

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології**

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**  
Завідувач кафедри екобіотехнології та  
біорізноманіття  
\_\_\_\_\_ Олена КВАСКО  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2025 р.

**БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**на тему «Введення в культуру *in vitro* бавовника звичайного (*Gossypium  
hirsutum L.*)**

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

**Гарант освітньої програми**

Кандидат біологічних наук,  
доцент, завідувач кафедри  
екобіотехнології та  
біорізноманіття

Олена КВАСКО

\_\_\_\_\_  
(підпис)

**Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи**

Доктор  
сільськогосподарських наук,  
професор, професор кафедри  
екобіотехнології та  
біорізноманіття

Оксана КЛЯЧЕНКО

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Виконала

Марта ГОНЧАРУК

\_\_\_\_\_  
(підпис)

**КИЇВ – 2025**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І**  
**ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології**

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри екобіотехнології та  
біорізноманіття

к.б.н, доцент \_\_\_\_\_ Олена КВАСКО  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2025 р.

**ЗАВДАННЯ**  
**на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи**  
**студенту**

Гончарук Марті Валеріївні

---

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи «Введення в культуру *in vitro*  
бавовника звичайного (*Gossypium hirsutum L.*)

затверджена наказом ректора НУБіП України від “22” жовтня 2024р. №1880

Термін подання завершеної роботи на кафедру 20 травня 2025 року

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи:  
насіння бавовника звичайного, регулятори росту, живильні середовища.  
Перелік питань, які потрібно розробити:

1. Введення в культуру *in vitro* бавовника звичайного (*Gossypium hirsutum L.*).
2. Вивчити особливості калюсо- та морфогенезу бавовника звичайного.
3. Укорінення рослин-регенерантів бавовника звичайного.

Дата видачі завдання 1 вересня 2024 року

**Керівник бакалаврської  
кваліфікаційної роботи**

\_\_\_\_\_  
(підпис)

**Оксана КЛЯЧЕНКО**

**Завдання прийняв до  
виконання**

\_\_\_\_\_  
(підпис)

**Марта ГОНЧАРУК**

## РЕФЕРАТ

Дипломна робота на тему «Введення в культуру *in vitro* бавовника звичайного (*Gossypium hirsutum L.*)» виконана на 47 сторінках друкованого тексту, містить 6 інформаційних таблиць та 6 рисунків.

Складається з наступних розділів: огляд літератури; матеріали та методи дослідження; результати дослідження; висновки; список використаної літератури; додатки (копії публікацій).

Усі наукові досліди відбувалися в лабораторії біотехнології рослин кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів та природокористування України.

*Метою роботи* було отримання асептичної культури *Gossypium hirsutum L.* та вивчення особливостей її культивування в умовах *in vitro*.

Для стерилізації насіння бавовника, його поетапно обробляли 70% етанолом – 10 хв, 15% відбілювачем типу «Білизна» – 30 хв та тричі промивали дистильованою водою – 5 хв. Комерційний відбілювач вважається дуже ефективним засобом для знищення мікроорганізмів і часто використовується для поверхневої стерилізації рослин для культури *in vitro*. Процедура стерилізації на основі відбілювача зазвичай комбінують з ополіскуванням 70% етанолом, який також вважається хорошим стерилізуючим засобом для багатьох рослин.

Пророслі пагони було пересаджено в живильне середовище Мурасіге-Скуга з додаванням НОК та кінетину у концентрації: НОК – 0,125 мл, кінетину – 0,025 мг/л. МС-середовище містить високу концентрацію макро- і мікроелементів, необхідних для росту рослинних клітин у культурі. Воно добре підтримує швидке ділення клітин, калюсоутворення та органогенез – усе це критично для бавовника, оскільки він має відносно складну морфогенетичну реакцію в культурі *in vitro*. НОК разом з кінетином

утворюють збалансоване продукування гормонів, створюють сприятливі та ефективні умови для росту, поділу та морфогенезу клітин бавовника *in vitro*, що має велику вагу та значення для мікроклонального розмноження.

## ЗМІСТ

<b>РЕФЕРАТ</b> .....	<b>4</b>
<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ</b> .....	<b>7</b>
<b>ВСТУП</b> .....	<b>8</b>
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	<b>11</b>
1.1. Біологічні особливості бавовника звичайного ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.).	11
1.2. Теоретичні основи мікроклонального розмноження та його практичне застосування .....	12
1.2.1. Отримання безвірусного посадкового матеріалу бавовника звичайного	15
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ</b> .....	<b>20</b>
2.1. Місце проведення досліджень, обладнання лабораторії і умови роботи..	20
2.2. Матеріали досліджень .....	23
2.3. Методи досліджень .....	23
2.3.1. Стерилізація насіння бавовника та умови культивування рослини ....	23
2.3.2. Підбір живильних середовищ для культивування бавовника звичайного .....	26
2.3.3. Статистична обробка результатів досліджень .....	30
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b> .....	<b>32</b>
3.1. Отримання асептичного матеріалу бавовника звичайного .....	32
3.2. Індукція калюсогенезу на експлантатах бавовнику звичайного.....	33
3.3. Прямий морфогенез <i>in vitro</i> бавовника звичайного .....	37
3.4. Індукція ризогенезу бавовника звичайного .....	39
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	<b>45</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	<b>47</b>
<b>ДОДАТКИ</b> .....	<b>50</b>

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,  
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

БАП – 6-бензиламінопурин

ІОК – індоліл-3-оцтова кислота

ІМК – індо-3-масляна кислота

НОК –  $\alpha$ -нафтилоцтова кислота

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота

МС – середовище Мурасіге і Скуга

МКР – мікроклональне розмноження

МКРР – мікроклональне розмноження рослин

ЖС – живильне середовище

SDS – додецилсульфат натрію

## ВСТУП

Бавовник звичайний середньоволокнистий (*Gossypium hirsutum*) – багаторічна рослина, але в більшості регіонів його сіють кожного року через теплолюбність і чутливість до холоду цієї рослини.

Рослина кущової форми з міцним, прямостоячим стеблом, висота якого може досягати 1-1,5 метра і більше. Із нижніх пазух листків розвиваються вегетативні пагони, тоді як у верхній частині рослини формуються генеративні (плодові) гілки. На ростових пагонах можуть з'являтися плодові відгалуження другого порядку. Листки розташовані по спіралеподібній траєкторії вздовж стебла.

Серед технічних культур, що дають волокно, бавовник утримує лідерство у світовому виробництві. Його волокно використовують як сировину для виготовлення текстильних матеріалів – тканин, трикотажних виробів, пряжі та інших побутових речей. Насіння бавовнику містить 20-30% олії, яку застосовують у харчовій галузі: для виробництва маргарину, мила, гліцерину, фарб. Інколи насіння використовується для годівлі худоби.

На спеціалізованих сортових господарствах отримують велику кількість сировини з бавовника (до 40-50 центнерів з гектара).

Бавовник звичайний (*Gossypium hirsutum L.*) є провідною технічною культурою, що становить основу для функціонування світової текстильної галузі. Він має вагомe значення для економіки країн, які займаються його вирощуванням, оскільки вся продукція та вироби з бавовни істотно впливають на формування грошових прибутків. Протягом тривалого часу селекційна наука спрямовувала зусилля на покращенні властивостей цієї культури за допомогою класичних методів гібридизації. Але через певні обмеження в генетичному коді цієї культури, які б могли створити резистентність від природи до комах, шкідників, вірусів, патогенів та

несприятливих умов середовища, значно довше стримувала подальший прогрес [17].

Але з часом, за допомогою нових відкриттів, почали запроваджуватись нові методи генетичної трансформації. З'явилися нові шляхи та перспективи щодо вдосконалення бавовника за допомогою чіткого перенесення потрібних генів між живими організмами та введення їх у його геном. Тоді коли була отримана перша генетично модифікована форма бавовнику, рахуючи з 1987 року, науковці успішно змогли отримати трансгенні лінії з великим списком корисних властивостей. З основного, було помітно збільшено толерантність рослини до біотичних (шкідників, комах, вірусів, хвороб, бактерії, грибів тощо) і абіотичних факторів (несприятливі умови середовища), а також забезпечено стійкість до гербіцидів. Також, окрім всього вище сказаного, тривають дослідження, які мають на меті врегулювати рівень олії та якості волокна [6].

Застосування генетичної інженерії та модифікацій в селекції дає змогу підвищувати врожайність, створювати нові сорти, покращувати стійкість і стабільність рослин.

Ще одним важливим біотехнологічним методом для покращення характеристик і властивостей бавовника звичайного є мікроклональне розмноження *in vitro*, яке робить можливим швидке відтворення генетично однорідних культур з потрібними чи поставленими ознаками. Також цей метод дає змогу ефективно відтворювати елітні генотипи, зберігати зникаючі чи рідкісні генетично цінні лінії.

Метод культивування тканин *in vitro* відіграє важливу роль у здійсненні генетичної трансформації, адже забезпечує можливість отримання цілісних рослин із клітин або тканин, у які було інтегровано цільові гени. Тим більше, МКР становить не лише практичний інтерес для масштабного вирощування сортів, що матимуть високий урожай, а й

широко застосовується у базових дослідженнях, пов'язаних із вивченням особливостей росту, розвитку та реакції бавовника на дію біотичний і абіотичних стресових факторів [2,13].

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Біологічні особливості бавовника звичайного (*Gossypium hirsutum* L.)

Бавовник належить до родини Мальвових (*Malvaceae*). Його коренева система характеризується добре розвиненим стрижневим коренем, що може заглиблюватися в ґрунт на 2-2,5 метра. Стебло рослини прямостояче, у нижній частині частково здерев'яніле. У сприятливих кліматичних зонах формується компактний кущ заввишки близько 80-100 см, який має від 7 до 15 бічних пагонів.

У бавовнику наявні два типи гілок: моноподіальні (вегетативні) – продовжуються вгору і завершуються верхівковою брунькою, та симподіальні (генеративні) – відповідають за формування репродуктивних органів, таких як бутони, квітки і плоди (коробочки). Нижнє листя на головному стеблі має серцеподібну форму, тоді як листки, розташовані вище, відзначаються лопатевою будовою.

Квітки бавовнику досить великі, гайчастіше мають біле або світло-кремове забарвлення. Цвітіння кожної окремої квітки триває лише одну добу. Хоча бавовник здебільшого є самозапильною культурою, у певних умовах можливе і перехресне запилення.

Плід бавовнику – коробочка, яка зазвичай складається з 4-5 гнізд. У процесі дозрівання вона розкривається, однак це не характерно для всіх сортів. Кожне гніздо містить від 5 до 11 насінин овальної форми. Насіння вкрите двома типами волокон: коротким лінтером і довгими волокнами, що використовуються у текстильному виробництві. Розміри насіння становлять: довжина -- 9-12 мм, ширина – 6-8 мм.

Більшість сортів бавовнику дають волокно білого кольору, проте селекціоновано форми з кремовим, зеленуватим або навіть коричневим забарвленням. Довжина волокон може коливатися в межах від 10 до 70 мм. Середня маса однієї сирої коробочки залежить від сорту і становить від 2 до 10 г або більше.



Рис.1.1. Сорт бавовни з зеленим ворсом Арканзас

Бавоник належить до теплолюбних і світлолюбних культур, які реагують на довжину світлового дня. Насіння починає проростати при температурі ґрунту від 12-15 °С, проте молоді сіянці чутливі до зниження температури та не витримують заморозків і холодної погоди. Найкращі умови для активного росту і розвитку бавовнику створюються при температурі в межах 25-30 °С [18].

## **1.2. Теоретичні основи мікроклонального розмноження та його практичне застосування**

МКР рослин є неоціненним і ефективним методом в біотехнології рослин, причому може застосовуватись у сільськогосподарстві, в декоративному мистецтві та інших сферах. Цей метод може суміщатись і перегукуватись з іншими біотехнологічними підходами, в основному для

оздоровлення рослинного матеріалу від вірусів, патогенів, грибків та хвороб. Також за допомогою МКРР можливо створювати трансгенні рослини, підтримувати колекції генетично важливих ліній, зберігати банки рослинних генетичних ресурсів в умовах *in vitro* з використанням живильних середовищ [7,10].

Науковці працюють над все новими і новими дослідженнями у цьому напрямі, адже прискорений ріст і розвиток рослинних культур дає велику кількість переваг і можливостей. Головне завдання – розмноження рослин, що є клонами особин з потрібними характеристиками і ознаками, і отримання великої кількості за мінімальний проміжок часу.

Для швидкого вегетативного розмноження зазвичай використовують частини рослин з активними точками росту. Проте традиційні способи мають обмежену ефективність у насінництві. Наприклад, при вирощуванні картоплі шляхом живцювання, відводків чи вкорінення пагонів з однієї рослини можна отримати до 700 нових, а при поєднанні методів – до 8000 [2].

Сучасні біотехнологічні підходи, зокрема технологія розмноження *in vitro*, мають низку переваг: мінімальні потреби у вихідному матеріалі; гарантована генетична однорідність рослин; ефективне розмноження рідкісних, або цінних сортів; збереження стерильних або нестабільних генотипів; збереження рідкісних видів у контрольованих умовах у разі екологічної загрози; довготривале підтримання колекційних зразків; швидке впровадження нових сортів у виробництво; щорічне планування і накопичення посадкового матеріалу; висока продуктивність на обмеженій лабораторній площі; можливість переривання фази спокою органів рослин; потенціал до автоматизації технологічних процесів; відбір форм зі зміненими спадковими ознаками; виробництво оздоровленого матеріалу, особливо безвірусного [2, 3, 9, 10].

Метод МКРР ґрунтується на здатності рослин відновлюватися з окремих частин – таких як клітини, тканини чи органи, що мають потенціал до утворення нових пагонів. Це явище пов'язане з тотипотентністю клітин, тобто, їх здатністю дати початок новій цілій рослині. В більшості випадків, відновлення рослин відбувається через формування калюсу, з якого потім розвиваються соматичні ембріоїди. Але треба пам'ятати, що подібний спосіб регенерації не завжди гарантує повну генетичну ідентичність нового організму з материнським [14, 19].

Однією з ключових переваг МКРР є те, що його можна використовувати для оздоровлення рослин, особливо коли йдеться про вірусні інфекції. У більшості випадків, саме культура *in vitro* дає змогу ефективно видалити збудники, які важко або взагалі неможливо усунути іншими методами. Тим більше, стерильні умови відкривають широкі можливості для різноманітних досліджень – від генетики й фізіології до біохімії та мікробіології [1,7].

Результативність методу МКРР залежить не тільки від правильної техніки та дотримання базових правил, а й від комплексу факторів: стану рослини-донора, хімічного складу ЖС, режиму освітленості й температури, типу тканин, які використовують, та навіть особливостей самого виду – його генетики, фізіології та умов утримання материнських рослин. Також важливе значення має джерело вуглецю, що додається до середовища для живлення клітин [1].

Процес мікроклонального розмноження включає 4 основні стадії:

- 1) добір і стерилізація донорських органів (експлантів);
- 2) безпосереднє розмноження *in vitro*;
- 3) стимулювання коренеутворення (ризогенез);
- 4) адаптація регенерантів до умов навколишнього середовища (*in vivo*).

Окремо виділяють ще одну важливу фазу – перехід з умов *in vitro* до ґрунтового середовища (*ex vitro*), що супроводжується постасептичною адаптацією. Цей етап є критичним для подальшої життєздатності рослин, які вирощувалися в стерильних умовах [1].

### **1.2.1. Отримання безвірусного посадкового матеріалу бавовника звичайного**

Успішне МКР бавовника звичайного тісно пов'язане з отриманням стерильного вихідного матеріалу та дотриманням суворих умов культивування. Саме від ретельності виконання початкового етапу – введення у стерильну культуру – залежить подальше залучення зразків бавовника до селекційних або програм з насіння із використанням методів культури тканин [5, 6].

Перш ніж перенести фрагменти бавовника (експланти) з умов природного середовища (*in vivo*) в лабораторні (*in vitro*), обов'язковим є проведення процедури їх стерилізації. Це необхідно, оскільки поверхня насіння, органів рослин, зокрема листків, черешків, часто вкрита численними бактеріями, грибами та іншими мікроорганізмами. У разі потрапляння таких контамінантів у штучне живильне середовище вони не тільки швидко поглинають поживні речовини, а й продукують токсичні сполуки, що ускладнюють або повністю пригнічують розвиток клітин бавовника [5, 23].

Для уникнення вищезазначених проблем, проводиться деконтамінація – знищення патогенної мікрофлори з поверхні експлантів. Вважається, що внутрішні тканини здорового бавовника, як і в інших видів, зазвичай естерильними, а отже, достатньо обробити лише зовнішні покриви. Найчастіше використовуються апікальні меристеми, які є природним бар'єром проти інфекцій, оскільки провідні пучки рідко досягають їхньої

центральної частини, а вузькі міжклітинні канали не дозволяють проникати вірусам [23].

У практиці стерилізації бавовника важливим є вибір відповідного органа. Наприклад, насіння, завдяки своїй щільній покривній тканині, без опушення та шершавостей, легше піддається обробці. Проте критично важливо проводити стерилізацію до попереднього замочування, оскільки змочування сприяє проникненню пагонів глибше у тканини – у такому разі частка інфікованих зразків може досягати 80%.

Варто враховувати, що навіть у зовні здорових тканинах можуть бути присутні непатогенні ендofіти, які важко виявити, але вони також можуть порушити процес культивування. У деяких випадках вони навіть вступають у симбіоз із рослиною, як, наприклад, у бавовника з представниками роду *Pseudomonas* або мікоризними грибами.

Ефективність стерилізації ( $E_1$ ) оцінюється як відсоткове співвідношення кількості чистих (неінфікованих) експлантів до загальної кількості стерилізованих зразків:

$$E_1 = \left( \frac{c}{s} \right) \times 100\%,$$

де  $c$  – кількість асептичних експлантів,  $s$  – загальна кількість оброблених зразків.

Результативність цього процесу значною мірою залежить від типу стерилізуючого агента, його концентрації, тривалості експозиції, ступеня зрілості тканини бавовника, а також її анатомо-морфологічних властивостей. Ідеальний дезінфікуючий засіб повинен забезпечити повне знезараження без суттєвого ушкодження клітинних структур.

Складність деконтамінації бавовника особливо помітна при використанні тканин з механічними пошкодженнями, які виникають,

наприклад, при відділенні пагонів або листків від материнської рослини. У таких випадках дезінфікуючі речовини можуть проникати в глибокі шари тканини, пошкоджуючи не лише поверхню, а й провідну систему, що в подальшому перешкоджає росту рослини в умовах *in vitro*.

Іноді поверхневі тканини можуть загинути внаслідок надмірного впливу антисептика, але морфогенез все одно відбувається за рахунок живих внутрішніх тканин, які залишилися незачепленими. Таке явище досить поширене в культурі бавовника, особливо при використанні регенеративно активних зон, наприклад, верхівкових меристем.

Ще однією проблемою є складне видалення залишків стерилізатора після обробки. Тому важливо забезпечити ретельне промивання експлантів стерильною, дистильованою й автоклавованою водою. Або ж застосовувати речовини, які самостійно розпадаються після дії стерилізатора.

Підготовка експлантів до стерилізації починається з очищення від забруднень. Для цього можна використовувати м'які миючі засоби, спирт або детергенти, які ефективно знімають забруднення з воскових і слабо змочуваних поверхонь, притаманних тканинам бавовника. Етанол, крім знежирення, також зневоднює поверхню, що покращує ефективність дії основного антисептика.

Загалом, правильно організований процес стерилізації є вагомим етапом у створенні високоякісного, безвірусного посадкового матеріалу бавовника звичайного, який далі використовується у програмах оздоровлення, селекції та масового МКР культури.

Таблиця 1

**Етапи та умови отримання безвірусного посадкового матеріалу  
бавовника звичайного**

Етапи	Опис процесу	Умови та переваги
Підготовка експлантів	Вибір верхівкових меристем, пагонів або насіння	Органи з мінімальним ризиком вірусного ураження
Очищення від бруду	Занурення у мийні розчини	Видаляє забруднення, полегшує змочування тканини
Промивання експлантів	Видалення залишків стерилізуючих речовин стерильною водою	Мінімізація фітотоксичної дії
Введення в культуру <i>in vitro</i>	Перенесення на ЖС під ламінарним боксом	Асептичні умови, щільне закриття посуду
Контроль стерильності	Оцінка рівня контамінації та життєздатності експлантів	Визначення ефективності стерилізації ( $E_1$ )
Морфогенез і регенерація	Ініціація росту пагонів та коренів з асептичного матеріалу	Можливе використання фітогормонів
Оздоровлення	Вирощування у стерильному середовищі, що унеможлиблює повторне зараження	У разі потреби – додаткове термотерапевтичне оздоровлення

Адаптація ( <i>ex vitro</i> )	Перенесення регенерантів до умов <i>in vivo</i>	Постасептична адаптація, контроль вологості та освітлення
-------------------------------	---	---

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Місце проведення досліджень, обладнання лабораторії і умови роботи

Дослідження проводилось в 2025 р. у лабораторії біотехнології рослин кафедри екобіотехнології та біорізноманіття.

Обладнання лабораторії:

1. Мийна зона обладнана подачею холодної, гарячої води. У цьому приміщенні необхідно мати дистилятор і подвійний дистилятор, сушильні стелажі для лабораторного посуду, сушильні шафи з температурним режимом 150-160 °С для термостерилізації інструментів, а також шафи для їх зберігання.
2. Приміщення для стерилізації має бути оснащено автоклавами горизонтального або вертикального типу, які використовуються для стерилізації поживних середовищ під тиском.
3. Лабораторія приготування поживних середовищ включає спеціалізовані робочі столи, технічні й точні ваги, прилади для дистиляції та подвійної дистиляції, рН-метр, холодильник, електроплитку, центрифугу, ультрацентрифугу, водяну баню та всі необхідні хімічні реагенти.
4. Асептична кімната оснащена ламінарними шафами, термостатами з підтриманням температури 25-27 °С і вологістю на рівні 80 %, витяжними системами, шейкерними пристроями.
5. Світлова культуральна кімната з кондиційованим повітрям повинна підтримувати температуру 24-26 °С, вологість на рівні 80-85 %, а світловий режим має тривати 16 годин на добу. Залежно від розміру приміщення використовуються кондиціонери типу БК-1500 або БК-2500.

6. Темне культуральне приміщення також має систему кондиціонування повітря з температурою 25-26 °С і вологістю 70-80%. Обладнана шейкерами й ротаційними платформами, які працюють зі швидкістю 90-100 об/хв, і мають гнізда для колб об'ємом 100 та 250 мл. Застосовується для культивування калюсних та суспензійних культур.
7. Цитологічна лабораторія включає мікроскопи моделей МБИ-3, МБИ-15, МБС-9, а також необхідні витратні матеріали: предметні, покривні скельця, мікроінструменти.

### **Посуд, інструменти та матеріали**

Лабораторний посуд має бути термостійким. З посуду в лабораторії є: колби об'ємом 100, 250, 500 мл, 1-5 л; хімічні стакани (50-1000 мл); мірні циліндри (25-2000 мл); пеніцилінові флакони; чашки Петрі (скляні та пластикові); пробірки.

Інструменти: піпетки Мора (1-10 мл); автоматичні та градуйовані піпетки (0,1-0,5 мл); конічні лійки; скляні палички; мембранні фільтри «Синпор» (0,4 мкм); пастерівські піпетки; металеві ножиці; ланцети; пінцети різного розміру.

Матеріали: фільтрувальний, пергаментний, обгортковий папір; вата; марля; ватні пробки; фольга з алюмінію.

### **Проведення досліджень**

Підготовка до асептичної роботи включала повну дезінфекцію ламінарного боксу. Робоча поверхня протиралася 70 % етиловим спиртом, після чого проводилася експозиція ультрафіолетом протягом 30 хв. Для збереження стерильності всередині боксу перед початком роботи запускала система продування стерильним повітрям.

Особиста гігієна включала обов'язкове носіння стерильного лабораторного одягу, маски, рукавичок, а також обробку рук 96% етанолом перед кожною серією маніпуляцій.

Інструменти (пінцети, ланцети, ножиці) стерилізують безпосередньо перед використанням: занурюють в етиловий спирт, а потім прожарюють у полум'ї спиртівки. Для запобігання контамінації охолоджують інструменти на стерильній підставці й використовують лише одноразово перед повторною стерилізацією.

Стерилізація ЖС здійснювалася в автоклаві за температури 121 °С під тиском 1-1,5 атм. Протягом 20-25 хв.

Стерилізація посуду та витратних матеріалів проводилася у сухожаровій шафі при температурі 160-180 °С протягом 2-2,5 год. Для запобігання попадання мікроорганізмів посуд одразу після охолодження поміщали у стерильні шафи або пакували у фольгу.

Отримання асептичних експлантів бавовника здійснювали шляхом поверхневої стерилізації живого матеріалу. Попередньо насіння промивали водою з мийним розчином, далі витримували у 70% спирті (10 хв) і занурювали у 15% розчин гіпохлориту натрію (30 хв). Після стерилізації насіння тричі промивали стерильною дистильованою водою.

Перенесення насіння в середовище проводилося в ламінарному боксі, в стерильному середовищі. Для бавовника зазвичай використовують середовище МС з додаванням ауксинів (2,4-Д або НОК) та цитокінінів (кінетин, ВАР) залежно від фази морфогенезу (калюсогенез, органогенез, регенерація рослин). Використано було середовище МС без додавання фітогормонів [20].

Культивування здійснювалося в контрольованих умовах (температура 25-27 °С, вологість 70-80 %, фотоперіод 16 годин при освітленості 2000-3000 лк). Для калюсу використовували темну кімнату.

Перевірка асептичності культур проводилася шляхом висіву на контрольне середовище без гормонів. У разі появи ознак контамінації (помутніння середовища, зміна кольору, утворення колоній) зразок видалявся, а зона роботи проходила дезінфекцію.

Регенерація безвірусних рослин включала стадії індукції калюсу, розвиток органів та акліматизацію отриманих рослин-регенерантів до нестерильних умов. На фінальному етапі проводилося укорінення на середовищі МС: на середовищі МСР1 з кінетином, на МСР2 кінетин + НОК.

## **2.2. Матеріали досліджень**

Для введення в культуру *in vitro* як експлантати використовували 9 шт. насіння бавовника звичайного (*Gossypium hirsutum L.*).

## **2.3. Методи досліджень**

В дослідженні застосували загальноприйняті в біотехнології методи досліджень: методи введення в культуру *in vitro*, мікроклонального розмноження, одержання калюсних культур, інтенсивність пагоноутворення в умовах *in vitro*, укорінення рослин-регенерантів.

Калюсну тканину бавовника отримували за культивування стеблових та листкових експлантатів. Для ризогенезу брали пророслі пагони з насінин бавовника.

### **2.3.1. Стерилізація насіння бавовника та умови культивування рослини**

Стає доволі очевидно, що насіння, яке було відібране з відкритого ґрунту, може містити велику кількість мікроорганізмів – як всередині, так і

ззовні. Серед них можуть бути певні бактерії чи гриби, які можуть досить сильно унеможливити та ускладнити процес одержання стерильних проростків. Не дивлячись на те, що застосовують асептичні умови у технологіях культури рослинних тканин, завжди є ризик отримання мікробного чи грибового забруднення. І ризик може бути високим. Причинами може бути наявність ендоспориїв у вихідному матеріалі, погана або недостатня стерильність лабораторії, чи лабораторного приладдя, недотримання особистої чистоти протягом виконання досліджень.

Проблема мікробної контамінації залишається серйозною перешкодою для культивування *in vitro*, оскільки мікроорганізми конкурують з рослинними тканинами за поживні речовини, що може спричинити некроз, нестабільний ріст, зниження частоти укорінення або загибель культури.

Для дезінфекції рослинного матеріалу найчастіше застосовують поверхневі стерилізатори, такі як етиловий спирт, гіпохлорит натрію та кальцію, рідше – газоподібний хлор, n-гексан (5%) чи перекис водню. N-гексан не є класичним стерилізатором, але може покращити ефективність інших засобів, особливо в комбінації з детергентами або спиртом, шляхом попереднього знежирення насіння. Відомо також, що хлорид ртуті, хоч і ефективний, є токсичним і потребує суворого дотримання заходів безпеки при використанні, а також спеціальної утилізації відходів. У практиці стерилізації насіння бавовнику часто використовуються етанол, гіпохлорит натрію, хлорид ртуті та додецилсульфат натрію (SDS), зокрема в комбінаціях для підвищення ефективності [12,16].

У межах цього дослідження насіння було стерилізоване за допомогою 70% етилового спирту та 15% розчину комерційного відбілювача, після чого пророщене в стерильних умовах. Через 7 днів проростки перевіряли на наявність мікробного забруднення. У разі наявності інфікованих зразків їх

одразу вилучали з термостата, оскільки такі експлантати можуть стати джерелом поширення інфекції на інші культури.

Таблиця 2.1

**Порівняльна характеристика недоліків і переваг стерилізуючих засобів для насіння бавовника**

Стерилізуючий засіб	Переваги	Недоліки
Етиловий спирт (70%)	-Висока швидкість дії; -добре розчиняє ліпіди клітинної стінки мікроорганізмів	-Не проникає глибоко в тканини; -недостатньо ефективний проти ендоспориїв
Гіпохлорит натрію (NaOCl)	-Висока ефективність проти широкого спектру мікроорганізмів; -недорогий і доступний	-Може пошкоджувати тканини насіння; -вимагає ретельного змивання; -втрачає активність з часом
Гіпохлорит кальцію (Ca(OCl) <sub>2</sub> )	-Стабільніший за NaOCl; -менш агресивний до тканин	-Може залишати осад; -слабша активність порівняно з NaOCl
Газоподібний хлор (Cl <sub>2</sub> )	-Висока проникаюча здатність; -ефективний проти ендоспориїв	-Високотоксичний; -вимагає спеціального обладнання; -небезпечний для здоров'я
Перекис водню (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	-Добре окислює мікроорганізми; -екологічно безпечний продукт розкладу (вода й кисень)	-Менш ефективний проти спор грибів; -може викликати окисне пошкодження тканин
Хлорид ртуті (HgCl <sub>2</sub> )	Надзвичайно ефективний навіть у низьких концентраціях	-Високотоксичний; -утворює небезпечні відходи;

		-потребує спеціальної утилізації
Додецилсульфат натрію (SDS)	Має миючі властивості, знижує поверхневий натяг, допомагає видалити мікроорганізми	-Слабка антимікробна активність самостійно; -частіше використовується в комбінації
n-гексан	-Добре розчиняє воскові та жирові забруднення; -сприяє очищенню поверхні насіння	-Не має антимікробної активності; -легкозаймистий; -токсичний при вдиханні; -використовується лише як допоміжний агент

Таблиця 2.2

### Стадії культивування бавовника звичайного (*Gossypium hirsutum* L.)

Стадія	Умови/особливості
Стерилізація	Етанол + гіпохлорит або інші агенти
Пророщування насіння	МС без гормонів або з невеликою кількістю цитокініну
Індукція калюсу	МС + 2,4-Д або інші ауксини
Формування пагонів	МС + БАП/кінетин
Укорінення	МС з ІОК/НОК, іноді – без гормонів

#### 2.3.2. Підбір живильних середовищ для культивування бавовника звичайного

Живильне середовище відіграє ключову роль у забезпеченні успішного росту ізольованих органів, клітин і тканин рослин *in vitro*. Залежно від поставлених завдань, використовують рідкі або тверді (загущені) середовища. Для отримання твердої консистенції зазвичай застосовують агар-агар – полісахарид природного походження, який добувають з морських водоростей. На відміну від нього, желатин не підходить для рослинних культур через його токсичну дію на рослинні клітини.

Склад ЖС зазвичай включає мінеральні елементи (макро- та мікроелементи), джерело вуглеводів (частіше сахарозу або глюкозу), вітаміни та фітогормони. У деяких випадках додають комплексні органічні речовини, як-от гідролізат казеїну, дріжджовий екстракт, кокосове молоко, ендосперм зернових або рослинні екстракти. Основою для приготування середовищ є дистильована або двічі дистильована вода.

Найбільш універсальним середовищем для культури різних типів рослинних клітин є середовище Мурасіге і Скуга, яке демонструє високу ефективність при індукції калюсоутворення та морфогенезу, особливо у дводольних видів.

Середовище Гамборга та Евеленга (B5) частіше використовується для культур бобових і злакових.

Середовище Уайта переважно застосовується для укорінення і підтримання росту пагонів після регенерації.

Для індукції андрогенезу в культурах пиляків, особливо у злаків, рекомендують середовище Нічєя або китайські модифікації.

Середовище Као та Михайлюка оптимальне для вирощування ізольованих протопластів або клітин при низькій густоті.

У даному дослідженні для пророщування насіння бавовника звичайного (*Gossypium hirsutum L.*) було обрано середовище МС без додавання фітогормонів. Такий вибір є цілком обґрунтованим з огляду на біологічні особливості цієї культури. Бавовник на початкових етапах розвитку, зокрема під час проростання, не потребує зовнішнього гормонального стимулювання, оскільки насіння містить власні запаси необхідних регуляторів росту. Саме тому гормонально нейтральне середовище дозволяє забезпечити природний, ненаправлений ріст без додаткового втручання в морфогенетичні процеси.

Крім того, середовище МС є добре вивченим, збалансованим за мінеральним складом і підходить для широкого спектру дводольних видів, до яких належить і бавовник. Його універсальність та ефективність зробили це середовище стандартом у багатьох протоколах культури тканин. Важливо також, що відсутність гормонів у середовищі унеможливорює випадкову індукцію калюсоутворення або аномалій росту, які могли б ускладнити аналіз результатів або призвести до непередбачуваних змін у розвитку проростків. Саме тому середовище МС без фітогормонів було найоптимальнішим варіантом для мети цієї роботи – отримання здорових, стерильних проростків бавовника *in vitro*.

Таблиця 2.3

**Склад безгормонального середовища МС для культивування насіння бавовника (на 250 мл)**

Компонент	Концентрація
Агар-агар	2 г
Сахароза	10 г
Макросолі по МС	25 мл
Мікросолі по МС	0,25 мл
Вітаміни по МС	0,25 мл

Fe-хелат	1,25 г
КОН	2,5 краплі

Першим етапом приготування поживного середовища є розчинення агар-агару. Його відважують у термостійкий стакан, додають приблизно половину загального об'єму середовища дистильованої або бідистильованої води. Після цього залишають для набухання на 15-20 хвилин, а потім нагрівають на електроплитці до температури близько 80-100 °С для повного розчинення.

Паралельно в мірний циліндр або інший посуд наливають 100-150 мл очищеної води, до якої по черзі вводять точно відміряні об'єми розчинів макро- і мікроелементів, вітамінів, вуглеводного джерела та інші необхідні компоненти.

Після цього до основної суміші додають гарячий розчин агар-агару. Загальний об'єм середовища доводять до заданого значення (наприклад, 250 мл або 1 л) дистильованою чи бідистильованою водою.

Наступним кроком є коригування кислотності середовища. За допомогою 1 N розчину гідроксиду калію (КОН) встановлюють значення рН у межах 5,6-5,8 – залежно від вимог культури.

Після приготування середовище розливають у стерильні ємності: біологічні пробірки або колби Ерленмейєра, заповнюючи їх на половину або дві третини. Ємності герметизують ватно-марлевими пробками або закривають алюмінієвою фольгою.

Стерилізація середовища здійснюється в автоклаві при температурі 121 °С (1 атмосфера тиску) протягом 20-25 хвилин. Якщо до складу середовища входять термолабільні речовини (наприклад, деякі гормони чи вітаміни), їх не автоклавують, а вводять у вже простерилізоване середовище

після попередньої фільтрації через мембранні фільтри (метод холодної стерелізації).

Після завершення стерелізації слід дочекатися повного вирівнювання тиску в автоклаві з атмосферним. Кришку відкривають лише тоді, коли стрілка манометра повертається на нуль. Це важливо для уникнення різкого перепаду тиску, який може призвести до змочування або виштовхування пробок з посуду.

### 2.3.3. Статистична обробка результатів досліджень

Усі експериментальні дані, отримані в ході дослідження, були піддані статистичній обробці з використанням інструментів пакету Microsoft Excel, що дозволило провести базовий аналіз результатів та оцінити їхню достовірність. У розрахунках визначались стандартні похибки середнього значення, що відображено у відповідних таблицях.

Рівень ефективності проведеної стерелізації ( $E_c$ ) розраховували у відсотковому співвідношенні за формулою:

$$E_c = \frac{K_e - K_{вр.е.}}{K_e} \times 100\%,$$

де  $K_e$  – загальна кількість експлантатів, шт;  $K_{вр.е.}$  – кількість вражених експлантатів, шт.

Аналіз результатів також включав оцінку відсотка контамінації, частоти калюсоутворення та візуального стану експлантатів після культивування.

Усі розрахунки виконані з дотриманням основних принципів – об'єктивності та відтворюваності. Це має значення для отриманих результатів, щоб вони були не просто числовими значеннями, а надійною основою для аналізу, порівнянь і формулювання обґрунтованих висновків у рамках дослідження. Якщо методика розрахунків коректна, а підхід

послідовний – можна бути впевненим в отриманих даних і оцінці результатів.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 3.1. Отримання асептичного матеріалу бавовника звичайного

Насіння бавовнику, зібране в польових умовах, як правило, має високий рівень мікробного забруднення, зокрема грибковими збудниками. Це значно ускладнює процедуру ефективної поверхневої стерилізації та негативно впливає на схожість, у порівнянні з насінням, яке зберігалось в контрольованому середовищі. З огляду на ці труднощі, дане дослідження було спрямоване на порівняння ефективності різних стерилізаційних агентів, що застосовуються у практиці культури тканин, з метою вибору найбільш доступних і результативних засобів для знезараження посівного матеріалу.

Одним із широко використовуваних дезінфекційних агентів є комерційний гіпохлоритовий відбілювач, який відзначається високою ефективністю проти широкого спектра мікроорганізмів. Його концентрація та час експозиції добираються індивідуально – залежно від виду культури. Часто цей агент комбінують із 70 % етиловим спиртом, що також вважається ефективним дезінфектором у роботі з рослинами для *in vitro*-культури. Застосований у даному дослідженні метод стерилізації виявився достатньо м'яким, не пошкодив поверхню насіння, проте забезпечив лише часткову стерильність [6, 20, 22].

Після проведення стерилізації насіння було висаджене у заздалегідь приготоване ЖС МС без додавання регуляторів росту, що дозволило оцінити природну здатність проростання. Подальше культивування відбувалося в культуральній кімнаті з контрольованими параметрами мікроклімату: температура 26 °С, відносна вологість 70 %, освітлення 2500 лк та фотоперіод 16 годин світла на добу.

Через сім днів після висіву було зафіксовано такі результати: одна насінина проросла з утворенням першого листка й досягла висоти 2 см, дві інші дали паростки, але їхній ріст був неактивним; ще одна насінина зазнала грибкової інфекції; решта п'ять залишилися без змін. Протягом наступного тижня проросли ще дві насінини, тоді як три інші залишилися без змін, не подаючи ніяких ознак росту.

Маючи формулу для обчислення рівня ефективності стерилізації, та підставивши значення, отримуємо:

$$E_c = \frac{9 - 1}{9} \times 100\% = \frac{8}{9} \times 100\% \approx 88,89\%$$

Такий рівень ефективності зазвичай вважається допустимим у біотехнологічних дослідженнях, тим більше, якщо це робота з об'єктами, що характеризуються високим рівнем природної мікробної контамінації.

Але якщо потрібно забезпечити майже повну стерильність, вибраний метод стерилізації потребує вдосконалення – наприклад, шляхом коригування концентрації стерилізуючого агента, тривалості його дії або застосування комбінованих підходів.

Таким чином, результати свідчать про те, що використання лише комарційного відбілювача та 70 % етанолу не забезпечує належного рівня стерильності насіння бавовнику для культивування *in vitro*. Виявлені випадки контамінації, а також низький відсоток проростання свідчать про потребу в оптимізації стерилізаційного протоколу для підвищення ефективності дезінфекції.

### **3.2. Індукція калюсогенезу на експлантатах бавовнику звичайного**

Існує кілька видів клітинних і тканинних культур рослин, які класифікують за способом їх отримання, умовами вирощування та

джерелом походження. Коли тканини культивуються на твердому поживному середовищі, формується калюс – пухка, безструктурна маса клітин. Калюсна тканина може з'явитись як на ізольованих фрагментах рослинної тканини, що вирощуються в умовах *in vitro*, так і на самій рослині у відповідь на механічне ушкодження. Калюсна культура являє собою скупчення клітин, які активно діляться і втратили свою спеціалізацію. Такі клітини утворюються з меристематичних або вже диференційованих клітин за наявності відповідного середовища [2, 3, 8].

Клітини калюсу характеризуються великим ядром і високим вмістом РНК і ДНК. Деякі з них можуть накопичувати крохмаль та інші метаболіти вторинного характеру. У лабораторних умовах калюс можна отримати з будь-якої живої частини рослини, типу тканини та методики. Необхідною умовою для формування калюсу є присутність у середовищі двох типів фітогормонів – ауксинів та цитокінінів. Ауксини стимулюють процес дедиференціації клітин, тоді як цитокініни сприяють поділу вже дедиференційованих клітин [3].

Якщо експлантат (частина листка чи стебла) помістити на середовище, що не містить гормонів, клітинний поділ не відбувається і калюс не формується, оскільки диференційовані клітини самостійно не здатні до проліферації. У більшості випадків калюс має білий або жовтуватий колір, іноді – світло-зелений. У рідкісних випадках можливі яскраво-зелені або червонуваті відтінки, що залежать від виду рослини, частини експлантату і умов культивування. Потемніння тканини до темно-коричневого кольору зазвичай є ознакою старіння клітин і пов'язане з накопиченням окиснених фенольних речовин. Для запобігання цьому до середовища додають антиоксиданти [11].

Процес переходу клітин із диференційованого стану в дедиференційований супроводжується змінами на генетичному рівні,

зокрема активацією одних генів і пригніченням інших (епігенетичні зміни), що веде до зміни складу білків. У калюсній тканині з'являються нові, специфічні білки, тоді як білки, характерні для фотосинтезуючих клітин, зникають або синтезуються у меншій кількості. У дводольних рослин такий процес проходить легше, ніж у однодольних.

Для отримання калюсу бавовника, після стерилізації насіння і пророщування в асептичних умовах, на 7 день частини рослини висаджували у чашки Петрі з поживним середовищем, збагаченим фітогормонами. Калюс отримували з листкових (0,6-1,0 см<sup>2</sup>) і стеблових (0,4-0,7 см) частин, попередньо зробивши на них насічки для стимуляції утворення калюсу. Експлантати висаджували на стерильне поживне середовище, яке стерилізували автоклавуванням (20 хвилин при 1 атм). Культивування проводили на модифікованому середовищі МС з додаванням 0,5 мг/л БАП і 2 мг/л НОК для стимулювання калюсогенезу.

1)



2)



3)



Рис. 3.1. Калюсогенез *Gossypium hirsutum* L.: 1), 2) листові частини; 3) частини стебла

### 3.3. Прямий морфогенез *in vitro* бавовника звичайного

Прямий морфогенез *in vitro* є важливим методом біотехнологічної регенерації рослин, що дозволяє утворювати нові органи або цілі рослини без проходження через стадію калюсної тканини. У контексті бавовника звичайного (*Gossypium hirsutum* L.), який є однією з основних технічних культур, цей процес має вагомe значення для мікроклонального розмноження [3].

Джерелами експлантатів для індукції прямого морфогенезу у бавовника можуть бути гіпокотилі, котиледони, листові пластини, мезокотилі, вузли пагонів, зародкові осі та інші молоді частини проростків. Найчастіше використовують гіпокотильні або котиледонні сегменти, які виявляють високу регенераційну здатність. Молоді тканини мають кращу реакцію на фітогормональні сигнали і швидше вступають у морфогенетичну програму [5,16].

Застосування прямого морфогенезу в біотехнології доволі обширне. По-перше, його використовують щоб створювати трансгенні рослини, адже це сприяє регенерації без утворення калюсу, що мінімізує ризик соматоклональних мутацій. До переваг цього методу також належить результативність у відтворенні цінних сортів у рамках МКР. Прямий морфогенез відіграє роль у збереженні генетичного різноманіття, слугує корисним інструментом у вивченні механізмів розвитку хвороб і реакцій рослин на стресові умови. Також, цей метод базується для використання технологій гаплоїдної селекції.

Дія прямого морфогенезу полягає в активації обмеженої кількості клітин на поверхні або поблизу провідних тканин експлантату. Ці клітини зазнають дедиференціації, стають меристемоподібними та починають

активно ділитися, утворюючи примодії органів – зазвичай пагонів. Генетично цей процес пов'язаний з активацією специфічних генів, які запускають органогенез та репресію генів, відповідальних за попередню диференціацію. Також в процесі прямого морфогенезу спостерігаються епігенетичні зміни, що сприяють зміні експресії залежних від гормонів та транскрипційних факторів [12, 16].

Культивування проводиться на модифікованому середовищі МС, з додаванням регуляторів росту. Найбільш ефективним стимулятором органогенезу є БАП, який застосовують у концентраціях від 0,5 до 2,5 мг/л. У деяких протоколах також використовують кінетин або тіадіазурон (TDZ) як альтернативні джерела цитокінінової активності. Низькі концентрації ауксинів, таких як НОК або ІОК, вводять для підтримання гормонального балансу, але надмірна кількість ауксинів може спричинити калюсогенез замість прямого органогенезу [4, 21].

Попри всі переваги прямого морфогенезу, бавовник вважається культурою зі складною регенераційною здатністю. Його регенераційна відповідь значною мірою залежить від сорту (генотипова специфічність), типу тканини, стадії розвитку експлантату, а також відточеності методики. Однією з основних проблем культури під час *in vitro* є потемніння тканин унаслідок виділення фенольних сполук, які окислюються і пригнічують поділ клітин. Для запобігання цьому в середовище іноді додають антиоксиданти, наприклад, аскорбінову кислоту або активоване вугілля.

Культивування експлантатів проводять в стерильних умовах. Насіння бавовника піддають ретельній поверхневій стерилізації (в нашому випадку, 70 % етанолом і 15 % розчином гіпохлориту натрію), після чого пророщують у стерильних умовах. Для індукції прямого морфогенезу на 5-7 день вирощування апікальні меристеми рослин висаджують на модифікованому поживному середовищі МС1, збагаченому вітамінним комплексом за

Уайтом та 0,5 мг/л БАП. Для стимулювання вкорінення мікропагонів, отриманих з ізольованих апікальних меристем, їх переносили на середовище МС2. Оптимальна температура культивування становить 24-26 °С, фотоперіод – 16 годин світла та 8 годин темряви [1,9].

Через 2-4 тижні на поверхні експлантатів формуються зелені пагінці, які потім переносять на середовище для укорінення, зазвичай без цитокинінів, але з додаванням низьких концентрацій ІМК (0,1-0,5 мг/л). Укорінені рослини адаптують до умов зовнішнього середовища шляхом поступової акліматизації у вологих камерах або парниках.

Таблиця 3.1.

#### **Склад ЖС для пагоноутворення та ризогенезу бавовника звичайного**

Компоненти	МС1	МС2
Макро МС	100 мл	50 мл
Мікро МС	1 мл	0,5 мл
Вітаміни по Уайту	1 мл	1 мл
Сахароза	20 г	20 г
Агар-агар	0,7 %	0,7 %
Fe-хелат	5 мл	5 мл
БАП	0,5 мг/л	-
НОК	-	1,0 мг/л

#### **3.4. Індукція ризогенезу бавовника звичайного**

Завершальним та одним із найскладніших етапів мікроклонального розмноження є формування кореневої системи у рослин-регенерантів. Існує кілька ефективних методів стимуляції коренеутворення, серед яких:

-внесення ауксинів у ЖС;

-попередня обробка нижньої частини мікропагонів ауксиновими розчинами з подальшим культивуванням на середовищі без фітогормонів;

-додавання активованого вугілля у невеликих кількостях або затемнення нижньої частини ємностей, що зменшує дію світла, який гальмує розвиток коренів [2, 5, 10].

Деякі науковці рекомендують використовувати розведене вдвічі мінеральне середовище без гормональних добавок, тоді як інші вважають за доцільне включення ауксинів до складу середовища.

У ході цього експерименту для вкорінення використовувалось поживне середовище МС з додаванням НОК та кінетину у наступних концентраціях: НОК – 0,125 мл, кінетин – 0,025 мг/л. Перед автоклавуванням середовище приводили до необхідного рівня рН, після чого стерилізували при 121 °С протягом 20 хвилин. Після охолодження до кімнатної температури, пророслі пагони бавовнику пересаджували у готове охолоджене середовище, попередньо видаляючи скальпелем корені.

Для досліду відбирали пагони однакового розміру з добре розвинутою листовою частиною. Їх висаджували на варіанти модифікованого середовища МС: МСР1 – з додаванням 0,125 мл НОК; МСР2 – з додаванням 0,125 НОК та 0,025 мг/л кінетину.

Уже через 7 днів після перенесення пагонів у ЖС спостерігалось формування кореневої системи. Коріння з'являлося біля основи пагонів. Після аналізу отриманих результатів було встановлено, що найефективнішим виявився варіант МСР2. Один із пагонів в середовищі МСР1 досяг 3 см у довжину й утворив переважно основні корені (до 1,0-1,5 см), інший – виріс до 8 см, але продемонстрував повільніше коренеутворення, з одним довгим коренем (2,5-3,0 см).



Рис.3.2. Ризогенез на середовищі МСР1



Рис. 3.3. Ризогенез на середовищі МСР2

Отже, аналізуючи результати бачимо, що на середовищі МСР1 ризогенез активний, оскільки ауксини прямо індукують формування корневих зачатків; швидкість коренеутворення помірно висока, але спостерігається деяке обмеження росту пагона, оскільки певна кількість ауксину може пригнічувати розвиток надземної частини; утворилися переважно основні корені.

На середовищі МСР2 додавання до середовища кінетину з ауксином змінило баланс гормонів, в наслідок чого спостерігаємо утворення меншої кількості коріння, але сам корінь виріс довшим, ніж коріння в МСР1, оскільки цитокініни частково стимулюють бічне галуження; пагін більший, через стимуляцію клітинного поділу цитокініном; темпи самого ризогенезу трохи повільніші, порівняно з середовищем МСР1.

Таблиця 3.2

**Порівняльна характеристика середовищ для ризогенезу  
*Gossypium hirsutum L.***

Параметри	МСР1	МСР2
Тип фітогормонів	Ауксин (НОК)	Ауксин (НОК) + цитокінін (кінетин)
Кількість утворених коренів	Формуються переважно основні корені	Сформувався один довгий головний корінь
Швидкість утворених коренів	Висока – перші корені з'явилися швидко (4-6 днів)	Помірна – трохи повільніше (6-8 днів)
Довжина коренів	Корені коротші, але численні (1,0-1,5 см)	Корінь довший, але тільки один (2,5-3,0 см)
Розвиток	Спостерігалась неоднорідність у розвитку коренів	Розвиток більш рівномірний, менше деформацій
Листкова частина	Погано росла і трохи жовтіла	Листя зелене, тургор збережено
Пагони	Ріст уповільнений	Хороший ріст

Використання	Для отримання корневих форм	Для збалансованого розвитку <i>in vitro</i>
Ризогенез	Високий	Помірний

## ВИСНОВКИ

1. Обробка насіння бавовника звичайного (*Gossypium hirsutum L.*) 70% етанолом та 15% розчином гіпохлориту натрію виявилася ефективною, забезпечивши стерильність на рівні 88,89%. Це створило необхідні умови для ефективного перенесення більшості зразків у стерильне середовище *in vitro*.
2. Посів насіння на ЖС МС без додаткових регуляторів росту дав змогу визначити його природну здатність до проростання. Протягом перших двох тижнів більшість насінин проросли, хоча темпи росту суттєво відрізнялися. Водночас один зразок був уражений грибковою інфекцією, що підкреслює важливість підтримання стерильних умов під час культивування.
3. Калюсогенез був успішно індукований із листкових і стеблових сегментів рослин, які попередньо були оброблені та висаджені на модифіковане середовище МС з вмістом 0,5 мг/л БАП і 2 мг/л НОК. Частота утворення калюсу склала 100%, що свідчить про високу ефективність використаної комбінації фітогормонів.
4. Ініціація прямого морфогенезу з апікальних меристем відбулася на ЖС МС1, до якого був доданий вітамінний комплекс за Уайтом та 0,5 мг/л БАП. Упродовж 2-4 тижнів після перенесення на середовище спостерігалось формування зелених пагонів, придатних до подальшої стадії вкорінення.
5. У дослідах з ризогенезом найкращі результати були отримані на середовищі МСР1, що містило тільки 0,125 мг/л НОК. В цьому випадку спостерігалось швидке й активне утворення коренів біля основи пагонів. Тож якщо основна мета – отримати добре розвинену кореневу систему, то середовище тільки з НОК (ауксином) може бути ефективнішим. Якщо потрібно досягти більш збалансованого розвитку як коренів, так і пагонів, то комбінація НОК і кінетину є більш доцільною.

6. Отже, бавовник чутливо реагує на комбінацію фітогормонів, і навіть низька концентрація цитокінінів здатна покращити морфогенез.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Подгаєцький А.А. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин : монографія / А.А. Подгаєцький, В. В. Мацкевич, А.Ан. Подгаєцький. – Біла Церква : БНАУ, 2018. – 209 с.
2. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л. Біотехнологія в агросфері. Навчальний посібник. Вінниця. ТОВ «Нілан-ЛТД», 2015. – 286 с.
3. Ruyack J, Downing MR, Chang JS, Mitchel ED (1979) Growth of callus and suspension culture cells from cotton varieties (*Gossypium hirsutum* L.) resistant and susceptible to *Xanthomonas malvacearum* (E.F.SM.) Dows. *In Vitro* 15: 368–373.
4. Motyka V. Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants: Proceedings of the International Symposium on Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants / V. Motyka, M. Kaminek // The Hague: SBP Academic Publishing.–1992.– P. 33-39.
5. Agrawal, D.C., A.K. Banerjee, R.R. Kolala, A.A. Dhage, W.V. Kulkarni, S.M. Nalawade, S. Hazra and K.V. Krishnamurthy (2010). *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep.*, 16: 647–652.
6. Gill, M.S. and Y.P.S. Bajaj. 1987. Hybridization between diploid (*Gossypium arboreum*) and tetraploid (*Gossypium hirsutum*) cotton through ovule culture. *Euphytica*, 36(2): 625-630.
7. Hatipoglu, R. 1995. Introduction to Biotechnology. Cukurova University, Agricultural Faculty, Lecture Book, No: 129, Adana-Turkey.
8. Stewart, J.M. 1991. Biotechnology of Cotton: Achievements and Perspectives. ICAC Review Articles on Cotton Production Research No: 3, 56 pages, USA.
9. Кушнір, В.В. Сарнацька. Мікроклональне розмноження рослин. К., Наукова думка, 2005. - 528 с.

10. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л., Коломієць Ю.В., Антіпов И.А. Біотехнологія. К., ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2013. – 350 с.
11. Trolinder, N.L. and C. Xhixian. 1989. Genotype specificity of the somatic embryogenesis response in cotton. *Plant Cell Reports*, 8: 133-136.
12. Barampuram, S., G. Allen and S. Krasnyanski (2014). Effect of various sterilization procedures on the in vitro germination of cotton seeds. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 118:179–185.
13. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497.
14. Ouma JP, Young MM, Reichert NA (2004) Rooting of in vitro regenerated cotton (*Gossypium hirsutum* L) is influenced by genotype, medium, composition, explant, type and age. *Afr J Biotechnol* 3:313–318.
15. Evans, D.A., W.R. Sharp and C.E. Flick. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. In: *Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture*, (Ed.): Trevor A. Thorpe, Academic Press, New York.
16. Sauer DB, Burroughs R (1986) Disinfection of seed surfaces with sodium hypochlorite. *Phytopathology* 76:745–749.
17. Власенко М.Ю. Фізіологія рослин з основами біотехнології / М. Ю. Власенко, Л. Д. Вельямінова-Зернова, В. В. Мацкевич – Біла Церква, 2006. – 504 с.
18. Perlak, F. J., Deaton, R. W., Armstrong, T. A., et al. (1990) Insect resistant cotton plants. *BioTechnology* 8, 939–943.
19. Umbeck, P., Johnson, G., Barton, K., and Swain, W. (1987) Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *BioTechnology* 5, 263–266.
20. Bayley, C., Trolinder, N., Ray, C., Morgan, M., Quisenberry, J. E., and Ow, D. W. (1992) Engineering 2,4-D resistance into cotton. *Theor. Appl. Genet.* 83, 645–649.

21. Davidonis, G. H. and Hamilton, R. H. (1983) Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. *Plant Sci. Lett.* 32, 89–93.
22. Stewart, J.M. and C.L. Hsu. 1977. In ovulo embryo culture and seedling development of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta*, 137: 113-117.
23. Webster, S., S.A. Mitchell and M.H. Ahmad (2003). A novel surface sterilization method for reducing fungal and bacterial contamination of field grown medicinal explants intended for in vitro culture. Proceedings of 17th SRC conference entitled ‘Science and Technology for Economic Development: Technology Driven Agriculture and Agro-Processing’ SRC, Jamaica.

## ДОДАТКИ



НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ  
І ЕКОЛОГІЇ

**ЗБІРНИК**

матеріалів доповідей

**XI МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ  
КОНФЕРЕНЦІЇ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ**

**І МОЛОДИХ ВЧЕНИХ**



**«ЕКОЛОГІЯ – ФІЛОСОФІЯ ІСНУВАННЯ  
ЛЮДСТВА»**

**23-24 квітня 2025 р.**

Київ – 2025

<i>Герасимо К., Мінцкіо А.А.</i> <b>ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ОРГАНІЗАЦІ МІСЛИВСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА ПО ЗАЙЦЮ СТРОМУ</b> .....	37
<i>Гайда В.Р., Паламарчук С.П.</i> <b>ОСОБЛИВОСТІ ПРОВЕДЕННЯ ЕКОЛОГІЧНОЇ ОЦІНКИ В УКРАЇНІ ТА СВІТІ</b> .....	39
<i>Гончаренко Н.С., Бондарь В.І.</i> <b>ЕКОТОКСИКОЛОГІЧНЕ НАВАНТАЖЕННЯ НА ҐРУНТИ ВНАСЛІДОК БОЙОВИХ ДІЙ</b> .....	41
<i>Гончарук М.В., Коваченко О.Л.</i> <b>ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ <i>IN VITRO</i> <i>COSSYRIUM HIRSUTUM</i> L.</b> .....	42
<i>Гордісто С.О., Нестерова Н.Г.</i> <b>ВІПЛИВ ЗАСОДЖЕННЯ ҐРУНТІВ НА ЕКОЛОГІЧНІ ПРОЦЕСИ В АГРОЕКОСИСТЕМАХ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЗМЕНШЕННЯ ЙОГО НЕГАТИВНИХ НАСЛІДКІВ</b> .....	44
<i>Гребельник О.Ю., Полюк С.Д.</i> <b>ОЦІНКА ВІПЛИВУ НА ДОВКІЛЛЯ СЛОВ'ЯНСЬКОЇ ТЕС</b> .....	46
<i>Гудзенко С.В., Клима А.В.</i> <b>МІКРОБІОЛОГІЧНА ОЦІНКА ЯКОСТІ ВОДИ ВІДКРИТОЇ ВОДОЙМИ У СЕЛІ ХОТІВ КІЇВСЬКОЇ ОБЛАСТІ</b> .....	48
<i>Гулік С.В., Нестерова Н.Г.</i> <b>ФЕРМЕНТАТИВНЕ РОЗЩЕПЛЕННЯ ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗНОГО КОМПЛЕКСУ МІКРОМІЦЕТАМИ <i>TRICHODEEMA SPP.</i></b> .....	50
<i>Давирський А.В., Суйко О.В.</i> <b>ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ <i>BIBDULELA DAVIDI</i> В УМОВАХ <i>IN VITRO</i></b> .....	51
<i>Дідишко І.А., Слободянник В.Г.</i> <b>РОЛЬ ПАРКІВ У ЗБЕРЕЖЕННІ МІСЬКИХ ЕКОСИСТЕМ</b> .....	53
<i>Ефименко О.Ю., Мінцкіо А.А., Давирський Л.А.</i> <b>ЕКОЛОГІЧНИХ НОРМАТИВІВ ВИДОБУВАННЯ КОРИСНИХ КОПАЛИН (НА ПРИКЛАДІ ТЕРНОПІЛЬСЬКОЇ ОБЛАСТІ)</b> .....	55
<i>Зеленка В.А., Полюк С.Д.</i> <b>ХІМІЧНА ПРОМІСЛОВІСТЬ ЯК ЧИННИК ЗАБРУДНЕННЯ ДОВКІЛЛЯ: ЛОКАЛЬНИЙ АНАЛІЗ ПІДПРИЄМСТВА ТОВ «ТСХ-ХІМРЕАКТИВ»</b> .....	57
<i>Ільїн І.С., Ситник А.Ю., Бурдубітський А.М.</i> <b>ЗНАЧЕННЯ АГРОФІЗИОЛОГІЧНИХ ЗАХОДІВ ПРИ УПРАВЛІННІ ПРОДУКЦІЙНИМ ПРОЦЕСОМ ЗА ВИРОЩУВАННЯ ЯРОЇ ПШЕННИЦІ СОРТУ МІРОНІВСЬКА-ЯРА В УМОВАХ ПІВНІЧНОЇ ЧАСТИНИ ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ</b> .....	59
<i>Калич П.І., Ладика М.М.</i> <b>ЕКОЛОГІЧНИЙ СТАН РІЧКИ ДУНАЙ</b> .....	61
<i>Клюшова А.І., Данилюк А.В.</i> <b>ВІРУСНІ ТА ГРИБНІ ХВОРОБИ ПШЕННИЦІ В УКРАЇНІ ТА МЕХАНІЗМИ ВІПЛИВУ ІМУНІТЕТУ</b> .....	63

УДК 581.1:633.511

**ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ IN VITRO GOSSYPIUM HIRSUTUM L.**

*Гончарук М.В.* - студентка 4 курсу спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія», факультету захисту рослин, біотехнологій та екології

*Кляченко О.Л.*, доктор с.-г. наук, професор кафедри екобіотехнології та біорізноманіття

*Національний університет біоресурсів і природокористування України*

Бавовна є основною товарною культурою в Пакистані. Вона дала значний поштовх сільськогосподарській промисловості і є основним джерелом надходжень іноземної валюти. Внутрішнє виробництво харчової олії також поповнюється за рахунок бавовни. Вважається, що бавовна не піддається проліферації in vitro. Повідомлялося про соматичний ембріогенез і регенерацію рослин з гіпокотилів, але реакція сильно залежить від генотипу. Рослини бавовнику сильно обмежені в регенерації in vitro з калюсу, протопласту або тканин листя. Ця поширена проблема наразі обмежує покращення небагатьох потенційних комерційних генотипів за допомогою генної інженерії. Розробка протоколів культури

тканини для індукції ефективної проліферації незалежно від генотипу є бажаною для генетичної трансформації бавовнику. Культура верхівкових паростків є альтернативою для отримання рослин і вирішення проблем відновлення рослин з калюсних тканин.

Таким чином, для покращення потенціалу комерційних сортів бавовнику для генетичної трансформації було розроблено альтернативну процедуру регенерації рослин бавовнику *in vitro* через верхівки пагонів. Ця процедура є досить простою і дешевою, а також потребує менших трудовитрат на регенерацію рослин бавовнику. У різних методах регенерації бавовнику через верхівки пагонів використовувалися різні типи і рівні фітогормонів.

**Мета роботи.** Дослідити особливості культивування *in vitro* *Gossypium hirsutum* L.; вибір підходящого живильного середовища для даного виду малькових.

**Матеріали та методи.** Вихідним матеріалом є пророслі пагони бавовнику (5 шт). Спиртівка, спирт етиловий 96%, дистильована вода, піпет, скальпель.

Використовували живильне середовище Мурасіге-Скута з додаванням нафталоктової кислоти (НОК) та кінетину у концентрації: НОК – 0,125 мг, кінетину – 0,025 мг/л. Середовище автоклавують при 121°C протягом 20 хвилин після регулювання рН. Автоклавоване середовище охолоджують до кімнатної температури. Пророслі пагони бавовнику пересаджують в готове живильне середовище, відрізаючи корінь.

**Результати та їх обговорення.** Через тиждень після введення пагонів в живильне середовище, було зафіксовано утворення коріння та подальше укорінення. Один з паростків проріс до 3 см і пустив бічні корені; другий виріс до 7 см, але в порівнянні з першим погано укорінився (бічних коренів не спостерігалось); третій виріс до 6 см і пустив бічні корені; у четвертого та п'ятого при пересаджуванні були зламані листки з частиною стебла, тож було посаджено поряд і стебло, і листок із частиною стебла. Пересажене стебло і в четвертого, і в п'ятого було без змія, а частина стебла з листком пустила невелике коріння.

MS-середовище містить високу концентрацію макро- і мікроелементів, необхідних для росту рослинних клітин у культурі. Воно добре підтримує швидке ділення клітин, калюсоутворення та органогенез — усе це критично для бавовнику, оскільки він має відносно складну морфогенетичну реакцію в культурі *in vitro*. НОК у комбінації з кінетином формують оптимальний гормональний баланс, забезпечують сприятливі умови для росту, ділення та морфогенезу клітин бавовнику *in vitro*, що особливо важливо при мікроклональному розмноженні.