

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07 – МКР. 1988 «С» 2023.11.01. 16 ПЗ

ПУЛИ ВІКТОРІЇ СТЕПАНІВНИ

2024р.

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
БІОРЕСУРСІВІ ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ
УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 602.9:61

<p>ПОГОДЖЕНО</p> <p>Декан факультету</p> <p>захисту рослин, біотехнологій та екології</p> <p>_____ Коломієць Ю.В.</p> <p>«__» _____ 2024 р.</p>	<p>ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ</p> <p>Завідувач кафедри</p> <p>екобіотехнології та біорізноманіття</p> <p>_____ Кваско О.Ю.</p> <p>«__» _____ 2024 р.</p>
---	---

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему Культивування клітин *Nepenthes mirabilis in vitro* для біологічно активних сполук медичного призначення

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

Д.с.-г.н., професор

(науковий ступінь та вчене звання)

_____ (підпис)

Лісовий М.М.

(ПІБ)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

Д.с.-г.н., професор

(науковий ступінь та вчене звання)

_____ (підпис)

Коломієць Ю. В.

(ПІБ)

Виконав

_____ (підпис)

Пула В. С.

(ПІБ студента)

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття
к.б.н., доцент Кваско О.Ю.
« » 2024 р.

З А В Д А Н Н Я

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Пулі Вікторії Степанівні

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 Культивування клітин *Nepenthes mirabilis in vitro* для біологічно активних сполук медичного призначення

затверджена наказом ректора НУБіП України від “1” листопада 2023 р. № 1998С

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 листопада 2024р.

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи рослина *Nepenthes mirabilis*, патогенний гриб *Botrytis cinerea*, біологічно активні сполуки, Живильні середовища, культура клітин.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Морфологічні та фізіологічні особливості клітинних культур *Nepenthes mirabilis*.
2. Утворення калюсу та розвиток суспензійної культури.
3. Отримання екстрактів з клітинних культур та оцінити їх активність проти

патогенного гриба *Botrytis cinerea*.

4. Визначити фітотоксичну активність екстрактів з клітинної культури *Nepenthes mirabilis*.

Дата видачі завдання “1” вересня 2023р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

(підпис)

Коломієць Ю. В.

Завдання прийняв до виконання

(підпис)

Пула В. С.

РЕФЕРАТ

Робота виконана на 82 сторінках, містить 3 розділи, 8 рисунків, 11 таблиць, 42 використаних джерела.

Мета дослідження. Метою цього дослідження є отримання та культивування калусної та суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis* для подальшого вивчення їх біологічних властивостей та антифунгіцидної активності. Особливу увагу буде приділено оптимізації умов культивування, екстракції біологічно активних речовин з клітинної маси, а також визначенню ефективності цих екстрактів у пригніченні росту грибкових патогенів.

Дослідження мало на меті дослідити потенційні протигрибкові властивості *Nepenthes mirabilis* шляхом створення калусу та суспензійної культури, а також шляхом проведення екстракції та подальших протигрибкових аналізів. Основна увага була зосереджена на визначенні того, чи можуть біологічно активні сполуки *Nepenthes mirabilis* пригнічувати ріст збудника грибка *Botrytis cinerea*.

В експерименті використовувались листки *Nepenthes mirabilis*, отримані з рослин природного походження. Експлантати були попередньо стерилізовані в 70% спирті протягом 60 секунд. Далі експлантати були промиті в дистильованій воді три рази, а потім перенесені на живильні середовища.

Встановлено, що *Nepenthes mirabilis* демонструє протигрибкову активність, зокрема проти *Botrytis cinerea*, завдяки біоактивним сполукам, присутнім у його тканинах. Результати дослідження показали, що екстракти з калусів і суспензійних культур *Nepenthes mirabilis* ефективно пригнічують ріст грибків при застосуванні методами дифузії на паперових дисках. Крім того, дані про зростання показали, що культури клітин досягли оптимального виробництва біоактивних сполук під час фази експоненціального росту. Використання методів контрольованої стерилізації та культивування дозволило успішно витягти та перевірити протигрибкові агенти з тканин рослини, забезпечивши основу для майбутніх досліджень видів *Nepenthes* як потенційних джерел протигрибкових агентів.

Отже, можна зробити висновок, що ***Nepenthes mirabilis*** демонструє перспективні антифунгіцидні властивості, які можуть бути використані в біотехнології для розробки природних засобів проти грибкових захворювань. Результати експерименту підтвердили ефективність екстрактів з калюсної та суспензійної культур цього виду при пригніченні росту *Botrytis cinerea*. Метод паперових дисків дозволив оцінити зони пригнічення, що підтвердило активність отриманих речовин.

Проведене дослідження також підкреслило важливість вибору оптимального середовища для культивування клітинних культур *Nepenthes mirabilis*, що дозволяє досягти максимального рівня продуктивності при збереженні активності антифунгіцидних речовин. Використання правильних методів стерилізації, підтримання належних умов для інкубації та дотримання біотехнологічних протоколів для роботи з культурними середовищами забезпечує успішне культивування клітин та збереження активних речовин, необхідних для ефективної дії проти грибків.

Таким чином, *Nepenthes mirabilis* є перспективним об'єктом для дослідження з метою подальшого застосування його біологічних екстрактів у створенні природних фунгіцидів. Отримані результати показують, що культивування тканин і клітин цієї рослини відкриває нові можливості для отримання активних речовин у біотехнології та фармакології.

ЗМІСТ

РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	13
1.1 Характеристика хижих рослин.....	13
1.2 Рід <i>Nepenthes</i> – найвідоміші глечикові хижі рослини.....	15
1.2.1 Історія тропічного глечика.....	16
1.2.2 Ботанічна характеристика.....	20
1.2.3. Поширення і середовище проживання.....	22
1.2.4 Екологічні взаємодії.....	24
1.2.5 Практичне застосування.....	26
1.3 Мікроклональне розмноження.....	27
1.3.1 Культура тканин рослин.....	27
1.3.2 Види культури тканин.....	29
1.3.2.1 Культури організованих структур.....	29
1.3.2.2 Культура неорганізованих клітин.....	29
1.3.2.2.1 Калюсна культура.....	29
1.3.2.2.2 Суспензійна культура клітин.....	34
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи	38
2.1 Матеріали необхідні для дослідження.....	38
2.1.1 Об’єкт дослідження.....	38
2.1.2 Характеристика живильного середовища.....	38
2.1.3 Характеристика фітогормонів.....	41
2.1.4 Стерилізація.....	42
2.2 Матеріали дослідження.....	43
2.2.1 Методика приготування калюсогенного живильного середовища.....	43
2.2.2 Методика приготування рідкого живильного середовища.....	45
2.2.3 Схема стерилізації експлантатів <i>Nepenthes mirabilis</i>	46
2.2.4 Індукція утворення калюсу <i>Nepenthes mirabilis</i>	47
2.2.5 Суспензійна культура калюсу <i>Nepenthes mirabilis</i>	47
2.2.5.1 Підготовка калюсу для суспензійної культури.....	47
2.2.5.2 Живильне середовище.....	48
2.2.4.3 Посів суспензії.....	48

2.2.4.4 Інкубація	48
2.2.5 Дослідження антифунгіцидної дії методом паперових дисків	48
2.2.5.2 Підготовка екстрактів	48
2.2.5.3 Дослідження антифунгіцидної дії	48
РОЗДІЛ 3. Результати дослідження	51
3.1 Особливості стерилізації.....	51
3.2 Результати утворення калюсу на експлантатах <i>Nepenthes mirabilis</i>	51
3.2.1 Морфологічні характеристики калюсу.....	52
3.3 Результати культивування суспензійної культури клітин <i>Nepenthes mirabilis</i>	52
3.3.1 Кількісні показники росту клітин суспензійної культури.....	53
3.3.1.1 Лаг-фаза	53
3.3.1.1.1 Фізіологічні процеси у клітинах під час лаг-фази	53
3.3.1.1.2 Кількісні показники лаг-фази.....	54
3.3.1.1.3 Особливості лаг-фази у суспензійній культурі <i>Nepenthes mirabilis</i>	54
3.3.1.2 Експоненційна фаза	54
3.3.1.2.1 Біометричні показники під час експоненційної фази	55
3.3.1.2.2 Метаболічна активність клітин під час експоненційної фази .	56
3.3.1.2.3 Зовнішні фактори, що впливають на експоненційну фазу.....	56
3.3.1.3 Стаціонарна фаза культивування суспензійної культури клітин <i>Nepenthes mirabilis</i>	57
3.3.1.3.1 Біометричні показники у стаціонарній фазі	57
3.3.1.3.2 Механізми стабілізації клітинної популяції	58
3.3.1.3.3 Фізіологічні зміни у клітинах під час стаціонарної фази.....	58
3.3.1.4 Фаза зниження росту суспензійної культури клітин <i>Nepenthes mirabilis</i>	59
3.3.1.4.1 Характеристика фази зниження росту	59
3.3.1.4.2 Причини зниження росту	59
3.3.1.4.3 Фізіологічні зміни у клітинах під час фази зниження росту ...	60
3.4 Дослідження антифунгіцидних властивостей <i>Nepenthes mirabilis</i>	61

3.4.1 Екстракція	61
3.4.2 Дослідження антифунгіцидних властивостей <i>Nepenthes mirabilis</i>	63
ВИСНОВКИ	66
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	67
ДОДАТКИ.....	71

ВСТУП

Рід *Nepenthes* включає в себе багато видів рослин, які відомі своєю неймовірною здатністю до виловлювання комах та інших дрібних організмів. Ці рослини є хижими та відомі своїми великими листками, які утворюють особливі глечики для збирання добутої їжі, такі як комахи.

Рослини роду *Nepenthes* є вічнозеленими ліанами чи кущами, з листками, що мають характерні в'юнкові форми та здатність до формування пасток. Кожна пастка має власний механізм для захоплення та розчинення дрібних живих організмів.

Nepenthes є поширеними в тропічних та субтропічних регіонах, зокрема в Південно-Східній Азії та Океанії. Вони зазвичай ростуть в вологих, тропічних лісах, на сонячних ділянках з високою вологою.

Nepenthes mirabilis є одним із видів роду *Nepenthes*. Він відзначається особливою формою та розміром своїх листків-пасток. Стебла можуть досягати вражаючих довжин, а листки-пастки мають великі розміри та барвисту зовнішність.

Цей вид зазвичай зустрічається в багатьох тропічних лісах та може адаптуватися до різних типів ґрунту. *Nepenthes mirabilis* часто росте на відкритих ділянках, де є велика кількість сонячного світла, що сприяє активному розвитку рослини.

У листках-пастках *Nepenthes mirabilis* містяться різноманітні біологічно активні сполуки, такі як алкалоїди та фенольні сполуки, які можуть мати потенційну цінність у медичних дослідженнях.

Актуальність дослідження. Рід *Nepenthes* став предметом інтенсивних досліджень, і вивчення його клітин та біологічних властивостей відкриває нові горизонти у розумінні біотичних взаємодій, а також можливостей для розвитку медичних технологій.

Nepenthes mirabilis, як частина роду *Nepenthes*, має в собі великий потенціал для використання у медицині завдяки своїм унікальним властивостям та можливостям накопичувати біологічно активні сполуки. Дослідження цього

виду може призвести до відкриття нових лікарських речовин та методів лікування.

Використання клітинної культури для культивування клітин *Nepenthes mirabilis* *in vitro* є перспективним напрямком у вирішенні проблем, пов'язаних із забезпеченням медично значущих речовин. Цей метод дозволяє отримувати чисті та стандартизовані продукти без потреби в експлуатації природних резервів.

Дослідження з культивування клітин *Nepenthes mirabilis* може внести важливий внесок у розвиток біотехнологій, розширюючи можливості отримання біологічно активних речовин з природних джерел.

Потенційне використання клітин *Nepenthes mirabilis* для отримання біологічно активних сполук створює можливості для фармацевтичної промисловості в розробці нових лікарських препаратів та біологічних добавок.

Дослідження медичного потенціалу *Nepenthes mirabilis* також може підкреслити важливість збереження природних ресурсів та екосистем, оскільки використання клітинної культури може допомогти у вирішенні проблем екологічного впливу на рослинний світ.

Мета дослідження. Метою цього дослідження є отримання та культивування калюсної та суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis* для подальшого вивчення їх біологічних властивостей та антифунгіцидної активності. Особливу увагу буде приділено оптимізації умов культивування, екстракції біологічно активних речовин з клітинної маси, а також визначенню ефективності цих екстрактів у пригніченні росту грибкових патогенів.

Завдання дослідження:

1. Огляд наукової літератури щодо біологічних особливостей *Nepenthes mirabilis* та інших хижих рослин.
2. Розробка та оптимізація методів стерилізації експлантатів *Nepenthes mirabilis* для використання у культурі *in vitro*.
3. Дослідження процесу калюсогенезу на різних живильних середовищах з метою отримання калюсної тканини.

4. Вивчення впливу різних фізіологічних і біохімічних факторів на ріст та розвиток калюсу *Nepenthes mirabilis*.
5. Оптимізація умов культивування суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis*.
6. Отримання екстрактів з калюсної та суспензійної культури для подальшого дослідження.
7. Вивчення антифунгіцидної активності екстрактів з використанням методу паперових дисків на прикладі гриба *Botrytis cinerea*.
8. Аналіз біометричних показників зон інгібування росту грибів під впливом різних концентрацій екстрактів.

Об'єкт дослідження. Об'єктом дослідження є рослина *Nepenthes mirabilis*, представник роду *Nepenthes*. В цьому контексті, об'єктом є сама рослина у всій своїй структурній та біологічній складності, включаючи її стебло, листки-пастки та клітини.

Предмет дослідження. Предметом дослідження є процес калюсогенезу та культивування суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis*, а також вивчення антифунгіцидної активності біологічно активних речовин, отриманих із цих культур. Особлива увага приділяється умовам культивування, що впливають на ріст калюсної та суспензійної маси, та впливу екстрактів на патогенні гриби.

РОЗДІЛ 1. Огляд літератури

1.1 Характеристика хижих рослин

Хижі рослини є однією з найбільш дивовижних і незвичайних груп рослин, які зазнали еволюційної адаптації для виживання в екстремальних умовах, де більшість інших рослин не здатні процвітати. Вони здатні поглинати поживні речовини з живих організмів, найчастіше комах, а в деяких випадках навіть дрібних ссавців або птахів, щоб компенсувати нестачу мінеральних речовин у ґрунті. Ці рослини зустрічаються переважно на заболочених територіях, у тропічних лісах і на бідних на поживні речовини ґрунтах, таких як піски або торф'яні болота. Їхня здатність до полювання на тварин дозволяє їм отримувати такі необхідні для росту та розвитку елементи, як азот, фосфор і калій.[29]

Механізми лову здобичі

Різноманіття хижих рослин проявляється в широкій гамі механізмів лову здобичі, які варіюються від простих пасток до надзвичайно складних пристосувань[18]:

- Липкі пастки. Рослини з такими пастками, як *Drosera* (росичка), мають листя, вкриті залозками, які виділяють липкий слиз. Цей слиз служить для утримання комах, що приземляються на листки, після чого листя закручується навколо здобичі, щоб забезпечити контакт з травними ферментами.
- Пастки-гльечики. Одним із найбільш знакових прикладів хижих рослин є представники роду *Nepenthes*, у яких утворюються спеціалізовані листки-гльечики. Ці урни або гльечики мають глибокі камери, куди комахи та інші дрібні організми потрапляють, приваблені нектаром і яскравим забарвленням. Внутрішні стінки гльечика дуже слизькі, що перешкоджає спробам здобичі втекти. Коли комаха потрапляє на дно гльечика, її тіло занурюється в травну рідину, де відбувається ферментативне розщеплення.
- Пастки-клапани. Рослини, такі як *Dionaea muscipula* (венерина мухоловка), володіють активними пастками, які закриваються при

дотику до тригерних волосків на поверхні листків. Цей механізм є однією з найбільш швидких реакцій у світі рослин, яка дозволяє мухоловці миттєво захопити комаху і почати її перетравлення.

- Пастки типу "колби". *Sarracenia* та інші подібні рослини мають колбоподібні пастки, в які комахи потрапляють через широкі отвори. Як тільки комаху спускається всередину колби, гладка поверхня та вниз направлені волоски не дають їй можливості піднятися назад. У результаті жертва занурюється в рідину, де починається процес її травлення.
- Бульбашкові пастки. Представники роду *Utricularia* (пухирники) мають підводні пастки у вигляді мікроскопічних бульбашок, які відкриваються під тиском і миттєво засмоктують дрібних водяних організмів, таких як найпростіші і дрібні ракоподібні.



Рис. 1.1. Види пасток хижих рослин

Хімічний процес перетравлення

Хижі рослини виробляють власні травні ферменти або використовують симбіотичні бактерії для розщеплення білків, жирів і вуглеводів із поглинутої здобичі. Травні ферменти, такі як протеази, фосфатази та ліпази, відіграють важливу роль у розкладанні тваринної органіки на прості сполуки, які рослина

може поглинати через клітини листків або пасток. Поглинені таким чином поживні речовини використовуються для забезпечення росту, розвитку і виживання рослин в умовах, де концентрація необхідних для життя елементів у ґрунті є недостатньою[23].

Адаптації та екологічна значущість

Хижі рослини розвивалися в різних регіонах і адаптувалися до різних умов, проте всіх їх об'єднує одна важлива спільна риса: вони еволюціонували на бідних ґрунтах, де доступ до мінеральних поживних речовин був обмеженим. Це середовище змусило їх розробити механізми для добування поживних речовин з тваринного світу, що є рідкісним явищем серед рослин. Ці рослини відіграють важливу роль у місцевих екосистемах, допомагаючи контролювати популяції комах і інших дрібних тварин, а також сприяючи кругообігу поживних речовин у середовищах з низькою концентрацією мінералів[23].

1.2 Рід *Nepenthes* – найвідоміші глечикові хижі рослини

Рід *Nepenthes* є одним із найвідоміших серед хижих рослин і налічує понад 170 видів, більшість із яких зростають у тропічних регіонах Південно-Східної Азії, на островах Індійського океану, в Австралії та на Мадагаскарі. Рослини цього роду відрізняються характерними глечиками, які можуть досягати вражаючих розмірів і є ефективними пастками для комах та інших дрібних тварин. У деяких випадках глечики можуть уловлювати навіть невеликих ссавців або птахів, роблячи *Nepenthes* найбільшими хижими рослинами в світі.

Особливість глечиків *Nepenthes* полягає в їхній структурі: верхня частина глечика виділяє нектар, що приваблює здобич, у той час як гладкі стінки внутрішньої поверхні глечика та рідина, багата ферментами, не дають комасі шансів на порятунок. Крім того, деякі види *Nepenthes* утворюють симбіотичні відносини з певними видами тварин, наприклад, з мурахами або кажанами, які живуть у їхніх глечиках і допомагають підтримувати екологічний баланс, видаляючи неперетравлені залишки здобичі.

Одним із найпоширеніших видів є *Nepenthes mirabilis* – рослина, яка має широке поширення і добре адаптована до різних екологічних умов, що робить її

об'єктом численних досліджень. *Nepenthes mirabilis* може формувати великі глечики, здатні уловлювати значну кількість здобичі, що забезпечує їй стабільне джерело поживних речовин. Цей вид також цікавий тим, що його екстракти містять біологічно активні речовини, які можуть мати антимікробні, антибактеріальні та антифунгіцидні властивості[23].

1.2.1 Історія тропічного глечика

Існує понад 150 істот — певні види мурах, жаб, крабів та багато інших — які використовують тропічну рослину як дім, місце для розмноження або джерело їжі. Ці види еволюціонували разом з *Nepenthes*, щоб не бути з'їденими, але в багатьох випадках вони підтримують взаємовигідні відносини з рослиною. Це відбувається у формі посліду, який живить рослину, захищає від шкідників, які інакше могли б завдати їм шкоди, і допомагає перетравлювати спійману здобич.

Місцеві жителі використовують *Nepenthes* як різні інструменти. Глечики справді виправдовують свою назву, коли їх використовують для збору дощової води для пиття або як водоміри. Деякі використовують великі глечики як ємності для приготування рису, що, нібито, посилює смак. Стебла *Nepenthes ampullaria* використовувалися як мотузка. Невідкриті пастки зі стерильною рідиною всередині використовуються як засіб від астми, болезаспокійливе та засіб для промивання очей. Вважається, що коріння має лікувальні властивості, які допомагають знизити температуру та регулюють менструацію. Інші частини рослини використовуються для лікування проблем зі шлунком, дизентерії, печії та нетравлення.

Вчені виявили, що *Nepenthes* є захоплюючим і незрозумілим видом. ДНК пов'язує їх генетично ближче до родичів клейколистих м'ясоїдних рослин, таких як *Drosera*, *Triphyophyllum* і *Drosophyllum*, ніж до інших м'ясоїдних тварин, що використовують пастки, таких як *Sarracenia* та *Heliamphora*. У Європі викопні рештки пилку відносять їх до еоцену, понад 58 мільйонів років тому. Сьогодні найдавніші види походять із Шрі-Ланки, північної Індії, Мадагаскару та Сейшельських островів. Коли цей вид мігрував до Південно-Східної Азії,

відбувся сплеск еволюційного різноманіття, внаслідок чого з'явилися численні види, які ми бачимо сьогодні.

Найдавніші відомості про *Nepenthes* датуються 17 століттям. У 1658 році французький колоніальний губернатор Етьєн де Флакур опублікував опис рослини глечик у своїй основоположній праці «Histoire de la Grande Isle de Madagascar».

«Це рослина заввишки близько 3 футів, яка на кінці листя, довжиною 7 дюймів, має порожнисту квітку або плід, схожий на невелику вазу, з власною кришкою, чудове видовище. Бувають червоні і жовті, жовті найбільші. Жителі цієї країни неохоче зривають квіти, кажучи, що якщо хтось мимохідь їх зірве, то в цей день не обійдеться дощ. Щодо цього, я та всі інші французи їх збирали, але дощу не було. Після дощу ці квіти наповнені водою, у кожній по півсклянки.» [23]

Флакур назвав рослину *Amramatico* за місцевою назвою. Понад століття потому цей вид був офіційно описаний як *N. madagascariensis*. [27] Другим видом, який було описано, був *N. distillatoria*, ендемік Шрі-Ланки. У 1677 році датський лікар Томас Бартолін коротко згадав про нього під назвою *Miranda herba*, що з латині означає «чудова трава». Через три роки голландський купець Якоб Брейне назвав цей вид *Bandura zingalensium* за місцевою назвою рослини. Згодом *Bandura* стала найпоширенішою назвою для тропічних глечикових рослин, доки Лінней не створив *Nepenthes* у 1737 році. *Nepenthes distillatoria* був знову описаний у 1683 році, цього разу шведським лікарем і натуралістом Германом Нікласом Грімом. [14] Грім назвав це *Planta mirabilis destillatoria* або «чудодійна винокурна рослина», і був першим, хто чітко проілюстрував тропічну рослину-глечик. Через три роки, у 1686 році, англійський натураліст Джон Рей процитував слова Гріма: «Корінь витягує вологу з землі, яка за допомогою сонячних променів піднімається вгору в саму рослину, а потім стікає через стебла і жилки листя в природний посуд, щоб зберігатися там до використання для потреб людини.»

Одна з найперших ілюстрацій Непентес з'являється в *Almagestum Botanicum* Леонарда Плюкенета за 1696 рік. (Рис.1.2)

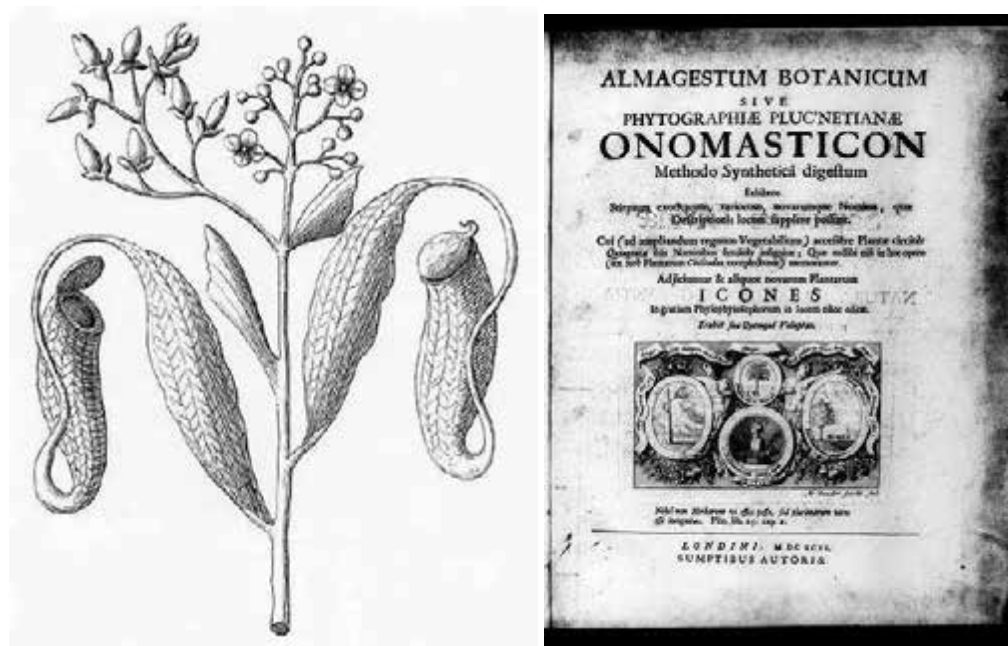


Рис.1.2. Одна з найперших ілюстрацій Непентеса, Plukenet's 1696 *Almagestum*

Приблизно в той же час німецький ботанік Георг Еберхард Румфіус відкрив на Малайському архіпелазі два нових види *Nepenthes*. Румфій проілюстрував перший, який зараз вважається синонімом *N. mirabilis*, і дав йому назву *Cantharifera*, що означає «носець цистерни». Другий, згаданий як *Cantharifera alba*. Румфій описав рослини у своїй найвідомішій праці — шеститомному *Herbarium Amboinense* — каталозі флори острова Амбон. Однак вона була опублікована лише через багато років після його смерті. Після того, як осліп у 1670 році, коли рукопис був лише частково завершений, Румфіус продовжив роботу над *Herbarium Amboinensis* за допомогою клерків і художників. У 1687 році, коли проект наближався до завершення, принаймні половина ілюстрацій була втрачена під час пожежі. Наполегливо, Румфіус і його помічники вперше завершили книгу в 1690 році. Однак через два роки корабель, який перевозив рукопис до Нідерландів, був атакований і потоплений французами, змусивши їх почати все спочатку з копії, яка, на щастя, була збережена губернатором - генерал Йоганнес Камфуйс. *Herbarium Amboinensis* нарешті прибув до Нідерландів у

1696 році. Навіть тоді перший том з'явився лише в 1741 році, через 39 років після смерті Румфіуса. До цього часу за Ліннеєм закріпилася назва Непентес.[23]

Nepenthes distillatoria знову була проілюстрована в *Thesaurus Zeylanicus* Йоганнеса Бурманна 1737 р. На малюнку зображено кінець квітучого стебла з глечиками (Рис 1.3).

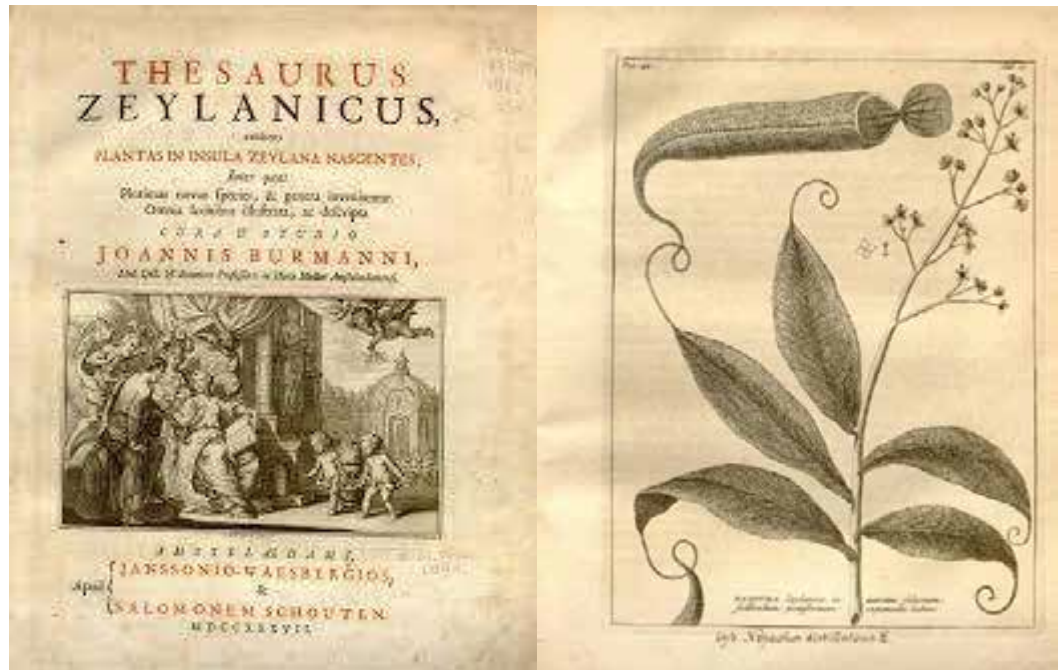


Рис.1.3. *Thesaurus Zeylanicus*, *Nepenthes distillatoria*

Наступна згадка про тропічні кувшинні рослини була зроблена в 1790 році, коли португальський священник Жоао де Лурейро описав *Phyllamphora mirabilis*, або «чудовий лист у формі урни», з В'єтнаму. Незважаючи на те, що Лурейро прожив у країні близько 35 років, малоймовірно, що Лурейро спостерігав живі рослини цього виду, оскільки він заявив, що кришка є рухомою частиною, яка активно відкривається та закривається. У своїй найвідомішій праці, *Flora Cochinchinensis*, він пише: «[...]кінчик листа закінчується довгим звисаючим вусиком, закрученим спірально посередині, з якого звисає щось на зразок вази, довгастої, пузатої, з гладкою губою з виступаючим краєм і прикріпленою кришкою на одну сторону, яка за своєю природою вільно відкривається та закривається, щоб прийняти росу та зберегти її. Чудова робота Господня!»

Phyllamphora mirabilis була зрештою переведена Рафаріном у рід *Nepenthes* у 1869 році. Таким чином, *P. mirabilis* є основою цього найбільш

космополітичного виду тропічної рослини. Опис Лурейро рухомої кришки був повторений Жаном Луї Марі Пуаре в 1797 році. Пуаре описав два з чотирьох видів *Nepenthes*, відомих на той час: *N. madagascariensis* і *N. distillatoria*. Він дав першому його нинішню назву, а другого назвав *Nepente de l'Inde*, або просто «*Nepenthes of India*», хоча цей вид відсутній на материку. У *Encyclopédie Méthodique Botanique* Жана-Батіста Ламарка він включив таку розповідь: «Ця урна порожниста, як я щойно сказав, зазвичай наповнена м'якою чистою водою, а потім закривається. Вона відкривається протягом дня, і більше половини рідини зникає, але ця втрата відновлюється протягом ночі, і наступного дня урна знову наповнюється і закривається кришкою. Це його корм, і його вистачає не на один день, тому що з настанням ночі він завжди заповнений приблизно наполовину.»

З відкриттям нових видів і сером Джозефом Бенксом оригінальні зразки в Європі в 1789 р., інтерес до *Nepenthes* ріс протягом 19 століття, завершившись тим, що було названо «золотим віком *Nepenthes*» у 1880-х роках. [3] Однак популярність рослин зменшилася на початку 20-го століття, перш ніж вони майже зникли під час Другої світової війни. Про це свідчить той факт, що з 1940 по 1966 рік не було описано жодного нового виду. Відродження глобального інтересу до культивування та вивчення Непентесу приписують японському ботаніку Шигео Курата, чия робота в 1960-1970-х роках багато в чому привернула увагу до цієї рослини. [8]

1.2.2 Ботанічна характеристика

Види *Nepenthes* зазвичай складаються з неглибокої кореневої системи та розпростертого або лазячого стебла, часто кілька метрів завдовжки та до 15 м або більше, і зазвичай 1 см або менше в діаметрі, хоча він може бути товщим у кількох видів (наприклад, *N. bicalcarata*). Зі стебел виникають чергові мечоподібні листки з цілісними краями. Розширення середньої жилки (вусика), яке у деяких видів допомагає лазити, виступає з кінчика листа; на кінці вусика утворюється глечик. Глечик починається як невеликий бутон і поступово розширюється, утворюючи пастку у формі кулі або труби. [4]

Пастка містить рідину власного виробництва рослини, яка може бути водянистою або більш в'язкою, і використовується для втоплення здобичі. Ця рідина містить в'язкопружні біополімери, які можуть мати вирішальне значення для утримання комах у пастках багатьох видів. В'язкопружна рідина в глечиках особливо ефективна для утримання крилатих комах. Ефективність уловлювання цієї рідини залишається високою, навіть якщо її значно розбавити водою, як це неминуче відбувається у вологих умовах.[7]

Нижня частина пастки містить залози, які поглинають поживні речовини зі спійманої здобичі. Уздовж верхньої внутрішньої частини пастки є гладкий восковий наліт, який робить втечу здобичі майже неможливою. Навколо входу в пастку розташована структура, яка називається перистою («губа»), яка слизька і часто досить різнобарвна, приваблює здобич, але пропонує невпевнену опору. Ефективність захоплення здобичі перистою ще більше посилюється у вологому середовищі, де конденсація може спричинити утворення тонкої водяної плівки на поверхні перистоми. У мокрому стані слизька поверхня перистоми змушує комах «аквапланувати» або ковзати й падати в глечик. Над перистою кришечка; у багатьох видів це запобігає потраплянню дощу, з метою запобігання розрідження рідини в глечику, нижня сторона якого може містити нектарні залози, які приваблюють здобич.[7]

Види *Nepenthes* зазвичай утворюють два типи глечиків, відомих як диморфізм листя. Біля основи рослини розташовані великі нижні пастки, які зазвичай сидять на землі. Верхні або повітряні глечики зазвичай менші, різного кольору та відрізняються від нижніх особливостями. Ці верхні глечики зазвичай утворюються, коли рослина досягає зрілості і росте вище. Щоб утримувати рослину стійко, верхні глечики часто утворюють петлю в вусику, що дозволяє їй обертатися навколо опори поблизу.[16] У деяких видів (наприклад, *N. rafflesiana*) різну здобич можуть залучати два типи глечиків. Ця різноманітна морфологія також часто ускладнює ідентифікацію видів.

Здобич зазвичай складається з комах, але найбільші види (наприклад, *N. rajah* і *N. rafflesiana*) іноді можуть ловити дрібних хребетних, таких як щури та

ящірки.(Рис. 1.4) [22] Квітки в суцвіттях або рідше в волотях з чоловічими і жіночими квітками на окремих рослинах.



Рис. 1.4. Необачний пацюк втрапив у глек Непентесу, острів Борнео, Малайзія

Три види мають симбіотичні стосунки з землерийками, які їдять нектар, що виробляється рослиною, і випорожнюються в глечики, забезпечуючи цінні поживні речовини.

Непентес запилюються комахами, основними є мухи (включаючи мух, мошок і комарів), міль, оси та метелики. [8] Їх запах може варіюватися від солодкого до затхлого або грибкового.

Насіння зазвичай утворюється в чотиристоронній капсулі, яка може містити 50–500 розподілених вітром насінин, що складаються з центрального ембріона та двох стулок, по одному з обох боків (хоча *N. pervillei* відрізняється). Рід є цитологічно диплоїдним, усі досліджені види мають число хромосом $2n=80$. [40] Вважається, що це високе число відображає палеополіплоїдію (ймовірно, $8x$ або $16x$).

1.2.3. Поширення і середовище проживання

Рід *Nepenthes* здебільшого зустрічається на Малайському архіпелазі, з найбільшим біорізноманіттям на Борнео, Суматрі та Філіппінах, особливо в

гірських дощових лісах Борнео. Повний ареал роду включає Мадагаскар (*N. madagascariensis* і *N. masoalensis*), Сейшельські острови (*N. pervillei*), Шрі-Ланку (*N. distillatoria*) та Індію (*N. khasiana*) на заході до Австралії (*N. Mirabilis*, *N. rowanae* і *N. tenax*) і Нова Каледонія (*N. vieillardii*) на південному сході. Більшість видів обмежені дуже малими ареалами, в тому числі деякі зустрічаються лише на окремих горах. Ці обмежені поширення та недоступність регіонів часто означають, що деякі види десятиліттями не були повторно відкриті в дикій природі (наприклад, *N. deaniana*, який був повторно відкритий через 100 років після свого першого відкриття). Приблизно 10 видів мають популяційний розподіл більший, ніж один острів або група менших островів. *Nepenthes mirabilis* вирізняється тим, що є найпоширенішим видом у своєму роді, починаючи від Індокитаю та Малайського архіпелагу до Австралії. [21] Через характер середовищ, які займають види *Nepenthes*, їх часто класифікують як низинні або високогірні види залежно від їх висоти над рівнем моря, де 1200 м є приблизним розмежуванням між низовиною та високогір'ям. Види, що ростуть на низьких висотах, потребують постійно теплого клімату з невеликою різницею між денною та нічною температурами, тоді як високогірні види процвітають, коли вони мають теплі дні та набагато прохолодніші ночі. *Nepenthes lamii* росте на більшій висоті, ніж будь-який інший представник роду, до 3520 м. Більшість видів *Nepenthes* ростуть у середовищі з високою вологістю та опадами та від помірного до високого освітлення. Декілька видів, у тому числі *N. ampullaria*, віддають перевагу густим затіненим лісам, але більшість інших видів процвітають на узбіччях деревно-чагарникових угруповань або галявин. Деякі види (наприклад, *N. mirabilis*) ростуть на вирубаних лісах, узбіччях доріг і порушених полях. Інші види пристосувалися рости в саванноподібних трав'яних угрупованнях. Ґрунти, на яких ростуть види *Nepenthes*, зазвичай кислі та мають низький вміст поживних речовин, вони складаються з торфу, білого піску, пісковика або вулканічних ґрунтів. Винятки з цих загальних правил включають види, які процвітають у ґрунтах з високим вмістом важких металів (наприклад, *N. rajah*), на піщаних пляжах у зоні бризок моря (наприклад, *N. albomarginata*).

Інші види ростуть на інсельбергах і як літофіти, тоді як інші, такі як *N. inermis*, можуть рости як епіфіти без контакту з ґрунтом.

1.2.4 Екологічні взаємодії

Найбільш очевидною взаємодією між видами *Nepenthes* та їх середовищем, включаючи інші організми, є взаємодія хижака та жертви. Види *Nepenthes*, звичайно, приваблюють і вбивають свою здобич, хоча і пасивно, через активне виробництво привабливих кольорів, солодкого нектару та навіть солодких запахів. Завдяки цьому зв'язку рослини в основному отримують азот і фосфор, щоб заповнити свої потреби в поживних речовинах для росту, враховуючи, що цих поживних речовин у ґрунті зазвичай бракує. Найчастішою здобиччю є численна та різноманітна група членистоногих, головними у меню є мурахи та інші комахи. Інші членистоногі, які часто зустрічаються, включають павуків, скорпіонів і багатоніжок, тоді як равлики та жаби більш незвичайні.

Найбільш незвичайною здобиччю видів *Nepenthes* є щури, знайдені в *N. rajah*. Склад спійманої здобичі залежить від багатьох факторів, включаючи місце розташування, але може включати сотні окремих комах і багато різних видів. Хоча багато видів *Nepenthes* є загальними спеціалістами в тому, що вони ловлять, принаймні один, *N. albomarginata*, спеціалізувався і майже виключно ловить термітів і майже не виробляє нектару. *Nepenthes albomarginata* отримав свою назву через кільце білих трихом безпосередньо під перистою. Ці трихоми — або «волоски» — приємні термітам і приваблюють їх до глечика. Під час збору їстівних трихом сотні чи тисячі термітів потраплять у глечик.

Симбіози. Нижній глечик *N. attenboroughii*, що підтримує велику популяцію личинок комарів. Вертикальна кришка цього виду наражає його глечики на вплив елементів, так що вони часто повністю заповнені рідиною.[23]

N. bicalcarata забезпечує простір у порожнистих вусиках своїх верхніх глечиків, щоб мураха-тесляр (*Camponotus schmitzi*) будувала гнізда. Мурахи беруть більшу здобич із глечиків, що може принести користь *N. bicalcarata*, зменшивши кількість гниття зібраної органічної речовини, що може завдати шкоди природному співтовариству видів фауни, які допомагають травленню

рослин. [23] *N. lowii* також склав залежні відносини, але з хребетними замість комах. Глечики *N. lowii* забезпечують нагороду цукристим ексудатом на відображеній кришці глечика для видів землерийок, які, як було виявлено, поїдають ексудат і випорожнюються в глечик. Дослідження 2009 року, яке ввело термін «туалетні землерийки», показало, що від 57 до 100% позакореневого поглинання азоту рослинами відбувається з фекалій землерийки. Інше дослідження показало, що форма і розмір отвору глечика *N. lowii* точно відповідають розмірам типової землерийки (*Tupaia montana*). [42] Подібна адаптація була виявлена у *N. macrophylla*, *N. rajah*, *N. ampullaria*, і, ймовірно, також присутня у *N. ehippiata*. Подібним чином, *N. hemsleyana*, яка походить з Борнео, має симбіотичне партнерство з шерстистим кажаном Хардвіка. Протягом дня кажан може ночувати над травною рідиною всередині глечика. Поки кажан знаходиться всередині, він може випорожнитися, і рослина може отримати азот з посліду.

Інфауна. Організми, які проводять принаймні частину свого життя в глечиках видів *Nepenthes*, часто називають *Nepenthes infauna*. Найпоширенішими видами інфауни, які часто представляють верхній трофічний рівень екосистеми інфауни, є багато видів личинок комарів. Інші види фауни включають личинки мух і мошок, павуків, кліщів, мурах і навіть вид краба (*Geosesarma malayanum*). Багато з цих видів спеціалізуються на одному виді рослин і більше ніде не зустрічаються. Цих фахівців називають непентебіонтами. Інші, часто асоційовані з видами *Nepenthes*, але не залежні від них, називаються непентофілами. Непентексени, з іншого боку, рідко зустрічаються в глечиках, але часто з'являються, коли процес гниття наближається до певного порогу, залучаючи личинок мух, які зазвичай не зустрічаються в спільноті фауни глечиків. Складний екологічний зв'язок між кувшинними рослинами та інфауною ще не повністю вивчений, але цей зв'язок може бути взаємним: інфауна отримує притулок, їжу або захист, а рослина, яка містить інфауну, отримує прискорене розщеплення спійманої здобичі, збільшуючи швидкість травлення та утримання шкідливих бактеріальних популяцій.[23]

Антимікробні властивості. Травні рідини *Nepenthes* є стерильними до того, як глечики відкриваються, і містять вторинні метаболіти та білки, які діють як бактерициди та фунгіциди після того, як глечики відкриваються. Поки виробляється травна рідина, глечик ще не відкритий, тому немає ймовірності мікробного зараження. Під час розвитку глечика в рідині глечика виробляється принаймні 29 травних білків, включаючи протеази, хітинази, білки, пов'язані з патогенезом, і тауматиноподібні білки. Окрім руйнування здобичі, вони можуть діяти як антимікробні агенти. Коли глечики відкриваються, рідина піддається впливу бактерій, грибкових спор, комах і дощу. Часто глечики мають кришку, яка закриває пастку, за винятком деяких (наприклад, *N. lowii*, *N. attenboroughii* та *N. jamban*), запобігаючи потраплянню дощової води. Кришка перешкоджає розрідженню травної рідини дощовою водою. Коли бактерії та гриби потрапляють у рідину, на додаток до антимікробних білків виробляються вторинні метаболіти. Зазвичай виробляються нафтохінони, клас вторинних метаболітів, які або вбивають, або пригнічують ріст і розмноження бактерій і грибків. Ця адаптація могла розвинутися, оскільки рослини *Nepenthes*, які могли виробляти вторинні метаболіти та антимікробні білки для знищення бактерій і грибків, швидше за все, були більш придатними. Рослини, які виробляють антимікробні сполуки, можуть запобігти втраті цінних поживних речовин, отриманих від комах у глечику. Оскільки непентес не може перетравлювати певні бактерії та гриби, бактерициди та фунгіциди дозволяють рослинам максимізувати поглинання поживних речовин.[23]

1.2.5 Практичне застосування

Глечик має багато потенційних застосувань, які до кінця не вивчені. Це включає видовий потенціал для декоративних рослин (як кімнатних, так і відкритих), оскільки різна форма та колір глечика можуть бути дуже привабливими. Крім того, ці види мають лікувальну цінність.

Непентес використовується в традиційній медицині для лікування багатьох хвороб. Повідомлялося, що північно-східний індійський травник прописав рідину, що виділяється з нерозкритого глечика *Nepenthes khasiana*, для лікування

цукрового діабету [35]. Крім того, рідину з нерозкритого глечика призначають для лікування курячої сліпоты, кон'юнктивіту, захворювань вуха та гінекологічних проблем. Люди хасі вживають рідину вранці як травний тонік. Подрібнений порошок глечика використовують для лікування холери. Традиційні лікарі Гаро використовують *N. khasiana* для лікування прокази, наносячи тонку пасту з глечика [41]. Народ Даяк Серебуанга використовував рідину з нерозкритого глечика Непентесу для лікування болю в животі та кашлю [34]. Традиційно корінь Непентесу використовується для лікування дизентерії та болю в животі [33]. *Nepenthes ampullaria* та *Nepenthes gracilis* є двома найпоширенішими видами, які використовуються в народній медицині, де рідина, що міститься в невідкритому глечику, вводиться для регуляції менструального циклу, полегшення народження дитини, полегшення астми, лікування запалення очей і діє як засіб для підвищення витривалості [17]. У Малайзії відвар стебла *N. ampullaria* споживали для лікування малярії [36]. У В'єтнамі *Nepenthes mirabilis* використовується традиційними лікарями для лікування виразки шлунка, жовтяниці, високого кров'яного тиску, каменів у сечоводі та гепатиту [37]. Фітохімічні дослідження показали, що види Непентесу містять нафтохінони та нафталінові глікозиди [2].

1.3 Мікроклональне розмноження

1.3.1 Культура тканин рослин

Культура рослинної тканини визначається як:

Культура in vitro рослинних протопластів, клітин, тканин або органів у контрольованих асептичних умовах, що призводить до клітинного мультиплікатаму або регенерації органів або цілих рослин

Це один із найкращих підходів для вираження потенціалу тотипотентності та індукування генотипових і фенотипових маніпуляцій у рослинних клітинах. Існують різноманітні базові та прикладні застосування культури рослинної тканини [20]. Кілька переваг, а також недоліків культури рослинних тканин наведено в таблиці 1.1.

Таблиця 1.1. Переваги та недоліки культури рослинних тканин

Переваги	Недоліки
Можна виконувати роботу від молекулярного до масового рівня. У культурі рослинних тканин можна відмовитися від трудомісткої роботи, такої як прополка, полив, обприскування	Потребує багато дорогих і спеціалізованих процедур, обладнання та навичок.
Для омолодження рослинного матеріалу, може зберігатися тривалий час	На відміну від польових рослин, вирощені рослини залежать від джерел живлення.
Виробництво не залежить від сезону і може тривати цілий рік	Не обов'язково, щоб калюс з'явився протягом короткого часу. Іноді калюс не з'являється місяцями, а на деяких рослинах калюс взагалі не з'являється.
Найкращий метод для введення часових характеристик і вивчення впливу декількох мутагенів, а також для спроб іммобілізації клітин. Для біотрансформації або біохімічних реакцій	Саджанці спочатку маленькі і мають небажані характеристики
Це може забезпечити безперервне, надійне джерело фітофармацевтичних препаратів і може бути використано для великомасштабного культивування рослинних клітин	Рослини не функціонують автотрофно в культурі і повинні пройти перехідну фазу до самостійного росту.
Культура рослинних тканин дозволяє отримати велику кількість клонів (з бажаними характеристиками), стійких	Ймовірність отримання генетично аберантних рослин може збільшитися

до посухи, повеней, хвороб, рослин з високою поживною цінністю та високоякісних рослин з підвищеним виходом вторинних метаболітів (також використовується для вивчення біогенезу вторинних метаболітів).	
Процес пропонує однорідну біомасу, доступну в будь-який час, синтез лікарських сполук, які важко або неможливо синтезувати хімічним шляхом, незалежно від стану ґрунту та зміни кліматичних умов.	Розсада більш схильна до забруднення і втрати води в зовнішньому середовищі, оскільки вирощується при високій відносній вологості.

1.3.2 Види культури тканин

1.3.2.1 Культури організованих структур

Організоване зростання сприяє створенню або підтримці визначеної структури. Ріст вищих рослин залежить від організованого розподілу функцій між органами, які, у свою чергу, стають диференційованими, модифікованими та спеціалізованими, щоб дозволити їм виконувати свої основні ролі. Органні культури є хорошими прикладами організованих структур. Органна культура використовується як загальний термін для тих типів культур, у яких можна постійно підтримувати організовану форму росту. Це культури ізольованих органів рослин, включаючи культури, отримані з кінчиків коренів, кінчиків стебла, зачатків листків або незрілих частин квітів і плодів. Органні культури поділяються на детермінантні та індетермінантні органи.[30]

1.3.2.2 Культура неорганізованих клітин

1.3.2.2.1 Калюсна культура

Калюс складається з аморфної маси пухко розташованих тонкостінних паренхіматозних клітин, що утворюються з проліферуючих клітин вихідної тканини. Частіше калюс плутають з терміном калоза, яка є полісахаридом, що

виділяється рослинами (елементами сита) під час будь-якого стресу або атаки мікробів, комах чи будь-яких інших патогенів. Калюс можна отримати практично з будь-якої частини рослини. Часто в результаті поранення на зрізаному кінці утворюється стебло або корінь. Це більш-менш неорганізована тканина, яка містить диференційовані (вихідний матеріал для індукції калюсу, наприклад, листя, корінь, пагін тощо), а також недиференційовані клітини. Тому термін калюс включає клітини з різним ступенем диференціації. Клітинна маса калюсу складається з неспеціалізованих клітин паренхіми. Паренхіматозні клітини, присутні в експлантатах, зазвичай піддаються цій диференціації. Отже, в принципі, калюс можна визначити як неорганізовану та менш диференційовану паренхіматозну тканину. Ця аморфна тканина зазвичай утворюється, коли рослинні клітини розмножуються несистематичним шляхом. Таким чином, калюсні культури - це в основному скупчення клітин, вирощені внаслідок неорганізованої проліферації клітин із сегмента органів рослини. У цій техніці рослинні клітини розмножуються на відповідних середовищах, утворюючи скупчення недиференційованих клітин, які називаються калюсами. Якщо калюс містить диференційовані клітини, присутні в ізольованих експлантатах, то перед поділом клітин має відбутися дедиференціювання (тобто клітини зазнають змін, щоб стати меристематичними). Якщо експлантати містять лише меристематичну тканину в ізольованому стані, то поділ клітин відбувається без дедиференціації. Під час процесу дедиференціювання зрілі дорослі клітини можуть тимчасово повернутися з дорослого стану в ювенільний. Омолоджені клітини мають більший потенціал росту та поділу. Ці клітини за особливих умов здатні регенерувати органи та/або ембріони. Тому дедиференціація є важливим кроком, який слід враховувати під час розмноження рослин *in vitro*. Ініціація калюсу зазвичай супроводжується додаванням відповідних гормонів індукції калюсу. Середовище, що підтримує ріст, і стерильні умови є обов'язковими для його росту та розвитку. Екзогенні регулятори росту, присутні в живильному середовищі, впливають на формування калюсу з експлантатів.[13]

Після великого відкриття, калюс широко використовувався як у фундаментальних дослідженнях, так і в промисловості. Окрім ауксину та цитокінів, інші гормони, такі як брасиностероїди або абсцизова кислота, також індують калюс і у деяких видів можуть замінити ауксин або цитокінін у формуванні калюсу. Фактори, які сприяють утворенню калюсу, і їх різні можливі механізми виділені на рис. 1.5. Основні фактори, які відповідають за індукцію калюсу, виділені темно-сірими колами, а їхні відповідні фактори транскрипції виділені світловими прямокутниками. Залежно від можливостей регенерації органів розрізняють калюси (рис. 1.6).

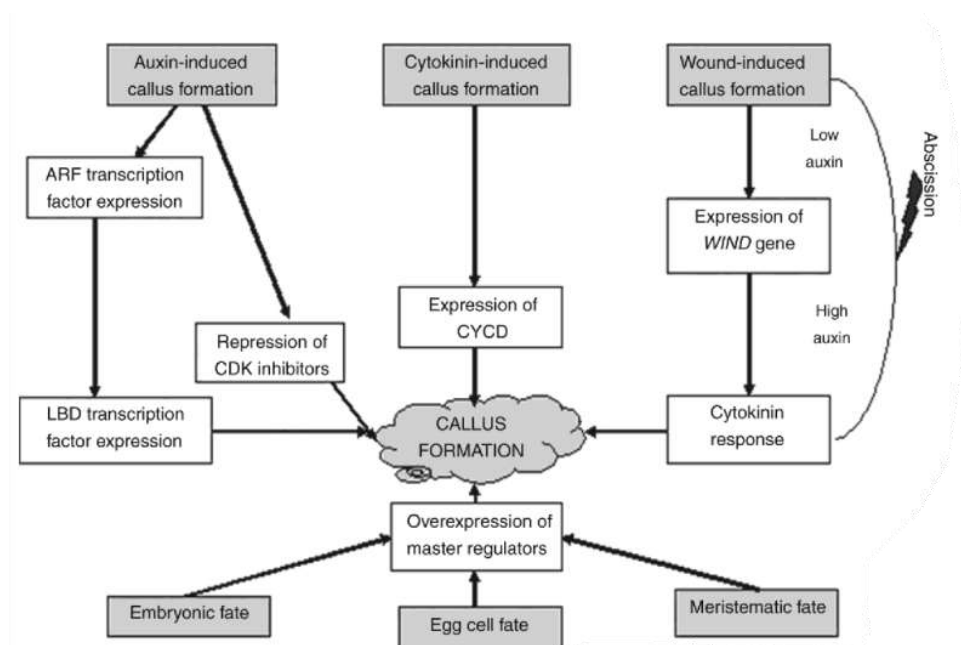


Рис. 1.5. Механізм формування калюсу

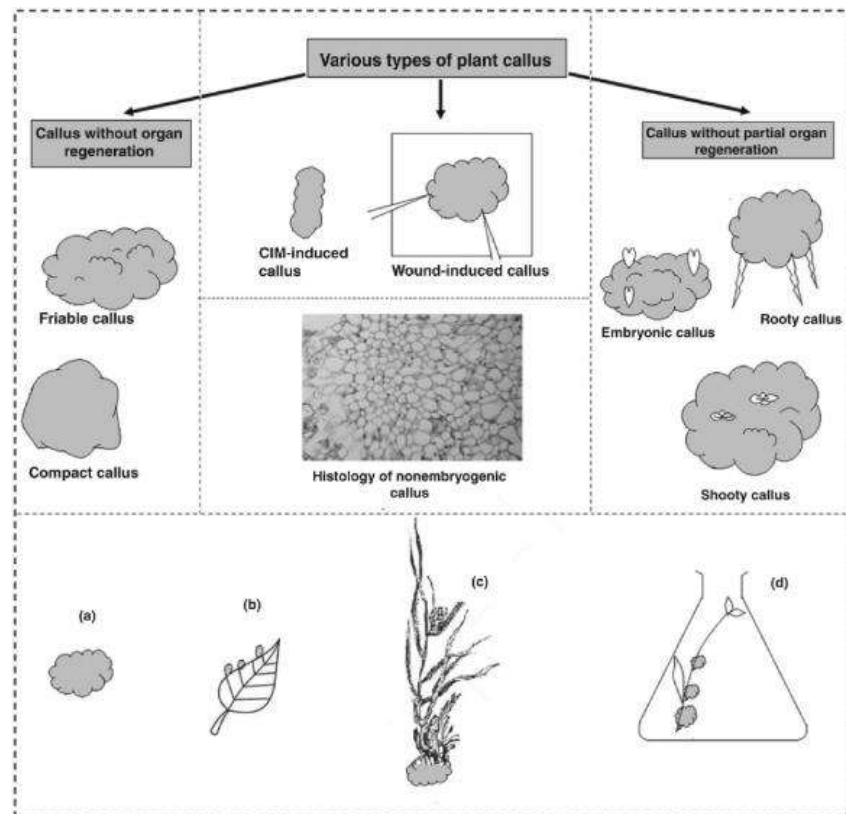


Рис. 1.6. Ілюстрація, що представляє типи, гістологію та різні форми калюсу (отримані *in vitro* та в природі). (a) Калюс, утворений в умовах *in vitro*; (b) калюс у місці пошкодження; (c) пухлина, індукована бактеріальною інфекцією; (d) генетичні пухлини, спричинені міжвидовим схрещуванням двох *Nicotiana sp.*

Морфологічні особливості калюсу

Калюс суттєво відрізняється за формою та текстурою, починаючи від твердих вузликів клітинних мас до пухких м'яких. Він може бути білим або кремовим, зеленим або повністю або частково у розвитку хлоропласта, або фіолетовим через накопичення антоціанів у вакуолях. Окремі клітини всередині маси коливаються за формою від майже сферичної до помітно витягнутої. Клітини, що не діляться в клітинній масі, мають тонкі стінки з великою центральною вакуолею, тоді як клітини в області активного клітинного поділу, меристематичній області, менші зі зменшеною вакуолею та густо забарвленою цитоплазмою. У деяких випадках може спостерігатися певна диференціація клітинної маси з клітинами флоєми та здерев'янілими клітинами ксилеми.[30]

Індукція калюсу

Стебла, листя, коріння, квіти, насіння та багато інших частин (бажано молодих рослин) видів рослин можна використовувати для індукції калюсної тканини; однак успішне утворення калюсу залежить від виду рослини та наданих умов. Дводольні рослини більш сприйнятливі до індукції калюсу, ніж однодольні, тоді як у деревних рослин ріст калюсу, як правило, повільний. У культурі ця дедиференційована маса може зберігатися необмежений час за умови пересіву калюсу на свіже середовище.

Підтримання калюсу

Калюс, утворений на вихідних експлантатах, називається первинним калюсом. Культивування вторинного калюсу починають із шматочків тканини, вирізаних з первинного. Таку культуру можна зберігати протягом невизначених періодів шляхом послідовного субкультивування. Під час субкультивування калюсні культури поділяють для отримання нових інокулятів для ініціації культивування на свіжому середовищі. Період від початку культури або субкультури до моменту її перенесення називається пасажем. Подальші калюсні культури не є культурами клітин, оскільки культивуються цілі асоціації тканин. Під час тривалого культивування відбуваються генетичні та епігенетичні зміни. Тоді можна сказати, що калюс складається з популяції клітин із дещо різними генотипами, що призводить до відмінностей між одним штамом калюсу та іншим.[30]

У випадках, коли калюс важко індукувати, або якщо потрібен молодий калюс, то використовуються незрілі ембріони або саджанці або їх частини. Ріст калюсу в межах виду рослини може залежати від типу вихідного матеріалу (ювенільний чи старий), вихідного положення експлантатів, рослини, віку рослини, фізіології рослини та умов зростання. Після формування калюсної тканини з експлантатів калюс далі переноситься на нове середовище. Цей процес перенесення називається субкультивуванням. При регулярному субкультивуванні на агаризованому середовищі калюсна культура демонструватиме S-фазу або сигмоподібну схему росту під час кожного пасажу.

Розрізняють п'ять фаз росту калюсу: лаг-фазу (де клітини готуються до поділу), експоненціальну фазу (де швидкість поділу клітин найвища), лінійну фазу (поділ клітин сповільнюється, але швидкість розширення клітин продовжує збільшуватися), уповільнення фаза (де швидкість поділу та подовження клітин продовжує зменшуватися), стаціонарна фаза (де кількість і розмір клітин залишаються постійними).[13]

Застосування калюсної культури

Культура калюсу надає інформацію про здатність рослини до регенерації та є хорошим вихідним матеріалом для виділення протопластів. Калюс можна використовувати як інокулят для ініціації суспензійних культур, служити кращим джерелом клітин для генетичних маніпуляцій з геномами рослин і підтримувати необмежений час у стані *in vitro* протягом більш тривалого періоду часу.[30]

1.3.2.2 Суспензійна культура клітин

Габерланд зробив першу спробу виділити поодинокі клітини з листя квіткових рослин [30]. Муір у 1958 році чітко показав, що клітини рослин можна вирощувати в рідких (суспензійних) культурах, подібних до мікроорганізмів. Однак рослинні клітини окремо в популяції культивовані клітини незмінно демонструють цитогенетичні та метаболічні варіації залежно від стадії циклу росту та умов культивування. Цей тип мінливості називається просторовою неоднорідністю [19]. Суспензійна культура — це культивування ізольованих клітин у рідких середовищах. Клітини можна виділити з рослинного матеріалу *in vivo* за допомогою механічних засобів або шляхом ферментативного розщеплення та утворити калюс, індукований з будь-яких експлантів. Культури клітинної суспензії можуть бути ініційовані практично з будь-якої частини рослини, як і культура калюсу. Це найпоширеніший спосіб ініціювання суспензійних культур із калюсу, який уже росте в культурі. Залежно від типу калюсу (розсипчастий калюс або м'який калюс потребує менше зусилля, щоб легко розірватися, ніж компактний калюс) виробляють суспензійні культури. Ці типи калюсу пропонують інокулят для формування суспензійних культур клітин. Для ініціювання клітинних суспензій слід використовувати відносно великі

інокуляти, щоб концентрація вивільненої речовини швидко зростала. Такі типи клітин представляють нижчий рівень організації, ніж культура тканини або калюсу, і їх часто називають клітинними культурами. Це рідке середовище, як правило, подібне за складом до того, на якому вирощується калюс. Однак може знадобитися коригування концентрації гормонів і неорганічних солей. Перемішування необхідне для суспензійних культур з трьома цілями: воно служить для руйнування клітинних агрегатів; він підтримує рівномірний розподіл клітин різних розмірів і форм, а клітинні згустки в середовищі забезпечують газообмін для клітин, щоб підтримувати клітинне дихання в рідкому середовищі. У міру поділу клітин інокуляти розпадаються і виділяють нові кластери клітин, які знову руйнуються, утворюючи окремі клітини та інші невеликі групи. Через природну тенденцію рослинних клітин злипатися разом, не завжди можливо виростити суспензію лише окремих клітин. Різні типи суспензійних культур виділено на рис. 2.7

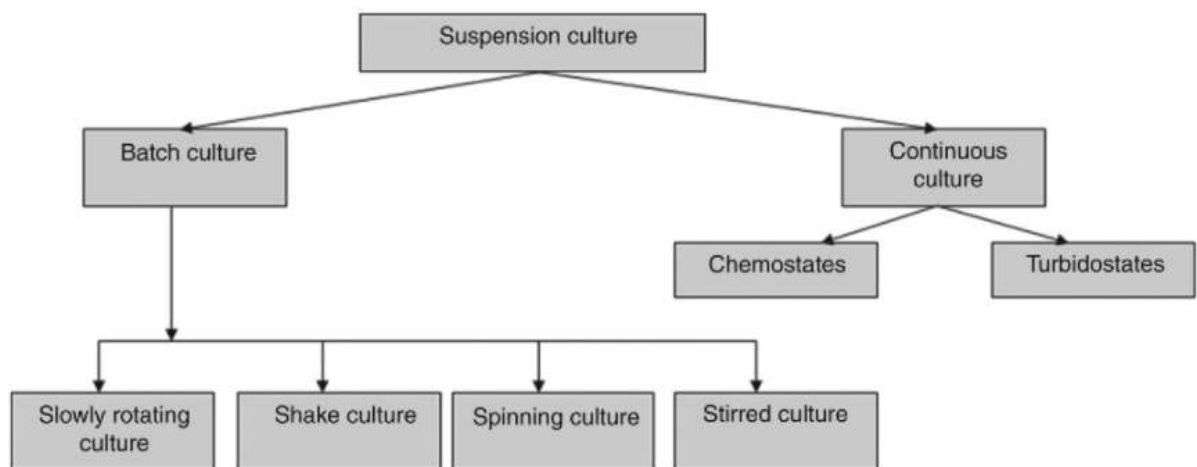


Рис. 1.7. Типи суспензійної культури

Методика суспензійної культури

Суспензійні культури клітин вищих рослин у синтетичних середовищах продемонстрував Торрі. У 1965 році Ерл і Торрі запропонували певне середовище для клітин, виділених з *Convolvulus*. Колонії були сформовані на запропонованих ним середовищах. Пізніше кілька дослідників визначили різні середовища для різних культур клітин рослин. Для ініціації клітинних культур при низькій

щільності інокулята використовується кондиціоноване середовище. Культуральне середовище для клітинної суспензії та її кондиціонування було продемонстровано Торресом. Це передбачає відділення клітинної культури високої щільності від культурального середовища низької щільності бар'єром, який забезпечує дифузію розчинених речовин і повітря. Існує дуже багато методів, які використовуються для культивування культури клітин. Серед них найстарішою і найбільш часто використовуваною технікою є методика клітинного посіву Бергмана (рис. 1.8). У цій методиці вільні клітини суспендують у рідкому середовищі, якщо наявні клітинні агрегати, культуру фільтрують), а культуральне середовище з агаром (0,6-1%) охолоджують і підтримують при 35°C на водяній бані (назад). Рівний об'єм цих рідких і агаризованих середовищ змішують і швидко розкладають у чашці Петрі, щоб клітини рівномірно розподілилися тонким шаром після затвердіння. Чашки Петрі закривають парафіном і досліджують за допомогою інвертованого мікроскопа для позначення окремих клітин (маркування роблять на зовнішній поверхні чашки). Планшети інкубують у темряві при 25°C і клітинні колонії, що розвиваються з мічених окремих клітин, використовують для отримання одноклітинних культур. Для вирощування окремих клітин також були розроблені різні інші методи (наприклад, техніка використання фільтрувального паперу, мікрокамерна техніка, біореактори тощо). Техніка мікрокамери була вперше спробована Де Роппом, потім успішно виконана Джонсом та ін. У цій техніці краплю середовища, що містить одну клітину, поміщають на предметне скло мікроскопа та покривають трьома різними покривними скельцями таким чином, щоб утворилася мікрокамера. Перед розміщенням кожного покривного скельця в асептичні умови наливають мінеральну олію. Сформована мікрокамера захищає рослинну клітину від втрати води, але забезпечує газообмін (75). Ці культивовані клітини можна зберегти шляхом кріоконсервації. Мустафа та ін. продемонстрували двоетапну техніку заморожування з контрольованою швидкістю, також відому як метод повільного заморожування для тривалого

зберігання, який успішно застосовувався до широкого діапазону рослинних суспензій.[30]

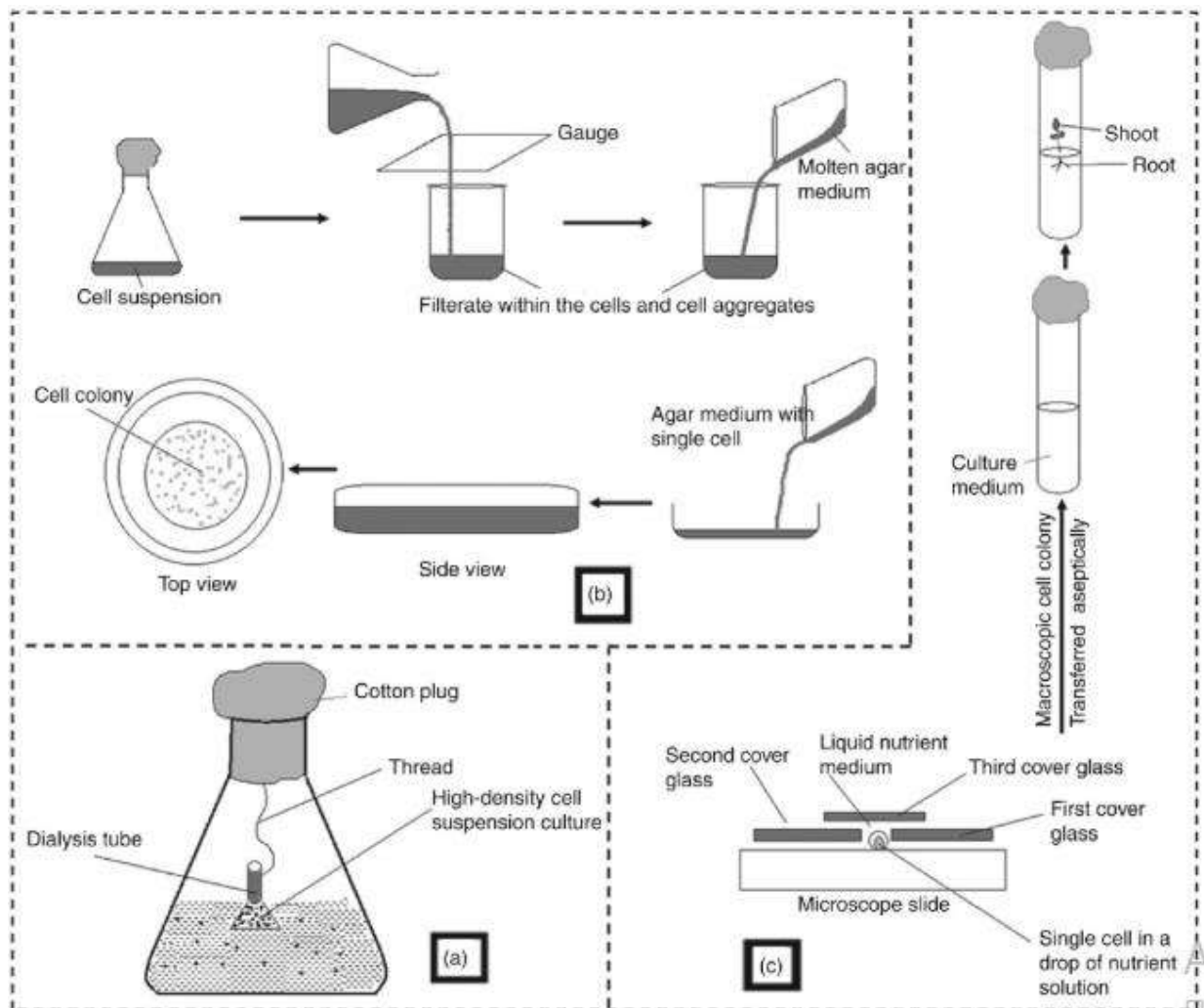


Рис. 1.8 (а) Пристрій для кондиціонування середовища для культивування клітин низької щільності; (b) методика висівання клітин Bergmann для культивування окремих клітин; (c) техніка мікрокамери для посіву клітин.

РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи

2.1 Матеріали необхідні для дослідження

Предметом дослідження в дипломній роботі було обрано рослини *Nepenthes mirabilis*. Для проведення експериментів використовувалося стандартне лабораторне обладнання та реактиви, необхідні для асептичної роботи й культивування рослинної культури. Зокрема, застосовувалися такі інструменти, як пінцети та скальпелі для роботи з експлантатами, стерильні колби з дистильованою водою для промивання експлантатів, чашки Петрі для культивування тканин, пробірки для зберігання екстрактів та 70% етанол для дезінфекції інструментів і стерилізації експлантатів.

2.1.1 Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження є рослина *Nepenthes mirabilis*, представник роду *Nepenthes*. В цьому контексті, об'єктом є сама рослина у всій своїй структурній та біологічній складності, включаючи її стебло, листки-пастки та клітини.

2.1.2 Характеристика живильного середовища

Живильне середовище є ключовим елементом для успішного культивування калюсу рослин, оскільки забезпечує всі необхідні поживні речовини, які сприяють росту і диференціації клітин. Основні компоненти живильного середовища включають макроелементи, такі як азот (N), фосфор (P), калій (K), кальцій (Ca), магній (Mg) та сульфати (SO_4^{2-}). Ці елементи необхідні для загального росту і розвитку рослин, включаючи синтез білків, нуклеїнових кислот та інших важливих молекул. Крім того, до складу середовища входять мікроелементи, серед яких залізо (Fe), мідь (Cu), цинк (Zn), бор (B), марганець (Mn), молібден (Mo) та хлор (Cl), які, хоч і необхідні в менших кількостях, грають важливу роль у багатьох ферментативних процесах.

У процесі культивування калюсу рослин найчастіше використовують стандартні живильні середовища, такі як середовище Мурасіге-Скуга (MS), яке містить високі концентрації нітратів та інших макро- і мікроелементів, або середовище Гамборга (B5), яке підходить для вирощування калюсів та інших

типів клітин. Для стимулювання утворення калюсів зазвичай використовуються підвищені концентрації цитокинінів.

Живильне середовище Мурасіге-Скуга містить глюкозу як джерело вуглеводів, а також високий рівень глютаміну та інших амінокислот. Відсутність окремих складових частин у середовищі може призвести до несприятливих наслідків для розвитку рослин, тому добір компонентів повинен бути ретельно обґрунтований.

Однією з переваг Мурасіге-Скуга є те, що його склад можна змінювати в залежності від потреб рослин, що дозволяє досягти оптимального рівня росту та розвитку рослин у культурі *in vitro*. Живильне середовище Мурасіге-Скуга використовують для культивування різних типів рослин, таких як тканини, клітини, протопласти, експлантати, з метою вивчення фізіології, біології, генетики та інших аспектів життєдіяльності рослин.

Таблиця 2.1 Макро- та мікроелементи у складі середовища Мурасіге-Скуга

Макроелементи	Мг/л	Мікроелементи	Мг/л
NH ₄ NO ₃	1650	KI	0.83
KNO ₃	1900	H ₃ BO ₃	6.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	MnSO ₄ ·H ₂ O	
KH ₂ PO ₄	170	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
(NH ₄) ₂ SO ₄		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
NH ₄ H ₂ PO ₄		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
NaNO ₃		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O		AlCl ₃	
KCl		NiCl ₂ ·6H ₂ O	
		FeCl ₃ ·6H ₂ O	
		Na ₂ ·EDTA	37.3
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
Сахароза (г)			30

pH	5.7-5.8
----	---------

Таблиця 2.2 Вітаміни та гормони у складі середовища Мурасіге-Скуга

Компонент	Мг/л
Інозитол	100
Нікотинова кислота	0.5
Піридоксин	0.5
Тіамін	0.1
Гліцин	2.0

Живильне середовище для більшості культур тканин рослин складається з п'яти груп інгредієнтів: неорганічні поживні речовини, джерело вуглецю, вітаміни, регулятори росту та органічні добавки. (Таблиці 2.1 і 2.2).

Неорганічні поживні речовини. Неорганічні поживні речовини складаються з мінеральних солей, які забезпечують потреби в макро- і мікроелементах. Для більшості цілей поживне середовище має містити кожного нітрату та калію. Амоній може бути необхідним для деяких культур, хоча кількості, що перевищують норму, можуть бути шкідливими. Однак завжди слід пам'ятати, що перенесення експлантатів на нове середовище може призвести до уповільнення темпів росту. Адекватну оцінку придатності середовища можна зробити лише після 2-3 культивувань. Будь-яку потребу в натрії і хлоридах можна забезпечити за рахунок солей кальцію, фосфатів або мікроелементів.

Вуглець і джерело енергії. Більшість клітин віддають перевагу сахарозі 2-4%. Її можна замінити глюкозою. Фруктоза також використовується, але інші цукри є поганими джерелами вуглеводів.

Вітаміни. У склад середовища входять різні вітаміни, такі як тіамін (вітамін B1), піридоксин (вітамін B6), нікотинова кислота (вітамін B3), пантотенова кислота (вітамін B5), рибофлавін (вітамін B2) та інші. Вони необхідні для багатьох процесів, таких як дихання, фотосинтез, обмін речовин та ріст клітин.

Таким чином, вітаміни є важливими складовими живильного середовища Мурасіге-Скуга, оскільки вони забезпечують нормальний ріст і розвиток рослин,

що є важливим для їх подальшого використання в мікророзмноженні та інших біотехнологічних застосуваннях.

Гормони. Гормональна добавка поділяється на дві категорії. Вироблення калюсу в більшості випадків є успішним за допомогою лише 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота (2-4 Д). Додавання цитокініну (кінетин, зеатин або бензиладенін) може бути корисним, але в більшості випадків достатньо лише 2,4-Д. Якщо культура тканини призначена для морфогенезу, комбінація нафталіноцтової кислоти (НОК) та бензиладеніну, зеатину або ізопентеніладеніну, можливо, буде кращою. Хоча 2,4-Д індукує поділ клітин, сполука має тенденцію пригнічувати морфогенез. НОК можна замінити на ІОК, але останню бажано стерилізувати через фільтр. ІОК також може розкладатися ферментами з клітин. Сполукою, яка ефективно індукує утворення калюсу в злаках, є 2,4-5-трихлорфеноксіоцтова кислота (2,4-5-Т).

Важливо враховувати правильний баланс рН середовища, який варіюється залежно від типу рослин, але зазвичай становить 5,5-6,5. Регулювання рН здійснюється додаванням HCl або NaOH. Стерилізація середовища проводиться шляхом автоклавування (при температурі 121°C протягом 15-20 хвилин), що забезпечує усунення мікроорганізмів і запобігає забрудненню.

2.1.3 Характеристика фітогормонів

Фітогормони, або рослинні гормони, є ключовими регуляторами росту і розвитку рослин, впливаючи на широкий спектр фізіологічних процесів. Вони діють у дуже малих концентраціях, але їхній вплив на життєвий цикл рослин є незамінним. Фітогормони класифікуються на кілька основних груп: ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизова кислота, етилен, брасиностероїди. Кожна з цих груп має специфічну функцію і бере участь у регуляції різних аспектів життєдіяльності рослин.

Фітогормони, такі як ауксини, гібереліни, цитокініни та абсцизова кислота, можуть бути додані до поживних середовищ для підвищення культурного росту і розвитку рослин.

Ауксини зазвичай додають до середовищ для підтримки ініціації корневих та брунькових культур, а також для збільшення урожайності культурних рослин.

Гібереліни, які зазвичай знаходяться в верхівках рослин, можуть додаватися до середовищ для стимулювання зростання пагонів та підтримки ініціації брунькових культур.

Цитокініни, які зазвичай присутні в молодих тканинах рослин, додають до середовищ для стимулювання клітинного поділу, формування зародків, розвитку бруньок і підтримки вегетативного зростання рослин.

Абсцизова кислота, яка відповідає за стресову відповідь рослин, може додаватися до середовищ для підвищення толерантності рослин до стресу, такого як засолення, посуха, низька температура та інші фактори несприятливого середовища.

Кожен з фітогормонів має свої специфічні функції та може бути використаний для стимулювання певних процесів росту і розвитку рослин у культурі *in vitro*.

2.1.4 Стерилізація

Процедура стерилізації експлантів залежить від типу експлантів, які використовуються для процесу культивування тканин. Тривалість хімічного впливу на експлант і використовуваний хімічний агент також визначаються на основі природи експлантата. Тому що надмірний вплив агресивних хімічних речовин на м'які експлантати може пошкодити їх тканини.

Хімічна стерилізація експлантів є одним із методів стерилізації рослинного матеріалу для введення його в культуру *in vitro*. Для непентесу потрібно кілька методів хімічної стерилізації, таких як:

Обробка експлантів водним розчином хлориду ртуті (HgCl_2). Цей метод забезпечує ефективне усунення мікробної флори та зменшує ризик контамінації культури. Інкують експланти у розчині сулими протягом 5-15 хвилин, в залежності від типу матеріалу та концентрації розчину, після чого їх необхідно промити декількома порціями стерильного фізіологічного розчину або дистильованої води.

Обробка експлантів етанолом. Експланти можуть бути занурені в 70% етанол на кілька хвилин. Цей метод є ефективним для видалення внутрішньої мікрофлори, яка може знаходитися всередині рослин.

Обробка експлантів антибіотиками. Іноді в культурному середовищі дають антибіотики, такі як тетрациклін або клорамфенікол, для зниження шкідливих бактерій, грибків та інших мікроорганізмів. Цей метод може бути використаний як додатковий захист для експлантів.

Після стерилізації експланти можна використовувати для культивування в культурному середовищі *in vitro*, де вони можуть розвиватися без конкуренції з бактеріями та іншими мікроорганізмами.

2.2 Матеріали дослідження

2.2.1 Методика приготування калюсогенного живильного середовища

Живильне середовище Мурасіге та Скоуга (Murashige and Skoog, MS) - це широко використовуване середовище для культивування рослин *in vitro*. Основними складовими MS-середовища є макро- та мікросолі, сахароза, вітаміни та фітогормони. Для більш зручного приготування поживних середовищ маточні розчини макро- і мікроелементів готують шляхом зважування і розчинення кожного компонента окремо в новій порції бідистильованої води. Основна методика приготування живильного середовища MS наступна:

1. Приготування розчину макро- та мікросолей.

Макро MS - 1 л розчину солей; по 100 мл розчину солей в 1 л поживного середовища:

NH_4NO_3 – 16,5 г; KNO_3 – 19,0 г; CaCl_2 – 3,3 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 4,2 г; KH_2PO_4 – 1,7 г.

Мікро MS - 100 мл розчину солей; по 1 мл розчину солей в 1 л поживного середовища:

H_3BO_3 – 620 мг; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 2,33 г; $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 860 мг; KI – 83 мг, розчинити окремо; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 25 мг, розчинити окремо; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 2,5 мг; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 2,5 мг.

2. Приготувати розчин Fe – хелату.

На 100 мл розчину беруть $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 557 мг; $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 745 мг. Наважки розчиняють окремо у бідистиляті, зливають і доводять до кипіння.

Для введення Непентесу в культуру *in vitro* було обрано середовище МС з половинною концентрацією компонентів з додаванням фітогормонів.

Для приготування 1 л середовища МС необхідно взяти наступні кількості маточних розчинів:

Таблиця 2.3

Кількість маточних розчинів на 1 л середовища Мурасіге-Скуга

Компоненти	Кількість
Макросолі, мл	100
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, мл	100
Мікросолі, мл	1
Вітаміни, мл	1
Fe-хелат, мл	5
Інозитол, г	0,1
Сахароза, г	30
Агар, г	13,6

Для індукції калюсу *N. mirabilis* було використано середовище $\frac{1}{2}$ Мурасіге-Скуга + 0,5 мг/л 6-бензиламінопурину(6-БАП), 0,5мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти(2,4-Д).

Таблиця 2.4

Складові досліджуваного середовищ для культивування *Nepenthes mirabilis*

Компоненти	Кількість
Макросолі, мл	50
CaCl ₂ *2H ₂ O, мл	50
Мікросолі, мл	0,5
Вітаміни, мл	0,5
Fe-хелат, мл	2,5
Інозитол, г	0,05
Сахароза, г	15
Агар, г	6,8
Бензиламінопурин (БАП), мл	0,5
2,4-дихлорфеноксіцтова кислота (2,4-Д), мл	0,5

2.2.2 Методика приготування рідкого живильного середовища

Для отримання суспензійної культури було обрано середовище МС з додаванням ауксинів та цитокінінів.

Для приготування 1 л середовища МС необхідно взяти наступні кількості маточних розчинів:

Таблиця 2.5

Кількість маточних розчинів на 1 л середовища Мурасіге-Скуга

Компоненти	Кількість
Макросолі, мл	100
CaCl ₂ *2H ₂ O, мл	100
Мікросолі, мл	1
Вітаміни, мл	1
Fe-хелат, мл	5
Інозитол, г	0,1

Сахароза, г	30
-------------	----

Для отримання суспензійної культури *N. mirabilis* було використано середовище Мурасіге-Скуга + 1мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д) та 0,5мг/л Кінетину.

Таблиця 2.6

Складові досліджуваного рідкого середовища для культивування *Nepenthes mirabilis*

Компоненти	Кількість
Макросолі, мл	100
CaCl ₂ *2H ₂ O, мл	100
Мікросолі, мл	1
Вітаміни, мл	1
Fe-хелат, мл	5
Інозитол, г	0,1
Сахароза, г	30
Кінетин, мл	0,5
2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота (2,4-Д), мл	1

2.2.3 Схема стерилізації експлантатів *Nepenthes mirabilis*

Стерилізація рослинних експлантатів спиртом є одним із методів, які використовують для дезінфекції матеріалу перед посівом на культуральне середовище.

Схема стерилізації експлантатів *Nepenthes mirabilis* включає такі кроки:

- Збір матеріалу для експлантації.
- Підготовка робочої зони, дезінфекція рук, інструментів та робочої поверхні.
- Обрізання експлантатів.
- Обробка експлантатів у спирті (70% етанол) протягом 60 секунд, щоб знищити зовнішні мікроорганізми та зменшити забруднення на поверхні.

- Промивання експлантатів у дистильованій воді декілька разів, протягом 10 хв кожен, для видалення залишків дезінфікуючого розчину.
- Перенесення експлантатів на живильне середовище.

Цей процес повинен проводитись в стерильних умовах, щоб запобігти зараженню експлантатів бактеріями, грибками або вірусами.

2.2.4 Індукція утворення калюсу *Nepenthes mirabilis*

Отримання калюсу *Nepenthes mirabilis* включає кілька етапів, включаючи підготовку експлантату, стерилізацію та індукцію.

Стерильні листяні сегменти *Nepenthes mirabilis* переносили у банки з живильним середовищем. Для цього сегменти обережно викладали на середовище з використанням стерильного пінцета.

Після посіву банки герметично закривалися кришками для запобігання втрати вологи і проникнення контамінантів. Потім інкубували в темряві при температурі $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Інкубація в темряві була обрана для стимулювання калюсогенезу, оскільки світло може інгібувати цей процес у деяких видів рослин.

Спостереження за розвитком калюсу проводили щотижня, починаючи з першого тижня після посіву. Чашки повертали у темний інкубатор після кожного огляду, щоб мінімізувати вплив світла. Інкубацію продовжували протягом 4 тижнів.

2.2.5 Суспензійна культура калюсу *Nepenthes mirabilis*

Суспензійна культура є важливим методом мікроклонального вирощування рослин, який дозволяє отримувати великий обсяг клітинної маси для подальшого вивчення, біотехнологічних застосувань або масового розмноження рослин. У випадку з *Nepenthes mirabilis*, суспензійна культура може сприяти швидшому росту калюсу та забезпечити більш однорідні умови для його розвитку порівняно зі стійкою (твердою) культурою.

2.2.5.1 Підготовка калюсу для суспензійної культури

Калюс, отриманий з попередніх експериментів на твердих середовищах, був використаний як початковий матеріал для суспензійної культури. Для цього

калюс було вирізано стерильними скальпелями на дрібні фрагменти розміром приблизно 1-2 мм³.

2.2.5.2 Живильне середовище

Вибрано базове середовище MS з додаванням оптимальних концентрацій фітогормонів, визначених на попередньому етапі дослідження. Концентрації фітогормонів були наступними:

- Кінетин – 0,5 мг/л;
- 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота (2,4-Д) – 1 мг/л.

2.2.4.3 Посів суспензії

Фрагменти калюсу були занурені в стерильну рідку форму живильного середовища та механічно роздрібнені за допомогою шейкеру зі швидкістю 100 об/хв протягом 10 хвилин для отримання однорідної суспензії клітин.

2.2.4.4 Інкубація

Отримані суспензії розподілилися по стерильним флаконам об'ємом 100 мл. Флакони інкубувалися на шейкері при температурі $25 \pm 2^\circ\text{C}$ і частоті обертання 120 об/хв. Інкубація тривала протягом 4 тижнів, протягом яких регулярно проводилися щотижневі заміри росту калюсу та його морфологічні оцінки.

2.2.5 Дослідження антифунгіцидної дії методом паперових дисків

2.2.5.2 Підготовка екстрактів

Екстракти з клітинної суспензії *Nepenthes mirabilis* отримували методом фільтрації та центрифугування. Після культивування клітин у суспензії протягом 21 дня, клітинну масу відокремлювали від рідкого середовища шляхом центрифугування (3000 об/хв). Водні та органічні екстракти готували шляхом екстрагування рідкого середовища розчинниками (метанол, етанол, вода), після чого екстракти випарювали до сухого залишку і розчиняли у невеликій кількості відповідного розчинника для отримання концентрованого екстракту.

2.2.5.3 Дослідження антифунгіцидної дії

Для проведення тесту використовували стерильні паперові диски діаметром 5 мм. Паперові диски стерилізували в автоклаві при температурі 121°C

протягом 15-20 хвилин, що забезпечувало стерильність матеріалу перед нанесенням екстрактів. Диски занурювали в отримані екстракти так, щоб вони наситилися досліджуваною рідиною рівномірно, після чого їх просушували під стерильними умовами. Це дозволяло забезпечити однакову кількість екстракту на кожному диску для подальших експериментів.

Для тестування антифунгіцидної активності було обрано патогенний гриб *Botrytis cinerea*, відомий як збудник сірої гнилі, що часто вражає рослини. Гриб вирощували на агаризованому середовищі Сабуро, яке забезпечує сприятливі умови для росту грибів. Середовище готували за стандартним протоколом, розливаючи його у стерильні чашки Петрі і даючи йому застигнути. Після цього чашки інокулювали спорами гриба. Для цього готували спорову суспензію гриба *Botrytis cinerea* у стерильному фізіологічному розчині. Спори рівномірно розподіляли на поверхні агаризованого середовища за допомогою стерильного шпателя для рівномірного росту міцелію по всій поверхні чашок.

Після підготовки та інокуляції чашок Петрі з грибом *Botrytis cinerea*, на поверхню кожної чашки рівномірно розміщували паперові диски, просочені екстрактами *Nepenthes mirabilis*. Для цього використовували стерильний пінцет, щоб уникнути додаткового забруднення. Кожна концентрація екстракту (50%, 75%, 100%) тестувалася у трьох повторностях, щоб забезпечити можливість отримати надійні й достовірні результати. Для контролю також використовували паперові диски, просочені виключно стерильною дистильованою водою, щоб визначити базовий рівень росту гриба без впливу активних речовин.

Після нанесення дисків, експериментальні чашки інкубували у термостаті при температурі 25°C. Інкубація тривала протягом 72 годин, що дозволяло спостерігати за розвитком грибів і визначати зони пригнічення росту навколо паперових дисків.

Через 72 години після інкубації результати оцінювали шляхом вимірювання діаметрів зон пригнічення росту гриба навколо паперових дисків. Для цього використовували лінійку або спеціальні мікробіологічні інструменти. Величину зон інгібування вимірювали в міліметрах, після чого обчислювали

середнє значення для кожної концентрації екстракту. Це дозволяло зробити висновки щодо залежності ефективності екстрактів від їх концентрації.

Для забезпечення надійності та статистичної значущості результатів проводився статистичний аналіз отриманих даних. Для цього обчислювали середні значення діаметрів зон інгібування, а також стандартні відхилення для кожної серії експериментів. Це дозволяло оцінити точність експериментальних даних і зробити висновки щодо відмінностей між ефективністю різних концентрацій екстрактів *Nepenthes mirabilis*.

РОЗДІЛ 3. Результати дослідження

3.1 Особливості стерилізації

Стерилізація експлантатів *Nepenthes mirabilis* спиртом проводилась з метою усунення можливих бактеріальних та грибкових забруднень, що може вплинути на успішне культивування калюсу *in vitro*. Експеримент проводився з використанням листків рослини.

Рослинний матеріал було зібрано зі зрілих глечиків *Nepenthes mirabilis* та ретельно промито під проточною водою, щоб видалити будь-яке поверхнєве сміття та забруднення.

Для стерилізації використовували 70% етиловий спирт. Експлантати занурювали в спирт на 1-2 хвилини, що дозволило знизити кількість мікроорганізмів на їх поверхні. Після обробки спирт зливали, а експлантати кілька разів промивали стерильною дистильованою водою, щоб повністю видалити залишки спирту.

Результати стерилізації показали, що така обробка значно знизила ризик контамінації мікроорганізмами. Всі типи експлантатів продемонстрували позитивний результат після стерилізації спиртом, що підтвердило ефективність застосованого методу. Після перенесення на живильне середовище спостерігався успішний розвиток калюсу на всіх оброблених експлантатах.

Отже, стерилізація експлантатів *Nepenthes mirabilis* спиртом є ефективним методом, що дозволяє уникнути забруднення мікроорганізмами та забезпечити успішне утворення калюсу для подальших досліджень і культивування *in vitro*.

3.2 Результати утворення калюсу на експлантатах *Nepenthes mirabilis*

У ході експериментів з культивування калюсу у *Nepenthes mirabilis* було виявлено, що процес його формування відбувався досить повільно порівняно з іншими видами рослин. Незважаючи на застосування оптимізованого живильного середовища Мурасіге-Скуга (МС) з додаванням фітогормонів, таких як 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота (2,4-D) у концентрації 0,2 мг/л та 6-бензиламінопурину 2 мг/л, розвиток калюсу відбувався з низькою швидкістю.

Перші ознаки калюсогенезу з'являлися тільки через 3 тижні після початку культивування. Протягом першого тижня не було зафіксовано жодних помітних змін на поверхні експлантатів. Лише після 21 дня з'явилися невеликі локалізовані осередки калюсних клітин. Протягом наступних тижнів спостерігалось поступове збільшення об'єму калюсу, але його темпи залишалися значно нижчими, ніж очікувалося.

3.2.1 Морфологічні характеристики калюсу

Калюс, який утворювався на поверхні експлантатів, мав щільну структуру і світло-зелене забарвлення. Його поверхня була гладкою, без явних ознак диференціації або розвитку органогенезу. Візуальний аналіз показав, що калюс розвивався переважно на краях розрізів листкових сегментів і не поширювався по всій поверхні експлантату. Це свідчить про повільну проліферацію клітин та низький рівень клітинного поділу в умовах даного експерименту.

Отримані результати підтверджують, що процес формування калюсу у *Nepenthes mirabilis* відбувається повільно, навіть за оптимізованих умов культивування. Незважаючи на це, клітини калюсу залишаються життєздатними, що відкриває перспективи для подальшого дослідження процесів регенерації та диференціації в цих умовах. Необхідно розробити додаткові стратегії для прискорення росту калюсу, такі як модифікація складу живильного середовища або використання нових стимуляторів росту.

3.3 Результати культивування суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis*

Дослідження культивування суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis* включало тривалий процес спостереження за динамікою росту клітин, визначення кількісних показників їх проліферації на різних етапах культивування, а також оцінку морфологічних і фізіологічних характеристик клітин. Результати експерименту дозволяють оцінити ефективність культивування клітин у суспензії та надати рекомендації для подальшої оптимізації цього процесу.

3.3.1 Кількісні показники росту клітин суспензійної культури

Культивування клітин проводилось на рідкому живильному середовищі Мурасіге-Скуга (МС), з додаванням фітогормонів (2,4-D у концентрації 1 мг/л та кінетин у концентрації 0,5 мг/л). Під час експерименту були виявлені кілька фаз росту суспензійної культури клітин, що підтверджувалося збільшенням кількості клітин та їхньою сухою масою на різних етапах культивування.

3.3.1.1 Лаг-фаза

Лаг-фаза є першим етапом росту клітин у суспензійній культурі, і вважається важливою частиною будь-якого клітинного культивування. Це період, протягом якого клітини адаптуються до нових умов середовища, налаштовують свої внутрішні метаболічні процеси та підготовлюються до активного ділення. У цьому етапі відбувається активація ферментів, синтез необхідних білків і адаптація до нового живильного середовища, що може включати синтез нових метаболітів або зміни в транспорті речовин через мембрани клітин.

У випадку культивування клітин *Nepenthes mirabilis*, лаг-фаза тривала відносно довго, приблизно 5-7 днів. Ця тривалість обумовлена складною структурою клітин та високою адаптивною здатністю до умов, що були створені в рідкому середовищі Мурасіге-Скуга (МС). Перші дні культивування не показували значного приросту як у кількісному показнику клітин, так і в біомасі. Це типова ситуація для клітинних культур, які мають тривалий час адаптації до штучних умов, особливо для таких специфічних рослин, як *Nepenthes mirabilis*, що належать до групи хижих рослин.

3.3.1.1.1 Фізіологічні процеси у клітинах під час лаг-фази

У цей період клітини *Nepenthes mirabilis* зазнали серії внутрішніх змін, спрямованих на адаптацію до нового рідкого середовища. Одним із головних процесів, що відбувається під час лаг-фази, є перебудова клітинного метаболізму. Клітини активують синтез ферментів, що відповідають за використання поживних речовин, доступних у середовищі. Для *Nepenthes mirabilis*, як хижої рослини, що в природі живиться переважно з атмосфери та здобуває азот із

уловлених комах, адаптація до рідкого середовища з неорганічними поживними речовинами вимагає суттєвих внутрішньоклітинних перебудов.

3.3.1.1.2 Кількісні показники лаг-фази

Незважаючи на активні метаболічні процеси, кількість клітин у цей період практично не змінювалася. У перший день культивування кількість клітин становила в середньому 5×10^4 клітин/мл. Протягом наступних кількох днів спостерігалось лише незначне збільшення їх кількості — до 8×10^4 клітин/мл на п'ятий день культивування.

День культивування	Кількість клітин ($\times 10^4$ клітин/мл)
1-й день	5
3-й день	6
5-й день	8

3.3.1.1.3 Особливості лаг-фази у суспензійній культурі *Nepenthes mirabilis*

Тривалість лаг-фази для *Nepenthes mirabilis* є відносно довшою порівняно з іншими рослинними видами, які зазвичай адаптуються до умов рідкого культивування швидше (2-3 дні). Це може бути пов'язано з унікальними фізіологічними властивостями хижих рослин, які в природних умовах ростуть в бідних на поживні речовини субстратах і пристосовані до екстремальних умов середовища.

Також важливо зазначити, що довга лаг-фаза може бути наслідком фізіологічного стресу, який відчувають клітини під час переходу з твердого на рідке середовище. Клітини повинні адаптувати свою клітинну стінку та систему транспорту речовин до нових умов. Особливо це актуально для клітин *Nepenthes mirabilis*, які звикли до специфічного середовища проживання і у процесі штучного культивування можуть демонструвати повільну реакцію на зміну умов.

3.3.1.2 Експоненційна фаза

Експоненційна фаза, або фаза логарифмічного росту, є одним з найважливіших етапів розвитку суспензійної культури клітин. У цей період

клітини активно діляться, що призводить до стрімкого збільшення їх кількості та біомаси. Основною характеристикою експоненційної фази є те, що клітини мають оптимальні умови для росту, включаючи доступ до поживних речовин, кисню та простору для проліферації. В даній фазі клітинний цикл проходить інтенсивно, і клітини досягають максимальної швидкості ділення.

Для клітин *Nepenthes mirabilis* експоненційна фаза тривала з 7-го по 21-й день культивування, протягом якого спостерігалось стрімке збільшення кількості клітин і біомаси. Це свідчить про те, що клітини успішно адаптувалися до рідкого живильного середовища і почали активно використовувати його ресурси для росту і розвитку.

3.3.1.2.1 Біометричні показники під час експоненційної фази

Протягом експоненційної фази кількість клітин у суспензійній культурі зростала в геометричній прогресії, що є типовим для цього етапу розвитку культури. У клітин було достатньо поживних речовин і простору для активного ділення, що дозволило досягти максимальної швидкості росту. Зокрема, кількість клітин збільшувалася майже у 6 разів за цей період:

День культивування	Кількість клітин ($\times 10^5$ клітин/мл)
7-й день	3,4
14-й день	8,2
21-й день	15,0

Протягом експоненційної фази суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis* спостерігається значне збільшення кількості клітин. Клітини діляться дуже активно завдяки достатній кількості поживних речовин у середовищі. На 7-й день кількість клітин складає $3,4 \times 10^5$ клітин/мл, на 14-й день вона зростає до $8,2 \times 10^5$ клітин/мл, а на 21-й день досягає $1,5 \times 10^6$ клітин/мл. Це свідчить про ефективний ріст клітин у цей період, коли умови живильного середовища залишаються оптимальними для їх розмноження.

3.3.1.2.2 Метаболічна активність клітин під час експоненційної фази

Під час експоненційної фази відбувається максимальна метаболічна активність клітин, що забезпечує інтенсивний синтез біомолекул, таких як білки, нуклеїнові кислоти та ліпіди. Це сприяє активному клітинному діленню та збільшенню кількості клітин. Важливо, що саме в цей період клітини мають найвищу фізіологічну активність, що робить експоненційну фазу ідеальним етапом для збирання клітин або продуктів їх метаболізму в біотехнологічних дослідженнях.

Для *Nepenthes mirabilis* в цей період важливою особливістю є значне зростання клітинної маси, а також активне утворення вакуолей та зміни в клітинній стінці. Клітини починають активно запасати поживні речовини, а також збільшують обсяги вакуолей, що відображає зростання клітинного об'єму.

Під час експоненційної фази також спостерігається активне поглинання поживних речовин із середовища. Концентрація цукрів, мікро- та макроелементів у живильному середовищі поступово знижується, що свідчить про активне споживання клітинами доступних ресурсів для побудови біомаси. У цей період важливо підтримувати оптимальні умови для росту, такі як регулярна аерація, постійна температура і рівень освітлення.

3.3.1.2.3 Зовнішні фактори, що впливають на експоненційну фазу

Швидкість росту клітин під час експоненційної фази може значно варіюватися в залежності від зовнішніх умов. Важливими параметрами для підтримання оптимального росту є аерація, температура та освітлення. У випадку *Nepenthes mirabilis* було встановлено, що оптимальна температура для росту клітин становить 25-27°C. Температурні коливання можуть призвести до уповільнення росту або, навпаки, стимуляції певних стресових процесів, таких як утворення захисних метаболітів.

Аерація є ще одним ключовим фактором, який забезпечує достатнє постачання кисню клітинам. У суспензійній культурі клітини ростуть у рідкому середовищі, тому для забезпечення рівномірного постачання кисню використовувалося струшування. У випадку даного експерименту оптимальним

рівнем струшування була швидкість 100 об/хв, що забезпечувало достатній доступ кисню без пошкодження клітин.

Поживне середовище відіграє вирішальну роль у забезпеченні експоненційного росту клітин. Для *Nepenthes mirabilis* використовувалося середовище Мурасіге-Скуга з додаванням фітогормонів, таких як 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота (2,4-D) і кінетин. Ці фітогормони сприяли стимуляції проліферації клітин і підтримці їх у стадії активного поділу.

2,4-D у концентрації 1 мг/л активізувала клітинний цикл, забезпечуючи високу швидкість ділення клітин. Кінетин у концентрації 0,5 мг/л стимулював диференціацію клітин, що дозволяло зберігати культуру у стані проліферації і одночасно запобігати передчасному старінню клітин.

3.3.1.3 Стаціонарна фаза культивування суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis*

Стаціонарна фаза є третьою стадією росту суспензійної культури клітин, яка характеризується стабілізацією кількості клітин і досягненням максимальної біомаси. У цій фазі темп росту клітин сповільнюється, а швидкість їх ділення врівноважується з темпом загибелі. Це може бути зумовлено різними факторами, такими як виснаження поживних речовин у середовищі, накопичення токсичних метаболітів, зміни у фізичних умовах або генетичні обмеження.

3.3.1.3.1 Біометричні показники у стаціонарній фазі

Протягом стаціонарної фази, яка для клітин *Nepenthes mirabilis* тривала з 21-го до 28-го дня культивування, спостерігалася стабілізація кількості клітин. Після активного росту під час експоненційної фази, кількість клітин досягла максимуму на рівні $1,5 \times 10^6$ клітин/мл, але потім залишалася приблизно на одному рівні.

День культивування	Кількість клітин ($\times 10^6$ клітин/мл)
21-й день	1,5
28-й день	1,5

У стаціонарній фазі кількість клітин залишається стабільною після досягнення максимального рівня росту. На 21-й день кількість клітин сягає

$1,5 \times 10^6$ клітин/мл, і на 28-й день цей показник залишається незмінним. Це свідчить про те, що клітини досягли межі доступних поживних речовин або стикнулися з накопиченням метаболітів, що обмежує їх подальший ріст. У стаціонарній фазі клітини перестають активно ділитися, і кількість живих клітин залишається на стабільному рівні.

3.3.1.3.2 Механізми стабілізації клітинної популяції

У стаціонарній фазі кількість клітин залишається стабільною, оскільки відбувається баланс між поділом і загибеллю клітин. Це може бути зумовлено такими факторами:

- Виснаження поживних речовин: Під час експоненційної фази клітини активно споживали доступні поживні речовини, і до моменту досягнення стаціонарної фази, їх кількість у середовищі значно зменшилася. Нестача таких важливих компонентів, як вуглеводи, мікроелементи та амінокислоти, може призводити до сповільнення росту.
- Накопичення метаболітів: У процесі метаболізму клітини виробляють різноманітні метаболіти, деякі з яких можуть бути токсичними. Накопичення цих сполук може пригнічувати активність клітин і призводити до їх загибелі.
- Генетичні обмеження: Клітини *Nepenthes mirabilis*, як і будь-яка інша культура, можуть стикатися з генетичними обмеженнями, які впливають на їх здатність до поділу та адаптації до нових умов. Це може включати мутації або епігенетичні зміни, що ускладнюють поділ клітин.

3.3.1.3.3 Фізіологічні зміни у клітинах під час стаціонарної фази

У стаціонарній фазі відбуваються важливі фізіологічні зміни в клітинах. Попередньо активна метаболічна діяльність клітин сповільнюється, і вони переходять у режим підтримки життєдіяльності. У цей період клітини можуть адаптувати свої внутрішні механізми до обмежених умов, зокрема, змінювати шляхи метаболізму, щоб зберегти енергію.

Клітини можуть активувати механізми стресу, що забезпечують їх виживання в умовах недостатності ресурсів. Наприклад, деякі з клітин можуть переходити в стан покою, де знижена метаболічна активність, але вони залишаються життєздатними. Це може бути корисно для подальшого відновлення культури, якщо умови знову стануть сприятливими.

Стаціонарна фаза є важливою частиною циклу росту суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis*. Вона характеризується стабілізацією кількості клітин і досягненням максимальної біомаси. Однак важливо пам'ятати, що під час цього етапу клітини можуть зазнавати стресу внаслідок виснаження ресурсів і накопичення метаболітів. Ефективне управління умовами культивування може допомогти підтримувати життєздатність клітин і підготувати їх до подальшої проліферації в наступних фазах.

3.3.1.4 Фаза зниження росту суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis*

Фаза зниження росту є заключною стадією життєвого циклу клітинної культури, що настає після стаціонарної фази. Цей період характеризується поступовим зниженням кількості клітин і скороченням їх біомаси внаслідок того, що фактори стресу та виснаження поживних речовин досягають критичних рівнів.

3.3.1.4.1 Характеристика фази зниження росту

Після стабілізації кількості клітин у стаціонарній фазі, клітини поступово починають втрачати життєздатність, що призводить до скорочення їх чисельності та зменшення біомаси. Це відбувається через повне виснаження середовища, зростання токсичності через накопичення метаболітів і виснаження енергетичних ресурсів клітин.

Зниження кількості клітин: Після 28-го дня культивування кількість клітин почала зменшуватися і до 35-го дня знизилася до $0,8 \times 10^6$ клітин/мл.

3.3.1.4.2 Причини зниження росту

Повне виснаження поживних речовин: Поживне середовище на даному етапі більше не може підтримувати ріст клітин через відсутність ключових

компонентів. У середовищі закінчилися запаси цукрів, амінокислот та інших необхідних речовин, що змусило клітини переходити в стан деградації.

Накопичення токсичних метаболітів: Протягом періоду активного росту клітини виробляли та накопичували різноманітні метаболічні продукти. Багато з цих продуктів, зокрема органічні кислоти або реактивні форми кисню, стали шкідливими для клітин у високих концентраціях. Це підвищувало рівень стресу і провокувало загибель клітин.

Високий рівень клітинного стресу: Через брак ресурсів клітини зазнають значного стресу, що проявляється в порушенні основних метаболічних процесів, збільшенні кількості загиблих клітин і зменшенні здатності до поділу.

3.3.1.4.3 Фізіологічні зміни у клітинах під час фази зниження росту

Під час фази зниження росту клітини зазнають суттєвих змін. Порушуються нормальні клітинні процеси, такі як синтез білків, реплікація ДНК і виробництво енергії. Клітини можуть демонструвати явища апоптозу (програмованої клітинної загибелі) або некрозу внаслідок стресу та порушення метаболізму.

Окрім цього, під час цієї фази клітини втрачають тургор і стають більш крихкими, що ускладнює їх виживання у несприятливих умовах. У деяких випадках клітини можуть перейти в стан покою, коли знижуються всі метаболічні процеси, щоб пережити несприятливі умови.

Фаза зниження росту є неминучим етапом життєвого циклу суспензійної культури клітин, включаючи *Nepenthes mirabilis*. На цьому етапі клітини зазнають виснаження ресурсів і накопичення стресових факторів, що зумовлює їх поступову загибель. Важливо вчасно розпізнати початок цієї фази і використовувати належні стратегії для управління умовами культивування, щоб продовжити життєздатність клітин або отримати максимальну кількість біомаси перед деградацією.

Дослідження культивування суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis* дозволило детально вивчити динаміку росту клітин та їх фізіологічні характеристики на різних фазах життєвого циклу. Протягом культивування було

виділено основні етапи росту: лаг-фаза, експоненційна фаза, стаціонарна фаза та фаза зниження росту. Кожна з них мала свої особливості з точки зору інтенсивності клітинного поділу, накопичення біомаси, змін у метаболічній активності та життєздатності клітин.

У лаг-фазі клітини проходили період адаптації до умов середовища, що характеризувалося низькою швидкістю росту та активацією основних механізмів метаболізму. Під час експоненційної фази клітини демонстрували максимально активний ріст, з швидким збільшенням їх кількості та біомаси. Стаціонарна фаза знаменувалася стабілізацією кількості клітин на високому рівні, але з обмеженням росту через виснаження поживних речовин та накопичення метаболітів. На завершальній стадії зниження росту клітини поступово втрачали життєздатність і кількість клітин зменшувалася.

Зібрані клітини в стаціонарній фазі досягли найбільшої концентрації біомаси, яка була використана для подальших досліджень, зокрема для екстракції біологічно активних речовин (БАР). Під час проведення екстракції з клітинної суспензії *Nepenthes mirabilis* було отримано фракції, що потенційно містять сполуки з антифунгіцидними властивостями. Особливий інтерес викликали вторинні метаболіти, які відомі своїм захисним ефектом у хижих рослин і можуть бути ефективними проти різних патогенних мікроорганізмів, включаючи гриби.

3.4 Дослідження антифунгіцидних властивостей *Nepenthes mirabilis*

3.4.1 Екстракція

Для отримання екстрактів із суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis* було використано кілька етапів, які забезпечували високий рівень чистоти та ефективності вилучення біологічно активних речовин. Процес екстракції розпочався з вирощування суспензійної культури до стаціонарної фази, коли клітини накопичували достатню кількість біомаси та вторинних метаболітів. Після досягнення цієї фази, клітинну біомасу відділяли від культурального середовища шляхом центрифугування. Центрифугування проводили при швидкості 3000 обертів на хвилину. Такий метод дозволив

ефективно осадити клітини, що утворювали щільний осад на дні центрифужних пробірок, тоді як надосадова рідина, що містила культуральне середовище, видалялася.

Після центрифугування клітинну масу кілька разів ретельно промивали стерильною дистильованою водою, щоб видалити залишки середовища, що могло б вплинути на результати екстракції. Такий підхід дозволив підготувати чисту клітинну біомасу для подальшого вилучення вторинних метаболітів.

Для екстракції біологічно активних сполук використовували 70% етанол, який є ефективним розчинником для вилучення широкого спектра метаболітів, включаючи фенольні сполуки, флавоноїди та інші вторинні метаболіти. Клітинну біомасу занурювали в етанол у співвідношенні 1:10 (маса біомаси до об'єму розчинника), що забезпечувало ефективний контакт клітин із розчинником. Процес екстракції проводили на шейкері зі швидкістю 100 обертів на хвилину протягом 24 годин при кімнатній температурі. Струшування клітин дозволяло збільшити поверхню контакту розчинника з клітинними структурами, що сприяло більш ефективному вилученню метаболітів.

Після завершення екстракції отриману суміш фільтрували через паперовий фільтр для видалення твердих частинок клітинної маси. Це забезпечувало отримання чистого екстракту без домішок, які могли б вплинути на точність подальших тестів. Далі екстракт концентрували за допомогою ротаційного випарника при зниженому тиску і температурі 40-45°C. Цей процес дозволив видалити етанол із екстракту, зберігаючи активні сполуки, які були вилучені на попередніх етапах. Ротаційне випарювання є ефективним методом збереження температурно-чутливих речовин, оскільки знижений тиск зменшує точку кипіння розчинника.

Таким чином, метод отримання екстрактів із суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis* включав кілька послідовних етапів: відділення клітин від середовища, промивання, екстракцію за допомогою етанолу та фільтрацію. Отримані екстракти містили вторинні метаболіти, які могли мати протигрибкові

властивості, що робило їх перспективними для подальших досліджень антифунгіцидної активності

Екстракція біологічно активних речовин із суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis* дозволила отримати екстракти, багаті на вторинні метаболіти, характерні для хижих рослин. Проведені дослідження показали наявність широкого спектра біологічно активних сполук, які потенційно мають антифунгіцидні властивості.

3.4.2 Дослідження антифунгіцидних властивостей *Nepenthes mirabilis*

Для дослідження антифунгіцидної активності екстрактів із суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis* був обраний один з найпоширеніших патогенних грибів — *Botrytis cinerea*. Цей грибок є збудником сірої гнилі та завдає значної шкоди сільськогосподарським культурам. Метою експерименту було визначити рівень пригнічення росту *Botrytis cinerea* під впливом екстрактів, багатих на вторинні метаболіти.

Методологія дослідження

Методологія дослідження антифунгіцидної активності екстрактів із суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis* була проведена з використанням методу паперових дисків, що є одним із найпоширеніших і ефективних методів для дослідження антимікробних та антигрибкових властивостей речовин. Цей метод дозволяє оцінити здатність екстрактів пригнічувати ріст патогенних грибів шляхом вимірювання зон інгібування росту навколо дисків, насичених досліджуваними речовинами.

Після отримання екстрактів із суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis* їх наносили на стерильні паперові диски (діаметром 5 мм), які потім розміщували на агаризоване середовище, інокульоване спорами *Botrytis cinerea*. Експериментальні чашки інкубували при температурі 25°C протягом 72 годин.

Кожна концентрація екстракту тестувалася у трьох повторностях для забезпечення достовірності результатів. Контрольні зразки включали паперові диски, просочені стерильною дистильованою водою без екстракту, щоб перевірити базове значення росту грибів без впливу активних речовин.

Зони інгібування росту грибів

Після інкубації спостерігали за зонами пригнічення росту навколо паперових дисків, що дозволило кількісно оцінити ефективність екстрактів.

За результатами експерименту було встановлено, що зони інгібування росту грибів були чітко вираженими. Для різних концентрацій екстракту спостерігали наступні діаметри зон інгібування:

Концентрація екстракту	Середній діаметр зони інгібування (мм)	Стандартне відхилення (мм)	Візуальні спостереження
50%	8,5	$\pm 0,2$	Помірне пригнічення росту на периферії міцелію
75%	12,3	$\pm 0,4$	Більш виражене пригнічення росту, чітка зона інгібування
100%	16,7	$\pm 0,3$	Максимальне пригнічення росту, повна відсутність міцелію в зоні дії екстракту
Контроль (дист. вода)	0	$\pm 0,0$	Відсутність пригнічення, рівномірний ріст міцелію по всій поверхні

Отримані результати чітко вказують на концентраційну залежність антифунгіцидної активності екстрактів. За підвищення концентрації екстракту спостерігалось збільшення діаметра зон інгібування, що вказує на високу ефективність біологічно активних речовин, присутніх в екстрактах.

При концентрації 50% зона інгібування була найменшою, що свідчить про помірну антифунгіцидну активність на низьких концентраціях.

При концентрації 75% було зафіксовано значне збільшення зони інгібування до 12,3 мм, що свідчить про підвищення ефективності екстракту за збільшення концентрації активних речовин.

Максимальний ефект спостерігався при концентрації 100%, де діаметр зони інгібування досягав 16,7 мм, що підтверджує потужну протигрибкову активність екстракту.

У контрольних зразках не було виявлено зон інгібування, що свідчить про відсутність природної пригнічувальної дії середовища на ріст *Botrytis cinerea*. Це підтверджує, що отримані антифунгіцидні властивості були виключно результатом впливу біологічно активних речовин з екстрактів *Nepenthes mirabilis*.

Отримані біометричні показники зон інгібування свідчать про високу ефективність екстрактів із суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis* проти *Botrytis cinerea*. Антифунгіцидна активність екстрактів зростала пропорційно до збільшення концентрації, що підтверджує наявність у них вторинних метаболітів із потужними протигрибковими властивостями.

Таким чином, екстракти клітин *Nepenthes mirabilis* можуть бути ефективними у боротьбі з грибковими патогенами, такими як *Botrytis cinerea*, і мають значний потенціал для використання як природні фунгіциди в сільському господарстві.

ВИСНОВКИ

1. Калюс зростав повільно, що може бути пов'язано зі специфікою рослини, поживного середовища та умов культивування.
2. Для суспензійної культури використовувалося стандартне середовище з додаванням фітогормонів, що забезпечувало поступовий ріст клітин у різних фазах — від лаг-фази до стаціонарної.
3. У лаг-фазі спостерігався повільний ріст клітин із кількістю 5×10^4 клітин/мл на початку культивування.
4. Експоненційна фаза характеризувалася активним ростом клітин, досягнувши $1,5 \times 10^6$ клітин/мл на 21-й день культивування.
5. У стаціонарній фазі кількість клітин стабілізувалася на рівні $1,5 \times 10^6$ клітин/мл, що вказувало на обмеження поживного середовища або накопичення токсичних метаболітів.
6. Екстракти із суспензійної культури клітин *Nepenthes mirabilis* продемонстрували помітну антифунгіцидну активність проти *Botrytis cinerea*.
7. Метод паперових дисків показав зони пригнічення росту гриба, що свідчить про наявність біологічно активних речовин, здатних впливати на патогенні гриби.
8. Дослідження показало потенціал використання *Nepenthes mirabilis* для отримання біологічно активних речовин із антифунгіцидними властивостями, що може стати основою для розробки нових природних фунгіцидів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. А.М., Заморока. «Глек Непенти.» Станіславський натураліст, 2010.
2. Angadam, J. O., M. Njoya, S. K. O. Ntwampe, B. S. Chidi, J. -W Lim, V. I. Okudoh, and P. L. Hewitt. 2022. "Nepenthes mirabilis Fractionated Pitcher Fluid use for Mixed Agro-Waste Pretreatment: Advocacy for Non-Chemical use in Biorefineries." *Catalysts* 12 (7). doi:10.3390/catal12070726. www.scopus.com.
3. Barthlott, W., Porembski, S., Seine, R., and Theisen, I. 2007. *The Curious World of Carnivorous Plants*. Portland, Oregon: Timber Press.
4. Bauer U, Federle W. 2009. The insect-trapping rim of *Nepenthes* pitchers: Surface structure and function. *Plant Signal Behav* 4 (11): 1019-1023.
5. Bauer U, Wilmes C, Federle W. 2009. Effect of pitcher age on trapping efficiency and natural prey capture in carnivorous *Nepenthes rafflesiana* plants. *Ann Bot* 103: 1219-1226.
6. Bennett KF, Ellison M. 2009. Nectar, not color, may lure insects to their death. *Biol Lett* 5: 469-472
7. Bonhomme V, Pelloux-Prayer H, Jouselin E, Yoe, Forterre, Labat JJ, Gaume L. 2011. Slippery or sticky? Functional diversity in the trapping strategy of *Nepenthes* carnivorous plants. *New Phytol* 191: 545-554.
8. Clarke, C.M. & C.C. Lee 2004. *Pitcher Plants of Sarawak*. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu.
9. Di Giusto B, Bessière J-M, Guérault M, Lim LBL, Marshall DJ, Hossaert McKey M, Gaume L. 2010. Flower-scent mimicry masks a deadly trap in the carnivorous plant *Nepenthes rafflesiana*. *J Ecol* 98: 845- 856.
10. Dinarti D., Sayekti U., Alitalia Y. 2010. Kultur Jaringan Kantong Semar (*Nepenthes mirabilis*). *Jurnal Hortikultura Indoensia*. 1(2): 59–65. <https://doi.org/DOI:10.29244/jhi.1.2.59-65>.
11. Farre-Armengol G, Filella I, Llusia J, Penuelas J. 2015. Relationships among floral VOC emissions, floral rewards and visits of pollinators in five plant species of a Mediterranean shrubland. *Plant Ecol Evol* 148 (1): 90-99.

12. Gaume L, Bazile V, Huguin M, Bonhomme V. 2016. Different pitcher shapes and trapping syndromes explain resource partitioning in *Nepenthes* species. *Ecol Evol* 6 (5): 1378-1392. DOI: 10.1002/ece3.1920.
13. Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol* 2000;18:1151-5.
14. Grimm, H.N. 1683. *Planta mirabilis destillatoria*. In: *Miscellanea curiosa sive Ephemeridum*. Med. Phys. Germ. Acad. Nat. Cur. Decuriae 2, ann. prim. p. 363, f. 27.
15. Gunn KS, Singh N, Giambrone J, Wu H. Using transgenic plants as bioreactors to produce edible vaccines. *J Biotech Research* 2012;4:92-9.
16. Handayani T, Latifah D, Dodo. 2005. Diversity and growth behaviour of *Nepenthes* (pitcher plants) in Tanjung Puting National Park, Central Kalimantan Province. *Biodiversitas* 6 (4): 248-252
17. Ismail NA, Kamariah AS, Lim LB, Ahmad N. Phytochemical and pharmacological evaluation of methanolic extracts of the leaves of *Nepenthes bicalcarata* Hook. F. *Int J Pharmacogn Phytochem Res* 2015;7(6):1127-38.
18. Kerry Lotzof. *Carnivorous plants: the meat-eaters of the plant world*.
19. Lal P, Ramachandran VG, Goyal R, Sharma R. Edible vaccines: Current status and future. *IJMM* 2007;25-93-102.
20. Landridge W. Edible vaccines. *Scientific Am* 2000;283:66-71.
21. McPherson, SR 2009. Old World pitcher plants.
22. Moran, JA 1991. Pitcher Dimorphism, Prey Composition and the Mechanisms of Prey Attraction in the Pitcher Plant *Nepenthes Rafflesiana* in Borneo.
23. *Nepenthes L.* in Döring M (2022). English Wikipedia - Species Pages. Wikimedia Foundation. <https://doi.org/10.15468/c3kkgh>
24. Ortiz-Mendoza N, Martínez-Gordillo MJ, Martínez-Ambriz E, Basurto-Peña FA, González-Trujano ME, Aguirre-Hernández E. Ethnobotanical, Phytochemical, and Pharmacological Properties of the Subfamily Nepetoideae (Lamiaceae) in Inflammatory Diseases. *Plants (Basel)*. 2023 Nov 2;12(21):3752.

25. Owen TP, Lennon KA. 1999. Structure and development of the pitchers from the carnivorous plant *Nepenthes alata* (Nepenthaceae). *Am J Bot* 86: 1382-1390.
26. Pavlovič A, Masarovicova E, Hudak J. 2007. Carnivorous syndrome in Asian pitcher plants of the genus *Nepenthes*. *Ann Bot* 100 (3): 527-536. Doi:10.1093/annbot/mcm145.
27. Poiret, JLM 1797. Népente. In: JB Lamarck Encyclopédie Méthodique Botanique Vol.4
28. Prakash CS. Edible vaccines and antibody producing plants. *Biotechnol Develop Monitor* 1996;27:10-3.
29. Regina Bailey. 2019. Carnivorous Plants. <https://www.thoughtco.com/carnivorous-plants-373605> .
30. Saurabh Bhatia, Kiran Sharma, Randhir Dahiya, Tanmoy Bera. 2020. Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences/
31. Schaefer HM, Ruxton GD. 2008. Fatal attraction: Carnivorous plants roll out the red carpet to lure insects. *Biol Lett* 4: 153-155
32. Scholz I, Bückins M, Dolge I, Erlinghagen T, Weth A, Hischen F, Mayer J, Hoffmann S, Riederer M, Riedel M, Baumgartner W. 2010. Slippery surfaces of pitcher plants: *Nepenthes* wax crystals minimize insect attachment via microscopic surface roughness. *J Exp Biol* 213: 1115-1125.
33. Schwallier R, de Boer HJ, Visser N, van Vugt RR, Gravendeel B. Traps as treats: A traditional sticky rice snack persisting in rapidly changing Asian kitchens. *J Ethnobiol Ethnomed* 2015;11:24
34. Setiawan H, Hakim L, Batoro J. Ethnobotany of *Nepenthes* spp. In dayak Seberuang people, west Kalimantan, Indonesia. *J Biodivers Environ Sci* 2015;7(6):275-84
35. Shil D, Mohanty JP, Saleem TS, Debnath J, Uriah T. Anti-Diabetic Activity of Leaf Extract of *Nepenthes khasiana* Hook on. India, 2014.
36. Shin KS, Lee SK, Cha BJ. Antifungal activity of plumbagin purified from leaves of *Nepenthes ventricosa* x *maxima* against phytopathogenic fungi. *Plant Pathol J* 2007;23(2):113-5

37. Thanh NV, Thao NP, Dat le D, Huong PT, Lee SH, Jang HD, et al. Two new naphthalene glucosides and other bioactive compounds from the carnivorous plant *Nepenthes mirabilis*. *Arch Pharm Res* 2015;38(10):1774-82.

38. Thanh NV, Thao NP, Dat le D, Huong PT, Lee SH, Jang HD, et al. Two new naphthalene glucosides and other bioactive compounds from the carnivorous plant *Nepenthes mirabilis*. *Arch Pharm Res* 2015;38(10):1774-82.

39. Thao NP, Luyen BT, Koo JE, Kim S, Koh YS, Thanh NV, Cuong NX, Kiem PV, Minh CV, Kim YH. In vitro anti-inflammatory components isolated from the carnivorous plant *Nepenthes mirabilis* (Lour.) Rafarin. *Pharm Biol.* 2016;54(4):588-94.

40. Tiewlasubon U, Mrityunjaya BP, Sivaiah K. In vitro antioxidant and hepatoprotective potential of *Nepenthes Khasiana* Hook. f against ethanol-induced. *J Pharm Res* 2015;14(4):81-9.

41. Tiewlasubon U, Mrityunjaya BP, Sivaiah K. In vitro antioxidant and hepatoprotective potential of *Nepenthes Khasiana* Hook. f against ethanol-induced. *J Pharm Res* 2015;14(4):81-9.

42. Walker, M. 2010. Giant meat-eating plants prefer to eat tree shrew poo. *BBC Earth News*.

ДОДАТКИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ



ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ ТА ЕКОЛОГІЇ

ДОСЯГНЕННЯ І ПЕРСПЕКТИВИ В ЗАХИСТІ ТА
КАРАНТИНІ РОСЛИН

*Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної
конференції здобувачів вищої освіти, присвяченій 126-
річчю НУБіП України*

(23 квітня 2024 р.)



Київ-2024

Фітопаразитичні нематоди трьох енергетичних культур для виробництва біопалива. Луцюк А. С., Стефановська Т. Р.	230
Особливості стерилізації вихідного матеріалу <i>Salvia officinalis</i> для введення в культуру in vitro. Майданович Н.Р., Лобова О.В.	232
Особливості методів стерилізації тюльпану для введення в умови in vitro. Матвієнко А.О., Лобова О.В.	235
Особливості дії біологічних препаратів при вирощуванні <i>Glycine max</i> L. Маценко Я. С., Бородай В. В.	237
Морфогенез та розмноження in vitro <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. Моргул Є.Є., Кляченко О.Л.	239
Застосування регуляторів росту стиму та регоплант у вирощуванні рослин міскантусу. Оставненко К.В., Медков А.І., Бородай В.В., Стефановська Т.Р.	241
Постасептична адаптація рослин регенерантів in vitro туї західної. Павленко Ю.С., Коломієць Ю.В.	242
Біологічно активні компоненти та мінеральні солі як ключові фактори в рості та використанні грибів <i>Pleurotus ostreatus</i> Kumm. Пигучко Р.О., Бойко О.А.	244
Підбір живильногосередовища для одержання калюсу непентесу чудового (<i>Nepenthes mirabilis</i>) в умовах in vitro. Пула В.С., Коломієць Ю.В.	246
Стратегії застосування культивування <i>Daucus carota</i> in vitro для підвищення біорезистентності та виробництва корисних біопродуктів. Самолук А. А., Коломієць Ю. В.	248
Вплив вуглецевих наноматеріалів на фізіологічні показники та структуру коренів сільськогосподарських рослин. Северін С.М., Ткаченко Т.А.	250
Мікроклональне розмноження змієголовника молдавського (<i>Dracosephalum moldavica</i> L.). Сипченко О. Ю., Лобова О. В.	252
Вплив біологічних активних речовин грибів роду <i>Daedaleopsis j.Schröt.</i> на ріст і розвиток овочевих культур. Сірик А.Є., Бойко О. А.	254
Ефективність комплексного застосування біопрепаратів в технології вирощування сої. Словінський В.В., Бородай В.В.	255
Оцінка препарату на основі с6-hsl (п-гексанойл-гомосеринлактон) для адаптації живців картоплі in vitro. Царуліца О., Лісовий М.М.	257
Введення <i>Pulsatilla alba</i> в культуру in vitro. Швець В. В., Лобова О.В.	259
Ксилотрофні базидієві гриби та їх використання в моніторингу екосистем. Швець Д.О., Бойко О.А.	261
Оптимізація біотехнології виробництва вакцин для птахівництва. Шевченко А.В., Бородай В.В.	262
Дослідження біосенсорного детектування мікотоксинів в різних матрицях. Шкарбан П.О., Таран О.П.	264
Отримання та використання полісахаридів гливи звичайної (<i>Pleurotus ostreatus</i> Kumm.) Для росту і розвитку зернобобових культур Шмиголь П.А., Бойко О.А.	266
Отримання та використання полісахаридів гливи звичайної (<i>Pleurotus ostreatus</i> Kumm.) Для росту і розвитку зернобобових культур. Шмиголь П.А., Бойко О.А.	267

УДК 58.085
ПІДБІР ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ
ОДЕРЖАННЯ КАЛЮСУ НЕПЕНТЕСУ ЧУДОВОГО
(*NEPENTHES MIRABILIS*) В
УМОВАХ IN VITRO

Пула В.С., магістр 1-го року навчання,
 Науковий керівник: *Коломієць Ю.В.*, доктор с.-г. наук, професор
Національний університет біоресурсів і природокористування України

Nepenthes mirabilis, це рослина-кувшин хижак, що поширена в Південно- Східній Азії, зокрема в Малайзії, Індонезії та Тайланді. Це велика рослина з глечиками, які можуть досягати довжини до 30 см. Глечики *Nepenthes mirabilis* зазвичай зелені або жовті і мають циліндричну форму з розширеним отвором у верхній частині.

Nepenthes mirabilis є стійким видом, який здатний переносити різноманітні умови вирощування, включаючи високі температури, вологість та низький рівень освітлення. Часто його можна знайти на відкритих, сонячних ділянках, таких як луки та чагарники. Рослина живиться різними комахами, такими як мухи, мурахи та жуки, які приваблюються солодким нектаром, що виділяється глечиком.

У культурі *Nepenthes mirabilis* є популярним видом завдяки своїй простоті догляду та привабливим глечикам. Зазвичай його вирощують як кімнатну рослину або у теплицях, де його можна утримувати в теплому вологому середовищі з яскравим непрямым світлом.

Отримання калюсу у хижих рослин є ключовим етапом у вивченні їхньої біології та фізіології. Дослідження, проведені з використанням калюсів, допомагають розуміти фізіологічні процеси у хижих рослин, такі як регенерація, акумуляція біологічно активних сполук.

Метою роботи був підбір живильного середовища для індукції непрямого мофогенезу *Nepenthes mirabilis* in vitro для подальшого дослідження біологічно активних речовин.

Об'єктом дослідження слугували стерильні експлантати та фрагменти листків *Nepenthes mirabilis*.

Дослідження проводили в лабораторії біотехнології рослин НУБіП України. Експлантати *Nepenthes mirabilis* були відібрані з 4-ох місячних рослин-донорів. Для визначення кращої комбінації регуляторів росту рослин, що призводять до індукції калюсу, було використано два середовища: $\frac{1}{2}$ Мурасіге-Скуга + 2мг/л 6-бензиламінопурину(6-БАП), 0,2 мг/л α - нафтилоцтової кислоти (НОК) та $\frac{1}{2}$ Мурасіге-Скуга + 2мг/л 6-бензиламінопурину(6-БАП), 0,2 мг/л 2,4-дихлорфеноксіцтова кислота (2,4-Д).

Протягом ініціального періоду дослідження, що тривав чотири тижні, не виявлено суттєвих змін у формуванні калюсу на живильних середовищах.

Протягом подальшого етапу дослідження планується продовження спостережень для виявлення початку наростання калюсу. Очікується, що подальші спостереження дозволять виявити більш сприятливе живильне середовище для ініціації та росту калюсу. Детальний аналіз та порівняльні спостереження допоможуть з'ясувати оптимальні умови для калюсогенезу та визначити фактори, що впливають на його початок та розвиток.

У даному дослідженні встановлено можливість використання різних гормональних середовищ на основі середовища Мурасіге і Скуга для індукції непрямого морфогенезу *Nepenthes mirabilis*. Подальше спостереження за розвитком експерименту дозволить з'ясувати оптимальні умови для ініціації та росту калюсу у *Nepenthes mirabilis*. Отримання калюсу дасть можливість подальшого дослідження біологічно активних сполук, що мають потенційне медичне застосування.

Список використаної літератури:

1. Shuaibu Babaji Sanusi, Mohd Fadzelly Abu Bakar, Maryati Mohamed, Siti Fatimah Sabran, Muhammad Murtala Mainasara. Ethnobotanical, phytochemical, and pharmacological properties of *Nepenthes* species: a review.
2. Nguyen Phuong Thao, Bui Thi Thuy Luyen, Jung Eun Koo, Sohyun Kim, Young Sang Koh, Nguyen Van Thanh, Nguyen Xuan Cuong, Phan Van Kiem, Chau Van Minh & Young Ho Kim (2016) In vitro anti-inflammatory components isolated from the carnivorous plant *Nepenthes mirabilis* (Lour.) Rafarin, *Pharmaceutical Biology*.
3. Magdalena Wójciak, Marcin Feldo, Piotr Stolarczyk, Bartosz J. Płachno. Biological Potential of Carnivorous Plants from *Nepenthales*.



НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ І
ЕКОЛОГІЇ

ЗБІРНИК

матеріалів доповідей

Х МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ
КОНФЕРЕНЦІЇ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ
І МОЛОДИХ ВЧЕНИХ



«ЕКОЛОГІЯ – ФІЛОСОФІЯ ІСНУВАННЯ
ЛЮДСТВА»

24-25 квітня 2024 р.

Київ – 2024

<i>Певно О.О., Чабанюк Я.В.</i> ЕКОТОКСИКОЛОГІЧНА ОЦІНКА ПРЕПАРАТУ BIONORMA ТРИХОДЕРМА В НАСАДЖЕННЯХ СУНИЦІ САДОВОЇ.....	222
<i>Пигичко Р.О., Бойко О.А.</i> ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ПРОДУКТИВНОСТІ ГРИБІВ PLEUROTUS OSTREATUS KUMM.....	224
<i>Побережський О.Р., Башта О.В.</i> ЗАХОДИ ЗАХИСТУ М'ЯТИ ПЕРЦЕВОЇ ВІД ІРЖІ (<i>PUCCINIA MENTHAE PERS.</i>).....	225
<i>Помагайбог С.О., Годованець М.О.</i> ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ АГРОЦЕНОЗІВ ЗА ЕКОЛОГІЧНО Й ЕКОНОМІЧНО ОБГРУНТОВАНИХ ЗАХОДІВ КОНТРОЛЮ КОМАХ ФІТОФАГІВ У ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ.....	227
<i>Погорєлова Я., Антіпов І.О.</i> РОЗРОБКА СИСТЕМИ ПЛР ДЕТЕКЦІЇ ВІРУСУ МОЗАЇКИ СОЇ.....	229
<i>Подрезов І.О., Сидякіна О.В.</i> ЕКОЛОГІЧНІ ШЛЯХИ ОПТИМІЗАЦІЇ ЖИВЛЕННЯ СОНЯШНИКУ.....	231
<i>Приймачук О.В., Сербенюк А.А.</i> ВИЯВЛЕННЯ ПРОБЛЕМ У ФОРМУВАННІ ЕКОЛОГІЧНОЇ МЕРЕЖІ ВОЛИНСЬКОЇ ОБЛАСТІ ТА РЕКОМЕНДАЦІЇ ДЛЯ ЇХ ВИРІШЕННЯ.....	233
<i>Проценко А.М., Наумовська О.І.</i> ЕКОЛОГІЧНІ ПРОБЛЕМИ, ЯКІ ПРОДУКУЮТЬ СМІТТЄЗВАЛИЩА.....	236
<i>Пула В.С., Коломієць Ю.В.</i> ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН НЕПЕНТЕСУ ЧУДОВОГО (<i>NERENTHES MIRABILIS</i>) В УМОВАХ IN VITRO.....	238
<i>Пустова С.О.</i> ІНДИКАТОРИ ЕКОЛОГІЧНОЇ ОСВІТИ В КОНТЕКСТІ СТАЛОГО РОЗВИТКУ.....	239
<i>Разінкіна Є.О., Бережнюк Є.М.</i> ЕКОЛОГІЧНІ НЕГАРАЗДИ І ВАЖЛИВІ СУСПІЛЬНІ ІНІЦІАТИВИ ЗА СУЧАСНОГО ЗЕМЛЕКОРИСТУВАННЯ ФЕОДОСІВСЬКОЇ ТЕРИТОРІАЛЬНОЇ ГРОМАДИ.....	241
<i>Расторгуєва М.Й., Олійник Г.С.</i> ІННОВАЦІЙНІ ТЕХНОЛОГІЇ ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ЕКОЛОГІЧНО ЧИСТИХ ТЕКСТИЛЬНИХ МАТЕРІАЛІВ: ОГЛЯД СВІТОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	243
<i>Реус І.Р., Павлюк С.Д.</i> ПОТЕНЦІАЛ ЕКОЛОГІЧНОГО ТУРИЗМУ НА ТЕРИТОРІЯХ ПЗФ ЗАХІДНИХ ОБЛАСТЕЙ УКРАЇНИ.....	245
<i>Рубаник Р.О., Ілєнко В.В.</i> ВПЛИВ ВНЕСЕННЯ ЗАБРУДНЕНОЇ ¹³⁷Cs ДЕРЕВНОЇ ЗОЛИ НА РАДІОАКТИВНЕ ЗАБРУДНЕННЯ КАРТОПЛІ.....	247
<i>Савицька Л.В., Нестерова Н.Г.</i> ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ РОСЛИН РОДУ FAGACEAE ДЛЯ ОЗЕЛЕНЕННЯ МІСЬКОГО СЕРЕДОВИЩА.....	249

УДК 58.085

**ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН НЕПЕНТЕСУ
ЧУДОВОГО (*NEPENTHES MIRABILIS*) В УМОВАХ IN VITRO**

Пула В.С., студентка 1 курсу ОС «Магістр», факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології

Коломісць Ю.В., доктор с.-г. наук, професор кафедри екобіотехнології та
біорізноманіття

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Рід Непентес (*Nepenthaceae*) давно використовується в народній медицині Індії та країн Південно-Східної Азії. Вони використовуються для лікування прокази, холери, курячої сліпоти, шлунково-кишкового дискомфорту, дизентерії, болю в шлунку та нічного нетримання сечі [3].

Фітохімічні сполуки, виділені з видів *Nepenthes*, включають флавоноїди, терпеноїди, дубильні речовини, алкалоїди та стероїди серед інших фітохімікати [2]. Неочищені екстракти та чисті біоактивні компоненти виявляють антибактеріальну, протигрибкову, протималарійну, антиоксидантну, протидіабетичну, антиостеопоротичну, протизапальну, цитотоксичну та гіполіпідемічну дію [1].

Вид *Nepenthes* належить до родини *Nepenthaceae*, широко відомий як м'ясоїдна рослина-кувшин. Це єдиний рід у родині *Nepenthaceae* із порядку *Nepenthales*, який виробляє унікальний глечик для відлову та травлення комах, щоб отримати поживні речовини в місцях існування, позбавлених азоту. Стебло кувшина являє собою напівчагарник або траву. Сам глечик є результатом модифікації листової пластинки [3].

Метою цього дослідження є вивчення антибактеріальної активності екстрактів, одержаних з *Nepenthes mirabilis*, та визначення їхнього впливу на ріст бактерій.

У цьому дослідженні буде використано модифікований метод дисків-дифузії для оцінки антибактеріальної активності екстрактів. Диски, зволожені екстрактами рослини, будуть накладені на агар, на якому здійснено посів бактерій. Аплікацію дисків проводять за допомогою стерильного пінцета. Відстань від диска до краю чашки і між дисками повинна бути 15-20 мм. Диски повинні рівномірно контактувати з поверхнею агару, для чого їх слід акуратно притиснути пінцетом. Відразу після аплікації дисків чашки Петрі поміщають в термостат догори дном і

інкубують при температурі 35°C протягом 18-24 год. Після інкубації чашки поміщають догори дном на темну матову поверхню так, щоб світло падало на них під кутом 45°. Діаметр зон затримки росту виміряють з точністю до 1 мм.

Очікується, що екстракти *Nepenthes mirabilis* виявлять високу антибактеріальну активність, що проявлятиметься утворенням зон інгібування навколо дисків. Розмір цих зон буде використаний для порівняння активності різних екстрактів та визначення їхньої ефективності.

Диско-дифузійний метод є ефективним і надійним способом для оцінки антибактеріальної активності екстрактів *Nepenthes mirabilis*. Отримані результати можуть бути важливими для подальшого вивчення та використання цієї рослини у медичній та фармацевтичній сферах.

Список використаних джерел:

1. Shuaibu Babaji Sanusi, Mohd Fadzelly Abu Bakar, Maryati Mohamed, Siti Fatimah Sabran, Muhammad Murtala Mainasara. Ethnobotanical, phytochemical, and pharmacological properties of *Nepenthes* species: a review.
2. Nguyen Phuong Thao, Bui Thi Thuy Luyen, Jung Eun Koo, Sohyun Kim, Young Sang Koh, Nguyen Van Thanh, Nguyen Xuan Cuong, Phan Van Kiem, Chau Van Minh & Young Ho Kim (2016) In vitro anti-inflammatory components isolated from the carnivorous plant *Nepenthes mirabilis* (Lour.) Rafarin, *Pharmaceutical Biology*.
3. Magdalena Wójciak, Marcin Feldo, Piotr Stolarczyk, Bartosz J. Płachno. Biological Potential of Carnivorous Plants from *Nepenthales*.



**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**



**ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ ТА ЕКОЛОГІЇ
КАФЕДРА ЕКОБІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОРІЗНОМАНІТТЯ**

**X ВСЕУКРАЇНСЬКА НАУКОВО-
ПРАКТИЧНА КОНФЕРЕНЦІЯ
СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ ТА МОЛОДИХ
ВЧЕНИХ «БІОТЕХНОЛОГІЯ:
ЗВЕРШЕННЯ ТА НАДІЇ»**

2-3 травня 2024 р.

м.Київ



Леонова Т.Р., Дашенко А.В. Роль посушливих умов в інтенсивності ураження культури <i>Triticum aestivum</i> L. хворобами.....	44
Литвиненко О. І., Дрозд П. Ю. Роль рослинних мікробіомів у захисті від хвороб.....	45
Литвиненко С. А., Таран О. П. Розробка підходів для оцінки фітотоксичності органічних субстратів з харчових побутових відходів	46
Магдійчук А.П. Перспективи вирощування енергокультур в межах кар'єрно-відвальних комплексів	48
Майданович Н.Р., Лобова О.В. Введення в культуру <i>in vitro</i> Шавлії лікарської.....	49
Манжура О.А., Кваско О.Ю. Визначення вмісту фруктозовмісних цукрів в рослинах астрагалу шерстистоквіткового	51
Моргун С.С., Кляченко О.Л. Морфогенез <i>Stevia rebaudiana bertonii</i> та технологія збереження рослин <i>in vitro</i>	52
Наумовська О., Молдаван Л., Лелюшок С. Ефективність вермикомпостування органічних відходів урбоценозів.....	53
Неліна Н.О., Нестерова Н.Г. Аспекти використання перспективних форм деревних рослин роду <i>Robinia</i> в озелененні м. Київ	55
Нікішина К., Кваско О.Ю. Отримання культури “бородатих” коренів жимолості.....	56
Павленко Ю.С., Коломісць Ю.В. Мікроклональне розмноження <i>Thuja occidentalis</i> в умовах <i>in vitro</i>	57
Пигичко Р.О., Бойко О.А. Біологічно активні компоненти та мінеральні солі: ключові фактори у рості <i>Pleurotus ostreatus</i>	58
Помагайбог С.О., Годованець М.О. Оптимізація системи захисту польових культур від шкідливих організмів за ресурсоощадних технологій у Лісостепу України.....	59
Помагайбог С.О., Годованець М.О. Особливості формування агроценозів за екологічно- й економічно обґрунтованих заходів контролю комах фітофагів у Лісостепу України.....	60
Пула В.С., Коломісць Ю.В. Ініціація клітинної суспензії <i>Nepenthes mirabilis</i>	61

розвитку. Однак, як фунгіциди, так і інсектициди доцільно застосовувати сумісно з мікроелементами, регуляторами росту.

Зокрема, із концентрованим хелатним мікродобривом з комплексом біостимуляторів HelMix до складу якого входять у максимально доступній формі та пропорції для рослини Mg хелат*, Fe хелат*, Mn хелат*, Zn хелат* *, Cu хелат*, Co хелат* , В комплекс, Mo хелат* *, N амід, K₂O, SO₄, Сукцинати, Малати, Тартрати, Цитрати, Оксалати, Аспарагинати, Transfoliovektor «TFV», Фактор росту «HV», Індоліл-оцтова к-та, Іноліл-масляна к-та Оксалоацетати, Оксалосукцинати, Ад ювант-ПАР.

УДК 58.085

Пула В.С., Коломієць Ю.В.

ІНІЦІАЦІЯ КЛІТИННОЇ СУСПЕНЗІЇ *NEPENTHES MIRABILIS*

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Вул. Героїв оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна

e-mail: vikipula624@gmail.com

Рослини роду *Nepenthes*, відомі також як *Nepenthaceae*, традиційно використовуються в народній медицині Індії та країн Південно-Східної Азії з метою лікування різних захворювань. Ці рослини використовуються для терапії прокази, холери, курячої сліпоти, розладів травлення, дизентерії, відчуття дискомфорту у шлунку, а також для зменшення болю у шлунку та нічного нетримання сечі [1].

Фітохімічні сполуки, виділені з різних видів *Nepenthes*, охоплюють флавоноїди, терпеноїди, дубильні речовини, алкалоїди та стероїди, серед інших фітохімікатів [2]. Якщо розглядати неочищені екстракти та чисті біоактивні компоненти, то вони виявляють антибактеріальну, протигрибкову, протималарійну, антиоксидантну, протидіабетичну, антиостеопоротичну, протизапальну, цитотоксичну та гіполіпідемічну дію [3].

Культура рослинних клітин є важливим інструментом для фундаментальних досліджень з біохімії та молекулярної біології рослин, а доступні методи включають регенерацію диференційованих культур (ціла рослина і культури органів; пагони, корені та додаткові корені) або недиференційованих культур (наприклад, калюси, суспензії клітин і протопласти) [4]. Дедиференційовані суспензії рослинних клітин *in vitro* зручніші для великомасштабного виробництва тонкодисперсних хімічних речовин у біореакторах та для вивчення клітинних і молекулярних процесів, оскільки вони пропонують перевагу спрощеної модельної системи для вивчення рослин.

Дослідження проводили в лабораторії біотехнології рослин НУБіП України. У дослідженні використовували отриманий калюс з рослини *Nepenthes mirabilis*. Для ініціації суспензійної культури використовували рідке живильне середовище Мурасіге-Скуга з додаванням 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д), 0,25 мг/л 6-бензиламінопурину (6-БАП). Піпеткою внесли 10 мл рідкого живильного середовища у стерильну 50-мл колбу Ерленмейєра. Стерильним пінцетом перенесли частину калюсу в колбу та подрібноли за допомогою піпетки. Помістили колбу в культуральну кімнату на орбітальний шейкер (80 об/хв) до досягнення адекватної фрагментації калюсу і щільності клітин.

Перші декілька діб після ініціації, спостерігалася лаг-фаза росту, де клітини адаптувалися до умов культивування. Цей період характеризувався повільним ростом, оскільки клітини реагували на нове середовище. Після лаг-фази настав етап експоненційного росту, коли клітини почали активно ділитися, що призвело до швидкого збільшення їхньої кількості. Нарешті, після досягнення максимальної щільності клітин, спостерігалася стаціонарна фаза росту, коли кількість новоутворених клітин врівноважилася з кількістю вмираючих клітин, що призвело до стабільності ростової кривої.

У даному дослідженні ми розглянули можливість вирощування клітинної суспензії *Nepenthes mirabilis*. Суспензійна культура є важливим інструментом в біологічних дослідженнях, а особливо в області рослинної біотехнології з метою виділення біологічно активних речовин.

Список використаної літератури:

1. Shuaibu Babaji Sanusi, Mohd Fadzelly Abu Bakar, Maryati Mohamed, Siti Fatimah Sabran, Muhammad Murtala Mainasara. Ethnobotanical, phytochemical, and pharmacological properties of *Nepenthes* species: a review.
2. Magdalena Wójciak, Marcin Feldo, Piotr Stolarczyk, Bartosz J. Płachno. Biological Potential of Carnivorous Plants from *Nepenthes*.
3. Mustafa NR, De Winter W, Van Iren F, Verpoorte R (2011) Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures.
4. Roberto Moscatiello , Barbara Baldan , and Lorella Navazio (2012) Plant Cell Suspension Cultures.