвенція про збереження мігруючих видів диких тварин.

Україна, як член міжнародної спільноти, підписала та ратифікувала низку міжнародних природоохоронних конвенцій, взявши на себе задачу збереження біорізноманіття [15, 16, 17, 18].

На Генеральній асамблеї Міжнародного союзу біологічних наук за підтримки ЮНЕСКО була прийнята Міжнародна програма "DIVERSITAS" та Конвенція про біорізноманіття, ратифікована Україною у 1994 році, на основі якої була підготовлена Загальнодержавна програма збереження біорізноманіття України на 2007-2025 роки. Беручи до уваги те, що на нашу країну припадає

припадає ~35% від усього біорізноманіття Європи, а займає Україна при цьому менше 6% площі Європи [30, 24].

Отже, робота по збереження різноманіття рослинного світу є особливо актуальною для нашої держави і підтримана міжнародно-правовим регулюванням.

### 1.5 Шляхи збереження видового різноманіття

В умовах глобального екологічного неблагополуччя не підлягає сумніву той факт, що в основу вирішення проблеми збереження біологічного різноманіття видів на Землі повинен бути покладений принцип комплексної охорони генофонду. Велике побоювання викликає стрімке скорочення видів рослин і тварин на планеті, а втрата біорізноманіття - це втрата цінного генофонду, а отже, і стійкості екосистем [21].

Зменшення біологічного різноманіття є в значній мірі результатом діяльності людини. Основну загрозу для біологічного різноманіття становлять незаконні забудови та вирубування лісів, розорювання місць поширення видів, браконьєрство, здійснення господарської діяльності на території прибережно-захисних смуг, степових та гірських районів, кліматичні зміни, інтродукція чужорідних видів, забруднення довкілля, неконтрольований видобуток природних багатств [10].

Одним з ефективних способів збереження живих об'єктів, є підтримка їх у колекціях. Ще недавно було поширене уявлення про колекції, як про місце хаотичного «складування» зібраних штамів. Проте зараз всі колекції перебувають в епіцентрі наукових досліджень, оскільки містять не тільки культури, але й значні обсяги корисної наукової інформації. У багатьох країнах світу спостерігається відродження колекційної справи, і колекції здобувають все більшу цінність. У всіх промислово розвинених країнах існування колекції живих об'єктів є необхідною умовою розвитку біотехнології. Наприклад, стійке

функціонування великих національних колекцій мікроорганізмів необхідно для дослідницьких і прикладних цілей. У той же час створення колекції - це трудомістка і затратна справа. Відповідно до підрахунків, вартість створення й збереження протягом 25 років колекції з 3 тис. мікроорганізмів становить 4 млн. доларів США [21].

У багатьох країнах створюються національні програми по збереженню природного багатства генетичних фіторесурсів. Обов'язковим компонентом є створення банків зародкової плазми (germplasm): насіння, меристем, пилка, зародків, культур тканин і клітин та іншого генетичного матеріалу. Довгострокове зберігання геномів (зародкової плазми) дозволяє зібрати й зберегти без втрати життєздатності генетично повноцінне морфологічне, фізіолого-біохімічне, адаптаційне багатство природної внутрішньовидової мінливості [21].

Одним з актуальних завдань сучасної еволюційної біології є створення системи генетичних стандартів. Це пов'язане з тим, що кожний генотип може еволюціонувати при наявності не менше 80-90% об'єкту генетичної інформації [21].

На даний момент розрізняють два основні підходи щодо збереження рослинного світу *in situ* - в природних екосистемах зі створенням природних територій, що охороняються: заказників, заповідників, національних парків, пам'яток природи тощо; *ex situ* - поза природними середовищами існування: колекції ботанічних садів, генетичні банки. Кожен з підходів є досить результативним та має свої переваги. Основною перевагою методу збереження *in situ* є можливість еволюційних змін видів і популяцій, так як природні об'єкти зберігаються в межах природних екосистем. До недоліків цього методу відносять необхідність у великих «диких» територіях, які будуть додатково охоронятися від втручання людей та можливість ураження рослин шкідниками та патогенами. Наявність конкретного виду рослини або тварини на території природоохоронній території не обов'язково забезпечує їх збереженню [2, 25]. Отже, охорона видів

в природних умовах хоча і є ефективним підходом, але не дає повної гарантії збереження, що робить метод *ex situ* необхідним компонентом збереження біорізноманіття.

## 2. Методи збереження видового різноманіття *in situ*

Збереження рослин *in situ* – це підтримання виду у складі природної екосистеми, чиєю частиною він є. [64, 55] З цією метою створюються території,

що охороняються. Однією з основних переваг використання системи *in situ* є

можливість еволюційних змін видів і популяцій, але в той же час простої наявності конкретного виду на території, що охороняється, ще не є гарантією його збереження [55]. Крім того, зберігання *in situ* стає все більш

проблематичним через зникнення значної кількості «диких» земельних

територій [41]. Іншим негативним фактором *in situ* є можливість ураження

рослин шкідниками та патогенними організмами. Тому, хоча збереження

екосистем в природних умовах вважається ефективним методом підтримання

біологічного різноманіття, суттєвим його доповненням стали технології

зберігання біорізноманіття рослин *ex situ*, які розглядаються як необхідні

компоненти єдиної глобальної системи збереження.

В Україні природно-заповідний фонд охороняється як національне надбання та має особливий режим охорони, відтворення і використання. До

природно-заповідного фонду належать: природні об'єкти та території -

природні заповідники, біосферні заповідники, національні природні парки,

регіональні ландшафтні парки, пам'ятки природи, заказники, заповідні урочища;

штучно створені об'єкти - ботанічні сади, дендрологічні парки, зоологічні парки,

парки-пам'ятки садово-паркового мистецтва. Заповідник це вища форма охорони

природних територій, природна лабораторія, де ведуться комплексні наукові

дослідження. Заповідники є в кожному великому природному комплексі [8].

Найбільший заповідник в Україні – Карпатський заповідник. Він створений 1968 року і має загальну площу 57880 га. У заповіднику відмічено 64 види рослин і 72 види тварин, занесених до Червоної книги України та до Європейського Червоного списку [5].

Одним з найстаріших заповідників є Кримський природний заповідник, створений на місці колишнього Заказника імператорських полювань і прилягаючих до нього землях. В даний час тут відомо 1180 видів вищих рослин, серед них багато рідких, ендеміків, реліктів, серед яких і Катран Стевена [27].

### 3. Методи збереження видового різноманіття *ex situ*

Стратегії збереження генофонду *ex situ* передбачають збір генетичного різноманіття видів і їх зберігання поза природним середовищем - в колекціях рідкісних та зникаючих видів рослин зі створенням банків насіння, польових генних банків та банків культур *in vitro*. Перевагами цих методів є охорона зразків протягом тривалого часу та можливість більш досконалого їх вивчення. При залученні невеликої кількості вихідних особин ці методи дають змогу отримати досить високий коефіцієнт розмноження навіть для видів, що погано піддаються розмноженню *in situ* та *ex situ* та не залежать від погодних та кліматичних умов [3].

Створення банків насіння спрямоване на збереження рослин з насінням, яке має високу схожість та добре переносить висушування [42]. Сповільнення старіння насіння досягається зниженням вологості та температури при зберіганні зразків, що сповільнює метаболічні процеси [64]. Польові генетичні банки, так звані живі колекції та колекції *in vitro* призначені для зберігання видів, що погано піддаються насінневому розмноженню та рослин з вегетативним розмноженням [43, 52]. Від стабільності відтворення *ex situ* залежить збереження генофонду рослин, відновлення чисельності яких в природі є ускладненим. Тому необхідно продовжувати пошук та розробку нових методів збереження

генетичного різноманіття. Перераховані вище проблеми вирішують використання біотехнологій, зокрема створення *in vitro* колекції рослин, культивування ізольованих клітин, тканин та органів рослин на штучних поживних середовищах [28].

#### 4. Шляхи збереження рослин *in vitro*

У даний час розроблені методи біотехнології для підтримки і зберігання генофонду цінних видів рослин. Основним методом є методи культивування *in vitro* клітин, меристем, тканин, зиготичних і соматичних зародків рослин. В основі технології збереження *in vitro* лежить здатність рослин тривалий час зберігати життєздатність в асептичних умовах. Проте це досить трудомісткий процес оскільки вимагає значних витрат кропіткої ручної праці, енергії та реактивів. У зв'язку із цим розробляються технології, що сприяють зменшенню економічних витрат. До технологій зберігання рослин відносять:

- уповільнення росту об'єктів;
- сушіння;
- криозбереження.

На базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України створена унікальна колекція рослин *in vitro*, в тому числі рослин, що занесені до Червоної книги України, яка постійно поповнюється [21, 28].

Збереження рослин в асептичній культурі *in vitro* може здійснюватись трьома шляхами:

- В умовах активного росту;
- В умовах уповільненого росту за низьких температур (+2-15°C);
- Криоконсервація у рідкому азоті (-196°C).

Кожен з зазначених шляхів збереження генетичного матеріалу забезпечує вирішення поставлених цілей та має ряд переваг [28].

#### 4.1 Збереження рослин в умовах активного росту

Збереження рослин в умовах активного росту забезпечується шляхом періодичних перенесень культур на свіже поживне середовище. Це підтримує регенераційний потенціал рослин на високому рівні та забезпечує постійний активний ріст рослини. Даний шлях збереження культури рослин дозволяє розмножувати, інтродукувати та зберігати велику кількість видів рослин, яких зберігання в банках насіння є неможливим у зв'язку з низькою схожістю насіння.

Зберігання в умовах активного росту дозволяє отримати велику кількість рослин-регенератів, які в подальшому можна використовувати як посадковий матеріал, для відновлення популяції з невеликої кількості рослин-донорів у природному для них середовищі [3].

До недоліків даного методу можна віднести велику витрату ручної праці, енергії та матеріалів. Також зберігання рослин в умовах активного росту часто супроводжується зниженням морфогенного потенціалу та виникненням соматональної мінливості. Це явище призводить до втрати чистоти генотипу, а це при збереженні генетичного різноманіття є небажаним [7].

#### 4.2 Збереження рослин в умовах уповільненого росту

Збереження рослин в умовах уповільненого росту характеризується сповільненням вегетативної активності виду та метаболічної активності. Цей метод збереження має ряд переваг:

- можливість тривалого зберігання культур;
- зменшення витрат на зберігання рослин;
- збільшення інтервалів між субкультуваннями [44].

Зберігання в умовах сповільненого росту зазвичай проводиться при температурі +1...+4°C, зменшеній освітленості, на живильних середовищах без регуляторів росту, зниженому вмісті мінеральних солей в середовищі,

зниженій концентрації сахарози, іноді з додаванням інгібіторів росту, таких як маніт, сорбіт, абсцизова кислота [43, 33, 23].

Також для вповільненого росту об'єктів служать наступні способи:

- зберігання під шаром мінерального масла (застосовується для грибних і бактеріальних культур);
- зміна газового складу і атмосферного тиску всередині культуральної посудини;
- зміна світлового режиму;
- охолодження до температури припинення активного росту;
- індукція клубенеутворення в пробірках;
- використання гормональних і осмотичних інгібіторів;
- заміна поживних  $\text{CaCl}_2$  на  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  [21].

Збільшити період між суб-культивуваннями можна шляхом підбору оптимальних умов культивування, разом з цим збільшиться період життєздатності культивованих рослин.

#### 4.3 Зберігання методом сушіння

Метод сушіння застосовується для збереження об'єктів та може бути проведений у вакуумсушильних шафах або в розпилюючій сушарці. Це дозволяє пневматично розподіляти розчин до дрібних крапель у камері з потоками нагрітого повітря.

Найчастіше використовують ліофільне сушіння. В основі цього методу лежить те, що температура кипіння води при тиску в 4,6 мм.рт.ст. становить  $0^\circ\text{C}$ , а при тиску 0,034 мм.рт.ст. знижується до  $-50^\circ\text{C}$ . При цій температурі вода замерзає, і тому процес розпарювання являє собою сублімацію.

Принцип проведення ліофільного сушіння простий. Водяний розчин повністю заморожують тонким шаром і витримують у вакуумі при тиску 0,01-2

мм.рт.ст. Завдяки випару води, заморожений розчин постійно охолоджується. Охолоджувальні пастки або поглиначі уловлюють водяні пари, що видаляються. Таким способом можна повністю висушити продукт за пару годин.

Переваги методу діофільного сушіння полягають у тому, що:

- ліофілізація не супроводжується встінюванням;
- у процесі розпарювання об'єкт перебуває при низькій температурі;
- під час всієї операції об'єкт перебуває при низькій температурі, отже, немає небезпеки його мікробіологічного руйнування, а ферментативне розщеплення зведене до мінімуму;

- немає небезпеки окислювання нестабільних речовин киснем повітря; отримані об'єкти містять близько 0,5% вологи, завдяки чому їх можна зберігати довгий час і не боюючись руйнування або зараження [21].

#### 4.4 Кріоконсервація рослинного матеріалу

Термін «кріозбереження» використовується для позначення складного багатоетапного процесу, що забезпечує необмежено довге зберігання живих клітин, органів, тканин у стані анабіозу. В основі кріозбереження лежить оборотне інгібування процесів життєдіяльності. Створити умови для тривалого зберігання біологічної системи з наступним повним поверненням її до вихідного стану в умовах нормотермії можна тільки в стані глибокого анабіозу, коли повністю зупиняються обмінні, біохімічні реакції та відсутня рідка фаза. Єдиним надійним засобом для досягання такого стану є глибокий холод (-140°C та нижче), що забезпечується застосуванням рідкого азоту.

Найважливіший етап у кріозбереженні є саме процес заморожування. Існує два методи заморожування: програмне та надшвидке заморожування.

Програмне, або як його ще називають повільне заморожування вивчається вже давно тому його досить широко застосовують при збереженні рослинних клітин. Повільна заморозка це повільне охолодження зразків з використанням

кріопротекторів та подальшим їх зануренням у рідкий азот для зберігання [39]. Надшвидке заморожування розробляється порівняно недавно, вважається, що за цим методом майбутнє

Заморожуванню підлягають дві групи об'єктів:

- тканини, в яких мінімальний вміст води (пиллок, ортодоксальне насіння).

Для таких об'єктів процес заморожування досить простий: їх можна занурювати безпосередньо в рідкий азот і дати їм відтанути згодом на повітрі у звичайних умовах;

- більшість рослинних тканин. Для них характерні: більші розміри клітин,

міцна целюлозна стінка і наявність центральної вакуолі. Причому саме ступінь вакуолізації клітини відіграє основну роль у стійкості до дії низьких температур. Для таких об'єктів прийом простого заморожування малоефективний, тому що не відбувається збереження всіх вихідних властивостей і життєздатності [21].

При кріозбереженні рослинних тканин, слід обирати дрібні клітини, які мають маленьку вакуолю, а отже, і низький вміст води. Це пов'язано з двома факторами, які негативно впливають на матеріал, який заморожують. Перший -

це кристали льоду, які виникають при заморожуванні навколо клітини та пошкоджують клітинні стінки зовні. Другий - дегідратація клітин, що

викликається формуванням кристалів позаклітинного льоду. Тому на етапі заморожування, потрібно, з найменшими втратами життєздатності матеріалу,

уникати при замороженні - розтаванні зону між температурою захисного розчину і температурою - 40°C. Бо саме в цій температурній зоні проявляється дія обох факторів.

Звідси впливає перше завдання кріозбереження - запобігти утворенню кристалів льоду всередині клітини. Цього можна досягти попередньо зневоднивши клітину або зменшити швидкість заморозки. Достеменно відомо,

що чим більше води у клітині, тим меншою має бути швидкість заморожування. А ось попереднє зневоднення може зашкодити клітині, так як відбувається процес дегідратації. Друге завдання кріозбереження - зменшити дію стресових

факторів під час дегідратації. Для цього необхідно додавати певні протектори та контролювати швидкість криозаморожування [21].

Кріоконсервація дозволяє повністю відмовитись від субкультивування. Завдяки цьому методи можуть зберігатися в рідкому азоті суспензійні та калюсні культури, сплячі бруньки, апікальні меристеми, ізольовані зародки насіння, соматональні ембріоди та пилок [39, 28].

Способи кріоконсервації меристем рослин, що зберігаються, поділяють на 3 види:

- повільна заморозка, про яку ми говорили вище;
- вітрифікація - швидке охолодження зразків, які попередньо дегідратують, що перешкоджає утворенню внутрішньоклітинної криги [68];
- інкапсуляція - дегідратація (штучне насіння) - інкапсуляція експлантів в альгінатні кульки з наступним зануренням у рідкий азот [43].

Основними вимогами до успішного збереження рослин *in vitro* для тривалого зберігання рослинного матеріалу є:

- підбір первинного експланта;
- умови поверхневої стерилізації;
- склад поживного середовища;
- хімічні та фізичні фактори культивування;
- умови зберігання колекцій рослин.

#### 4.5 Збереження рослин у кріобанках

Збереження та ефективне використання біорізноманіття рослин для забезпечення економічної, екологічної, продовольчої, соціальної безпеки та розвитку - одна з найбільш актуальних проблем людства. В Україні цю діяльність ще на початку XX сторіччя ініціювали такі видатні вчені як П. В. Будрін, Л. М. Делоне, А. Є. Зайкевич, В. Я. Юр'єв, М. І. Вавілов, Б. К. Єнкен, М.

М. Кулешов, та інші. Зокрема, Микола Іванович Вавілов являється піонером створення колекцій насіння культур, що визнано світовою спільнотою [29].

Людство організувало 1300 генних банків рослин. З них 50 банків насіння.

Їх діяльність координують «Консультативна група міжнародних сільськогосподарських досліджень». У їхніх колекціях сконцентровано понад 2 млн зразків.

В Україні для збереження біологічного різноманіття рослин створено Національний генбанк рослин України. Його підтримують та поповнюють 28 провідних наукових і селекційних установ. Разом вони утворюють Систему генетичних ресурсів рослин України. Для координації всіх установ було створено Національний центр генетичних ресурсів рослин України (НЦГРРУ) на базі Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва (Харків).

Завдяки збереженню криоконсервованого генофонду, селекціонери можуть отримати потрібний генотип з шуканими ознаками. Наприклад, це може бути: необхідний пилок для проведення гібридизації, унікальне насіння, трансформованні, гібридні, мутантні, клітини різних видів рослин, здатних до морфогенезу, зиготичні та соматичні зародки.

Зберігання рослинного матеріалу в рідкому азоті практично не дімітоване. А повне відновлення росту заморожених культур отримано після 25 років зберігання. Відновленні культури зберегли всі свої основні характеристики: клітини картоплі, моркви і меристеми регенерували рослини.

Отже, криозбереження - сучасний, надійний спосіб тривалого зберігання генетичного матеріалу [21].

## 5. Живі колекції рослин

З технічної точки зору найпростішим та найдавнішим способом збереження рослинного генофонду у вегетативній формі - польові генетичні

банки (живі колекції рослин). Цей метод відноситься до *ex situ*, адже створений поза природних ареалів існування. Основними системами збереження біорізноманіття дикорослих видів у складі живих колекцій є ботанічні сади.

Сільськогосподарські культури зберігають у спеціальних депозитаріях в польових умовах або в умовах теплиці. Методи розмноження рослин, які розмножуються вегетативним способом, відрізняються від тих, що розмножуються насінням, та є дорожчими [48, 69, 67].

Підтримка рослинного генофонду в польових генетичних банках має кілька проблем. По-перше, потреба у великих земельних ділянках та значних затрат праці. По-друге, рослини в польових умовах можуть бути уражені або знищені шкідниками, захворюваннями або несприятливими погодними умовами. По-третє, в ізольованих колекціях збільшується ймовірність ауткросинга, що веде до гомозиготності, або навіть до втрати фертильності. Крім того, деякі види рослин не здатні до виживання в умовах інтродукції. При цьому обмін генофондом при вирощуванні у відкритому ґрунті обмежена через ризик перенесення захворювань [6].

В Україні існує 18 ботанічних садів загальнодержавного значення та 10 місцевого значення. Найбільшим серед загальнодержавних ботанічних садів є Нікітський ботанічний сад. Його площа складає 876,6 га. Слід відзначити, що Ботанічний сад Національного університету біоресурсів та природокористування також відноситься до загальнодержавних.

## РОЗДІЛІ МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 1. Морфогенез в культурі *in vitro*

Морфогенез - це процес перетворення структур з недиференційованого стану у диференційований. Регуляція цього процесу здійснюється на клітинному, тканинному та на рівні організму. Особливістю вищих рослин - це здатність давати початок цілій рослині з однієї клітини, через здатність переходити до дедиференційованого стану. Крім цього, рослинна клітина властива тотипотентність - здатність клітини зберігати потенціал до утворення всіх типів клітин дорослого організму. Тканини і організми, які зберегли здатність до організації морфогенезу називають органогенними чи морфогенними відповідно [28].

Лише два шляхи морфогенезу - соматичний ембріогенез і органогенез пагонів з наступним ризогенезом призводять до регенерації цілого організму в культурі *in vitro* [53]. Обидва шляхи морфогенезу можуть бути реалізовані як шляхом прямого (утворення адвентивних бруньок на експлантах, взятих з різноманітних органів, без утворення калюсної тканини), так і непрямого органогенезу (утворення морфогенних меристем, які дають початок органам, утвореним *de novo*).

Автори першої концепції детермінації, компетентності та диференціації тканини в процесі органогенезу було виділено 3 стадії органогенезу [36]. Набуття клітинами експланта органогенної здатності відповідати на гормональні сигнали (компетентності);

1. Детермінація компетентних клітин під дією екзогенних регуляторів росту;
2. Власне морфогенез, що протікає незалежно від регуляторів росту.

В культурі *in vitro* початковим етапом органогенезу є дидиференціація. За ступенем розрізняють плюрипотентні (здатні формувати практично будь-який тип клітин, але не є достатнім для формування цілого організму); мультипотентні

(здатні дати початок кільком типам клітин); тотипотентні клітини (можуть дати початок усім типам клітин) [45].

Компетентність клітини набувають на другому етапі органогенезу, яка починається з реакції на специфічні фітогормональні сигнали. Відповідь на ці сигнали призводять до перебудови властивій клітині програми розвитку та перших поділів з утворенням меристематичного центру. Під час утворення нової меристеми компетентні клітини вибирають різні програми, які визначають шлях їх подальшої детермінації [37]. З тканини експланта можна індукувати розвиток бруньок або коренів в культурі *in vitro*.

Соматичний ембріогенез - процес, в якому соматичні клітини диференціюються і утворюють зачатки цілої рослини в результаті морфологічних і біохімічних змін. Соматичні зародки формуються саме з соматичних клітин рослини і повністю потворюють генотип материнського організму [47, 57].

Ефективність індукції соматичного ембріогенезу залежить від таких факторів, як генотип, тип експланту, регулятори росту, мінеральний склад поживного середовища, температура та освітленість під час культивування [46].

Отже, для розробки протоколів мікророзмноження та для збереження генетичного різноманіття важливо розуміти процес морфогенезу і регенерації рослин в умовах *in vitro*. Таким чином дослідження у цьому напрямку допоможуть розробити протоколи мікроклонального розмноження Катрану Стевена для збереження генофонду цієї рослини.

## 2. Фактори, що впливають на морфогенез в умовах *in vitro* рослин роду *Crambe L.*

Для отримання асептичних рослин Катрану Стевена в культурі *in vitro* потрібно розуміти чинники, які впливають на цей процес та яким чином. Як

зазначалося вище, найбільший вплив на морфогенез мають: генотип материнської особини, тип експланту, мінеральні компоненти, які додають до живильного середовища, регулятори росту та фізичні умови культивування [51, 11].

## 2.1 Вибір експланту при мікроклональному розмноженні в культурі *in vitro*.

Експлант - це фрагмент тканини чи органа рослини, який самостійно інкубується на живильному середовищі чи використовується для отримання первинного каллусу. Основними ознаками експланту, що визначають його морфогенний потенціал - генотип рослини, метаболізм клітин, стадія клітинного циклу клітин експланту, ендогенні регулятори росту. Не менш важливими факторами, що впливають на морфогенний потенціал є те, від якого органу було отримано експлант для подальшого розмноження, спосіб розміщення рослини донора на середовищі та його вік [34].

Опрацювавши літературні джерела [22, 66, 35, 54], з'ясовано, що для мікроклонального розмноження рослин роду *Crambe L* використовують такі експланти:

- сім'ядольні вузли;
- сім'ядольні вузли;
- апікальні меристеми;
- частини кореня;
- частини листка;
- частини стебла;
- бічну бруньку.

Великі експланти гірше піддаються поверхневій стерилізації, але при цьому вони краще реагують на введення в асептичну культуру, мають більше пазушних бруньок та швидше ростуть.

Ефективність роботи з апікальними та пазушними бруньками пояснюється наявністю в них необхідних структур для розвитку рослини-регенерата і їх залишається лише активувати. При використанні листка, кореня чи інших частин рослини, які не мають такої меристематичної активності, як бруньки, потрібно спровокувати формування меристематичних клітин, а вже потім починається процес регенерації.

Для введення рослин в асептичну культуру часто використовується насіння. Проте, при роботі зі зникаючими видами рослин, часто використовувати насіння для отримання асептичних рослин є неможливим. Адже, цінність кожної насінини надто висока. Додатковою складністю є ще й те, що насіння знаходиться у стані спокою, тому потрібні додаткові стимули для переривання цього стану. Тому, насіння рослин роду *Crambe L* для успішного введення у асептичну культуру спочатку скарифікували. Існує два види скарифікації:

перший – усунення тільки перикарпу; другий - усунення перикарпу та насінневої шкірки [22]. Процедура скарифікації давала позитивний результат. Так, насіння без насінневої шкірки у культурі *in vitro* відбулося вже на 6-7 добу. А на 30 добу зі всіх насінин, що культивувалися утворились життєздатні проростки.

Натомість, насіння з насінневою шкіркою у асептичних умовах не проростало навіть на 90 день після поверхневої стерилізації [22].

Поширеною практикою є використання частини листка, стебла або черешка, коли в них відбувається процес утворення меристем адвентивних бруньок, в якості первинних експлантів. В таких експлантах морфогенний потенціал забезпечується активністю інтеркалярної меристеми в основі листа і черешку, та високим вмістом ендогенних регуляторів росту. Використання листків та черешків рослин забезпечує збереження рослини-донора, що досить важливо при роботі зі зникаючими видами. До того ж, надземні органи рослин мають нижчий рівень контамінації [72].

Ефективним для розмноження рослин видів *C. maritima*, *C. giberosa* та *C. tatarica* виявилось використання кореневих експлантів у асептичній культурі [35, 54, 59]. Для *C. tatarica* та *C. maritima* розроблено протоколи мікроклонального розмноження тільки з кореневих експлантів кореня.

Проаналізувавши джерелами вирішили у якості експланта обрати насіння *Crambe steveniana*.

## 2.2 Регулятори росту при мікроклональному розмноженні в культурі *in vitro*

Розвиток і ріст рослини контролюється регуляторами росту. Регулятори росту поділяють на ендогенні фітогормони - речовини, які синтезуються у рослині та регулюють її розвиток і ріст; екзогенні регулятори росту рослин - синтетичні аналоги ендогенних фітогормонів [56]. Оскільки первинні експланти мають невеликі розміри і через це не здатні самостійно регулювати власний розвиток та ріст в асептичних умовах, тому в культурі *in vitro* використовують екзогенні гормони.

Різні варіанти складу та концентрацій екзогенних фітогормонів дозволяють стимулювати морфогенний потенціал і процеси регенерації експланту в асептичній культурі. У дослідженнях, проведених Магомедалієвим [22], показано, що культивування кореневих експлантів *C. giberosa* на середовищі з вмістом 0,5 мг/л БАП викликає пагоноутворення. На середовищі з 10% кокосового молока, 0,8 мг/л кінетину та 2,0 мг/л ІОК – на кореневий експлантах *C. maritima* відбувався ембріогенез. А за наявності у поживному середовищі НОК та БАП кореневі експланти Катрану татарського починали процес пагоноутворення [35].

Висока активність калусогенезу листкових експлантів притаманна Катрану татарського. Калусна тканина на листкових експлантах утворювалась тільки при наявності у живильному середовищі ауксинів та цитокинінів, при цьому БАП був менш ефективним ніж кінетин, а 2,4-Д був більш ефективним за

НОК. Найвища інтенсивність наростання на листкових пластинах калюсної тканини відмічена на середовищі з 1 мг/л 2,4-Д та 2 мг/л кінетину. Для катрану татарського показано низьку здатність до калюсогенезу кореня, якщо порівнювати з листям. Найбільша здатність до калюсоутворення для корневих експлантів спостерігалась за культивування на середовищі з 2 мг/л 2,4-Д [54].

### 2.3 Фізичні фактори, що впливають на морфогенез в культурі *in vitro*

В культурі *in vitro* на морфогенез окрім регуляторів росту і вибору експланту також впливають: температурні умови, зазвичай, оптимум температури становить 24-25°C, підбираючи температуру. Для рослин-регенератів краще спиратися на оптимальну температуру для рослини-донора. Місткість культивального посуду, яку потрібно обирати спираючись на розмір експланту. Вибір інтенсивності освітлення, як і температурний режим, обирається з урахуванням оптимуму для рослини-донору [62].

При дослідженні регенераційної здатності різних типів експлантів *S. abyssinica* відмічено вплив застосування гелютворюючих сполук, наприклад фітобленд, гелюрайт та мікробіологічний агар-агар. При культивуванні сім'ядольних листків на живильних середовищах з додаванням агару, дослідники відмітили калюсогенез на експлантах при відсутності регенерації. При культивуванні однакових експлантів на середовищах з фітобленду за однакових концентрацій регуляторів росту виликало непряму регенерацію пагонів [62]. На середовищі з агаром відмічали пряму регенерацію пагонів на частинах епикотилія з частотою від 23% до 98%. Частота прямої регенерації на середовищі з фітоблендом вища – від 50% до 100%. Проте використання агару в середовищі показало позитивний вплив на активність калюсогенезу на гіпокотиліях. Фітобленд у середовищі збільшує частоту регенерації агонів у порівнянні з гелюрайтом [50].

Джерела азоту та вуглецю також можуть впливати в культурі *in vitro* на регенерацію різних органів рослин. Необхідним для росту і розвитку рослин потрібен азот. В культурі *in vitro* до експлантів надходить в основному у формі іонів  $\text{NO}_3^-$  та  $\text{NH}_4^+$  тому наявність обох іонів має важливе значення для диференціації клітин та росту [58]. Дослідження зазначають, що застосування  $\text{NH}_4^+$  як єдиного джерела азоту впливає на регенерацію і ріст нових пагонів негативно та може знижувати темпи поділу клітини, формування пагонів у культурі тканин [60, 70]. Для сприяння ембріогенезу важливим є баланс між іонами  $\text{NO}_3^-$  та  $\text{NH}_4^+$

Джерело вуглецю може спровокувати зміни частоти регенерації. Так для регенерації з піпокотилія Катрану абиссинського вміст у середовищі 30г/л сахарози або 16г/л глюкози викликав підвищення частоти регенерації, якщо порівнювати з середовищем з 10-16 г/л фруктози [50].

Існують дані, які свідчать про позитивний вплив на здатність регенерації експлантів наявності  $\text{AgNO}_3$  у живильному середовищі. Так, вміст 5 мг/л  $\text{AgNO}_3$  у середовищі MS підвищує частоту регенерації для Катрану абиссинського.

### 3. Методи стерилізації

Стерилізація ламінар-боксу. Всі ламінар-бокси обладнані мікробіологічним фільтром, через який повітря подається всередину шафи ламінарним потоком.

Завдяки цьому повітря всередині ламінару чисте. Також в ламінар-боксі

обладнанні ультрафіолетовими лампами, які стерелізують робочу поверхню.

Перед використанням ламінару, його потрібно включити за 2 години до роботи.

Це забезпечить обробку ультрафіолетом робочої поверхні та змінить повітря

всередині шафи. Перед початком роботи, поверхню ламінар боксу, захисний

екран, інструменти додатково обробляють 70% розчином етилового спирту.



Рис. 3.1 Стерильний ламінар-бокс

Стерилізування рук проводять розчином 96% етиловим спиртом.

Стерилізацію води та живильного середовища проводили в автоклаві при температурі  $121^{\circ}\text{C}$ , тиску в 1 атмосферу протягом 40хв.



Рис.3.2 Підготовлене живильне середовище та дистильована вода для стерилізації

Стерилізація інструментів та скляного посуду проводилась у електричній шафі при температурі  $160^{\circ}\text{C}$  протягом 2-х годин.

Стерилізація рослинного матеріалу залежить від вибору експланта. Цей етап є одним з найважливіших та найважчих. Тому що для стерилізації необхідно нейтралізувати мікрофлору на поверхні експланта, при цьому не пошкодивши рослинну тканину. Для стерилізації рослинного матеріалу використовують стерилізуючі речовини, які не проникають у тканину і легко змиваються водою [21].

Зважаючи на те, що в природних умовах на поверхні рослин велика кількість спор, бактерій, грибів. Тому рослинний матеріал занурюють у 70% розчин етилового спирту. Час занурення для меристем листя - 0,5-1 хвилину; насіння - 2-3 хвилини.

В подальшій стерилізації використовують такі препарати:

- ртутні препарати, такі як розчин сулеми, фалосепт, діонід;
- препарати з активним хлором, наприклад, 9% гіпохлорид кальцію, 0,5-5% гіпохлорид натрію, хлорамін, білізна;
- 1% бромна вода, 5-20% перекис водню, 0,5-2% азотнокисле срібло.

Час стерилізації залежить від експланту та обраної стерелізуючої речовини.

Щоб видалити з експланту стерилізуючу речовину, промивку стерильною водою проводять тричі з 15 хвилинним періодом експозиції. Якщо режим буде порушено, то відбувається отруєння культури, що спричиняє заторможення ростових процесів або повної загибелі рослин.

Перед відкриттям пеніцилінок чи пробірок з живильним середовищем, кришку та місце, де вона закріплюється обпалюють над вогнем спиртівки.

#### 4. Методика приготування живильного середовища Мурасіге - Скуга

В культурі *in vitro* використовують тверді та рідкі живильні середовища.

Рідкі середовища використовують для культивування калюсів, суспензій, ізольованих клітин рослин. Пробірки з рідким живильним середовищем поміщають на спеціальні містки-підтримки з синтетичних пористих матеріалів або фільтрувального паперу. Тверді, або як їх ще називають щільні, середовища готують на основі агар-агару - полісахариду, який утворює з водою гель при рН 5,6-6,0 та входить до складу морських водоростей. В якості заміника агар-агару використовують поліакриламідні гелі Р10 та Р200. Для синтетичних живильних середовищ додають маточні розчини - розчини макро- і мікросолей. Маточні розчини зберігають у спеціальних умовах: мікро- і макросолі в посудинах з притертими пробками в холодильниках при температурі від 0 до 4<sup>0</sup>С; вітаміни, ферменти, фітогормони, рослинні екстракти - при 20<sup>0</sup>С в невеликих посудинах з пробками об'ємом по 5-10 мл. Маточні розчини мікросолей перевищують в 100-1000 разів робочі розчини, макросолей - в 10-40 разів, вітамінів - в 1000 разів.

При приготуванні маточного розчину мікро- та макросолі окремо розчиняють кожну сіль в стакані для нагрівання, потім зливають всі в один великий скляний стакан та доводять до необхідного об'єму дистильованою водою. В охолоджений розчин суміші макросолей останнім додають розчин солей магнію, а мікросолей - солей молібдену. Це робиться для запобігання випадання осаду.

Успіх в культивуванні об'єктів залежить від ретельності приготування поживного середовища і вибору його складу. До поживних середовищ входять вітаміни B1, B6, B12, PP та інші; макро- і мікроелементи (N, K, P, Ca, Mg, Fe, B, Zn, Co, Cu, Mn, Mo, J); вуглеводи (глюкоза, сахароза); фітогормони (найчастіше цитокініни і ауксини) [14].

Такі фітогормони, як ауксини викликають клітинну дедиференціацію. З ауксинів найчастіше використовують нафтилоцтову кислоту (НОК), 2,4 - дихлорфеноксиоцтову, та ІОК. Вищі концентрації ауксинів використовують для індукції калусогенезу.

Цитокініни індуюють ділення дедиференційованих клітин та вони необхідні для отримання калусних тканин. Часто використовують такі цитокініни: 6-бензиламінопурин (БАП), кінетин, зеатин. Іноді також використовують гіберилову кислоту та аденін. Як активатори росту застосовують також дріжджовий екстракт, кокосове молоко, гідролізат казеїну і тому подібне.

В залежності від біотехнологічного об'єкту до поживного середовища додаються різні компоненти:

- середовище з цукрами, азотом, гормонами і вітамінами - для культивування тканин і клітин вищих рослин;
- середовище без гормонів і вітамінів - для грибів;
- середовище без глюкози - для ціанобактерій, хлорели.

Більшість різноманітних поживних середовищ є модифікаціями основних: Уайта, Мурасіге-Скуга, Шенка-Хільдебранда, Гамборга, Хеллера, Чапека та інших.

Вплив мінерального живлення на рослинні об'єкти в культурі *in vitro*.

Фосфор - необхідний для росту ізольованих органів і калюсних тканин. Зазвичай фосфор використовується у вигляді ортофосфату. Джерелом фосфору також можуть бути фосфати цукрів. Важливими для регулювання рН середовища при культивуванні тканин у невеликих кількостях є іони  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,

$\text{SO}_4^{2-}$ .

Азот - представлений, у більшості живильних середовищ, у вигляді нітрату, але в деяких з них, таких як Мурасіге і Скуга та Гамборга, крім нітратів додають солі амонію. Нітрати вводяться у середовище в концентрації від 2 до 25 мМ.

Сірка - вноситься у середовище у вигляді сульфїту, сульфату, метіонїну, глутатїону, цистеїну. Сірка може поглинатися рослинами лише у вигляді іона,  $\text{SO}_4^{2-}$ . Одна з функцій сірки - формування третинної структури білків.

Кальцій - вноситься до складу середовища в сполуках хлориду кальцію, складного фосфату кальцію та нітрату кальцію. Цей елемент відіграє важливу роль у клітинному метаболізмі.

Магній - вноситься до середовища у вигляді сульфату ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Так як саме магній надає клітинам рослини зеленого забарвлення, то він є важливим для фотосинтезу рослини.

До більшості живильних середовищ додають і мікроелементи. Певна кількість мікроелементів у середовище немінуча, адже макроелементи в більшості додаються у сполуках з мікроелементами.

Вуглеводневе живлення - джерелом вуглецю і енергії є глюкоза або сахароза, зазвичай в концентрації 20-40 г/л.

В своїй роботі я використовувала модифікацію поживного середовища

Мурасіге - Скуга об'ємом 250мл. рН – 5,6

Склад поживного середовища наступний:

Макро MS	25 мл
Мікро MS	0,25 мл
Вітаміни	0,25 мл
Fe – халат	1,25 мл
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	25 мл
Ізотенол	0,025 г
Сахароза	7,5 г
Агар	1,7 г

Етапи приготування:

1. Помістити у скляний термостійкий стакан магнітний змішувач і налити 100 мл бідистильату і додали 25 мл макросолей, 0,25 мл мікросолей, 1,25 мл Fe-халату і 0,25 мл вітамінів та 25 мл CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O.
2. Зважити на хімічних вагах 0,025 грам ізотенолу, 7,5 г сахарози. Кожну наважку розчинили у окремій порції бідистильованої води. Та додали до стакану з мікросолями, макросолями і вітамінами.
3. Довели рН до значення 5,6 за допомогою 1N КОН. Значення рН перевіряли за допомогою рН-метра.
4. Агару в кількості 1,7 г помістили у термостійку колбу та залили холодною водою (100 мл) та залишили на 20 хв для набухання. Стакан помістили на нагрівач і постійно помішували для розчинення агару.

5. Розчинений агар додали до стакану з сумішшю компонентів. Розмішували до однорідного стану і довели до потрібного об'єму бідистильованою водою.

НУБІП України

6. Готове поживне середовище розлили у пеніцилінки та щільно закрили фольгою.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## РОЗДІЛ III РЕЗУЛЬТАТИ ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНИХ ПРОРОСТКІВ *CRAMBE STEVENIANA*

### I. Отримання стерильних проростків *Crambe steveniana* з насіння

Рослини виду *Crambe* мають низьку насінневу схожість. Відомо, що показники схожості насіння значно підвищуються, якщо їх культивувати в умовах інтродукції, у порівнянні з місцями природнього зростання. Зниження коефіцієнту насінневого розмноження результат не лише антропогенного впливу. Дослідники з ботанічного саду Південного федерального університету зазначають, що коефіцієнт насінневої продуктивності в саду складає 45,5%, а ті ж рослини у природних місцях зростання всього 18,1% [32]. Виходячи з цієї статистики, можна зробити висновок, що методи біотехнології, які спрямовані на збільшення кількості посадкового матеріалу, доповнять існуючі методи збереження біорізноманіття. Для того, щоб це було і ефективно, необхідно дослідити всі етапи роботи певного виду рослин у культурі *in vitro*.

Етапи стерилізації насіння Капрану Стевена:

1. Промили насіння у мильному розчині, для усунення бруду та пилу з оболонки.



Рис. 1.1 Промивання насіння *Crambe steveniana* у мильному розчині

2. Помістили насіння на 1 хвилину у 70% розчин етилового спирту.
3. Перенесли насіння у хімічний стакан з розчином стерилізуючої речовини «Білизна» у пропорції з дистильованою водою 1:2 відповідно. Час експозиції - 10 хвилин.
4. Промивали насіння у стерильній дистильованій воді по 10 хвилин. Промивання виконували 3 рази.



Рис. 1.2 Промивання насіння у стерильній воді

5. Перенесла стерильне насіння у чашку Петрі з фільтрувальним папером, для видалення зайвої вологи.



Рис. 1.3 Стерильне насіння Катрану Стевена

Стерильне насіння перенесла у пеніцилінки з раніше приготованим середовищем.



Рис. 1.4 Насіння Катрану Стевена внесене в культуру *in vitro*

Культивування насіння *Crambe steveniana* проводили при температурі 22 - 24<sup>0</sup>С. Через 7 днів культивування жодна з насінин не проросла, що є нормою для рослин роду *Crambe*. Проте я перевірила ефективність стерилізації. Всього було

в культуру було введено 14 насінин Катрану Стевена. Дві з них були заражені.  
 На першому фото - бактеріальне зараження, на другому - грибок.



Розраховуємо ефективність стерилізації:

1. Розраховуємо відсоток зараженого насіння.

100% – 14 посадкових насінин

X% - 2 заражені

$$X = 100 * 2 / 14 = 14,2\%$$

2. Розраховуємо ефективність стерилізації

$$100\% - 14,2 = 85,8\%$$



Рис. 1.5 Кругова діаграма ефективності поверхневої стерилізації насіння Катрану Стевена

## 2. Вплив скарифікації насіння на її ефективність проростання

Існує два види скарифікації насіння. Перший - усунення тільки перикарпу; другий - усунення перикарпу та насінневої шкірки. Для своєї роботи я обрала перший тип скарифікації. Для того, щоб не пошкодити насіння та щоб було легше видалити перикарп, насіннини замочили у стерильній воді на 15 хв. Попередньо провели поверхневу стерилізацію так, як це описано у розділі вище. Далі у ламінар-боксі на чашці Петрі за допомогою пінцету та скальпеля прибрала перикарп. Очищені насіннини перенесли на стерильну чашку Петрі для отримання проростків.

Через 10 днів скарифіковане насіння Катрану Стевена почало проростати.



Рис. 2.1 Скарифіковане насіння *Crambe steveniana* на 10 день проростання

На 14-й день культивування отримала проросток *Crambe steveniana*, достатнього розміру для його перенесення в культуру *in vitro* для подальшого культивування.



Рис. 2.2 Стерильний проросток *Crambe steveniana*

Отже, виходячи з мого дослідження лише скарифіковане насіння дає проростки у асептичних умовах. На це потрібно зважати, при розробці методики вирощування в культурі in vitro зникаючого виду рослин *Crambe steveniana*.

НУБІП УкРАЇНИ

НУБІП УкРАЇНИ

НУБІП УкРАЇНИ

НУБІП УкРАЇНИ

НУБІП УкРАЇНИ

НУБІП УкРАЇНИ

**ВИСНОВКИ**

Провівши літературний аналіз ми встановили морфологічні та біологічні особливості *Crambe steveniana*. Встановлено, що для отримання стерильних проростків *Crambe steveniana* необхідно скористатися скарифкованим насінням.

Виявлено, що найкращим стерилізуючим розчином для насіння рослини *Crambe steveniana* є розчин «Білизни» в концентрації 1:2. Ефективність стерилізації становила 82%.

В процесі досліджень визначили що оптимальним живильним середовищем для отримання асептичних проростків рослини *Crambe steveniana* є класичне середовище Мурасіге-Скуга.

В результаті досліджень було отримано життєздатний асептичний проросток *Crambe steveniana* для подальшого укорінення та адаптації умов *in vivo*.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Альтернативні палива і сировина для їх виробництва. Посилання для доступу: [https://elib.lntu.edu.ua/sites/default/files/elib\\_upload/Передрий,Речун/page15.html](https://elib.lntu.edu.ua/sites/default/files/elib_upload/Передрий,Речун/page15.html)
2. Андреев Л.Н. Роль ботанических садов России в сохранении биологического разнообразия растений / Л.Н. Андреев, Ю.Н. Горбунов // Биологическое разнообразие. Интродукция растений: Материалы III Международной научной конференции (Санкт-Петербург, 23-25 сентября 2003 г.). – СПб: БИН РАН, 2003. – С. 5-7.
3. Белокурова В.Б. Методи біотехнології в системі заходів зі збереження біорізноманіття рослин / В.Б. Белокурова // Цитология и генетика. – 2010. – Т. 44, No 3. – С. 58-72. Біорізноманіття рослин / В.Б. Белокурова // Цитология и генетика. – 2010. – Т. 44, No 3. – С. 58-72.
4. В. А. Бурлака, М. М. Кривий, Д. А. Засекін і співав. Еколого-біологічні особливості та господарська цінність малопоширених культурних та природних рослинних ресурсів / Навчальний посібник. Житомир: «Полісся», 2011. С. 33-34.
5. В. Ф. Верес "Земне намисто Карпат". - Ужгород, видавництво "Карпати", 1989 р.
6. В.Б. Белокурова - Методи біотехнології в системі заходів зі збереження біорізноманіття рослин, 2010 ISSN 0564-3783. Цитология и генетика. <https://cytgen.com/articles/4430058a.pdf>
7. Вечернина Н.А. – Сохранение биологического разнообразия редких, исчезающих видов, уникальных форм и сортов растений методами биотехнологии : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня док. биол. Наук : 03.00.05 «Ботаніка», 03.00.12 «Фізіологія рослин» / Вечернина Нина Александровна. – Новосибирск, 2006. – 32 с.
8. Г. О. Білявський, Р. С. Фурдуй "Основи екологічних знань". - Київ, видавництво "Либідь", 1997 р.

9. Демидась Г.І., Слюсар І.Т. Нетрадиційні кормові культури. НУБіП України, 2019. с.; фото, іл.

10. Екологія право людини. Збереження різноманіття. Електронний доступ <http://epl.org.ua/environment-tax/zberezhennya-bioriznomanittya/> (дата звернення 28.07.2022) Назва з екрану

11. Журавлев Ю.Н. Морфогенез у растений in vitro / Ю.Н. Журавлев, А.М. Омелько // Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 5. – С. 643-664

12. Калетнік Г.М., Токарчук Д.М., Скорук О.П. Організація і економіка використання біоресурсів: підручник: 2-ге видання, перероблене і доповнене. Вінниця: ТОВ «Друк», 2020. - 372 с

13. Катран мирслюбивый заменитель хрена [Електронний ресурс] Ботаничка. Режим доступу до інформ.: <https://www.botanichka.ru/article/katran-mirolyubiviyiy-zamenitel-hrena/>

14. Ковальов В. М. Фармакогнозія з основами біохімії рослин : підруч. для студ. вищ. фармац. навч. закл та фармац. ф-тів вищих мед. навч. закл. III-IV рівнів акред. / В. М. Ковальов, І. О. Павлій, Т. І. Ісакова. – Харків: Вид-во НФаУ : МТК-книга, 2004. – 704 с

15. Конвенція про збереження мігруючих видів диких тварин ( Про приєднання до Конвенції див. Закон N 535-XIV ( 535-14 ) від 19.03.99 ) [Електронний ресурс] Режим доступу : [http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/995\\_136](http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/995_136).

16. Конвенція про охорону біологічного різноманіття від 1992 року Конвенцію ратифіковано Законом N 257/94-ВР від 29.11.94 [Електронний ресурс] - Режим доступу : [http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/995\\_030](http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/995_030)

17. Конвенція про охорону дикої флори та фауни і природних середовищ існування в Європі Берн, 19 вересня 1979 року [Електронний ресурс] – Режим доступу : [http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/995\\_032](http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/995_032)

18. Концепція національної екологічної політики України на період до 2020 року від 17 жовтня 2007 р. N 880-р. [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=880-2007-%F0>.

19. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Л-56. Відп. ред. А. М. Гродзінський. - К.: Видавництво «Українська Енциклопедія» ім. М. П. Бажана, Український виробничо-комерційний центр «Олімп», 1992. - 544 с. : іл,

20. Опис та характеристика Катран Стевена. Лінк на ресурс: <https://agrarii-razom.com.ua/culture/katran-stevensa>

21. М.Д. Мельничук, О.Л. Кляченко, Ю.В. Коломієць, Т.О. Ангіпов. Біотехнологія: Підручник. К.: ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2013. - 300 с.

22. Магомедалиева В.К. Особенности морфогенеза и регенерации Катрана бурччатого *in vitro* fundamental research. / В.К. Магомедалиева // Biol. Sci. - 2013. - Т. 10. - С. 114-118.

23. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений / И.В. Митрофанова // Физиология и биохимия культурных растений. - 2009. - Т. 41, No 6. - С. 496-508

24. Міняйло А.А. Біорізноманіття агроландшафтів: фауністичні дослідження / А.А. Міняйло // Бюлетень Інституту сільського господарства степової зони НААН України. - 2013. - Т. 4. - С. 139-142.

25. Новикова Т.И. Сохранение редких и полезных растений в коллекции Центрального сибирского ботанического сада / Т.И. Новикова, А.Ю. Набиева, Т.В. Полубоярова // Вестн. ВОГиС. - 2008. - Т. 12, No 4. - С. 564-572.

26. Польза или вред от катрана в народной медицине [Электронный ресурс] Травник. Режим доступа до інформ. : <https://esobabka.ru/travnik/k/katran.html> (дата звернення: 26.04.2022). Назва з екрану.

27. Природні заповідники України. - К., 1994.

28. Пушкарьова Н.О., Кучук М.В. Розробка способів мікроклонального розмноження та вивчення впливу культивування *in vitro* на біохімічні властивості та генетичну мінливість рослин рідкісних видів роду *Crataegus*. Дисертація. Київ 2017

29. Сайт «Інститут рослинництва імені В.Я. Юр'єва»  
<https://yuriev.com.ua/ua/pro-institut/nacionalnij-centr-genetichnih-resursiv-roslin-ukrain/>

30. Сытник К.М. Биотическое разнообразие: его изучение, сохранение и обогащение / К.М. Сытник // Альгология. - 2010. - Т. 20, No 3. - С. 368-382.

31. Что такое катран растение. Растение катран: виды, использование, отзывы, фото [Электронный ресурс] MakeMone. Режим доступа до информ.:  
<https://makemone.ru/okna-i-dveri/chto-takoe-katran-rastenie-rastenie-katran-vidyispolzovanie-otzyvy.html>

32. Шмаряева А.Н. Рост и развитие *Crambe maritima* L. (сем. Brassicaceae) в условиях интродукции в ботаническом саду ЮФУ / А.Н. Шмаряева, Ж.Н. Шишлова, В.В. Федяева // Научный журнал КубГАУ. - 2014. - Vol. 96, No 02. - С. 1-14.

33. Bell R.L. In vitro tissue culture of pear: Advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation / R.L. Bell, B.M. Reed // Proc. 8th IS on Pear. - 2002. - P. 412-418.

34. Bhojwani S.S. Plant tissue culture: An introductory text / S.S. Bhojwani, P.K. Dantu // - New Delhi: Springer, 2013. - 309 p

35. Bowes B.G. In vitro morphogenesis of *Crambe maritima* B.G. Bowes // Protoplasma. - 1976. - Vol. 89. - P. 185-188.

36. Christianson M.L. Phenocritical times in the process of in vitro shoot organogenesis / M.L. Christianson, D.A. Warnik // Dev. Biol. - 1984. - Vol. 101. - P. 382-390.

37. Competence, determination, and meristemoid plasticity in tobacco organogenesis in vitro / H.S. Dhaliwal, N.S. Ramesar-Fortner, E.C. Yeung, T.A. Thorpe // Can. J. Bot. - 2003. - Vol. 81, No 6. - P. 611-621

38. *Crambe abyssinica* a non-food crop with potential for the Mediterranean climate: Insights on productive performances and root growth / F. Zanetti, D. Scordia, T. Vamerali [et al.]. Ind. Crops Prod. 2016. Vol. 90. P. 152-160

39. Cruz-Cruz C.A. Biotechnology and conservation of plant biodiversity / C.A. Cruz-Cruz, M.T. González-Arriaga, F. Engelmann // Resources. – 2013. – Vol. 2. – P. 73-95.

40. Davies T.J. Extinction risk and diversification are linked in a plant biodiversity hotspot / T.J. Davies // PLoS Biology. – 2011. – Vol. 9, No 5. – C 1-9.

41. Engelmann F. In vitro conservation of tropical plant germplasm – a review // Euphytica. – 1991. – 57. – P. 227-243.

42. Engelmann F. Technologies and strategies for ex situ conservation / F. Engelmann, J.M.M. Engels // Managing Plant Genetic Diversity (Eds. J.M.M. Engels, V.R. Rao, A.H.D. Brown, M.T. Jackson). – Wallingford, UK: CABI Publishing, 2002. – P. 89-104.

43. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity / F. Engelmann // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2011. – Vol. 47. – P.

44. In vitro conservation of *Mandevilla moricandiana* (Apocynaceae): short-term storage and encapsulation–dehydration of nodal segments / S.Z. Cordeiro, N.K. Simas, A.B. Henriques, A. Sato // In Vitro Cell Dev Biol Plant. – 2014. – Vol. 50. – P. 326- 336.

45. In vitro morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides* / Y.H. Komatsu, K.D. Batagin-Piotto, G.E. Brondani [et al.] // Dor. Res. – 2011. – Vol. 22, No 2. – P. 209-215.

46. Jimenez V.M. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and nonembryogenic cultures of carrot / V.M. Jimenez, F. Bangerth // Physiol. Plant. – 2001. – Vol. 111. – P. 389-395.

47. Jimenez V.M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis / V.M. Jimenez // Plant Growth Regul. – 2005. – Vol. 47. – P. 91-110.

48. Kuckuck H., Kobabe G., Wenzel G. Safeguarding and utilization of natural genetic diversity // Fundamentals of plant breeding / Eds D. Boringer, W. Hondelmann, V. Stoy,

49. Leung D.W.M. Plant biotechnology helps quest for sustainability: With emphasis on climate change and endangered plants. (D.W.M. Leung // Climate change and sustainable development (Ed. R. Reek) - Louisville: Linton Atlantic Books, 2010. - P. 247-250.

50. Li X. Highly efficient in vitro regeneration of the industrial oilseed crop *Crambe abyssinica* / X. Li, A. Ahlman, H. Lindgren, L.-H. Zhu // Ind. Crop. Prod. - 2011. - Vol. 33. - P. 170-175.

51. Lim K.-B. Influence of genotype, explant source, and gelling agent on in vitro shoot regeneration of *Chrysanthemum* / K.-B. Lim, S.J. Kwon, S.I. Lee // Hort. Environ. Biotechnol. - 2012. - Vol. 53, No 4. - P. 329-335.

52. Pence V.C. Controlling contamination during in vitro collecting / V.C. Pence, J.A. Sandoval // In vitro collecting techniques for germplasm conservation (Eds. V.C. Pence, J.A. Sandoval et al.). - Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute, 2002. - P. 30-40.

53. Phillips C. Invited review: In vitro morphogenesis in plants - recent advances / C. Phillips // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. - 2004. - Vol. 40. - P. 342-345.

54. Piovan A. *Crambe tataria*: actions for ex situ conservation / A. Piovan, G. Cassina, R. Filippini // Biodivers. Conserv. - 2011. - Vol. 20. - P. 359-371.

55. Plucknett D.L., Horne M.E. Conservation of genetic resources // Agriculture, Ecosystems and Environment. - 1992. - 42. - P. 75-92.

56. Prina A.O. Taxonomic review of the genus *Crambe* sect. *Crambe* (Brassicaceae, Brassicaceae) / A.O. Prina // Anales Jard. Bot. Madrid. - 2009. - Vol. 66, No 1. - P. 7-24

57. Raghavan V. Developmental biology of flowering plants / V. Raghavan // New York: Springer, 2000. - P. 354.

58. Ramage C.M. Inorganic nitrogen requirements during shoot organogenesis in tobacco leaf discs / C.M. Ramage, R.R. Williams // J. Exp. Bot. - 2002. - V. 53. - P. 1437-1443

59. Rao N.K. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology / N.K. Rao // Afr. J. Biotech. - 2004. - Vol. 3, No 2. - P. 136-145

60. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco / P. Walch-Liu, G. Neumann, F. Bangerth, C. Engels // J. Exp. Bot. – 2000. – Vol. 51. – P. 227-237.

61. Red List Europe, Red List EU 27, IUCN Red List, World Red List

62. Regeneration and transformation of *Crambe abyssinica* / W. Qi, I.E.M. Timmenbroek-Capel, J.G. Schaart [et al.] // BMC Plant Biology – 2014 – Vol. 14. – P. 235

63. Righini D., Zanetti F., Monti A. The bio-based economy can serve as the springboard for camelina and crambe to quit the limbo. OCL Oilseeds Fats Crop. Lipids 2016, № 23.

64. Roberts E.H. Predicting the storage life of seeds / E.H. Roberts // Seed Sci. Technol. – 1973. – Vol. 1. – P. 499-514.

65. Sarasan W., Cripps R., Ramsay M.M., Atherton C., McMichen M., Pranderkast G., Rowntree J.K. Conservation in vitro of threatened plants – progress in the past decade // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant, 2006. – 42. – P. 206-214.

66. Studies on the Plant regeneration from single cell culture of *Crambe abyssinica* / H.B. Gao, Y. Wang, F. Gao, P. Luo // Hereditas (Beijing). – 1998. – Vol. 20 (suppl.). – P. 50-52

67. Towill L.E. Biotechnology and germplasm preservation // Plant Breed. Rev. – 1989. – 7. – P. 159-182.

68. Vitrification as an approach to cryopreservation / G.M. Fahy, D.R. MacFarlane, C.A. Angell, H.T. Meryman // Cryobiology. – 1984. – Vol. 21. – P. 407-426

69. Westwood M.N. Maintenance and storage: clonal germplasm // Plant Breed. Rev. – 1989. – 7. – P. 111-128

70. Woodward A.J. The effect of nitrogen source and concentration, medium pH and buffering on in vitro shoot growth and rooting in *Eucalyptus marginata* / A.J. Woodward, I.J. Bennett, S. Pusswonge // Sci. Hortic. – 2006. – Vol. 110. – P. 208-213.

71. Xiao-qin S., Hui P., Jian-lin G. et al. Fatty acid analysis of the seed oil in a germplasm collection of 94 species in 58 genera of Brassicaceae // Chem. Ind. of Forest Prod. - 2011. - Vol.31 (6). - P. 46-54.

72. Yancheva S.D. Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during in vitro organogenesis in apple / S.D. Yancheva, S. Golubowicz, E. Fisher [et al.] // Plant Sci. – 2003. – Vol. 165. – P. 299-309.

73. Ziv M. Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes in vitro / M. Ziv, H. Lilien-Kipnis // Plant Cell Rep. – 2000. – Vol. 19. – P. 845-850

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України