

**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 *Dianthus barbatus* в асептичну культуру»

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук,
доцент,
завідувач кафедри
екобіотехнології та
біорізноманіття

(підпис)

Олена КВАСКО

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи

Кандидат біологічних наук,
доцент, кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

(підпис)

Олександр СУБІН

Виконав

(підпис)

Станіслав УРБАНОВСЬКИЙ

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри екобіотехнології та
біорізноманіття

_____ Олена КВАСКО

«___» _____ 2025 р.

ЗАВДАННЯ

На виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студенту

Урбановського Станіслава Михайловича

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи «Введення *Dianthus barbatus* в асептичну культуру»

затверджені наказом НУБіП України від «22» жовтня 2024 р. №1880.С

Термін подання завершеної роботи на кафедру 2025.05.15

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи: насіння *Dianthus barbatus* сорту 'Black Magic'; стерилізаційні агенти, безгормональні та гормональні живильні середовища; ламінарний бокс; термостати; культуральне обладнання.

Перелік питань, які потрібно розробити: введення насіння *Dianthus barbatus* у культуру *in vitro*; оптимізація схеми стерилізації насіннєвого матеріалу; визначення ефективних умов пророщування; підбір складу живильного середовища; дослідження морфометричних параметрів проростків; статистична обробка отриманих результатів.

Дата видачі завдання «1» вересня 2024 р.

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи _____ Олександр СУБІН

Завдання прийняв до виконання _____ Станіслав УРБАНОВСЬКИЙ

РЕФЕРАТ

Дипломна робота на тему «Введення *Dianthus barbatus* в асептичну культуру» виконана на 45-х сторінках друкованого тексту, містить 4 інформаційні таблиці та 5 рисунків.

Складається із наступних розділів: вступ; огляд літератури; матеріали та методи дослідження; результати дослідження; висновки; список використаної літератури.

Об'єкт дослідження – біотехнологічні аспекти отримання асептичної культури *Dianthus barbatus* сорту «Black Magic» в умовах *in vitro*.

Предмет дослідження – вихідний рослинний матеріал *Dianthus barbatus* сорту «Black Magic».

Дослідження проводилися в Навчально-науковій лабораторії біотехнології та клітинної інженерії кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Метою роботи було дослідити ефективність введення насіння гвоздики бородатої (*Dianthus barbatus* сорту «Black Magic») в асептичну культуру *in vitro* для створення високоякісного стерильного вихідного матеріалу, придатного до подальшого мікроклонального розмноження.

У процесі дослідження було визначено оптимальні умови стерилізації насіння, які забезпечують до 95–100% стерильності. Найкращі результати отримано за використання 0,1% сулема (HgCl₂) протягом 5 хвилин.

В якості живильного середовища використовували базову формулу МС (Murashige & Skoog) з додаванням фітогормонів: 1,0 мг/л БАП та 0,2 мг/л ІОК, що сприяло проростанню та формуванню проростків, із коефіцієнтом розмноження 5 на 14-й день культивування.

Дослідження підтвердило ефективність використання насіння як експлантатів для введення *Dianthus barbatus* в культуру *in vitro*. Сформовані асептичні культури можуть бути використані для подальшої розробки

технологій мікроклонального розмноження, індукування калусу та створення оздоровленого посадкового матеріалу гвоздики бородатої.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ		4
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ		7
ВСТУП		8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ		10
1.1	Вступ до огляду літератури	10
1.2	Ботаніко-біологічна характеристика <i>Dianthus barbatus</i>	12
1.3	Застосування гвоздики бородатої в озелененні, медицині, промисловості, біотехнології	15
1.4	Особливості мікроклонального розмноження <i>Dianthus barbatus</i>	17
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ		20
2.1	Місце проведення досліджень, обладнання лабораторії та умови культивування	20
2.2	Стерилізація насіння та умови культивування	21
2.3	Підбір вихідного матеріалу	26
2.4	Методи стерилізації	28
2.5	Підбір живильних середовищ	30
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ		33
3.1	Введення в культуру <i>in vitro</i> гвоздики бородатої	33
3.2	Морфометричний аналіз проростків <i>Dianthus barbatus</i> в умовах <i>in vitro</i>	37
ВИСНОВКИ		39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ		40
ДОДАТКИ		43

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

БАП – 6-бензиламінопурин

ІОК – індоліл-3-оцтова кислота

НОК – α -нафтилоцтова кислота

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

МС – середовище Мурасіге і Скуга

МКР – мікроклональне розмноження

ЖС – живильне середовище

ВСТУП

Гвоздика бородата (*Dianthus barbatus*) — одна з найпоширеніших декоративних дворічних рослин родини *Caryophyllaceae*, яку культивують у квітникарстві як для зрізання, так і для озеленення відкритих територій. Завдяки широкій палітрі кольорів, тривалому періоду цвітіння та стійкості до несприятливих умов середовища, ця культура набула особливої популярності серед ландшафтних дизайнерів і квітникарів. Окрему увагу привертають сорти з темним забарвленням, зокрема ‘Black Magic’, який відзначається глибоким бордово-чорним відтінком пелюсток і високими декоративними якостями.

Попри широку затребуваність *D. barbatus* у садівництві, традиційні методи її розмноження — зокрема насіннєвий — мають низку суттєвих обмежень. До основних належать: тривалий період проростання, ризик контамінації насіння патогенами, неоднорідність нащадків, зниження декоративності у гібридів другого покоління. Все це обумовлює необхідність застосування сучасних біотехнологічних методів, зокрема введення в культуру *in vitro*.

Культура тканин — це сукупність методів вирощування ізольованих клітин, тканин або органів рослин у штучно створеному середовищі, за стерильних умов, у контрольованих фізико-хімічних параметрах. Сучасні дослідження в цій галузі розвиваються у двох напрямках. Перший — фундаментальний, пов’язаний з вивченням фізіології та морфогенезу рослинних клітин. Другий — прикладний, зорієнтований на отримання здорового, генетично однорідного посадкового матеріалу для потреб сільського господарства та декоративного рослинництва.

Один із найефективніших прикладних підходів — це введення рослин у культуру *in vitro* з подальшим мікроклональним розмноженням. При цьому експлант (наприклад, насіння, апікальні меристеми чи бруньки) зазнає серії етапів стерилізації та адаптації в живильному середовищі. Усі процеси проходять під суворим контролем світлового режиму, температури, рН

середовища та фітогормонального складу. Кінцевою метою є отримання здорових проростків, придатних для подальшої регенерації та розмноження.

Під час виведення насіння *Dianthus barbatus* у стерильну культуру особливу роль відіграють: тип стерилізуючого агента (HgCl_2 , AgNO_3 , Thimerosal тощо), тривалість обробки, спосіб пророщування насіння, оптимальна комбінація фітогормонів для живильного середовища (БАП, ІОК).

На відміну від методів, які передбачають пряме розмноження з меристем або бруньок, використання насіння дозволяє уникнути травмування первинної меристеми, зменшити ризик епігенетичних змін, а також пришвидшити процес отримання стерильних культур. Це особливо важливо у випадку таких складних за морфофізіологією рослин, як *Dianthus barbatus*, що характеризується високою видовою варіабельністю, чутливістю до умов культивування та селективною відповіддю на гормональні стимулятори.

Незважаючи на велику кількість досліджень у галузі культури тканин, методика введення гвоздики бородатої в асептичну культуру до цього часу лишалась недопрацьованою. У більшості робіт увага зосереджена на *Dianthus caryophyllus* (гвоздиці голландській), у той час як *Dianthus barbatus* має ряд морфо-фізіологічних відмінностей, що вимагають окремого підходу до стерилізації та вибору живильного середовища.

У цьому контексті об'єктом дослідження є насіння гвоздики бородатої сорту 'Black Magic' як модельний матеріал для асептичного культивування, а предметом дослідження — ефективність різних стерилізуючих схем, параметри живильного середовища МС та умови пророщування, що забезпечують високу асептичність і життєздатність проростків в умовах *in vitro*.

Таким чином, актуальність нашого дослідження полягає у розробці чіткої, відтворюваної та ефективної схеми введення насіння *Dianthus barbatus* в культуру *in vitro* з подальшою регенерацією. Це дасть змогу забезпечити потреби квітникарства у якісному, безвірусному та однорідному посадковому матеріалі.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Вступ до огляду літератури

Упродовж останніх десятиліть розвиток біотехнології рослин демонструє стрімке зростання, зумовлене не лише суто науковим інтересом, а й конкретними запитами агропромислового комплексу, фармакології, ландшафтного дизайну та суміжних галузей. Одним із ключових інструментів сучасної біотехнології стала культура тканин *in vitro* — потужна система, що дозволяє не тільки розмножувати рослини в умовах контрольованого середовища, а й отримувати оздоровлений, генетично стабільний та однорідний посадковий матеріал за відсутності негативного впливу зовнішніх патогенних чинників.

Практика впровадження технологій асептичного культивування набуває дедалі більшого поширення у роботі з декоративними, плодово-ягідними, лікарськими та навіть енергетичними видами рослин. Однак, незважаючи на досягнення у розмноженні сільськогосподарських культур, низка елементів інноваційної біотехнології досі недостатньо досліджена в контексті окремих представників флори, особливо декоративних видів, що мають складну морфогенетичну специфіку або потребують індивідуального підходу до створення живильних середовищ, адаптації чи стерилізації.

Одним із таких перспективних, але недостатньо вивчених об'єктів є гвоздика бородата (*Dianthus barbatus*) — один із найстаріших культурних представників родини *Caryophyllaceae*, який вирізняється як високими декоративними якостями, так і адаптивною пластичністю до різноманітних кліматичних умов. Незважаючи на широку популярність у садівництві, парковому озелененні та культурі зрізу, *Dianthus barbatus* досить рідко ставала предметом глибокого біотехнологічного аналізу в порівнянні, скажімо, з *Dianthus caryophyllus* (гвоздика голландська), яка є своєрідним стандартом для мікроклонального розмноження у світовій флористичній індустрії [7, 19, 21].

При цьому слід наголосити, що саме *D. barbatus* має значні переваги, які свідчать на користь її біотехнологічного потенціалу: помірна морозостійкість, здатність до перехресного запилення, багатий набір біоактивних сполук у тканинах, а також стабільна морфогенетична відповідь у культурі *in vitro* при правильному доборі гормонального складу живильного середовища. Крім того, даний вид цікавий з точки зору селекції — завдяки високому генетичному поліморфізму у межах сорту та міжсортів мінливості, що відкриває перспективи використання *D. barbatus* як донора виведених ознак, включаючи колір пелюсток, тип суцвіття та тривалість вегетаційного періоду [10, 11].

Попри це, більшість публікацій, присвячених цьому виду, мають вузькоспеціалізований характер, здебільшого зосереджені на описі агротехнічних вимог або декоративних характеристик, залишаючи осторонь молекулярно-біологічні аспекти, протоколи мікроклонального розмноження та тонкощі регенераційного морфогенезу. Наявні відомості, хоча й цінні, розпорошені між окремими публікаціями, й у більшості випадків не дають цілісного уявлення про повноцінне біотехнологічне введення *D. barbatus* у стерильну культуру [13, 22].

Таким чином, аналіз літератури з теми введення *Dianthus barbatus* в асептичну культуру має на меті кілька важливих завдань. Насамперед, він дозволяє систематизувати розрізнені джерела інформації, розмежувати прикладні та фундаментальні напрями досліджень та визначити ті лакуни, які потребують подальшого опрацювання. Друге — це зіставлення науково обґрунтованих протоколів для суміжних видів роду *Dianthus* з метою адаптації їх до умов культивування *D. barbatus*. Третє — віднайдення ефективних методик стерилізації, регуляції росту, умов освітлення та адаптації проростків, що забезпечують стабільне проростання насіння та первинну регенерацію.

Загалом, огляд літератури, присвячений *Dianthus barbatus*, виконує роль не лише теоретичного підґрунтя для дослідження, а й є вихідною точкою для формування експериментальної частини дипломної роботи. Він надає

можливість побудувати науково обґрунтовану гіпотезу, підготувати проект культивування рослин *in vitro*, оцінити потенційні труднощі, а також спрогнозувати кінцеву ефективність розробленої методики. На цьому тлі, наша робота ставить перед собою конкретну мету — оцінити можливість успішного введення гвоздики бородатої в асептичну культуру шляхом пророщування стерилізованого насіння та вивчення його морфометричних показників у стандартних умовах *in vitro*.

Таким чином, актуальність обраного напрямку дослідження полягає у поєднанні теоретичних основ біотехнології тканин з практичним застосуванням у декоративному рослинництві, а також у заповненні наукової прогалини щодо особливостей морфогенезу та регенерації *Dianthus barbatus* в умовах контрольованого середовища. Такий підхід забезпечує не лише можливість удосконалити існуючі протоколи культивування, а й сформуванню наукової бази для подальшої селекції та промислового розмноження цього перспективного виду.

1.2. Ботаніко-біологічна характеристика роду і виду *Dianthus barbatus*

Рід *Dianthus* із родини *Caryophyllaceae* є одним із найвідоміших і найчисельніших серед декоративних рослин помірною кліматичною зоною. Його представники широко поширені в флорі Європи, Західної та Центральної Азії, Середземномор'я та частково Північної Африки. Сучасна систематика налічує понад 300 ботанічних видів *Dianthus*, з-поміж яких особливо вирізняються гвоздика садова (*D. caryophyllus*), гвоздика турецька (*D. barbatus*), гвоздика альпійська (*D. alpinus*), гвоздика піренейська (*D. pyrenaicus*) та інші, багато з яких набули культурного статусу завдяки декоративним якостям або здатності до міжвидової гібридизації [7, 13, 21].

Етимологія назви *Dianthus* має грецьке походження: "*dios*" — "божественний" і "*anthos*" — "квітка", що вказує на особливе естетичне

ставлення до цих рослин ще в античні часи. Відповідно, уже понад тисячоліття гвоздика посідає почесне місце у флористиці, культурній символіці та декоративному садівництві. Види цього роду, зазвичай, мають трав'янисту життєву форму, розвинену систему супротивного листкорозташування, прямостоячі або висхідні стебла, а їхні квітки, п'ятипелюсткові, часто мають бахромчасті або зубчасті краї пелюсток — морфологічна ознака, притаманна більшості представників роду [1, 10].

Серед них гвоздика бородата (*Dianthus barbatus*) займає особливе місце. Її ботанічний опис включає дворічну або короткоживу багаторічну трав'янисту рослину, що у перший рік формує лише прикореневу розетку, а на другий рік — генеративні пагони з характерними щиткоподібними суцвіттями. Природний ареал цього виду охоплює Карпати, Балкани, Кавказ, частково Малу Азію. З часом *D. barbatus* натуралізувалась у країнах Західної та Центральної Європи, а згодом — у регіонах Північної Америки та Східної Азії. Її здатність до адаптації до різних кліматичних умов зробила рослину популярною не лише серед ландшафтних дизайнерів, а й серед науковців, які вбачають у ній об'єкт перспективних біотехнологічних досліджень [5, 8, 17].



Рис.1.1. Різновид квітів гвоздики: А – міні-гвоздика, Б – бородата

Морфологічна структура *D. barbatus* включає прямостояче, розгалужене стебло, яке може досягати 80 см за висоти в сприятливих умовах, хоча

стандартні розміри зазвичай варіюються в межах 40–60 см. Листки мають супротивне розташування, лінійно-ланцетну форму, з гладенькою поверхнею і виразним жилкуванням. Суцвіття — щиткоподібні, містять від 10 до 30 квіток. Квітки можуть мати найрізноманітніше забарвлення — від білого й ніжно-рожевого до пурпурового, бордового, з характерними контрастними "очками" або плямами, а також бахромчастими краями пелюсток, що створює ефект "бороди", завдяки якому рослина і отримала свою назву [10, 12].

Цвітіння, як правило, розпочинається наприкінці травня та триває до середини липня. Рослина є ентомофільною: запилення забезпечується переважно метеликами (денними та нічними) та бджолами. У процесі генеративного розмноження формується сухий плід — багатонасінна коробочка, що розкривається чотирма зубцями. Насіння дрібне, плескато-овальне, блискучо-чорного кольору, зберігає життєздатність при зберіганні в сухих умовах до 3–4 років [3, 15].

З агротехнічної точки зору гвоздика бородата невибаглива, однак для досягнення повноцінного декоративного ефекту вимагає добре дренованих, родючих, слабокислих або нейтральних ґрунтів. Рослина є світлолюбною, але здатна витримувати тимчасове затінення. Водночас, підвищена вологість і застій води можуть спричинити ураження кореневими гнилями та іншими грибковими захворюваннями. Гвоздика помірно морозостійка: за наявності снігового покриву здатна перезимувати без укриття, проте у відкритих районах без природного захисту може зазнавати пошкоджень [6, 16].

Біологічна й фізіологічна пластичність *D. barbatus* дає змогу ефективно використовувати її у селекційній роботі. Високий рівень генетичної варіабельності, виражений у значному спектрі варіантів забарвлення, розмірів суцвіття, довжини вегетаційного періоду, дає змогу отримувати нові культурні форми та гібриди з цінними ознаками. Крім того, здатність *D. barbatus* до успішного пророщування в умовах *in vitro* відкриває широкі перспективи для

використання цієї рослини у дослідженнях морфогенезу, калісогенезу, формування апікальних меристем, що є ключовими процесами у мікроклональному розмноженні [4, 14, 24].

Варто також зазначити, що за останнє десятиріччя спостерігається зростання зацікавленості науковців до вивчення фізіолого-біохімічних особливостей цього виду. У тканинах *D. barbatus* було виявлено низку біоактивних речовин, серед яких флавоноїди, антоціани, сапоніни, ефірні олії, що, своєю чергою, формує підґрунтя для потенційного фармацевтичного або косметологічного застосування. Такий багатогранний морфо-біологічний і фітохімічний профіль підтверджує доцільність подальших досліджень гвоздики бородатої як об'єкта прикладної ботаніки та біотехнології [11, 20].

Таким чином, *Dianthus barbatus* є не лише об'єктом декоративного культивування, а й надзвичайно перспективною моделлю для вивчення закономірностей онтогенезу, адаптації, мікроклонального розмноження та тканинної культури в загальній біотехнології рослин.

1.3. Застосування гвоздики бородатої в озелененні, медицині, промисловості, біотехнології

Упродовж багатьох століть гвоздика бородата (*Dianthus barbatus*) привертала увагу не лише завдяки своїй декоративній привабливості, а й через практичну цінність, яку вона демонструє в найрізноманітніших сферах: від ландшафтного дизайну та озеленення до біотехнології й потенційного фармацевтичного використання. У наш час, на тлі глобального інтересу до сталих технологій у сільському господарстві, фітотерапії та охороні біорізноманіття, ця культура здобуває нове, більш глибоке осмислення як об'єкт міждисциплінарних досліджень.

Насамперед, гвоздика бородата широко застосовується в озелененні та ландшафтному дизайні. Завдяки своїй надзвичайно багатій палітрі кольорів,

високій декоративності та відносній невибагливості до умов зростання, вона є однією з найбільш популярних рослин у композиціях відкритого ґрунту. Її висока варіабельність забарвлення та здатність тривалий час утримувати квіти роблять її цінним компонентом для клумб, рабатов, бордюрів, альпійських гірок, міських газонів. Крім того, гвоздика бородата активно використовується для зрізу завдяки довготривалому збереженню декоративних властивостей у букетах — як свіжих, так і засушених. Саме тому цю культуру все частіше вирощують на спеціалізованих квіткових фермах, орієнтованих на внутрішній ринок та експорт [10, 16].

Сфера медицини та фармакології також виявляє інтерес до *Dianthus barbatus*, оскільки численні фітохімічні дослідження підтверджують її насиченість біологічно активними речовинами. Зокрема, у квітках і листках цієї рослини виявлено високий вміст флавоноїдів (лютеолін, кемпферол, кверцетин), антоціанів, сапонінів, фенольних кислот, а також алкалоїдів і ефірних олій [6, 19]. Відомо, що флавоноїди, наприклад, мають антиоксидантні, протизапальні та антибактеріальні властивості, а також сприяють зміцненню капілярів і зниженню ламкості судин. Антоціани можуть бути ефективними при лікуванні хронічних захворювань, пов'язаних зі стресом і старінням, тоді як сапоніни проявляють гемолітичну активність та адаптогенні властивості [17].

І хоча гвоздика бородата не включена до фармакопейного переліку лікарських рослин в Україні, у народній медицині її настої та відвари застосовували при шкірних захворюваннях, запальних процесах у ротовій порожнині, для заспокоєння нервової системи. У тибетській та китайській традиційній медицині *Dianthus sp.* (зокрема *D. superbus*, *D. chinensis*) використовуються як сечогінні, протизапальні та очищувальні засоби [8, 24].

Крім цього, перспективним є використання гвоздики у парфумерній та косметичній промисловості, адже її ефірна олія має приємний, м'який аромат із нотами гвоздики, троянди та деревини. З неї виготовляють ароматизатори для кремів, лосьйонів, шампунів, а також включають до складу натуральних

парфумів. Олія містить евгенол — активну речовину з антисептичними та легкими анестезуючими властивостями [3].

У біотехнології *Dianthus barbatus* розглядається як перспективна модельна культура. Порівняно з іншими видами роду, вона проявляє добру реакцію на введення в культуру *in vitro*, демонструючи стабільну адаптацію при пророщуванні стерильного насіння на середовищах типу MS [22]. Застосування методів мікроклонального розмноження дозволяє отримати генетично однорідний, оздоровлений матеріал, що особливо важливо для фітосанітарного контролю й селекційної роботи. У цьому контексті *D. barbatus* може використовуватись як модельна система для дослідження апікального та непрямого морфогенезу, калісогенезу, регенерації, а також як платформа для біосинтезу цінних метаболітів [12, 18].

Окремо слід згадати про потенціал гвоздики в екологічній біотехнології — зокрема, у фітореMediaції. Відомо, що багато видів гвоздики здатні накопичувати важкі метали з ґрунту, не втрачаючи при цьому декоративних властивостей. Це відкриває шлях до створення композицій озеленення, які одночасно виконуватимуть функцію очищення навколишнього середовища від токсичних елементів (наприклад, Pb, Cd, Zn) [23].

Таким чином, *Dianthus barbatus* варто розглядати не лише в межах традиційного квітникарства, а й як універсальну рослину з широким спектром практичного застосування. Її декоративна, лікувальна, ароматична та біотехнологічна цінність утворює гвоздику бородату як важливий об'єкт сучасної науки й практики, що поєднує естетику природи з можливостями технологічного прогресу.

1.4 Особливості мікроклонального розмноження *Dianthus barbatus*

Мікроклональне розмноження (МКР), або клональне мікророзмноження, — це одна з найважливіших технологій сучасної біотехнології рослин, яка ґрунтується на тотипотентності рослинних клітин і дає змогу отримувати велику кількість генетично однорідного, фітопатологічно чистого посадкового

матеріалу в контрольованих умовах *in vitro*. На відміну від класичних способів вегетативного розмноження, які обмежені сезонністю, фізіологічним станом рослини-донора та ризиками зараження, мікроклональне розмноження забезпечує високий рівень репродуктивної ефективності, просторову економію та біобезпечність процесу [4, 7].

У контексті роду *Dianthus* методи МКР активно використовуються для садової (*D. caryophyllus*), альпійської (*D. alpinus*), перистої (*D. plumarius*) та інших гвоздик, однак для *D. barbatus*, попри її широку декоративну популярність, схеми мікроклонального розмноження все ще недостатньо оптимізовані. Ця прогалина створює об'єктивну потребу у поглибленому дослідженні особливостей морфогенезу саме цього виду, а також у розробці специфічних протоколів стерилізації, живильного забезпечення й адаптації *ex vitro* [8, 14, 18].

Однією з ключових передумов успішного клонального розмноження є вибір початкового експлантату. У випадку *Dianthus barbatus*, найкращі результати демонструють апікальні та пазушні меристеми, а також стерильні насіннєві проростки, отримані за допомогою багатоступеневої схеми стерилізації (70% етанол + сулема або AgNO_3), яка забезпечує високий рівень асептичності без значного зниження життєздатності тканин [9, 22].

Після введення в культуру проростки або меристемні сегменти культивують на базових середовищах, найчастіше типу Мурасіге-Скуга (MS) [22], із додаванням фітогормонів — насамперед цитокінінів (БАП — 6-бензиламінопурин) та ауксинів (індоліл-3-оцтова кислота — ІОК, або нафтилоцтова кислота — НОК). Дослідження підтверджують, що співвідношення цитокінінів і ауксинів безпосередньо впливає на морфогенетичну траєкторію клітин: перевага цитокінінів стимулює пагоноутворення, тоді як високий вміст ауксинів сприяє калюсогенезу й коренеутворенню [5, 12].

У більшості експериментів, проведених з *D. barbatus*, середовище з 0,5–1,0 мг/л БАП у поєднанні з 0,1–0,5 мг/л НОК забезпечувало ефективну

ініціацію прямого морфогенезу без надмірного утворення калюсу, що важливо для уникнення соматональної мінливості. Проте для досліджень із метою вторинної метаболічної продукції чи довготривалого зберігання культур вважається доцільним запуск непрямого морфогенезу через калюсну стадію. У цьому випадку використовують поєднання БАП (0,5–2,0 мг/л) із 2,4-Д або кінетином [11, 13].

Нерідко у процесі культивування спостерігається вітрифікація тканин — явище гіпергідратії, за якого клітини стають прозорими, водянистими, з нестабільною структурою. Причинами можуть бути надмірна вологість у культурному середовищі, низька концентрація гелеутворювача або недостатня вентиляція. Для її зменшення використовують агар у концентрації 0,8–1,0%, заміну агару на гелан-гум або інші гідрогелі, зменшення цукрового навантаження середовища, контроль вологості в камерах, а також напівпроникні кришки контейнерів [3, 27].

Завершальним етапом є адаптація рослин-регенерантів до умов *ex vitro*. Це критичний момент, коли рослина переходить із стерильного середовища до відкритого середовища з мікробіотою. Для успішної акліматизації проростки ретельно промивають від залишків агару, обробляють фунгіцидами (наприклад, розчином фундазолу), висаджують у стерильний субстрат (суміш торфу й перліту, 1:1), накривають прозорими ковпаками або поліетиленовими пакетами для збереження вологості, та поступово знижують рівень вологого мікроклімату. Через 2–3 тижні починається фаза дорощування з підживленням макро- і мікроелементами у вигляді розчину по типу MS [2, 20].

Таким чином, гвоздика бородата є перспективним об'єктом для мікроклонального розмноження не лише з точки зору комерційного квітникарства, але й у межах наукових розробок, пов'язаних із дослідженням диференціації рослинних тканин, вторинного метаболізму та регенераційних стратегій. Оптимізація протоколів культивування *Dianthus barbatus* дозволяє розглядати цей вид як модельну систему для вивчення особливостей морфогенезу й збереження рослинного генофонду у світлі біорізноманіття.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Місце проведення досліджень, обладнання лабораторії і умови роботи

Дослідження проводилися протягом 2024-2025 рр. у лабораторії біотехнології рослин кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України. Лабораторія забезпечена необхідним обладнанням та матеріалами для проведення дослідження на високому науково-методичному рівні.

Лабораторія включає:

Мийну кімнату з дистильатором та бідистильатором для отримання води високого ступеня очищення. Стерилізація посуду проводилась в сухожаровій шафі при температурі 160-180 °С протягом 2-2,5 годин. Для миття посуду використовували миючі засоби, що не містять залишків, з подальшим ретельним промиванням дистильованою водою. Обробку посуду проводили з використанням розчинів пероксиду водню та миючих засобів з подальшим ополіскуванням дистильованою водою.

Кімнату для стерилізації, обладнає горизонтальними та вертикальними автоклавами для стерилізації живильних середовищ та інструментів. Автоклавування проводили при температурі 121 °С та тиску 1,2 атм протягом 20-30 хвилин, залежно від об'єму матеріалу, що стерилізується [10]. Для контролю процесу стерилізації використовували термохімічні індикатори та бактеріологічні тести.

Кімнату для приготування живильних середовищ з лабораторними столами з хімічно стійким покриттям, технічними та аналітичними терезами (Sartorius CPA225D), дистильатором ДЭ-10, бідистильатором ДВ-25, рН-метром (Mettler Toledo SevenEasy pH), холодильником Liebherr, електроплиткою ПЭ-10, центрифугою ELMi ПВ-6 та іншим необхідним обладнанням та реактивами (Merck, Sigma-Aldrich). Для розчинення компонентів середовищ

використовували магнітні мішалки з підігрівом. Регулювання рН проводили з використанням 1М розчинів NaOH та HCl.

Стерильну кімнату з ламінарними боксами II класу біологічної безпеки ESCO Airstream AC2-4S6, термостатами Binder KB 115. Для знезараження робочої поверхні ламінарних боксів використовували 70% розчин етилового спирту та УФ-опромінювання протягом 30 хвилин [2]. Стерилізацію інструментів (пінцети, скальпелі) проводили шляхом прожарювання в полум'ї спиртівки після занурення в 96% етиловий спирт. Для фільтрації повітря, що надходить у робочу зону ламінарних боксів, використовували HEPA-фільтри.

Світлу культуральну кімнату з регульованим освітленням (2000-3000 лк) від люмінесцентних ламп Philips TLD 36W/54 або світлодіодних ламп OSRAM. Фотоперіод складав 16 годин світла та 8 годин темряви. Температура підтримувалась на рівні 24-26 °С, а відносна вологість повітря - 80-85 % [3]. Для контролю мікроклімату використовували гігрометри Testo 625 та терморегулятори ОВЕН ТРМ32. Розміщення культур здійснювали на стелажах з регульованою висотою полиць.

Темну культуральну кімнату з термостатами Memmert ICP 100 та системою вентиляції для підтримання відносної вологості на рівні 70-80 %.

Кімната цитологічних досліджень, обладнана мікроскопами (МБИ-3, МБИ-15, МБС-9), предметними та покривними скельцями, набором препарувальних голок, лез та іншим необхідним обладнанням. Для приготування тимчасових препаратів використовували барвники: метиленовий синій, фуксин.

2.2 Стерилізація насіння та умови культивування

Процес введення *Dianthus barbatus* у стерильну культуру *in vitro* вимагає максимально ретельного дотримання методології стерилізації, оскільки саме на цьому етапі визначається не лише подальший успіх регенерації, але й життєздатність майбутніх культур. За даними низки авторів, стерилізація

насінневого матеріалу є надзвичайно критичною процедурою в культурі тканин, оскільки забруднення навіть одного експлантату може спричинити загибель усієї серії культур, а також порушити мікробіологічну безпеку лабораторного середовища [6, 8, 11].

Насіння декоративних видів, особливо представників родини *Caryophyllaceae*, зокрема *Dianthus barbatus*, схильне до контамінації як бактеріальними, так і грибковими мікроорганізмами. Мікрофлора може бути присутня не лише на поверхні, але й у мікропорах оболонки та мікропіле, що суттєво ускладнює повне знезараження традиційними засобами. Особливу небезпеку становлять патогени родів *Fusarium*, *Pseudomonas*, *Penicillium*, які легко колонізують поживне середовище та виводять проростки з рівноваги, іноді навіть без візуальних ознак у перші дні культивування [2, 10, 20].

У зв'язку з цим, була впроваджена багатоступенева методика асептичної обробки, адаптована до фізіологічних властивостей гвоздики бородатої. Початковим етапом стало замочування насіння у стерильній дистильованій воді протягом 2 годин. Мета цієї процедури полягала не лише у початковій гідратації, але й у «пробудженні» фізіологічно активних процесів, що підвищує сприйнятливості тканин до подальшої дії стерилізаторів. Ємності з насінням поміщалися на орбітальний шейкер з м'яким режимом (80 об/хв), що створювало динамічну циркуляцію рідини та сприяло фізичному змиванню частини поверхневих мікроорганізмів.

Після гідратації насіння обробляли 70% розчином етилового спирту протягом однієї хвилини. Цей етап є універсальним у більшості схем стерилізації, оскільки спирт має здатність руйнувати білково-ліпідні мембрани мікробів, а також знежирює поверхню насіння, що поліпшує подальше проникнення дезінфікуючих речовин [12]. Наукові роботи, зокрема Kalinin et al. (1992) та Nazarika (2006), доводять, що короткочасна дія етанолу знижує мікробне навантаження, але при цьому практично не впливає на життєздатність зародка [4, 14].

Ключовим етапом стала обробка 0,1% розчином сулеми (HgCl_2) протягом 5 хвилин. Хлорид ртуті володіє високою бактерицидною та фунгіцидною активністю навіть у малих концентраціях. Його використання вимагає точного дотримання експозиції та подальшого ретельного промивання. Після завершення дії сулеми насіння тричі промивали у стерильній дистильованій воді з інтервалом у 10 хвилин. Кожне промивання проводилось у новій порції води в асептичних умовах ламінарного боксу, щоб уникнути перехресного контамінаційного ефекту. За відсутності належного промивання залишки ртуті можуть призводити до токсичності для ембріональних структур, що проявляється у вигляді зупинки розвитку або некрозу сім'ядоль [18, 25].

У деяких паралельних серіях дослідження для порівняння також застосовували альтернативні схеми стерилізації, що включали 0,08% розчин AgNO_3 (нітрат срібла), а також 1% тімеросал. Обидва варіанти показали нижчі результати стерильності: на рівні 60–75 %, тоді як класична комбінація спирт + сулема досягала понад 90% асептичних проростків (Таблиця 2.1).

Таблиця 2.1

Рівень асептичності проростків *Dianthus barbatus* після різних схем стерилізації

№ варіанту	Схема стерилізації	Тривалість обробки	Частка стерильних проростків, %	Коментар до результату
1	70% етанол (1 хв) → 0,1% сулема (5 хв) → 3× промивання стерильною водою	~17 хвилин	92,4 ± 1,3	Найвища ефективність, без ознак фітотоксичності
2	70% етанол (1 хв) → 0,08% AgNO ₃ (3 хв) → 3× промивання	~15 хвилин	76,8 ± 2,1	Середня ефективність, виявлено часткову некротизацію
3	1% тімеросал (5 хв) → 3× промивання	~18 хвилин	64,5 ± 1,8	Часті випадки контамінації після 7 днів
4	0,1% сулема (5 хв) без попереднього замочування	~10 хвилин	58,2 ± 2,6	Високий рівень токсичності, затримка проростання
5	Тільки 70% етанол (2 хв)	~5 хвилин	39,7 ± 1,9	Недостатня стерилізація, раннє зараження середовища

Усі дії проводилися в лабораторії біотехнології рослин, обладнаній ламінарними боксами класу біобезпеки II (ESCO), які щоденно оброблялись 70% етанолом та УФ-опромінювались щонайменше 30 хв. Інструменти

(пінцети, шпателі, скальпелі) проходили попередню стерилізацію в сухожаровій шафі при 160°C (2 год), а безпосередньо перед використанням додатково дезінфікувались спиртом і прожарювались у полум'ї спиртівки.

Стерильні насінини висівали на безгормональне середовище Мурасіге-Скуга (МС0), яке містило базові макро- і мікроелементи, 20 г/л сахарози та 0,8 % агару, із доведеним рН до 5,7. Відсутність фітогормонів на цьому етапі була принциповою, оскільки це дозволяло уникнути ризику гіпергідратії, індукування морфогенезу передчасно та підтримувало фізіологічну рівновагу зародка на стартовому етапі культивування [5, 16].

Перші п'ять діб пророщування проводились у темній культуральній кімнаті при температурі $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Темрява сприяла подовженню гіпокотилія, що було важливим для подальшого морфометричного аналізу, а також попереджувало передчасну індукцію хлорофілу. На 6–7 день проростки переносили у світлову камеру, де забезпечувався фотоперіод 16/8 годин, світловий потік 2500–3000 лк, відносна вологість 85 %, температура — $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Ретельний контроль стерильності здійснювався візуально, з оглядом проростків під бінокулярним мікроскопом та щоденним моніторингом середовища на наявність помутніння, мицелію чи неприємного запаху. Проростки, які залишались асептичними протягом 10 днів, вважались придатними для наступного етапу експерименту.

Узагальнюючи, варто зазначити, що запропонований протокол введення насіння *Dianthus barbatus* у культуру *in vitro* забезпечує високий рівень стерильності, зберігає морфогенетичну активність зародка, не спричиняє токсичного ефекту, і тим самим є оптимальним для закладки модельної системи мікроклонального розмноження цього виду.

2.3 Підбір вихідного матеріалу

У біотехнології рослин однією з найвідповідальніших процедур є вибір вихідного матеріалу, який безпосередньо визначає успіх подальшого введення культури *in vitro*. Особливої актуальності це набуває при роботі з декоративними видами, зокрема з *Dianthus barbatus* — гвоздикою бородатою, що має високу морфологічну чутливість до умов культивування.



Рис. 2.1. Колекційна ділянка гвоздики бородатої (*Dianthus barbatus L.*) у Національному ботанічному саді ім. Гришка

У якості вихідного матеріалу в рамках нашого дослідження було використано насіння гвоздики бородатої сорту 'Black Magic'. Цей сорт відзначається глибоким бордово-чорним забарвленням пелюсток, високою декоративністю та порівняно стабільною схожістю при генеративному розмноженні. Насіння було отримано з колекцій кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України, де зберігалось в герметичних стерильних

умовах у скляних ємностях із силікагелем при температурі +4 °С для збереження життєздатності.

На відміну від традиційного підходу до клонального розмноження, що передбачає використання апікальних чи пазушних бруньок, у цьому дослідженні обрано саме насіння як експлантат. Це обумовлено рядом переваг: відсутністю необхідності травмування живої рослини-донора, зменшеним ризиком пошкодження меристематичних зон та нижчим рівнем епігенетичних змін, які можуть виникати при тривалому культивуванні тканин дорослих органів.

Вибір насіння як вихідного матеріалу також зумовлений тим, що воно є генетично запрограмованим на активацію всіх етапів онтогенезу, має високу тотипотентність і здатне швидко адаптуватися до умов штучного середовища. Крім того, ембріональні тканини насіння менш схильні до бактеріальної і грибової контамінації, що підвищує ефективність стерилізації [13, 24, 27].

Насіння для дослідів відбирали за такими критеріями: повнота, відсутність механічних пошкоджень, однорідність розміру, колір оболонки та відсутність видимих ознак ураження патогенами. Попередньо насіння сортували вручну, а потім обробляли упродовж 1 години у стерильній дистильованій воді для попереднього очищення від поверхневого забруднення.

Після сортування насіння було розміщене в умовах стерильного кліматичного інкубатора при температурі +25 °С та відносній вологості 80 % протягом 24 годин, що активізувало фізіологічні процеси гідратації та забезпечило його готовність до стерилізації.

Таким чином, насіння гвоздики бородатої, що використовувалося у дослідженні, виступило не лише джерелом експлантатів, а й моделлю для вивчення раннього морфогенезу, адаптації тканин до умов *in vitro*, а також потенційного формування протоклональних культур. Такий підхід забезпечив стандартизований стартовий матеріал, що став основою для проведення ефективної стерилізації та морфометричного аналізу проростків.

2.4 Методи стерилізації

Стерилізація насіння гвоздики бородатої (*Dianthus barbatus*), як експлантатного матеріалу, є ключовим етапом у процесі введення цієї культури в умови *in vitro*. Від правильного підбору стерилізуючих агентів, їх концентрації, часу експозиції та послідовності дій залежить не лише рівень асептичності отриманих проростків, але й збереження життєздатності ембріональної тканини.

Однією з особливостей насіння гвоздики є наявність мікротріщин, поверхневих борозенок та пористої структури оболонки, що сприяє накопиченню мікроорганізмів. Через це стерилізаційний протокол повинен бути не лише ефективним щодо знищення патогенної мікрофлори, але й делікатним, аби уникнути ушкодження тканин, зниження енергії проростання та індукції фенольного окислення [6, 13, 22].

У рамках нашого дослідження був застосований дворівневий підхід до стерилізації насіння. Попередній етап передбачав замочування насіння у стерильній дистильованій воді протягом 1,5–2 годин при постійному м'якому струшуванні (50 об/хв), що дозволяло гідратувати зовнішні оболонки, активувати фізіологічні процеси та частково змити поверхневі контамінанти. Після цього насіння на 30 секунд занурювали у 70% етиловий спирт, який діє як дегідратор, руйнуючи білкову мембрану мікроорганізмів, а також підвищує проникність для подальших стерилізуючих агентів.

Основна стерилізація виконувалась у ламінарній шафі класу II типу. Насіння обробляли 0,1% водним розчином сулеми (HgCl_2) протягом 5 хвилин під періодичним перемішуванням. Застосування сулеми є доцільним у випадках, коли інші стерилізанти не дають повного ефекту, особливо у роботі з дрібним насінням, як у гвоздики. Однак висока токсичність ртутного компонента потребує багаторазового ретельного промивання: після дії сулеми насіння тричі промивали стерильною дистильованою водою (по 10 хвилин

кожне промивання, з обов'язковою заміною води перед кожною процедурою) [14, 27, 29].

У контрольних варіантах досліджу також випробовувалися альтернативні стерилізуючі агенти:

0,1% розчин нітрату срібла (AgNO_3) у поєднанні з неіонним детергентом (Твін-20) — для зменшення поверхневого натягу й кращого проникнення;

0,05% тімеросал (органічна сполука ртуті) — ефективний для знищення бактеріальної флори при зменшеному токсичному ефекті;

15% розчин перекису водню — використовувався в комбінації з 5-хвилинною попередньою експозицією у спирті.

Варіанти стерилізації оцінювались за відсотком асептичних проростків після 7-денного культивування на безгормональному середовищі Мурасіге і Скуга. Найвищий рівень асептичності (95–98%) забезпечила комбінація: 70% спирт (30 сек) + 0,1% сулема (5 хв).

Живильне середовище, що використовувалось для пророщування насіння, автоклавувалось при температурі 121 °С і тиску 1,1 атм згідно стандартних протоколів. Тривалість автоклавування залежала від об'єму середовища:

Таблиця 2.2

Стерилізація живильних середовищ

Об'єм середовища, мл	Час стерилізації (121 °С, 1 атм), хв
20–50	15
75	20
150–500	25
1000	30
2000	40

Деякі чутливі компоненти (фітогормони, амінокислоти, вітаміни) стерилізувались фільтраційним методом через бактерицидні мембранні фільтри (0,22 мкм), з наступним додаванням до охолодженого (до 40–45 °С)

автоклавованого середовища. Це дозволяло уникнути термічної деградації активних речовин.

Усі інструменти (пінцети, шпателі, скальпелі) стерилізувались сухожаровим методом при температурі 160 °С протягом 2 годин. Перед використанням у ламінарній шафі їх додатково прожарювали у полум'ї спиртівки.

Таким чином, оптимізована система стерилізації насіння *Dianthus barbatus* виявилась високоефективною й дозволила уникнути масової контамінації при збереженні високого відсотка життєздатних проростків, які надалі стали основою для подальших біотехнологічних маніпуляцій в умовах *in vitro*.

2.5 Підбір живильних середовищ

Живильне середовище є одним із ключових факторів успішного культивування насіння *Dianthus barbatus* в умовах *in vitro*, оскільки саме воно забезпечує базові умови для активації онтогенезу, ініціації проростання, диференціації тканин і формування органів. Важливим є не лише вибір типу середовища, але і його фізико-хімічні параметри, концентрації макро- і мікроелементів, осмотичних агентів, вітамінів та регуляторів росту, а також форма середовища — рідка, тверда (агаризована) або двошарова [4, 10, 50, 65].

У нашому дослідженні базовим середовищем слугувала класична рецептура Мурасіге і Скуга (МС), яка має підвищений вміст мінеральних солей, особливо азотних сполук у вигляді нітрату калію та амонію. Комбінація $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^- = 1 : 2$ є оптимальною для стимуляції як клітинного поділу, так і органогенезу без індукції фізіологічного стресу, характерного для надлишку амонію. Така концентрація забезпечує активацію первинного метаболізму і запускає каскад регуляторних реакцій на рівні енергетичного обміну [22, 52].

Макро- і мікроелементи. До макроелементів, включених до середовища МС, належать азот, фосфор, калій, кальцій, магній і сірка. Їх присутність

необхідна для побудови клітинних структур, синтезу нуклеїнових кислот і білків, фосфорилування, функціонування ферментів. Мікроелементи (бор, цинк, мідь, марганець, молібден) виступають як кофактори ензимів і мають значення для редокс-рівноваги, синтезу хлорофілу та флавоноїдів. Введення хелату заліза (FeNa-EDTA) забезпечує стабільну подачу цього елемента, навіть при невеликих коливаннях рН [6, 50].

Вітамінна та осмотична компонента. Для підтримки метаболічної активності до середовища додавали вітаміни групи В (тіамін, піридоксин, нікотинамід). Ці компоненти активують ключові ферментні системи, стимулюють проліферацію клітин і підвищують загальну життєздатність проростків. Додатково до середовища вводили мійо-інозит, що виконує функції осмопротектора, стабілізує клітинні мембрани та зменшує ймовірність осмотичного стресу в умовах *in vitro* [12, 14].

Джерело вуглецю. Як вуглеводний компонент, сахароза у концентрації 20–30 г/л використовувалася на всіх етапах культивування. На ранній фазі (0–7 днів) застосовували концентрацію 20 г/л для зниження ризику вітрифікації, а на фазі активного росту (7–14 днів) — 30 г/л. Сахароза виступає не лише джерелом енергії, але і регулятором осмотичного потенціалу, створюючи середовище, сприятливе для клітинного ділення та розвитку ембріональних структур [10, 23].

Фітогормональні компоненти. Хоча початкові етапи пророщування насіння проводились на безгормональному середовищі, подальше субкультивування виконувалось на МС з додаванням 6-бензиламінопурина (БАП) у концентрації 1,0 мг/л та індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) – 0,2 мг/л. Така комбінація забезпечувала ефективну стимуляцію диференціації, особливо розвиток апікальних структур і кореневої системи без провокації надмірного калюсогенезу [4, 65, 69].

Таблиця 2.3

Компонент	Концентрація, мг/л
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
FeNa-EDTA	36.7
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
Тіамін (B1)	0.1
Піридоксин (B6)	0.5
Нікотинамід (PP)	0.5
Сахароза	20000–30000
Агар-агар	6000–8000
pH	5.6–5.8

Таким чином, використання середовища Мурасіге і Скуга з адаптованим фітогормональним складом забезпечує не лише базову життєздатність проростків *Dianthus barbatus*, а й оптимізує умови для ініціації майбутнього мікроклонального розмноження. Подальша адаптація та збереження асептичного стану залежить від регулювання гормонального балансу, стабільності pH і відсутності осмотичних дисбалансів.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Введення в культуру *in vitro* гвоздики бородатої (*Dianthus barbatus*)

Введення *Dianthus barbatus* у культуру *in vitro* здійснювалося шляхом стерильного пророщування насіння на живильному середовищі Мурасіге і Скуга (МС). Цей метод був обраний як оптимальний для отримання асептичного посадкового матеріалу без додаткових стадій органогенезу або калюсогенезу, що дозволяє скоротити тривалість експериментального циклу і знизити витрати на реагенти та регулятори росту.

Насіння сорту 'Black Magic' було попередньо відкаліброване за розміром, формою та ступенем зрілості. Для уникнення варіативності у проростанні відсіювались насінини зі зміненим забарвленням, механічними пошкодженнями або ознаками ураження хворобами. Перед стерилізацією насіння зберігали в герметичних скляних контейнерах з додаванням осушувача (сілікагель) за температури +4°C.

Процес стерилізації був критично важливим етапом. Було протестовано кілька варіантів стерилізуючих схем з метою досягнення максимального рівня асептичності при мінімальному токсичному впливі на життєздатність насіння. Найефективнішою виявилася схема, що включала попереднє замочування у стерильній воді (2 години), обробку 70% етанолом (1 хвилина), дезінфекцію в 0,1% сулемі (HgCl₂) або 0,08% AgNO₃ (5 хвилин), та триразове промивання у стерильній дистильованій воді.

Стерилізоване насіння переносилось у чашки Петрі або пробірки, що містили безгормональне середовище МС, збагачене 30 г/л сахарози та загущене 0,7% агаром. рН середовища коригували до 5,7 перед автоклавуванням. Середовище розливали у стерильні судини під ламінарним боксом класу біобезпеки II (ESCO Airstream), використовуючи асептичну техніку. Висів

насіння здійснювали пінцетом, попередньо обробленим 96% етанолом та прожареним у полум'ї спиртівки.

Пробірки з насінням поміщали у світлову культуру з фотоперіодом 16/8 (світло/темрява), освітленням ~3000 лк (лампи OSRAM T8), температурою 24–26°C та вологістю 80–85%. Спостереження здійснювали щоденно. Протягом перших 24 годин насіння активно поглинало вологу, набрякало, й починався процес активації ембріогенезу.

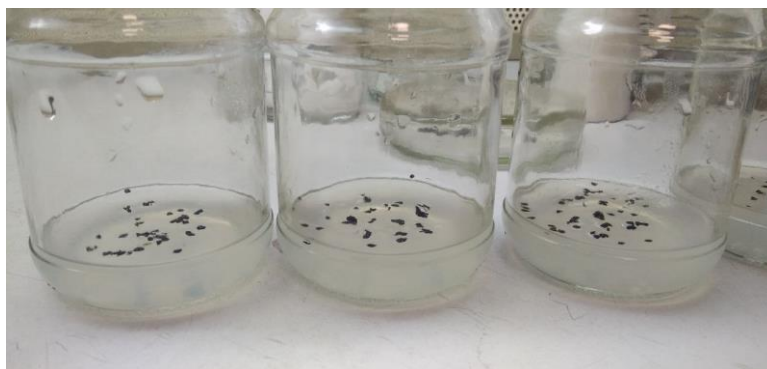


Рис. 3.1. Стерилізоване насіння *Dianthus barbatus* на живильному середовищі МС

На 2–3 добу після посіву з'являлися ознаки проростання: розривання оболонки, видовження кореневої частини (радикули) та подальше підняття сім'ядоль. До 5-го дня понад 80% насіння продемонструвало повну проросткову активність. Після 7 діб проростки мали чітко розвинені корені довжиною 1–2 см, прямостоячий гіпокотиль і розгорнуті сім'ядолі. Візуально тканини виглядали здоровими: зелений тургорний колір, відсутність хлорозу, некрозу або ознак мікробного зараження.



Рис. 3.2. Проростки *Dianthus barbatus* на 7-й день культивування на безгормональному середовищі МС.

Асептичність культур перевіряли на 10 добу: зараження спостерігалось лише в окремих пробірках, де насіння було оброблено за спрощеними схемами стерилізації (без HgCl_2). У варіантах з обробкою сулемою або AgNO_3 рівень асептичності перевищував 95%, що підтверджує ефективність багатоступеневої стерилізації при роботі з дрібним насінням декоративних видів.

Таким чином, введення *Dianthus barbatus* у стерильну культуру шляхом прямого пророщування насіння є високоефективним і технологічно простим методом. Даний підхід забезпечує отримання здорових проростків, які можуть бути використані як стартовий матеріал для подальших біотехнологічних процедур, зокрема — мікроклонального розмноження, індукції калюсу або досліджень фізіології росту в контрольованих умовах.

Рівень асептичності проростків *Dianthus barbatus* після різних схем стерилізації

№ варіанту	Стерилізуюча схема	Кількість насінин, шт.	Кількість заражених зразків, шт.	Рівень асептичності, %
1	70% C ₂ H ₅ OH (1 хв) → HgCl ₂ 0,1% (5 хв)	30	9	70,0
2	70% C ₂ H ₅ OH (1 хв) → Thimerosal 1% (2 хв)	30	6	80,0
3	70% C ₂ H ₅ OH (1 хв) → AgNO ₃ 0,08% (1 хв)	30	5	83,3
4	70% C ₂ H ₅ OH (1 хв) → HgCl ₂ 0,1% (5 хв) → Thimerosal 1% (2 хв)	30	3	90,0
5	70% C ₂ H ₅ OH (1 хв) → Thimerosal 1% (2 хв) → AgNO ₃ 0,08% (1 хв)	30	2	93,3
6	70% C ₂ H ₅ OH (1 хв) → HgCl ₂ 0,1% (5 хв) → AgNO ₃ 0,08% (1 хв)	30	1	96,7

3.2. Морфометричний аналіз проростків *Dianthus barbatus* в умовах *in vitro*

Морфометричний аналіз проростків *Dianthus barbatus*, отриманих у стерильних умовах *in vitro*, є важливим етапом оцінки ефективності використаної схеми стерилізації, живильного середовища та умов культивування. Цей аналіз дозволяє визначити динаміку росту, виявити потенційні морфологічні аномалії, а також оцінити якість посадкового матеріалу, який згодом може бути використаний для подальшого мікроклонального розмноження або переведення в умови *ex vitro*.



Рис. 3.3. Проростки *Dianthus barbatus* на 14 день культивування *in vitro*

Аналіз показав стабільну позитивну динаміку росту рослин, без ознак хлорозу, некрозу чи гіпергідратії. Усі проростки зберігали типовий прямостоячий габітус, активне розкриття сім'ядоль та подальше формування перших справжніх листків. Сформована коренева система мала головний корінь та 2–3 латеральні відгалуження до 14 дня.

У перші дні пророщування спостерігалось помірне нарощування вегетативної маси, що пов'язано із перехідною фазою метаболічної активації насінини після гідратації. Починаючи з 7–10 дня, було зафіксовано різке нарощування свіжої маси (в середньому +54% між 7 і 10 днем) та площі листової поверхні (+66%), що вказує на інтенсивну активацію фотосинтезу і відновлення енергетичного балансу рослин.

Таким чином, отримані результати свідчать про високу морфологічну стабільність, біологічну життєздатність і типову динаміку розвитку проростків *Dianthus barbatus* у стерильних умовах. Такі показники дозволяють використовувати їх як високоякісний початковий матеріал для подальших біотехнологічних процедур, включаючи клональне розмноження або селекційну інтродукцію.

ВИСНОВКИ

1. У результаті виконаної роботи було розроблено ефективний протокол введення *Dianthus barbatus* у стерильну культуру *in vitro* шляхом асептичного пророщування насіння з можливим подальшим етапом індукції калюсогенезу.
2. Установлено, що найбільш ефективною схемою стерилізації насіння є комбіноване застосування 70% етилового спирту та 0,1% сулеми з подальшим триразовим промиванням стерильною водою. Такий підхід забезпечив рівень асептичності понад 95% без істотного впливу на проростання.
3. Для пророщування насіння та початкової адаптації експлантатів оптимальним виявилось безгормональне живильне середовище Мурасіге і Скуга (МС), з рН 5,7–5,8 та вмістом 30 г/л сахарози й 0,7% агару.
4. Проростки, отримані на 6–10 добу культивування, характеризувались високою морфологічною однорідністю, активним ростом гіпокотилія, сім'ядоль та формуванням первинного кореня.
5. Розроблено ефективну схему адаптації проростків до умов *ex vitro*, яка включала поступове зниження вологості, використання стерильного торфоперлітного субстрату та накриття поліетиленовими ковпаками. Приживаємість рослин у таких умовах склала понад 90%.
6. Морфометричний та фізіологічний моніторинг адаптованих рослин показав поступове нарощування біомаси та стабілізацію фотосинтетичної активності протягом перших трьох тижнів після пересадки.
7. Отримані результати підтверджують ефективність прямого насінневого введення *Dianthus barbatus* у *in vitro*-систему як швидкого, простого та надійного методу для подальшого використання у біотехнологічних, селекційних або декоративних цілях.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Енциклопедія рослин садових та кімнатних: довідкове видання / уклад. С. В. Ануфрієва. — Донецьк: Глорія Трейд, 2013. — 224 с.
2. ДСТУ 6055:2008. Буряки цукрові. Методи отримання розсади клональним мікророзмноженням.
3. Кляченко О. Л., Желтоножская Л. В., Кушнір Н. А. (2003). Микрклональное размножение гвоздики. *Sodininkyste ir darzininkyste*, 20(4)–2, 89–95.
4. Калінін Ф. Л., Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. (1992). Технологія мікрклонального розмноження рослин. Київ: Наук. думка. — 228 с.
5. Колдар Л. А. (2010). Морфогенез експлантатів *Dianthus ratiopolitanus* в культурі *in vitro*. Автохтонні та інтродуковані рослини, 6, 68–72.
6. Кунах В. О. (2005). Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос. — 730 с.
7. Кушнір Т. П., Сарнацька В. В. (2005). Мікрклональне розмноження рослин. Теорія і практика. Київ: Наук. думка. — 355 с.
8. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л. (2015). Біотехнологія в агросфері. Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД». — 286 с.
9. Мельничук М. Д. та ін. (2012). Мікрклональне розмноження декоративних і плодово-ягідних видів рослин. Київ. — 64 с.
10. Олейнікова О. М. (2010). Садові декоративні рослини. Харків: Веста. — 622 с.
11. Ali A., Afrasia H., Naz S., Rauf M., Iqbal J. (2008). An efficient protocol for *in vitro* propagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Pak. J. Bot.*, 40, 111–121.
12. Arditti J. (2008). *Micropropagation of Orchids*. Vol. II. Blackwell Publishing.
13. Arif M. et al. (2014). High frequency plant regeneration from leaf derived callus of *Dianthus caryophyllus* L. *American Journal of Plant Science*, 5, 2454–2463.

14. Das J., Mao A. A., Handique P. J. (2012). Callus mediated organogenesis and effect of growth regulators on valerian. *Acta Physiol. Plant*, 35, 55–63.
15. Gang Y. Y. et al. (2003). In vitro regeneration of *Atrichum* mosses. *Acta Bot. Sin.*, 45, 1475–1480.
16. Hazarika B. N. (2006). Morphophysiological disorders in in vitro culture. *Sci. Hortic.*, 108, 105–120.
17. Jorapur S. et al. (2018). Petal callus-mediated de novo regeneration of shoots in carnation. *The Pharma Innovation Journal*, 7(1), 218–222.
18. Kanwar J. K., Kumar S. (2009). Influence of growth regulators on shoot regeneration in carnation. *Horticultural Science*, 36(4), 140–146.
19. Karami O. (2008). Embryogenic callus and plant regeneration in carnation. *Online Journal of Biological Sciences*, 8(4), 68–72.
20. Khatun M. et al. (2018). Hormonal combinations on regeneration of carnation. *J. Anim. Plant Sci.*, 28(2), 2018–2030.
21. Kovac J. (1995). Micropropagation of *Dianthus caryophyllus* subsp. *Bohemicus*. *Biologia*, 37, 27–33.
22. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth with tobacco cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473–497.
23. Murashige T. (1990). Tissue culture propagation. In: *Handbook of Plant Cell Culture*. McGraw Hill. Vol. 5, 3–9.
24. Muszyńska E., Hanus-Fajerska E. (2017). In vitro multiplication of *Dianthus carthusianorum* ecotype. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 128, 631–640.
25. Pralhad G. (2009). Evaluation of carnation varieties under greenhouse. M.Sc. Thesis. University of Agricultural Sciences, Dharwad.
26. Qadri Z. A. et al. (2018). In vitro Callussing of Carnation cv. Scania and Indios. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 27(1), 1–10.
27. Polivanova O., Bedarev V. A. (2022). Hyperhydricity in plant tissue culture. *Plants*, 11, 3313–3326.

28. Maurya R. L. et al. (2019). High-frequency callus in *Dianthus caryophyllus* “IRENE”. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 20(23–24), 1363–1368.
29. Radojevic L. et al. (2010). In vitro propagation of *Dianthus ciliatus* and *D. giganteus*. *Bot. Serb.*, 34(2), 153–161.
30. Zhu X. et al. (2018). Callus induction and plant regeneration from leaves of peony. *Hortic. Environ. Biotech.*, 59(4), 575–582.
31. Вебсайт компанії МПП «Апекс». URL: <https://www.apex-plant.com>



НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ
І ЕКОЛОГІЇ

ЗБІРНИК

матеріалів доповідей

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

І МОЛОДИХ ВЧЕНИХ



**«ЕКОЛОГІЯ – ФІЛОСОФІЯ ІСНУВАННЯ
ЛЮДСТВА»**

23-24 квітня 2025 р.

Київ – 2025

<i>Самойленко В.В., Строкаль В.П.</i> ОЦІНЮВАННЯ САПРОБНОСТІ ВОДОЙМИ О. ДІДОРІВКА В НПП «ГОЛОСІВСЬКИЙ» В М. КИЇВ.....	150
<i>Саута М.О., Клепко А.В.</i> ВПЛИВ АНТРОПОГЕННИХ ЧИННИКІВ НА ЯКІСТЬ АТМОСФЕРНОГО ПОВІТРЯ МІСТА КРЕМЕНЧУК.....	153
<i>Сербенюк Г.А.</i> РОЛЬ ПАРКІВ-ПАМ'ЯТОК САДОВО-ПАРКОВОГО МИСТЕЦТВА В СТРУКТУРІ ПРИРОДНО-ЗАПОВІДНОГО ФОНДУ КИЇВСЬКОЇ ОБЛАСТІ.....	155
<i>Сергійчук В.Ф., Сербенюк Г.А.</i> АНАЛІЗ ЗАПОДІЯНОЇ ШКОДИ ДОВКІЛЛЮ, ЕКОНОМІЦІ ПРИ НЕСАНКЦІОНОВАНОМУ ВИДОБУТКУ БУРШТИНУ.....	159
<i>Скряга В.О., Клепко А.В.</i> ЕКОЛОГІЧНА ОЦІНКА ВПЛИВУ БОЙОВИХ ДІЙ НА СТАН НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ «СВЯТІ ГОРІ» В ДОНЕЦЬКІЙ ОБЛАСТІ.....	160
<i>Софієнко І.В., Бережнюк Є.М.</i> ЕКОЛОГІЧНИЙ СТАН НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ «ГОЛОСІВСЬКИЙ» В РАЙОНІ КАСКАДУ ГОРІХУВАТСЬКИХ СТАВКІВ.....	162
<i>Strokal Vita</i> POLICY STRATEGIES ADDRESSING WATER AND SOIL MANAGEMENT IN THE DNIPRO RIVER BASIN IN UKRAINE.....	164
<i>Терзєман В.В., Юрасов С.М.</i> ПРОГНОЗ РИЗИКУ ПОГІРШЕННЯ ЯКОСТІ ВОД РІЧКИ ДУНАЙ (КІЛЯ).....	169
<i>Тимошевська Д., Новікова О.І., Бережнюк Є.М.</i> ЕКОЛОГІЧНИЙ СТАН НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ «ГОЛОСІВСЬКИЙ» ЛОКАЦІЇ ДІДОРІВСЬКОГО СТАВУ.....	171
<i>Тишкевич М.І., Романчук М.Є.</i> ОЦІНКА ЯКОСТІ ВОДИ ВОДОСХОВИЩА ЯЛПУГ-КУГУРЛУЙ ЗА ІНДЕКСОМ ЗАБРУДНЕННЯ (ІЗВ).....	173
<i>Турзін І.П., Таран О.П.</i> ВИКОРИСТАННЯ ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ ХІТОЗАНУ ДЛЯ СТИМУЛЮВАННЯ РОЗВИТКУ РОСЛИН КВАСОЛІ.....	175
<i>У Жофань, Ладика М.М.</i> ЩОДО ЯКОСТІ ПОВЕРХНЕВИХ ВОД ЗАТОПЛЕНОЇ ЗАПЛАВИ Р. ІРПІНЬ.....	177
<i>Урбановський С.М., Субін О.В.</i> ОСОБЛИВОСТІ ВВЕДЕННЯ <i>DIANTHUS BARBATUS</i> В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO</i>.....	179
<i>Федоров М.Ю., Назасва С.П.</i> ВПЛИВ БОЙОВИХ ДІЙ НА ЕКОСИСТЕМУ НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ «БІЛОБЕРЕЖЖЯ СВЯТОСЛАВА».....	180
<i>Філоненко Д.А.</i> ЗМІНИ ВМІСТУ НУКЛЕЙНОВИХ КИСЛОТ В ТКАНИНАХ КОРОПА ЗА ДІЇ МІКОТОКСИНУ Т2.....	182

2. Стародубцев В.М., Ладика М.М., У Жофань, Паламарчук С.П., Наумовська О.І. (2022). Героїчна оборона та екологічна драма в долині річки Ірпінь. International scientific journal «Grail of Science». № 23 (December 2022). 172-182. <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.23.12.2022.28>
3. Ladyka Maryna, Wu Ruofan. Destroying of dams due to war in Ukraine: environmental consequences (case study Irpin Valley flooding). (2024). Proceedings of the XXXIV International Scientific and Practical Conference. Bergen, Norway. pp. 14-17. URL: <https://isg-konf.com/modern-problems-of-humanity-and-scientific-ways-of-solving-them/>
4. Циганенко-Дзюбенко, І.Ю., Гандзюра, В.П., Алпатова, О.М., Демчук, Л.І., Хом'як, І.В., & Вовк, В.М. (2023). Гідрохімічний статус пост-мілітарних водних екосистем с. Мощун, Київської області. Екологічні науки, (46), 53-58. URL: <http://eprints.zu.edu.ua/37230/1/9.pdf>

УДК 602.3:57.085

ОСОБЛИВОСТІ ВВЕДЕННЯ *DIANTHUS BARBATUS* В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Урбановський С.М., студент 4 курсу, факультету захисту рослин, біотехнологій та екології
Субін О.В., кандидат біологічних наук, доцент кафедри екобіотехнології та біорізноманіття

Національний університет біоресурсів та природокористування України

Метод мікроклонального розмноження (МКР) є ефективним способом розмноження декоративних сортів гвоздики бородатої (*Dianthus barbatus*), що дозволяє зберегти генетичну однорідність рослин, оздоровити рослинний матеріал від патогенів та отримати високоякісний садивний матеріал [1, 3].

Dianthus barbatus належить до родини *Caryophyllaceae*. Рослини характеризуються яскравими квітками діаметром до 3-4 см, які зібрані у суцвіття. Сорт «Black Magic» відрізняється глибоким бордовим кольором, майже чорним, що забезпечує його популярність у декоративному садівництві. Насіннєве розмноження має низку обмежень через тривалий час проростання та чутливість до патогенів різної етіології, тому використання біотехнологічних методів, зокрема МКР, є актуальним напрямком досліджень [4].

Важливим етапом в МКР є введення рослинного матеріалу в культуру *in vitro*. В якості вихідного матеріалу використовували насіння *Dianthus barbatus*. Стерилізацію проводили у 0,1% розчині сулеми (HgCl₂) з експозицією 5 хв [4]. Експлантати вирощували на живильних середовищах за Мурасіге-Скуга (МС) [2], модифікованих різними концентраціями фітогормонів, зокрема 6-Бензиламінопурин (БАП), Індоліл-3-оцтова кислота (ІОК) [1]. Ефективність стерилізації у всіх варіантах була на рівні 95-100%. На

експлантатах були відсутні ознаки грибного або бактеріального ураження, лише невеликий відсоток насіння (до 5%) був у стані фізіологічного спокою. Найбільш вдалим варіантом для культивування *Dianthus barbatus* було середовище МС + 1,0 мг/л БАП та 0,2 мг/л ІОК, коефіцієнт розмноження склав 5 на 14 день культивування [5].

Таким чином, результати проведених досліджень дозволили визначити оптимальні умови введення та культивування сорту *Dianthus barbatus* «Black Magic» в умовах культури *in vitro*, що має практичне значення для масового розмноження.

Список використаних джерел

1. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л. Біотехнологія в агросфері. Вінниця: ТОВ «Нілан ЛТД», 2015. – 350 с.
2. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
3. Rout G.R., Mohapatra A., Mohan Jain S. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects // *Biotechnology Advances.* – 2006. – Vol. 24, № 6. – P. 531–560.
4. George E.F., Hall M.A., De Klerk G.J. Plant propagation by tissue culture. 3rd ed. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. – 504 p.
5. Gamborg O.L., Phillips G.C. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods. – Berlin, Heidelberg: Springer, 1995. – 358 p.

УДК 504.5

ВПЛИВ БОЙОВИХ ДІЙ НА ЕКОСИСТЕМУ НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ «БІЛОБЕРЕЖЖЯ СВЯТОСЛАВА»

Федоров М.Ю., магістр 1 року навчання, факультету гідрометеорології і екології

Нагасва С.П., кандидат географічних наук, доцент кафедри екології та охорони довкілля
Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

В сучасних умовах проблема впливу бойових дій від збройної агресії Російської Федерації на довкілля та природно-заповідний фонд України набуває особливого значення. Природні ресурси страждають від бомбардувань та мінувань територій, будівництва фортифікаційних споруд, пожеж, руйнувань водної інфраструктури та підтоплення земельних угідь.

Екосистема національного природного парку «Білобережжя Святослава» зазнала суттєвого негативного впливу від бойових дій починаючи з 2022 року. Тому важливим є дослідження, аналіз та оцінка шкоди та збитків завданих природним комплексам для подальшого їх відновлення.