

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

06.07. – МКР. 216 «С». 2023.15.02. 14 ПЗ

НУБІП України

ШУРГАЛЬСЬКА ВІКТОРІЯ ВОЛОДИМИРІВНА

НУБІП України

2023

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ  
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології  
УДК 604.7:582.926.2

ПОГОДЖЕНО  
Декан факультету  
захисту рослин, біотехнологій та екології  
Коломієць Ю.В.  
2023 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ  
Завідувача кафедри  
екобіотехнології та біорізноманіття  
Кваско О.Ю.  
2023 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Технологія мікроклонального розмноження рослин беладони (*Atropa Belladonna L.*)»

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»  
(код і назва)  
Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»  
(назва)  
Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна  
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми  
д. с.-г. наук, професор  
(науковий ступінь та вчене звання)

Лісовий М.М.  
(підпис) (ПІБ)

Керівник кваліфікаційної магістерської роботи  
д. с.-г. наук, професор  
(науковий ступінь та вчене звання)

Коломієць Ю.В.  
(підпис) (ПІБ)

Виконав  
(підпис)

Шургальська В.В.  
(ПІБ студента)

КИЇВ-2023

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Завідувач кафедри

“ ” 2023 р.

НУБІП України

ЗАВДАННЯ  
ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Шургальської Вікторії Володимирівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

НУБІП України

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

НУБІП України

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Технологія мікроклонального розмноження  
рослин беладони (*Atropa Belladonna L.*)»

Затверджена наказом ректора НУБіП України від 15.02.2023 р. №216 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 1 листопада 2023 р.

НУБІП України

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи регулятори росту, живильні середовища,  
рослини

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Одержання стерильних проростків з насіння *Atropa Belladonna L.*
2. Вибір найоптимальніших умов стерилізації насіння беладони
3. Визначення складу поживних середовищ для ініціації росту стерильних рослин *Atropa Belladonna L.*
4. Визначення найкращих поживних середовищ та вегановлення результатів дослідження

Дата видачі завдання 1 вересня 2022 року

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

(підпис)

(прізвище та ініціали)

НУБІП України

Завдання прийняв до виконання

(підпис)

(прізвище та ініціали)

## РЕФЕРАТ

Магістерська робота на тему «Технологія мікроклонального розмноження рослини беладони (*Atropa Belladonna L.*)» виконана на 67 сторінках друкованого тексту, містить у собі 13 рисунків, 5 таблиць та 1 гістограму. Опрацьовано 34 літературні джерела.

Робота складається із таких розділів: зміст, вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати та обговорення, висновки і списки використаних джерел.

Дослідження здійснювались на базі навчально – наукової лабораторії біотехнології та клітинної інженерії НУБіП України.

**Мета дослідження:** одержання чистого та здорового посадкового матеріалу беладони шляхом підбору оптимального живильного середовища для найкращого результату.

**Об'єкт дослідження:** мікроклональне розмноження беладони (*Atropa Belladonna L.*).

**Предмет дослідження:** насіння та експланти беладони.

**Методи дослідження:** біотехнологічні, статистичні та аналітичні

**Завдання роботи:**

- Визначити та підібрати якісний рослинний матеріал для мікроклонального розмноження;
- Вибір найоптимальнішого способу стерилізації насіння;
- Встановлення складу поживних середовищ, опираючись на кожен етап МКР;
- Визначення найкращих поживних середовищ та встановлення результатів дослідження.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1. Загальна класифікація родини Пасльонові.....	6
1.1.1. Опис і характеристика рослин.....	7
1.1.2. Типові представники і їх загальна характеристика.....	11
1.1.3. Значення в сільському господарстві.....	13
1.2. Морфологічна та біологічна характеристика беладони.....	16
1.3. Історична роль застосування беладони в медицині та її хімічний склад.....	21
1.4. Роль біостимуляторів на фізіологічні процеси в лікарських рослинах.....	27
1.5. Хвороби та шкідники беладони звичайної.....	29
1.6. Клональне мікророзмноження рослин.....	31
1.6.1. Загальна схема мікроклонального розмноження.....	32
1.6.2. Переваги методу клонального мікророзмноження в умовах in vitro.....	35
1.6.3. Характеристика поживного середовища Мурасіге – Скуга для культивування рослинних клітин.....	37
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	38
2.1. Загальний опис матеріалів необхідних для дослідження.....	38
2.1.1. Характеристика агаризованого середовища.....	38
2.1.2. Загальна характеристика фітогормонів.....	39
2.1.3. Основна характеристика стерилізуючих розчинів.....	42
2.1.4. Підготовка води.....	45
2.2. Методи досліджень.....	47
2.2.1. Підбір режиму стерилізації експлантів.....	47
2.2.2. Загальна методика приготування поживного середовища Мурасіге – Скуга.....	50
2.2.3. Визначення оптимальної концентрації фітогормону.....	55
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	61
ВИСНОВКИ.....	70
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	71

## ВСТУП

Беладона звичайна (*Atropa Belladonna* L.) – це лікарська рослина роду Пасльонових – Solanaceae, відома своєю отруйністю. У плодах цієї рослини містяться алкалоїди, такі як атропін, скополамін та гіосциамін, які можуть викликати галюцинації та марення. Атропін вважається основним алкалоїдом, який міститься в беладоні.

Беладону використовують у медицині та косметичній промисловості. Рослина поширена в Європі, Західній Азії та Північній Африці, і деякі регіони класифікують її як бур'ян. В Україні беладону вирощують в Криму, Полтавській області та на Півночі. Проте рослина є видом, що перебуває під загрозою вимирання і внесена до Червоної книги.

З початку 1920-х років розпочалося промислове вирощування беладони, що дозволило задовольнити потреби медицини у високоякісній сировині.

Селекційна робота з беладонною використовує традиційні методи, такі як індукований мутагенез та гібридизація. Збереження виду, масове розмноження та селекційна робота є важливими завданнями, оскільки беладона має природоохоронний статус і є важливою для медичної промисловості.

В останні роки велику увагу приділяють біотехнологічним підходам, зокрема культивуванню клітин, тканин та органів рослин в умовах *in vitro*. Дослідники активно вивчають можливості отримання якісного посадкового матеріалу та синтезу алкалоїдів беладони *in vitro*. Біотехнологія також може бути використана для отримання фітобіотиків та препаратів рослинного походження з властивостями, корисними для здоров'я тварин та людей. Тому дана робота спрямована та має за мету отримання якісного та здорового рослинного матеріалу для подальшого перенесення рослин в ґрунтові умови.

**Завдання дослідження:**

НУБІП України

Підібрати якісний рослинний матеріал для мікроклонального розмноження;

Обрати оптимальний спосіб стерилізації насіння;

- Визначити підходящий склад поживних середовищ відштовхуючись від кожного етапу мікроклонального розмноження для отримання потрібної кількості якісного посадкового матеріалу;

НУБІП України

- Визначити який склад поживного середовища допоміг досягнути найкращого результату МКР беладони.

**Об'єкт дослідження:** мікроклональне розмноження беладони.

НУБІП України

**Предмет дослідження:** насіння та експланти беладони.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

# НУБІП УКРАЇНИ

### 1.1. Загальна класифікація родини Пасльонові

Родина Пасльонові є одним з найбільших серед сучасних рослинних сімейств, включаючи понад 2300 видів, що охоплюють трави, чагарники і навіть дерева. Основною спільною рисою для цього сімейства є наявність зрослопелюсткового віночка, який формується завдяки зрощенню квіткових пелюсток. У кожній квітці сімейства пасльонові можна виділити 5 чашолистків, 5 пелюсток та 5 тичинок, і їх плодом може бути коробочка або ж ягода. Незважаючи на те, що в ньому сімействі існують отруйні види, багато з них використовується як їжа, оскільки отруйні речовини переважно концентруються у бадиллі, а не в коренеплодах або плодах. Крім того, рослини з сімейства пасльонові мають різні застосування в медицині, ландшафтному дизайні та технічних галузях [23].

Більшість сучасних культур, що належать до цієї родини, мають своє походження з Південної і Центральної Америки і мають тисячолітню історію. Вперше вони були введені до Європи Христофором Колумбом, і пізніше швидко розповсюдилися на інші континенти. Родина Пасльонові є найпоширенішими продуктами харчування у сучасному світі. Воно включає в себе такі відомі представники, як картопля (часто називається «другим хлібом»), баклажани, перець і томати. Ці овочі, незважаючи на високий вміст лугів в складі, вважаються ідеальними для збалансованої дієти людини, доповнюючи молочно м'ясний раціон [12].

Пасльонові налічують безліч дикоростучих видів, які вважаються отруйними як для людини, так і для тварин. До таких рослин відноситься паслін солодко – гіркий і паслін чорний, вживання ягід яких може призвести до серйозних отруєнь навіть із летальними наслідками. Також до цієї категорії відноситься блекота чорна, яка вважається небезпечною, але використовується

як ліки для знеболювання та зняття спазмів. Її листя є цінним матеріалом для виготовлення лікувальних мазей. Дурман зазвичай викликає сильні отруєння і може призвести до опіків шкіри, але з листя цієї рослини видобувають цінні алкалоїди для виготовлення рослинних лікарських препаратів. Беладона звичайна відома також як беладона, має привабливі чорні плоди, які можуть здаватися смачними та придатними до споживання. Однак ця рослина давно вже культивується як лікарська рослина [23].

Родина Пасльонових включає в себе різноманітні види декоративних рослин, які досить популярні для вирощування на садових ділянках та міських клумбах. Наприклад, серед них можна виділити петунії, які є красивими та невибагливими трав'янистими рослинами. Однак серед флористів особливо цінується фізаліс звичайний, який використовується для створення композицій в ікебани, сухих букетах та для оформлення живих квіткових композицій. Також в родині пасльонових зустрічаються ліани, такі як соландра, яка поширена в тропічній Африці. Її довгі та товсті стебла обвивають великі дерева, піднімаючись до вершини, де розкривають свої шкірясті листя та дзвонові квіти.

Також потрібно зазначити, що однією з рослин сімейства пасльонових є тютюн справжній, який спричинив шкідливу звичку куріння, якої багатьом людям важко позбутись. Куріння є проблемою для значної частини населення планети. Але боротьба із цією звичкою активно ведеться у багатьох країнах. Тютюн – махорка, який є родичем тютюну, не має практичного застосування як курильний продукт, але з нього видобувають лимонну кислоту, нікотин і нікотинову кислоту для медичних цілей [11].

### 1.1.1. Опис і характеристика рослин

Насіння пасльонових мають форму нирок. Плоди цих рослин можуть бути коробочками або ягодами. Квіти в них складаються з п'яти тичинок, п'яти

пелюсток та п'яти чашолистиків. Пелюстки зазвичай зростаються і утворюють зрослопелюстковий віночок.

Родина Пасльонових поділяється на дві підродини – пасльонові та ноланові. В підродині ноланових є два роди – нолана (більше сімдесяти п'яти видів) і Алона (від п'яти до шести видів, родом з Чилі). Решта родів цього сімейства належать до підродини пасльонових, яка, в свою чергу, поділяється на п'ять триб. Триба Никандрову включає лише один рід, а саме рід никандра. Найбільшою є триба пасльонових, в яку входять десятки родів [14].

Важливо зазначити, що багато представників цього сімейства мають отруйні частини, що, ймовірно, є механізмом захисту від тварин, які харчуються цими рослинами. Сімейство пасльонових (лат. Solanaceae) налічує понад 2,5 тисячі видів рослин (приблизно дев'яносто родів), багато з яких мають цінні властивості для людини включаючи лікарські рослини.

Велика кількість рослин з цієї родини славиться своїми цілющими властивостями і є дводольними. Часто вони містять алкалоїди. Пасльонові включають в себе напівкущівники, чагарники, трави, іноді невеликі дерева, особливості в тропічних регіонах. У цьому сімействі також представлені культурні рослини, такі як томати, картопля, тютюн, стручковий перець, баклажани та цифомандра. Однак, серед них є і лікарські рослини, деякі з них можуть бути отруйними. До цієї категорії відносяться дурман, блекота та скополія. Крім того, є декоративні види, такі як петунія та інші [14].

Багато з цих рослин є багаторічними травами, але деякі можуть бути невеликими деревами, чагарниками або ліанами. Лікарські рослини з цього сімейства зазвичай ростуть у субтропіках, тропіках та помірних кліматичних зонах, зокрема в Південній і Центральній Америці.

Серед садівників популярні ароматні рослини, такі як цеструм, брунфельсія, двійочки іохреми (пурпурні та червоні), солядум (фіолетові та білі), ліхтарики фезалісу та чорний гірко – солодкий мексиканський тютюн.

Пасльонові в основному представлене трав'янистими рослинами, які використовуються для господарських потреб, включаючи внутрішні та зовнішні приміщення. У квітниках можна зустріти запашний тютюн з великими білими квітами. Більшість частин рослини «тютюн» містять отруйні речовини, і тому куріння цієї рослини негативно впливає на здоров'я людини. На жаль, деякі види тютюну також знаходять своє використання в промисловості. Цікавою особливістю квіток тютюну є те, що вони розцвітають вночі, і нічні метелики грають важливу роль у запиленні цих квітів. Квітка тютюну має віночок із подовженою трубкою, який має воронкоподібну форму [12].

Дурман і блекота є іншими отруйними рослинами, які можна знайти на незабудованих ділянках, пустирях і навколо будівель. Блекоту можна зустріти переважно в північних регіонах, тоді як дурман віддає перевагу теплим місцевостям, зокрема, південним регіонам. Квіти обох цих рослин мають схожу структуру, з подовженими трубками та воронкоподібною формою. Плідом є коробочка.

Блекота та дурман можуть бути небезпечними для життя людини, але також використовуються в медицині, при дотриманні низьких доз. Наприклад, листя блекоти використовується у фармацевтичній галузі для створення препаратів із протисудомними властивостями. Блекота росте на Канарських островах, в Африці та Євразії і є отруйною рослиною. Вона відноситься до однієї дворічних трав'янистих рослин. З листя блекоти виготовляють екстракт для створення препаратів із седативним і протиспазматичним ефектом. Мандрагора, яка налічує 5 – 6 видів, це великі безстебельні багаторічні тварини з великим листям. Вони ростуть в Гімалаях, Передній та Середній Азії та регіонах Середземномор'я. Мандрагора тибетська має менший розмір і менше

виділяється серед інших видів. Скополія є багаторічною рослиною, що зазвичай росте в помірному кліматичному поясі Європи. Вона має від чотирьох до шести видів і використовується як лікарська декоративна рослина. *Skopelija karnioliska* зростає на Північному Кавказі [7].

Перець овочевий налічує багаторічні трави, напівчагарники та чагарники, серед яких існує близько двадцяти видів, які найчастіше можна зустріти в Південній і Центральній Америці. Крім вищезазначених популярних видів пасльонових овочів, існують менш популярні рослини, такі як томатілло,

земляна вишня, садова чорниця, пепіно та піменто. Піменто який також відноситься до сімейства пасльонових, нагадує болгарський перець, але відрізняється червоним кольором та походженням від перцю *Capsicum annuum*. Оригінальні приправи, такі як кайенський перець, виробляють з рослини

*Capsicum frutescens*. Паприку, зазвичай червоний перець, також отримують із роду *Capsicum*. Гострий перець також належить до сімейства пасльонових [7].

Основні характеристики сімейства пасльонових можуть бути таким чином описані:

- У всіх пасльонових рослин спостерігається проста листкова структура, що розташована послідовно один за одним на стеблах. Форма листя може варіюватися від цільних до зубчастих країв або надрізаних.

Плодами є або ягоди, або коробочки. Наприклад, паслін, помідор, картопля та баклажани мають ягоди, в той час як перець, блекота, тютюн і петунії розвивають коробочки. Важливо зазначити, що більшість отруйних представників пасльонових мають коробчкові плоди.

- Всі ці рослини мають схожу будову квіток, що складаються з двох колиць: зрощених п'яти чашолистиків та зрощених п'яти пелюсток, утворюючи зрослопелюстковий віночок. Кількість пелюсток і тичинок також становить п'ять.

У всіх представників сімейства пасльонових можна виявити присутність отруйної сполуки соланіну в їх тканинах, включаючи плоди. Навіть у звичних овочах цього сімейства соланін присутній у дуже невеликих кількостях.

- Деякі з рослин сімейства пасльонових виділяють характерний аромат, оскільки їхні стебла та листя покриті залозистими клітинами, що сприяють виходу цього аромату в атмосферу. Отруйні види пасльонових, такі як дурман і блекота, містять небезпечні для людей та тварин алкалоїди.
- Останні зустрічаються дуже часто по узбіччях доріг, поблизу житла людей, в саду, городі. Серед них є отруйні – солодко – гіркий паслін і чорний. Це напівчагарник, який цвіте бузковими квітками, має яскраві червоні ягоди. Найчастіше його можна зустріти біля водоймищ, в ярах, в низинах, лісі.
- Чорних паслін виростає поруч з людиною, його часто можна побачити, вийшовши на вулицю з дому. Цвіте він невеликими білими квітками, плід має чорне або зелене забарвлення [2].

### 1.1.2. Типові представники і їх загальна характеристика

1. Картопля: Цей овоч є надзвичайно популярним не лише в Україні, а й у багатьох інших країнах. Вона містить в складі велику кількість вуглеводів завдяки крохмалю. Картопля також багата на вітамін С і містить деякі незамінні амінокислоти, які є життєво важливими для здоров'я людини.
2. Томати: Містять практично всі вітаміни групи В і, особливо, вітамін Е, який сприяє омолодженню клітин організму. Також в томатах міститься речовина тирамін, яка сприяє синтезу серотоніну – «гормону щастя», що регулює емоційний стан людини.
3. Перець (гострий та солодкий): Перець має велику користь, оскільки містить вітаміни С і Р, які позитивно впливають на стан серцево – судинної

системи і сприяють виведенню шкідливого холестерину. Перцевий пластир також використовується для створення вігріваючого ефекту при застуді, радикуліті та розтягненні зв'язок.

4. Баклажан: Цей овоч сприяє кровотворенню, знімає набряклість при серцево – судинних проблемах і має протизапальні властивості, що допомагають заспокоїти нерви.

5. Фізалис харчовий: Ця красива рослина може служити прикрасою садової ділянки і має яскраві помаранчеві коробочки з смачними солодкуватими ягодами такого ж кольору. Вона містить вітаміни та необхідні для організму мінерали. Основна її користь полягає в антиоксидантних властивостях, які допомагають в профілактиці онкологічних захворювань.

Сімейство Пасльонових має в своєму складі численні лікарські рослини, які мають різноманітні корисні властивості:

1. Отруйний чорний паслін виявляється ефективним у лікуванні численних захворювань, таких як псоріаз і лишай. Також він корисний для лікування цирозу. Відвар з листя і стебел гірко – еселодкого пасльону використовується для лікування ревматизму. Цей вид рослини може бути використаний для приготування смачних страв, а також для лікування простудних захворювань, ангіни та виразки шлунку.

2. Беладона також використовується в медицині. З кореня і листя цієї рослини виробляють сировину для лікарських препаратів. Вона має болезаспокійливу і протизапальну дію і часто призначається при виразках шлунку і дванадцятипалій кишці, м'язових болях, туберкульозі, епілепсії та паркінсонізмі.

3. Блекота чорна використовується для виготовлення олії, а її листя використовують в народній медицині. У невеликих кількостях ця рослина використовується як седативний засіб. Її екстракт додають до таблеток для подолання неприємних симптомів морської хвороби.

Блекота також входить до складу різних настоянок і мазей для лікування подагри і захворювань суглобів.

4. Дурман звичайний має листя, яке багате гіосциаміном, що застосовується для створення лікарських засобів із заспокійливими властивостями.

5. Мандрагора використовується в медицині за допомогою коренів, які мають форму, нагадуючу людську фігуру. Вони містять токсичні психоактивні речовини і застосовуються як седативний, снодійний і болезаспокійливий засіб, включаючи лікування зубних болей,

геморою, а також під час пологів. Мандрагору використовували для зменшення припухлостей та боротьби з онкологічними захворюваннями [1]

### 1.1.3. Значення в сільському господарстві

Картопля має величезне значення для сільського господарства різних країн і використовується у різних галузях. Як продукт харчування, сировина для технічної промисловості і корм для сільськогосподарських тварин. Вперше картоплю ввезли в Європу з Південної Америки в 1565 році. Лише в 19 столітті цю рослину оцінили на справедливому рівні, і вона здобула широке розповсюдження. Однак картопля – це не єдина культура сімейства пасльонових, яка стала невід’ємною частиною сучасного сільського господарства. До інших видів, що отримали популярність, відносяться томати, різні сорти перцю і баклажани [1].

Томати були привезені до Європи з Перу і Еквадору в 1523 році.

Спочатку їх використовували як декоративні рослини для садів, і більшість з них були жовтого кольору, що привело до їхньої назви «помідор», що перекладається як «золоте яблуко» з іспанської мови. З часом ці плоди стали

використовувати в якості лікарських рослин, а потім вони отримали велике значення для сільського господарства. Уперше також здобули велику популярність. Ці рослини прибули з Гватемали та Мексики і вони потребують тепла для росту. У Європі їх почали вживати вже з 16 століття. Баклажани також мають важливе значення у сільському господарстві. Вони були вперше описані

в документах 9 століття індіанцями, і їх історія використання свідчить, що з часом вони стали популярними у різних країнах. У Європі баклажани раніше вважались небезпечними для здоров'я, але навпаки американським індіанцям, їхнє вживання стало актуальним [1]. За міжнародною класифікацією, пасльонові

рослини відносяться до класу Дводольні і відділу Покритонасіння. Вони належать до окремого порядку – пасльоноцвітіє. Представники цього сімейства можуть бути трав'янистими, прямостоячими, в'юнкими або сланкими рослинами, такими як картопля, мандрагора і чорний паслін. Незалежно від

форми життя, всі пасльонові мають спільні характерні ознаки. Деякі представники цього сімейства, такі як беладона, дурман і блекота, містять сильні алкалоїди, які можуть бути смертельно небезпечними для людини. Зазвичай отруйними є всі частини цих рослин, квітка беладони зображена на Рис.1.1.



Рис. 1.1. Квітка беладони  
(фото з мережі Інтернет)

Пасльонові представляють собою багаторічні рослини, відзначаються простими листками і ароматними квітами з витягнутими пелюстками. Тип плоду, який є характерним для пасльонових, залежить від конкретного виду рослин. Нижче подано загальний опис органів рослини [14].

Органи рослини:

1. Уагони: Вони соковиті і м'ясисті, часто покриті волосками. В певних випадках можуть утворюватися бульби на стеблах, які є видозмінною підземних витяжок (як, наприклад, картопля).
2. Листки: Листки можуть бути простими, лопатевими, цілокраїми або розсіченими. Вони розташовані на стеблах по чергово і зазвичай не мають прилистків. Часто вони покриті волосками, особливо у випадку томатів.
3. Квіти: Квіти можуть бути простими або складними, включаючи одиничні квіти, завитки, кисті та звивини.
4. Квіткова будова: У пасльонових квіти є дволопатовими і мають подвійну оцвітину. Чашечка складається з п'яти зрощених чашолистків, а віночок складається з п'яти зрощених пелюсток. Тичинок також п'ять, вони оточують пестик. Часто вони утворюють щільний конус.
5. Плоди: Плоди пасльонових можуть бути у вигляді ягід (як у картоплі, баклажана і фізалису) або коробочок (як у петунії, тютюну чи дурману). Приклад коробочки у плоді петунії зображено на рисунку 1.2.
6. Коренева система: Зазвичай у пасльонових рослин розвинена стрижнева коренева система, але при вегетативному розмноженні може розвиватися мичкувата коренева система [14].



Рис.1.2. Приклад коробочки у плоді петунії

(фото з мережі Інтернет)

## 1.2. Морфологічна та біологічна характеристика беладони

Беладона (*Atropa belladonna* L.) – це багаторічна трав'яниста рослина з родини Пасльонових (*Solanaceae*), біологічна класифікація така:

- Домен: Еукаріоти ( Eukaryota),
- Царство: Зелені рослини (Viridiplantae),
- Відділ: Вищі рослини (Streptophyta),
- Надклас: Покритонасінні (Magnoliophyta),
- Клас: Еудікти,
- Підклас: Айстериди,
- Порядок: Пасльоноцвіті (Solanales),
- Родина: Пасльонові (Solanaceae),
- Рід: Беладона (*Atropa*),
- Вид: Беладона звичайна. Бінальна назва – *Atropa belladonna* L.

У давньогрецькій міфології її ім'я пов'язане з Атропоею, однією з Мойр, богинь підземного світу. Рослина має великі та гнучкі стебла, які можуть досягати висоти від 0,5 до 2 метрів, із густим темно-зеленим листям. Листя беладони має еліптичну або яйцевидну форму і може бути великим (довжина до 22 см і ширина до 11 см) або малим (довжина 7,5 см і ширина 3,5). Квіти беладони поодинокі та великі, розташовані в пазухах листя. Вони мають дзвоникоподібну форму і фіолетово-бурий колір, завдовжки до 20–23 мм і завширшки 12–20 мм. Плід – це багатонасінна, соковита, чорного кольору ягода із фіолетовим соком, яка за смаком нагадує вишню. Період цвітіння беладони припадає на другу половину літа [22]. Рослина може рости як поодинокі, так і у вигляді заростей на оклицях доріг, в лісових вирубках, на галявинах, узліссях, берегах річок та у ярах. Вона особливо любить вологі, пухкі та перегнійні ґрунти букових лісів, і рідше зустрічається в ялівцевих лісах (рис. 1.1).



Рис. 1.3. Беладона звичайна: а – рослина, б – коренева система, в – ботанічна ілюстрація (за Готтше, 1985 р.)

Беладона, науково відома як *Atropa belladonna* L., є поширеною багаторічною трав'янистою рослиною в Південній і Центральній Європі, Південній Америці та США. В Україні її можна знайти в Карпатах, Криму, Західному Лісостепу, Опіллі та Розточчі. Рослина також має багато народних назв, таких як «красавка звичайна», «красуха», «сонний одур», «скажена ягода», «скажена вишня», «беладона європейська» та «беладона звичайна» [23].

Назва беладони походить від італійського слова «bella donna», що означає «красива жінка». Це пов'язано з тим, що жінки в Стародавньому Римі, Італії та Іспанії використовували атропін, основний алкалоїд рослини, для розширення зіниць і надання блиску очам. Вони також використовували сік ягід для надання рум'янцю щокам. Латинська назва «Атропа» походить від грецьких слів «atropos» і «atrope», які означають «непоступлива» і «безповоротна». Ця назва пов'язана з однією з Мойр, стародавніми грецькими богинями долі, яка перерізала нитку життя, не зважаючи на вік або стать. Їм'я також може вказувати на отруйний характер рослини. Беладону вважали отруйною рослиною ще в давні часи, і її знали як «божевільну рослину» [23].

Німецький токсиколог Густав Шенк особисто переконався в дії беладони на організм людини, вдихаючи дим, що виділяється під час спалювання насіння цієї рослини. Раніше вважалося, що беладона може спричинити божевілля, але пізніше виявилось, що вона може бути корисною у невеликих дозах для лікування безсоння, епілепсії, нічного нетримання сечі, кашлю, холери, а також для лікування шлунково – кишкових та шкірних захворювань, а також венеричних захворювань [27].

У 1831 році вчені Мейн та в 1833 році Гейгур та Хейссе вперше виділили атропін – основний алкалоїд рослини – з коренів беладони у чистому вигляді. Це дозволило встановити, що саме ця речовина відповідає за більшість лікувальних та отруйних властивостей беладони. У дикому стані беладона поширена в різних регіонах, включаючи Західну та Південну Європу, Балкани, узбережжя

Атлантичного океану, Середземномор'я та Малу Азію. Вона також зростає в Пакистані, Ірані, Кавказі, Афганістані, Північній Африці та США. В Україні беладону можна знайти в Карпатах (Закарпаття), іноді в Крикарпатті [26].

Рослина зазвичай росте в лісах групами, насадженнями в узліссях, на берегах річок та галявинах. Беладону також внесено до Червоної книги України.

Беладона є багаторічною рослиною, висотою до двох метрів, з товстим кореневищем. Її стебло пряме, зеленого або бурого-пурпурного кольору, вгорі виллоподібно розгалужене та залозисто опушене. Листя має яйцевидну форму із загостреними краями та завдовжки 15 – 20 см. Квітки великі та поодинокі, розташовані в пазухах листків на квітконіжках. Віночок квітки трубчасто-дзвоновидний, червоно-бурий або коричнево-фіолетовий, з п'ятьма короткими лопатями [26].

Розцвітає від червня до серпня. Плід - куляста блискуча соковита ягода чорного кольору із фіолетовим соком. Беладону вирощують як промислову культуру у багатьох країнах світу, включаючи регіони Європи, Америки та Азії, включаючи Україну, зокрема Крим. Ця багаторічна рослина вимагає теплого клімату та постійного снігового покриву для виживання. Відомо, що при відсутності снігу та при температурі 10 - 15°C нижче нуля беладона може вмерзнути, тоді як при наявності снігового покриву рослини витримують навіть -30°C. Важливо, щоб беладона росла на сонячних ділянках, оскільки недостатній доступ до сонячного світла може призвести до тонкого листя і втрати кількості алкалоїдів. З практичною метою урожай беладони з культивованих рослин збирають 3 – 4 рази протягом літа [22].

Головні алкалоїди, такі як атропін та гіосциамін, містяться в різних частинах рослини: корені містять 0,4%, листя – від 0,14% до 0,12%, стебла – від 0,2% до 0,65%, квітки – від 0,23% до 0,6%, а зрілі плоди – 0,7%. Сушене листя та корені беладони використовуються як лікарська сировина. Листя має зелене забарвлення та слабкий запах наркотичних речовин. Вміст вологи у сировині не

повинен перевищувати 13%, а втрачене забарвлення листя не повинно перевищувати 4%. Верхівки пагонів з плодами та квітами не повинні містити більше 4% вологи [22].

Також мінімальний вміст алкалоїдів повинен становити 0,3%. Контроль кількісного визначення алкалоїдів проводиться щорічно. Для виготовлення лікарських форм беруть менше сировини, якщо відсотковий вміст алкалоїдів перевищено. Корені беладони мають циліндричну форму, товщина яких коливається від 0,6 до 2 см, мають світло – сірувато – буре забарвлення, зморшкуваті та містять не менше 5% алкалоїдів. Вологість коренів не повинна перевищувати 13%, а чорне забарвлення на зламі не повинно перевищувати 3%.

Корені та листя беладони зберігаються обережно для подальшого використання в медичних препаратах, порошках, екстрактах та настоянках [25].

Атропін є провідним представником холінолітичних речовин, які блокують системи М-холінореактивних систем організму. Ця речовина впливає на М-холінореактивні системи, які взаємодіють з ацетилхоліном, та позбавляє їх чутливості до ацетилхоліну, який виділяється на кінцях постгангліонарних холінергетичних нервів. Це призводить до порушення передачі нервових імпульсів до виконавчих органів. Дія атропіну на очі людини супроводжується розширенням зіниці через блокування М-холінореактивних систем в м'язах оболонки радужки. Крім того, атропін пригнічує виділення поту і великої кількості секрету в залозах шлунково – кишкового тракту [28].

Це також призводить до прискорення серцебиття і розслаблення гладкої мускулатури бронхів, шлунку та кишечника через блокування систем гладкої мускулатури цих органів. Атропін також має блокуючий ефект на М-холінореактивні системи ретикуляційної формації. Великі дози атропіну можуть стимулювати кору головного мозку і викликати рухове та психічне збудження.

### 1.3. Історична роль застосування беладони в медицині та її хімічний склад

*Atropa belladonna* L. є відомою лікарською рослиною, яка використовується як у народній, так і в науковій медицині, і відрізняється широким спектром фармакологічних властивостей. Токсичні властивості беладони зазвичай пов'язані з присутністю у неї алкалоїдів, які мають потужний вплив на центральну нервову систему [27].

Отруєння організму рослиною беладони відомою під назвою «сонна одурь» характеризується певними симптомами. Існують давні записи, свідченням про знайомство з отруйними та деякими лікувальними властивостями беладони, і вони датуються античними часами. В стародавніх творах грецьких і римських лікарів і письменників можна знайти згадки про ці властивості. Про застосування беладони в медицині античних часів обмежена та зовсім не обширна. Її відомо як отруйну рослину, що згадується в творах Теофраста (372–287 років до н.е.) і Diosкорида (1 століття н.е.), останній називав рослину «*Struchnos manicos*», що перекладається як «божевільна рослина» [22].

У давніх германських племенах були відомі воїни-Берсерки, які перед битвою вживали напій із беладони, яка росла в лісах Західної Європи. Цей напій призводив до стану сильного збудження, і воїни виступали на ворога з надзвичайною енергією. У східних країнах, ще 2500 років тому, беладону застосовували в якості наркотичного засобу разом із іншими рослинами, такими як індійська конопля, снодійний мак та болиголов [25].

У одному з наукових трактатів, що датуються 1504 роком, беладону називали «*Solanum mortale*», що означає «смертельний паслін». Перший ботанічний опис рослини під назвою «*Solanum mortiferum*» був представлений Леонардом Фуксом (1591-1565) в 1542 році. Польський лікар та ботанік Шимон Северський також писав про цю рослину [25].

Зазвичай в середньовіччі сік беладони використовували як отруту, і в історії є приклади випадків, коли данці, відступаючи перед ворогами, залишали бочки з пивом, яке було засмачено соком беладони, для своїх ворогів. Після того, як вороги випивали цей напій, вони потрапляли в глибокий сон, і данці з легкістю перемагали їх [23].

Солдати наполеонівської армії отруїлися, споживши ягоди беладони, коли вони перебували неподалік від німецького міста Пирна у 1813 році. Завдяки своїм галюциногенним властивостям, беладона, а також блекота, часто вважались чарівними рослинами і використовувались у зілваринні та напоях.

Особливо популярною була «мазь відьом», яку виготовляли із соку плодів беладони у VIII-XIV століттях. Жінки, які вважали себе відьмами, вживали такий напій або мазь і відчували незвичайні ефекти, такі як потіт, стрімке переміщення у просторі, галюцинації у зоровій, нюховій та слуховій сферах, і вони переконувалися в реальності цих відчуттів, вважаючи, що приймають участь в шабаші. Ці явища, спричинені дією беладони, були відомі німецькому токсикологу Густаву Шенку, який вдихав дим запаленого насіння цієї рослини [23].

Парацельс, видатний алхімік та лікар (1493-1541), вважав, що беладона може викликати божевілля. Але вже в середньовіччі ця рослина застосовувалась в невеликих, практично гомеопатичних дозах для лікування безсоння, епілепсії, нічного нетримання сечі, холери, подагри, коклюшу, шлунково – кишкових захворювань, шкірних та венеричних хвороб. У 1677 році Фабер детально описав застосування та вплив беладони, яку він назвав «*Solanum furiosum*». У XVI столітті італійський лікар та ботанік Матіеллі проводив ризикові дослідження з беладони на злочинцях. Приблизно в той же час рослину вже називали «*Herba Belladonnae*» (трава беладони) і використовували жінки Венеції для підсилення блиску своїх очей [24].

У XVIII столітті беладона привернула увагу багатьох вчених і дослідників, включаючи Петруса Даруючі (1776) та Монхе (1789), що вказує на зростаючий інтерес до неординарних властивостей цієї рослини. Хоча мідріатичні властивості беладони були відомі вже в 1802 році, але її анальгетичні властивості стали відомі тільки у 1860 році. До XIX століття залишалося невідомим, яка саме біологічно активна сполука в беладоні має терапевтичну дію на організм тварин [26].

У 1831 році Мейн та незалежно від нього Гейгер і Хессе виділили кристалічні гіосциамін і атропін з коренів беладони. Встановлено, що ці сполуки є головними активними речовинами, які визначають фармакологічні властивості беладони. У 1879 році був синтезований атропін з атропового кислотою і тропіну. Кінцем XIX століття Ладенбург встановив структуру атропіну та ідентифікував його з гіосциаміном [25].

З цього часу атропін став важливою складовою багатьох лікарських засобів і отримав широке використання в медицині. Окрім атропіну, беладона містить інші алкалоїди, такі як гіосциамін, скополамін та інші, які також використовуються в медицині. Вже в 1866 році беладону було визнано як лікарську рослину, і вона була включена до першої фармакопеї. У 1868 році Trousseau вважав атропін одним із найефективніших засобів при бронхіальній астмі. Проте пізніше арсенал засобів для лікування астматичних захворювань розширився, і атропін відступив на другий план. Проте в 70-х роках минулого століття було виявлено, що атропін та його похідні мають бронхорозширюючу дію при інгаляційному введенні [31].

На початку XIX століття мешканець міста Шипка в Болгарії, Іван Раїв, розробив засіб від хвороби Паркінсона, який став справжньою сенсацією. Італійська королева Олена заплатила йому чотири мільйони лір за цей секрет. Цей засіб був використаний у лікарнях для лікування хворих на енцефаліт. У 25%

випадків пацієнти одужували, а в 40% відзначалось помітне поліпшення їх стану. Проте цей засіб не здобув широкого визначення через побічні ефекти.

Задовго до відкриття атропіну, мазь з екстракту беладони використовували для лікування защемлених гриз. В минулому, в Богемії, корінь беладони додавали до пива та іноді до горілки, щоб надати їм одурманюючі властивості. В Австралії беладону додають до корму волів, щоб підтримувати гладку шерсть у тварин. В народній медицині беладону рекомендували при різних захворюваннях, включаючи сказ, сифіліс, імпотенцію, бронхіальну астму, туберкульоз легенів. Для лікування кишкових розладів використовували

спиртовий настій ягід беладони. Свіжий сік з листя рослини, розведений горілкою, застосовували для лікування хронічних запалень очей як у людей, так і ветеринарії. Аплікації та припарки з листя беладони рекомендували для симптоматичного лікування інфільтратів та для лікування раку молочної залози

[22]. В сучасній медицині настоянку беладони використовують для лікування паралічу з втратою мови, артритів, радикулітів, ревматизму та захворювань шлунково-кишкового тракту. В Франції використовують беладону при мігрені,

неврозах, невралгії лицевого нерва, болях та хворобах шлунку, кишок, печінки та нирок, а також при енурезі. Екстракт коренів використовують як засіб для знеболювання при подагрі, ревматизмі, невралгіях, і настоянка плодів застосовується при дизентерії [24].

У всіх частинах рослини містяться тропанові алкалоїди, такі як атропін, гіосциамін, скопаламін та інші. Вміст алкалоїдів в різних частинах рослини коливається від 0,15% до 1,32%. Ці алкалоїди використовуються для створення препаратів зі спазмолітичними і седативними властивостями, а також в офтальмологічній практиці для розширення зіниць. Деякі з відомих препаратів, які містять беладону та її алкалоїди, включають Белатамінал, Бекарбон, Бепасал, Белалгін, Бетіол, Белацехол, Анузол та Атропін [26].

Зелене листя беладони випускає наркотичний аромат та солонувато – гіркий смак, корінь має спочатку солодкуватий, а потім пекуче-гіркий смак. Листя цієї рослини містять алкалоїди тропанового ряду (у діапазоні від 0,15% до 1,3 %), такі як атропін, гіосциамін, скопаламін, гіосцин, беладонін, атропін.

Також листя містить леткі азотовмісні сполуки у вигляді основ, такі як N-метилпіролін, N-метилпіролідин, піридин, оксикумарини, тетраметилдіамінобутан, стероїди, фенолкарбонові кислоти та їх похідні, аліфатичні вуглеводні та різні інші речовини, такі як танін, аспаргін, слиз, віск, крохмаль, вуглеводи, смоли та мінеральні речовини [2].

Корені беладони вміщують близько 0,5% тропанових алкалоїдів, таких як атропін, гіосциамін, скопаламін, норпсевдотропанові алкалоїди, калістегіни, піролідиновий алкалоїд, кускгігрин, леткі азотовмісні сполуки у вигляді основ такі як N-метилпіролін, N-метилпіролідин, піридин, метилпіролін, тритерпеноїди і кумарини, ескулетин, метилескулетин, дубильні та інші речовини [2]. Насіння беладони містить стероїдні глікозиди спіростанового типу, відомі як атропозиди А, В, С, D, E, F, G і H. Тропанові алкалоїди, такі як гіосциамін, присутні в інших частинах рослини, включаючи квітки, стебла, нестигли та стиглі плоди, та насіння, хоча у менших кількостях [4].

Основна активна речовина, що визначає фармакологічні властивості *Atropa belladonna* (зображена на рисунку. 1) – атропін. Атропін проявляє спазмолітичну та болевамувальну дію, зменшує виділення слинної, шлункової та потової рідини, розширює зіниці очей, призводить до паралізу акомодациї, розширює бронхи при їхніх спазмах та знижує перистальтику кишок. Крім цього, атропін збуджує серцевий ритм. У великих дозах він може спричиняти стан збудження, судоми, галюцинації, занепокоєння, а також параліч при надмірному вживанні.

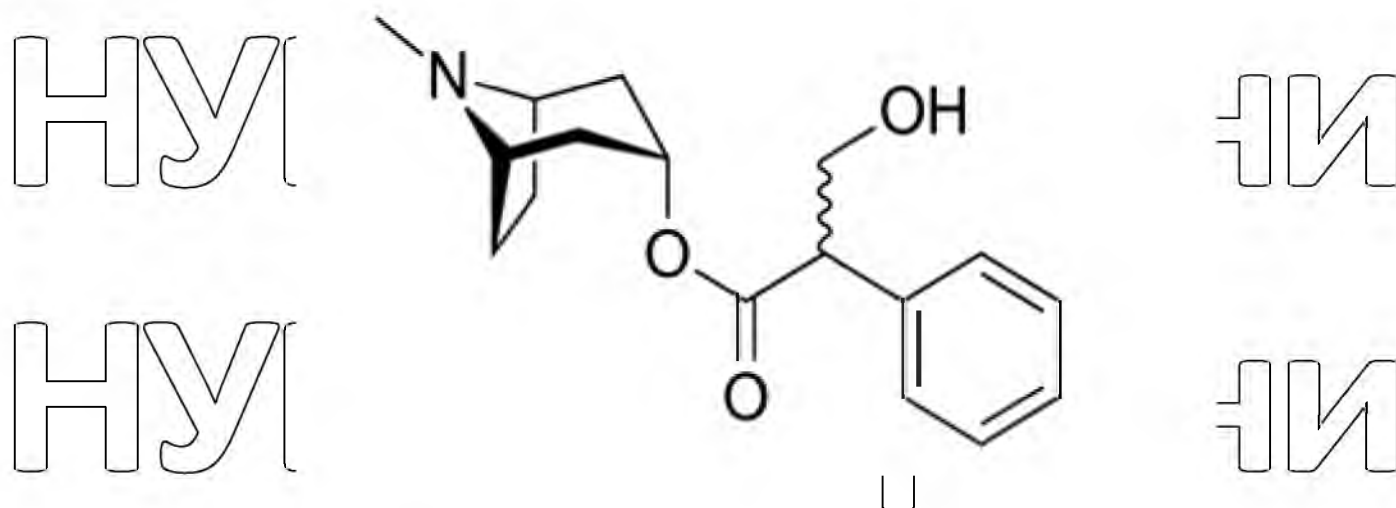


Рис.1.4. Хімічна будова атропіну [12].

Атропін в медицині використовується для різних цілей: як спазмолітик при астмі, виразковій хворобі шлунку та дванадцятипалої кишки, пілороспазмі, хронічному гіперацидному гастриті, спазмах кишківника, а також для лікування хвороб жовчовивідних шляхів, жовчного міхура, захворювань підшлункової залози, алергічних розладів, безсоння, нервового збудження, туберкульозу легень, геморою, хвороби Паркінсона та інших розладів [12].

Атропін використовується також в офтальмології для розширення зіниць за діагностичними та лікувальними цілями, а при отруєнні деякими речовинами та грибами він може служити протиотрутою. Препарати на основі беладони використовуються в медицині під різними торговими назвами для лікування різних захворювань [6]. Безпосередньо в народній медицині беладону використовують у вигляді відвару з коренів для полегшення подігри, ревматизму та невралгій, а також як засіб зовнішнього застосування для зменшення болю [6].

Отже, *Atropa belladonna* – це лікарська рослина, що має широкий спектр застосування в медицині та народній медицині завдяки вмісту різноманітних активних речовин, включаючи атропін [17].

#### 1.4. Роль біостимуляторів на фізіологічні процеси в лікарських рослинах

Лікарські культури, до яких відноситься беладона звичайна, представляють особливу групу рослин, які мають властивості, що характерні для дикорослих видів. Одним із проявів цих спільних біологічних властивостей є тривалий період спокою насіння і затягнутий процес проростання, що призводить до виникнення слабких та нерівномірних зростань, а також сповільнення темпів росту на ранніх стадіях онтогенезу. Усе це супроводжується зменшенням стійкості рослин до шкідників, хвороб, конкурентоспроможності в порівнянні з дикорослими бур'янами [14].

Насіння таких культур, як аммі велика (*Ammi majus* L.) і зубна (*Ammi visnaga* (L.) Lam.), беладона звичайна (*Atropa belladonna* L.) та великої кількості інших рослин відрізняється низькою схожістю через недорозвиненість зародка.

Зміцнити схожість такого насіння можливо завдяки проведенню прийому, такого як холодна або гаряча стратифікація.

В останні роки, найперспективнішим і високоефективним способом підвищення енергії проростання та схожості насіння є їх передпосівна обробка росторегуляторами. Цей метод має кілька переваг перед традиційною стратифікацією, так як він скорочує тривалість передпосівної підготовки насіння, зменшує працезатрати і витрати коштів [16].

В ряді зарубіжних країн надзвичайно активно розвивається виробництво сільськогосподарської продукції на основі екологічно чистих технологій, що отримало назву екологічне сільське господарство. Під поняттям «екологічне сільське господарство» слід розуміти виробництво сільськогосподарської продукції з обмеженою або повною відмовою від використання промислових мінеральних добрив і хімічних засобів захисту рослин. Замість цього, акцент робиться на використанні біологічних факторів для підвищення родючості, при цьому не завдаючи негативного впливу на навколишнє середовище.

Зазначено, що багато лікарських рослин, які деякий час тому ростуть переважно в дикій природі, мають слабкі сходи насіння. Тому, звісно ж необхідні дії щодо пошуку біогенетичних стимуляторів, які б змогли «розбудити» насіння і підвищити їхнє проростання [14].

Проростання насіння – критичний етап у вирощуванні рослин, оскільки від нього залежить однорідність насіння та загальний врожай. Ця фаза має велике значення в аграрній галузі. Важливо пам'ятати та враховувати, що природні стимулятори росту рослини можуть виконувати ту ж функцію, що й хімічні стимулятори, але без їхньої небезпечності для здоров'я та довкілля.

Беладона, через свої унікальні біологічні особливості, характеризується низькою подібністю насіння, тривалим періодом вирощування та повільним ростом на початкових стадіях вегетації. Ці аспекти можуть знизити стійкість рослини до стресових факторів, особливо в умовах непердбачуваної погоди [22].

Потрібно пам'ятати, що фітогормони мають головну роль у регулюванні процесів росту та адаптації рослин. Застосування зовнішніх фітогормонів може мобілізувати природні резерви рослин та підвищити їхню біопродуктивність. В останні роки науковці все більше звертають увагу на роль вторинних метаболітів у регулюванні життєдіяльності рослин, на додаток до природних фітогормонів [25].

У дослідженні, проведеному Курдинською І. В., було виявлено, що для забезпечення нормального проростання насіння беладони існує два можливих методи: стратифікація насіння або обробка гіберелом як регулятором росту. Використання гібереліну має перевагу, оскільки дозволяє уникнути необхідності в стратифікації, яка є ресурсомістким процесом. Проте слід зауважити, що гіберелін не має завжди позитивний вплив на рослини. Наприклад, у дослідженнях на лікарській рослині серпус вінценосний виявлено, що обробка насіння гібереліном, яка стимулює ріст надземної частини проростків, призводить до пригнічення росту кореневої системи. Залежно від погодних умов,

особливо при недостатньому сонячному світлі, застосування гібереліну може спричинити значне витягування стебел та зменшення поверхні асиміляції листків. І, можливо, саме через ці обставини гіберелін був виключений із «Державного реєстру препаратів, дозволених до використання в Україні» для обробки насіння [17].

Дослідження, проведені Хазиевою Ф. М. і командою Пушкіної Т. П., Бушковської Л.М. і Марчук Л.Т., демонструють, що комбінування гібереліну з іншими фітогормонами, такими як епібрасинолід, або з вторинними метаболітами, такими як гідроксикоричні кислоти, може зняти деякі негативні аспекти його дії і покращити результати обробки насіння [19].

### 1.5. Хвороби та шкідники баладони звичайної

З огляду на зростання популярності вирощування лікарських рослин серед українських фермерів, неодмінно виникають питання стосовно їхнього захисту. В Україні промислово вирощується понад 26 видів лікарських рослин, включаючи беладону звичайну.

Система заходів для лікарських культур включає, по-перше, ряд заходів, спрямованих на профілактику захворювань та шкідників на ґрунтах, де безпосередньо вирощують рослини. Вибір попередника має значний вплив на запобігання накопиченню шкідників та хвороб, що вразливі для цієї культури. Важливим є також вчасний контроль над бур'янами, оскільки вони можуть стати укриттям для багатьох шкідливих комах та патогенних мікроорганізмів.

Щодо шкідливої ентомофауни для лікарських рослин загалом, включаючи беладону звичайну, яку вирощують на полях України, переважають

багаторічні види. Посадки беладони звичайної часто стають жертвами хвороб, спричинених різноманітними групами мікроорганізмів [23].

В Україні виділяють п'ять найпоширеніших типів захворювань, які найбільше завдають шкоди цій лікарській рослині:

1. Плямистість листків. Ці хвороби викликаються мікроміцетами різних родів, такими як *Cercospora*, *Septoria*, *Phyllosticta*, *Colletotrichum*, *Peronospora*, *Ramularia*. Пошкоджені листки приводять до зниження урожаю надземної біомаси беладони на 26-62%.

2. Кореневі гнилі. Гриби родів *Fusarium*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Helminthosporium* є збудниками цих захворювань. Хвороби проявляються у вигляді в'янення, чорної гнилі або кільцевої м'якоті. Ураження рослин походять від заражених решток рослин, ґрунтової інфекції та насіння.

3. Борошнисті роси. Переважно мікроміцети родів *Erysiphe* та *Sphaerotheca* викликають ці хвороби. Борошниста роса є однією із найшкідливіших хвороб, яка може завдати ураження до 16% рослин порівняно з іншими захворюваннями.

4. Іржі: Ці захворювання викликані грибами родів *Russinia*, *Uromyces*, *Coleosporium*, *Phragmidium*, які проявляються у вигляді дрібних оранжевих спор або коричневих вивихів, що розсіпають численні спори.

5. Вірусні захворювання: Вони спричиняються фітопатогенами вірусного походження. Уражість вірусами коливається від 12% до 74%.

Згідно з висновками Глушенко Л. А., поширення цих захворювань тісно пов'язане з ґрунтово-кліматичними умовами. Вологий клімат характеризується іржастими захворюваннями, плямистістю і пероноспорозами, що поширені на заході України. У центральній і східних областях з більш сухим кліматом більше розповсюджені борошнисторосі гриби і фузаріозне в'янення. Усі ці шкідники і хвороби призводять до пошкодження наземної та підземної частин рослини, що

призводить до зниження врожайності беладони та непридатності сировини для фармацевтичної промисловості [15].

### 1.6. Клональне мікророзмноження рослин

Мікроклональне розмноження – це безстатевий спосіб вегетативного розмноження рослин у культурі *in vitro*, при якому отримуються рослини, що мають ідентичний генетичний склад з вихідною материнською формою. Цей процес сприяє збереженню генетично однорідного спадкового матеріалу. Термін «клон» походить від грецького слова «κλῶν», що означає «паросток» або «пагін». Він був запропонований Гербертом Джоном Вебером у 1903 році для позначення «групи рослин, отриманих з використанням будь – якої вегетативної частини рослини (наприклад, бульби або цибулини) і є частиною тієї ж індивідуальної особи». Для такого виду розмноження використовуються частини рослин, які вже містять меристемні (твірні) тканини або групи клітин, здатні до росту і розвитку. Це можуть бути зародки, еморіоди, різні види бруньок (верхівкові, пазушні, сплячі і т.д.), або такі осередки індукуються під час досліджень. Метод культури твірних тканин для мікроклонального розмноження вперше був застосований французьким дослідником Жаном Морелем в 1690 році для виду орхідеї – цимбідіума (*Cymbidium*). За один рік він зміг отримати близько 4 мільйонів рослин з одного вихідного експланту [2].

Клональне мікророзмноження – це процес масового безстатевого розмноження рослин в умовах культури *in vitro*, при якому отримані рослини, з генетичної точки зору, є ідентичними до вихідної батьківської форми. Термін «клон» вказує на популяцію клітин, які утворилися з однієї початкової клітини шляхом мітозу, або це може бути група рослин, які отримані шляхом вегетативного розмноження і всі їхні частини походять від однієї клітини, яка була повторно культивована.

Основною для клонального мікророзмноження є здатність тотипотентних рослинних клітин до регенерації. Для виконання клонального мікророзмноження в асептичних умовах, різні методи можуть використовуватися в біотехнологічних лабораторіях, залежно від потреб виробництва і специфікацій видів рослин. Вибір оптимальної моделі культивування *in vitro* зазвичай пов'язаний з біологічними характеристиками видів рослин. Багато факторів, таких як тип експланта, генотип рослини, умови культивування донорських рослин, склад живильного середовища, фотоперіод і інші, можуть впливати на розвиток регенерантів [2].

Процес клонування *in vitro* складається з чотирьох основних етапів:

1. Перший етап – відбір, підготовка та стерильна культивация донорських експлантів;
2. Другий етап – активне розмноження рослин *in vitro*;
3. Третій етап – індукція процесу ризогенезу;
4. Четвертий етап – адаптація рослин до умов *in vitro*, коли вони переносяться з асептичного середовища *in vitro* до нестерильних умов *in vitro*.

У сучасних дослідженнях також виділяють п'ятий етап, під час якого рослини, які були вирощені *in vitro*, переносяться в природні умови вирощування, і цей процес називається *ex vitro*.

### 1.6.1. Загальна схема мікроклонального розмноження

Метод клонального мікророзмноження базується на стимуляції росту верхівкових і пазушних меристем за допомогою цитокинінів. Кожна з цих меристем формує багато пагонів. Після утворення великої кількості пагонів їх розділяють на менші групи і переносять в свіже середовище для подальшого росту. Цей процес повторюється знову і знову [1].

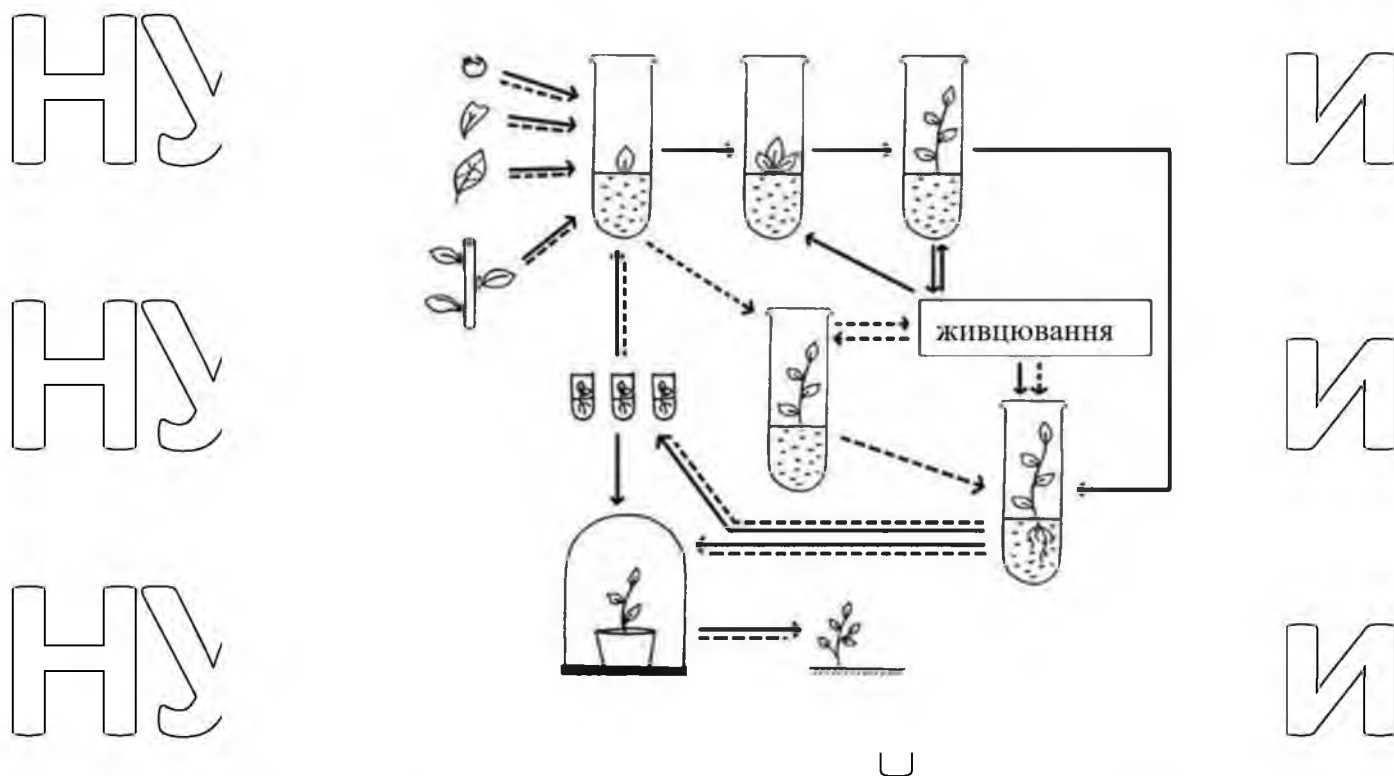


Рис.1.5. Схема процесу клонального мікророзмноження рослин[1]:

Шлях I – активування росту існуючих меристем;

Шлях II – стимулювання виникнення адвентивних бруньок; 1 – вибір вихідного експланта; 2 – отримання стерильної культури; 3 – формування адвентивних бруньок на початковому експланті; 4 – зростання бруньок та створення мікроростків; 5 – розмноження мікроростків; 6 – розвиток кореневої системи у мікроростків; 7 – збергання рослин – регенерантів; 8 – адаптація рослин до природних умов ґрунту; 9 – висадка регенерантів в натуральні умови.

Швидкість процесу клонального мікророзмноження може коливатися в залежності від виду рослини, але найчастіше можна отримати мільйони рослин з єдиної бруньки за один рік. Існують ключові чинники, що впливають на процес мікроклонального розмноження, такі як тип вибраного матеріалу для експланта, склад живильних середовищ і умови культивування. Для початку можуть використовуватися верхівкові та пазушні меристеми стебла, молоді листки, компоненти суцвіття та квітки, цибулини та бульбоцибулини. Для отримання

багатьох пагонів ідеальним вибором є використання апікальних і пазушних бруньок здорових рослин, які активно ростуть. Технологія клонального мікророзмноження включає в себе чотири основні етапи, перший з яких – введення рослини в асептичну культуру [1].

Процедура полягає в стерилізації відповідних експлантів та їх розміщенні на штучних живильних середовищах. Експлантами можуть служити будь-які частини рослин, але найчастіше використовуються пазушні та верхівкові бруньки, а також насіння. Стерилізація здійснюється за допомогою різних стерилізуючих розчинів, таких як розчин гіпохлориту натрію (засіб для відбілювання «Білизна»), пероксид водню, або злорид ртуті.

У випадках, коли експланти мають значне зараження грибами, використовуються фунгіциди. Сам процес мікророзмноження реалізується за допомогою фітогормонів. У випадку існуючих меристем (включаючи всі види бруньок), фітогормони використовуються для сприяння швидкого поділу клітин цих меристематичних клітин, що призводить до збільшення кількості клітин, що формують нові пагони [2].

Коли в якості вихідного матеріалу використовують органи рослини, які не містять головних меристемних тканин, фітогормональна стимуляція є необхідною для створення таких меристематичних осередків. Цей перехід від високоспеціалізованої до низькоспеціалізованої клітини, яка може бути перепрограмована, можливий завдяки явищу тотипотентності рослинних клітин.

Утворення коренів у отриманих мікропагонах. Зазвичай цей процес досягається шляхом пересадки отриманих пагонів на безгормональне живильне середовище або ж на середовище, яке містить невеликі концентрації ауксинів, таких як індолілоцтова кислота, нафтилоцтова кислота або індолілмасляна кислота [2].

Перехід асептичних рослин в умови ґрунту. Адаптація рослин до умов ґрунту є необхідним етапом мікроклонального розмноження, оскільки умови *in vitro* відрізняються від умов природного середовища. Вони характеризуються високою вологістю (понад 95%), присутністю додаткових джерел вуглецю та відсутністю мікрофлори.

Тому зазвичай адаптацію проводять, пересаджуючи молоді рослини в стерилізований ґрунт, який поступово населяється мікрофлорою, що дозволяє рослинам пристосовуватися до такого середовища. Також, поступово зменшують вологість повітря. Крім того, протягом адаптаційного періоду молода рослина переходить на повністю автотрофний спосіб живлення, оскільки в умовах асептичної культури вона отримує органічний вуглець з живильного середовища, а не синтезує його самостійно.

Не існує універсальної технології мікроклонального розмноження, оскільки оптимальні умови кожного з етапів відрізняються для різних видів рослин. При розробці протоколу розмноження слід враховувати генотип донорської рослини, її фізіологічний стан, розмір і тип використовуваного експланта (частини рослини, призначеної для розмноження), склад живильного середовища і інші фактори. На сьогодні технологія мікроклонального розмноження була розроблена для багатьох сотень видів рослин, і кількість цих видів постійно зростає [2].

### 1.6.2. Переваги методу клонального мікророзмноження в умовах *in vitro*

Переваги методу клонального мікророзмноження в умовах *in vitro* включають:

- Мінімізація використання вихідного матеріалу;
- Отримання генетичного однорідного матеріалу;
- Накопичення садивного матеріалу в рослинах, які мають низький коефіцієнт розмноження, є високо цінними або рідкісними в природному середовищі;

НУВБІП УКРАЇНИ

Підтримання генотипів, які мають генетичну стерильність

Збереження видів, які стикаються з вкрай несприятливими зовнішніми умовами під час вирощування і загрожують вимиранням

- Підтримання та збереження колекційних зразків тривалий час
- Швидке розширення нових сортів та гібридів

НУВБІП УКРАЇНИ

Накопичення садивного матеріалу впродовж року та планування обсягу його використання

- Отримання великої кількості матеріалу на обмеженій лабораторній площі
- Переривання періоду спокою органів рослин

НУВБІП УКРАЇНИ

Автоматизація процесів вирощування рослин

Виділення форм зі зміненою спадковістю

Застосування разом з іншими методами для отримання оздоровленого садивного матеріалу та боротьби з патогенною інфекцією та іншими проблемами.

НУВБІП УКРАЇНИ

Мікроклональне розмноження ґрунтується на здатності створювати повноцінні рослини з окремих органів або фрагментів рослин, які обов'язково повинні містити початковий елемент пагона. Ця можливість регенерації рослин *in vitro* включає в себе можливість відновлення рослин з вегетативних органів і навіть окремих клітин завдяки тотипотентності клітин рослин. Однак останню опцію можна реалізувати шляхом калусогенезу та формування ембріоподібних органів, але це не завжди гарантує ідентичність одержаного насінневого матеріалу [3].

НУВБІП УКРАЇНИ

Цінність мікроклонального розмноження полягає у його можливості поєднання з іншими методами, такими як оздоровлення рослин від інфекцій, включаючи вірусні, які можуть завдати значних втрат в урожаї та поки що не були успішно усунені іншими методами. Стерильні умови культури *in vitro* дозволяють використовувати пробірковий матеріал для біотехнологічних, генетичних, фізіологічних, мікробіологічних та інших видів досліджень [1].

НУВБІП УКРАЇНИ

# НУБІП України

## 1.6.3. Характеристика поживного середовища Мурасіге – Скуга для культивування рослинних клітин

Для клонального мікророзмноження використовують різні варіанти середовища Мурасіге-Скуга. Однак, варто зауважити, що деякі групи рослин можуть мати свої власні, індивідуальні вимоги до харчових компонентів. Культури можуть рости на агаризованих середовищах або на рідких поживних середовищах, які розташовані на мостиках, виготовлених з фільтрувального паперу. Залежно від параметрів, таких як склад поживних середовищ, температура і освітлення, можна сприяти розвитку назущних бруньок або пагонів, які ростуть безпосередньо з клітин екепланта або калусу [1].

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Загальний опис матеріалів необхідних для дослідження

Для проведення досліджень у дипломній роботі використовувалися обрані рослини роду Solanaceae, а саме *Atropa belladonna*. Для досліджень використовувалися такі матеріали: пінцети, скальпель, розчин етанолу 70%, розчин сулеми з концентрацією 0,1% у співвідношенні 1:10, колби із стерильною дистильованою водою, чашки Петрі, пробірки, етанол.

#### 2.1.1. Характеристика агаризованого середовища

Агар – агар є одним із основних компонентів у складі поживного середовища Мурасіге – Скуга. Ця речовина – нерозгалужений полісахарид, який можна видобути з певних видів червоних морських водоростей, зокрема з родів *Gracilaria*, *Gelidium* і *Ahnfeltia*, які зростають у Чорному, Білому морях та Тихому океані. Цей продукт може бути отриманим із морських водоростей, включаючи бурі та червоні види, такі як анфельцій і фурцеярій. Хімічно, агар – агар є полімером, який складається з частин цукрової галактози та є складовою частиною клітинних стінок деяких видів водоростей, наприклад *Sphaerococcus eusema*. Промислово видобувають його з *Gelidium amansii*. Склад агару включає вуглеводи (до 70%), невелику кількість білкових сполук (1-2%), а також невелику кількість олій та значну кількість кальцію. Суміш вуглеводів також може містити азот та сірку[1].

Вперше агар був використаний в мікробіології у 1892 році Вальтером Гессеном, німецьким мікробіологом, який працював як помічник Роберта Коха. Він відкрив, що агар – агар виявився більш корисним для затвердіння середовища, ніж желатин.

Агар – агар слабо розчиняється в холодній воді та набухає у ній. Коли його розчиняють в гарячій воді та охолоджують, агар передворюється в желе. При розчиненні у гарячій воді, агар утворює колоїдний розчин, який при охолодженні стає міцним та стійким гелем, який має склоподібну структуру. Однак гелеутворююча властивість агар – агару зменшується при нагріванні в присутності кислоти. Гелі досить стабільні при рН вище 4,5 та термозворотні. Гелеутворююча властивість агару в 10 разів вища, ніж у желатину[12].

### 2.1.2. Загальна характеристика фітогормонів

Фітогормони представляють собою хімічні сполуки, які синтезуються у рослинах і відіграють ключову роль у регулюванні їх росту та розвитку.

Зазвичай, ці речовини утворюються в активно ростучих тканинах, зокрема на верхівках стебел і коренів.

Основними класами фітогормонів є ауксини, гібереліни і цитокініни та інколи інші сполуки, такі як абсцизова кислота, розглядаються як гормони росту.

Варто зазначити, що, на відміну від тваринних гормонів, фітогормони мають меншу специфічність та часто діють в тій же ділянці рослини, де утворюються. Велика кількість специфічних речовин володіють такою ж дією, як і природні фітогормони.

Фітогормони – органічні речовини невеликої молекулярної маси, що утворюються в незначних кількостях в одних областях багатоклітинних рослин та діють на інші їх області як регулятори та координатори росту і розвитку. Гормони з'являються безпосередньо у складних багатоклітинних організмів, в тому числі й рослин, як спеціалізовані регуляторні молекули для вірного здійснення дуже важливих фізіологічних потреб та програм, що вимагають досить координованої роботи різних клітин, тканин та органів, зазвичай віддалених один від одного. Фітогормони здійснюють важливу функцію

біохімічну регуляцію. Це регуляція онтогенезу у багатоклітинних рослин. Порівнюючи із гормонами тварин специфічність фітогормонів виражена слабше, а діючі концентрації звично ж вищі як правило. У рослин, на відміну від тварин немає спеціалізованих органів (залоз), що синтезують гормони [2].

Також можна охарактеризувати антагоністичний вплив різного роду фітогормонів на проходження визначених процесів в рослинному організмі. Наприклад, гібереліни мають властивість сприяння проростання. Варто зазначити, що в пивоварній промисловості доведений факт, що при обробці зерен ячменю гібереліном спостерігається значне підвищення швидкості проростання для отримання безпосередньо якісного солоду.

На швидкість росту та рівномірність розвитку пагонів позитивно впливає обробка. Абсцизова кислота затримує процес проростання. Утворенню листових зачатків сприяють цитокініни, а от ауксини навпаки стримують даний процес. Абсцизинова кислота перешкоджає росту листя, пагонів та колоса. На цей процес можна вплинути безпосередньо використавши цитокініни або гальмувати дії АВА (азолі, етробіурін, азот). Коли ми розуміємо, що стресові періоди обмежені у часі, то такі дії можуть дати бажаний результат підвищення продуктивності, але перед досить довготривалим стресом це звично ж може знизити шанси рослини на виживання.

Гетероауксин ( $\beta$ -індолілоцтова кислота) – це речовина, що відноситься до групи ауксинів, стимулятор росту рослин, фітогормон. Вона належить до високої фізіологічної активності речовин, яка утворюється в рослинах та якісно впливає на ростові процеси, також це найпоширеніший ауксин [2].

В 1934 році голландським хіміком Ф. Кеглем із співробітниками був вперше виділений з культури пліснявих грибів та інших мікроорганізмів, згодом виявлений і у вищих рослин, він утворюється з амінокислоти триптофану в

листках, і вже потім в зростаючі стебла та коріння рослин переміщається, там окислюється і переходить до діяльного стану.

Гетероауксин також можна отримати синтетично саме шляхом взаємодії гліколевої кислоти та індолілу під високою температурою в присутності луку.

Також зазначають, що його можна отримати методом гідролізу індол – 3 – ацетонітрилу (його сожна отримати взаємодією граміну із шпандами лужних металів), реакцією 26 синтезу індолів за Фішером, також реакцією індолу з діазооцтовим ефіром, окисленням індол – 3 – пірвіноградної кислоти і також іншими методами [2].

Простота його синтезу значно сприяла вивченню дії гетероауксину на рослини, і також застосовувалась в рослинництві для прискорення утворення коренів при розмноженні рослин живцями. Залежно від ступеня одревесіння рослини яка черенкується та виду дози гетероауксину можуть коливатись від 50 до 200 мг/л. Варто зазначити, що фізіологічна роль гетероауксину в рослинах дуже різноманітна. Окрім стимуляції до розтягування рослинних клітин, гетероауксин теж впливає на багато інших процесів. Під дією гетероауксину інтенсифікується поділ клітин [1].

Також загальновідомо, що опадання листя і саме процес контролюється гетероауксином (перед опаданням приплив його з листя в черешок скорочується. Опадінню запобігає обробка черешка гетероауксином. Складними здаються механізми саме регуляції гетероауксином процесів плодоношення та цвітіння.

Також він впливає на стать утворюваної квітни, її ріст та сам процес формування пилкової трубки. Також стверджено, що саме гетероауксином стимулюється ріст плодів які утворюються в насінні та надходять в тканину плоду. Цікаво те, що якщо видалити насіння із плоду, то його ріст просто припиняється, але він знову відновиться одразу після того, як тканина плоду розпочне отримувати гетероауксин штучним шляхом [1].

Відомо, що деякі ефекти гіберелінів значно опосередковані через стимуляцію синтезу ними гетероауксину. Зараз досить обмежені уявлення про систему гетероауксину та характер ініційованих його взаємодією із даними рецепторами в рослинній клітині процесів. В малих концентраціях гетероауксин стимулює ріст рослин, а інгібітором виявляється у великих концентраціях.

Такі процеси як проростання рослини, диференціація та утворення органів, пригнічення чи стимулювання апікальної домінант, старіння і дозрівання плоду, період спокою зародка безпосередньо перед проростанням піддаються регулюванню фітогормонів. Варто зазначити, що різні види фітогормонів мають відповідно різний спосіб хімічної дії, та утворюються в рослині у різних місцях, і також мають різний механізм перенесення із у рослині [2].

### 2.1.3 Основна характеристика стерилізуючих розчинів

Перекис водню – це безбарвна прозорого забарвлення в'язка рідина із своєрідним слабким запахом і «металевим» смаком, також необмежено розчинна у воді, ефірі та спирті. Це негорюча, але пожежовибухонебезпечна рідина, також є сильним окислювачем, із багатьма речовинами вступає у реакції. Також вона здатна зовсім мимовільно здійснювати розкладання на кисень та воду, вона зміщується у будь-яких співвідношеннях із водою. Концентровані водні розчини є вибухонебезпечними. Чудовим розчинником є пероксид водню. Його температура плавлення – мінус 0,432 °С, температура кипіння – 150,2°С. Окиснення антрагідрокінону - основний промисловий спосіб. Це застосовують анодне окиснення сульфатної кислоти у розведеному розчині. Водний розчин із вмістом  $H_2O_2$  дsl 30% до 90%. Перогідроль – 30%-й розчин пероксиду водню, та містить стабілізуючі добавки. В біологічних системах він є токсичним, адже утворюються вільні радикали. Зокрема у мітохондріях та пероксисомах та клітинній цитоплазмі знешкоджується з допомогою ферментів

антиоксидативного захисту. Значно концентровані розчини зумовлюють опіки шкіри, слизових оболонок і дихальних шляхів, у повітрі визначено ГДК на рівні  $1,4 \text{ мг/м}^3$ . При опіках окисненням ліпідів епідермальний шар шкіри стає непрозорим та отримує білий колір опіку. Ліпідні оболонки оновлюються через кілька днів, а от опік пергідролем проходить просто безслідно [2].

Пероксид використовують для відбілювання шкіри, хутра, текстильних матеріалів, паперу, також жирів і олій. До складу ракетних палив також входить окисник. У хімічному синтезі використовують задля добування органічних та неорганічних пероксидів, гліколів і епоксидів. Як антисептичний засіб розчин перекису водню використовують в медицині.

Перекис водню при контакті із слизовими оболонками або пошкодженою шкірою розщеплюється з активним виділенням кисню під впливом каталази, це сприяє згортанню крові і також створює несприятливі умови для розвитку та розмноження мікроорганізмів.

Гіпохлорид натрію – це неорганічна сполука, що є сіллю гунохлоритної кислоти складу  $\text{NaClO}$ . «Лабаракова вода» - тривіальна, тобто історична назва водного розчину солі, вона має дезінфікуючі та антисептичні властивості.

Використання сполуки досить широке, зокрема як побутовий і промисловий відбілювач та дезінфектант, засіб знезараження та очищення води, також як окисник для процесів хімічного промислового виробництва. В медицині застосовується як стерилізуючий та бактерицидний засіб, також в промисловості та сільському господарстві. У вільному стані сполука є нестійкою, використовується зазвичай у вигляді стабільного гектагідрату  $\text{NaOCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  або ж водного розчину, вона має характерний дуже різкий запах хлору та значно високі корозійні властивості. Сполука містить 95,2% активного хлору та являється сильним окисником. Під визначенням «активним хлором»

підпорядковується кількість хлору, що виділяється при взаємодії з  $\text{HCl}$ , у чистому хлорі міститься 100% «активного хлору». У відсотках вміст «активного

хлору» розраховується як відношення маси одного моля хлору (70,9г) до маси пошукової речовини, що здатна при реакції з HCl виділяти один моль хлору (74,5 г для NaOCl). Як і більшість інших гіпохлоридів гіпохлорид натрію широко застосовується у целюлозній промисловості [2].

Однією найважливішою перевагою є те, що саме NaOCl є значно більша міцність та яскравість обробленої целюлози. Також як активний інгредієнт який входить до численних засобів побутової хімії призначених для відбілювання, дезінфекції та очищення поверхонь та матеріалів. Дуже відомою назвою цієї речовини є «Білизна». Засіб є розчином гіпохлориду натрію, що призначається для видалення плям із природних тканин, для дезінфекції та миття плитки, посуду. Також широко застосовується для дезінфекції обладнання та акваріумів. Фасується речовина зазвичай в пляшки із поліетилену об'ємом до 1 л.

Найвідомішим антисептиком відомим людству є етанол, давньогрецьким лікарем Клавдієм Галеном була відзначена його здатність знезаражувати поранення, а згодом і французький хірург П'єр Шоліак підтримав цю думку. Спиртні напої, що виготовляються ферментацією вуглеводів мають основну активну складову – етанол. Задля промислових потреб етиловий спирт синтезують досить часто з нафтової і газової сировини каталітичною гідратацією етилену [4].

Етанол застосовують як для виготовлення харчових продуктів, так і у великій кількості як пальне, антисептик, розчинник та сировина задля отримання промислово важливих речовин. Етанол широко проявляє сильні бактерицидні дії в концентрації 30% та вище, що залежить від типу бактерій, вмісту води та виділеного часу дії. Після досліджень найефективнішою є дія етанолу при концентрації 60% - 70% - як у присутності, так і у відсутності води. Такий вміст етанолу має побутовий антисептик для рук. Використання більшої концентрації задля дезінфекції шкіри немає ніякої потреби, адже при таких концентраціях

етанол виявляє свої дубильні властивості, а от антисептичні властивості падають.

Етанол викликає високу біоцидну дію проти вегетативних бактерій, грибів, вірусів, але не спор. Щодо принципу дії етанолу на мікроорганізми, можна зазначити, що вплив полягає у впливі на їхні мембрани та швидкій денатурації білків, що у висновку призводить до погіршення та порушення метаболізму бактерій і подальшого руйнування клітин. Етанол не має спороцидної дії та він не може бути використаний задля стерилізації, але його властивостей достатньо для профілактичного знезаражування шкіри та поверхонь [6].

#### 2.1.4. Підготовка води

На виробництві фармацевтичного характеру використовують такі типи води: питна вода, з цієї води отримують високоочищену методом подвійного зворотного осмосу спільно із іншими схожими методами, наприклад, електродіонізацією та ультрафільтрацією; вода для ін'єкцій, її також отримують із питної води або ж очищеної шляхом двоступеневої дистиляції чи методом подвійного осмосу; очищена вода, яку отримують шляхом дистиляції із питної води іонним обміном або ж будь-яким іншим подібним способом.

Двоступенева дистиляція відбувається із використанням обладнання, частини якого контактують із водою, та виготовлені з нейтрального скла, кварцу, або ж іншого подібного матеріалу. Обладнання повинно бути забезпечене досить ефективним пристроєм задля запобігання захоплення крапель, також обов'язково повинні здійснюватись своєчасні перевірки, обслуговування та належне зберігання. Після здійснення дистилювання води, першу порцію виливають, а потім збирають дистилят. Отримання очищеної, високоочищеної та

води для ін'єкцій – це фінішні стадії, які забезпечують отримання фармацевтичної води згідно норм та вимог ДФУ [1].

Взагалі необхідна попередня підготовка води (сукупність технологічних методів), щоб отримати питну воду, джерелом якої є природна вода, без домішок: органічних речовин, механічних домішок, мікроорганізмів, розчинених хімічних сполук, колоїдів, бактеріальних ендотоксинів, розчинених хімічно активних та неактивних газів, залишкових дезінфікуючих речовин та ін.. Попередня підготовка води може включати в себе декілька стадій залежно від якості вихідної води відповідного ступеню чистоти [1].

Правильний вибір технологічної схеми попередньої підготовки води до завершальної стадії отримання води зумовлений:

- якістю отриманої води;
- загальними вимогами виробника ЛЗ;
- вибором кінцевої стадії отримання води;
- вимогами ДФУ згідно до якості води;
- стадіями очищення води, що спрямовані на видалення домішок, вміст яких формується та нормується нормативною документацією або ж виробником фармацевтичної продукції.

На принципах фільтрації, іонного обміну та зворотного осмосу заснована попередня підготовка води. Для попередньої підготовки води стадію пом'якшення води використовують в трьох випадках:

- безпосередньо перед зворотним осмосом та дистиляцією;
- отримання води для регенерації установки іонного обміну;
- у випадку, коли отримання пом'якшеної води є достатнім етапом.

Також слід зазначити, що установки для пом'якшення води видаляють полівалентні іони, тим самим знижують потенційну можливість утворення на мембранах зворотного осмосу і внутрішніх поверхнях дистиляторів

нерозчинного осаду. З вихідної води одночасно видаляють слідові концентрації небажаних іонів (алюміній, стронцій та барій) [2].

## 2.2 Методи досліджень

### 2.2.1. Підбір режиму стерилізації експлантів

Для того, аби знизити ризик потрапляння вірусів у здорові тканини потрібно використовувати застосування попередньої термотерапії або хімотерапії вихідних рослин. Як в умовах *in vivo* так і *in vitro* застосовується

метод термотерапії та передбачає застосування гарячого сухого повітря. Існує

безліч гіпотез які пояснюють механізм звільнення рослин від вірусів у процесі термотерапії.

Перша гіпотеза передбачає руйнування білкової оболонки та нуклеїнової кислоти вірусу. Друга гіпотеза передбачає дію високих температур на віруси

через метаболізм речовин. Високі температури збільшують коефіцієнт розмноження на 50 - 60% та значно підвищують адаптацію пробіркових рослин на ґрунтових умовах та дозволяють отримувати більшу кількість безвірусних маточкових рослин. Іншим способом оздоровлення є хімічний. До поживного

середовища (на якому культивують апікальні меристеми) додають препарат вірозола в загальній концентрації 20 - 50 мг/л, але не більше [14].

Це противірусний препарат, що має широкий спектр дії. Його застосування дозволяє значно збільшити число безвірусних рослин від 40% до 80-100%. Даний

метод передбачає використання хімічних сполук – інгібіторів вірусів, що

додають до складу поживного середовища. Найчастіше використовують 1 $\beta$ -Д-рибофуранозил-1,2,4-тиразол-3 карбоксимід. Віразол завжди стерилізується шляхом фільтрації та додається до охолодженого середовища. Концентрація та

тривалість обробки залежить від виду рослин. Віразол є досить ефективним при

оздоровленні картоплі, сливи, малини, черешні та декоративних рослин.

Стерильні паростки використовують з метою отримання експлантів для

калусних культур, мікроклонального розмноження та вивчення гормональної регуляції. Для пророщення насіння висівають або на воду, або на правильно обране живильне середовище. Перед стерилізацією рослинні об'єкти досить ретельно промивають під проточною водою інколи використовуючи миючі засоби та очищають від зайвих тканин. Із коренеплодів потрібно зняти шкірку, з пагонів – кору [13].

Рослинні експланти зазвичай стерилізують розчинами речовин, які містять активний хлор (хлораміном), бром (бромною водою), перекисом водню, нітратом срібла, спиртом, білизною та антибіотиками. Варто підбирати концентрації стерилізуючих речовин, щоб вони не пошкоджували саме насіння, не псували функцію їх схожості та забезпечували відповідно максимальну стерильність. Досить часто застосовують для попередньої стерилізації етиловий спирт протираю чи ним поверхню та занурюючи матеріал на кілька секунд в абсолютний спирт. Іноколи такої стерилізації виявляється достатньо, і її застосовують при роботі із плодами, пагонами, насінням та зав'язями [22].

Гіпохлорит кальцію або ж інакше його назва хлорне вапне використовується у вигляді 5 – 7% розчину для обробки зав'язей, насіння, квіток та пагонів протягом 5 – 8 хвилин. Також гіпохлорит натрію використовується у вигляді 0,5 – 5% розчину задля обробки будь – яких експлантів протягом 1 – 20 хвилин. Дана речовина є клітинною «отрутою», тому експериментально підбирають час та концентрацію стерилізації.

Сулема – досить токсична речовина та вимагає особливої уважності і ретельності, як при зберіганні, так і при виборі концентрації для окремих об'єктів. Задля стерилізації зародків використовують 0,1% розчин протягом 1 – 3 хвилин, для коренів та бульбочок – до 10 -20 хвилин. Розчини, які містять активний хлор використовуються 1 раз та готують їх уже безпосередньо перед роботою. Діанід використовується в 0,2% розчині для стерилізації насіння, коренеплодів, шматочків тканин, верхівкових меристем, ізольованих пиляків та

Сулема – досить токсична речовина та вимагає особливої уважності і ретельності, як при зберіганні, так і при виборі концентрації для окремих об'єктів. Задля стерилізації зародків використовують 0,1% розчин протягом 1 – 3 хвилин, для коренів та бульбочок – до 10 -20 хвилин. Розчини, які містять активний хлор використовуються 1 раз та готують їх уже безпосередньо перед роботою. Діанід використовується в 0,2% розчині для стерилізації насіння, коренеплодів, шматочків тканин, верхівкових меристем, ізольованих пиляків та

зародків. Антибіотики використовують для стерилізації рослинного матеріалу, інфікованого бактеріями тканини [22].

Найчастіше застосовують стрептоміцин та тетраміцин 10 – 80 мг/л, ампіцилін 200 – 400 мг/л, левоміцетин та каноміцин. Також як стерилізуючу

речовину використовують перекис водню, дана речовина найменше пошкоджує

експланти, також після цієї стерилізації не потрібно застосовувати промивання

водою, адже вона швидко розкладається. Стерилізацію експлантів потрібно

проводити виключно в стерильних умовах та в ламінарному боксі. Колби з

експлантами поміщають в абсолютну темряву при кімнатній температурі та

залишають близько на тиждень для виявлення ступеня стерильності. Звісно ж

колби, в яких почалося зараження – одразу слід видаляти [14].

Важливим аспектом у виборі стерилізуючої речовини є здатність до нейтралізації епіфітної мікрофлори без завдання шкоди рослинним тканинам.

Речовина повинна також легко видалятися та не проникати глибоко у тканину.

Підхід до обробки насіння обирається індивідуально в залежності від типу

насіння. Насіння беладони характеризується бурим кольором, комірчастею

поверхнею та формою, схожою на нирку чи трохи кутовату. Його довжина

становить приблизно 1,6 -2,2 мм, і вага 1000 насінин коливається від 0,7 до 1,40

г.

У зв'язку із твердою та грубою насінневою оболонкою, час, необхідний

для проростання, зазнає істотного збільшення. Для стерилізації насіння беладони

потрібно підготувати розчин сулеми з концентрацією 0,1% у співвідношенні

1:10. Кількість варіантів стерилізації та час проведення зображені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Дослідний варіант, №	Етиловий спирт (70%), хв	Розчин блізни, хв	Сулема, хв	Дистильована вода, хв
1	5 хв	7 хв	-	10 хв
2	1 хв	-	7 хв	10 хв
3	3 хв	-	10 хв	10 хв

Насіння слід помістити в марлеві мішечки, розміщуючи по 10 насінин в кожному мішечку. Потім ці мішечки із насінням переміщують у склянку з 70%-м етанолом на 3-5 хвилин.

За допомогою стерильного пінцету переносять мішечки із насінням у склянку зі стерилізуючим розчином (сулема). Час витримки становить 7–10 хвилин, і кожні 2 хвилини мішечки перевертають, щоб розчин рівномірно проникав і змочував насіння. За допомогою стерильного пінцету переносять мішечки із насінням до склянки зі стерильною водою, де насіння залишається на 10 хвилин. Промивання повторюють тричі, використовуючи нову порцію дистильованої води. Мішечки із промитим насінням переносять стерильним пінцетом до стерильної чашки Петрі з простерилізованими паперовими фільтрами, щоб видалити надлишкову вологу із чистого насіння.

## 2.2.2. Загальна методика приготування поживного середовища

### Мурасіге – Скуга

При мікроклональному розмноженні рослин в культурі in vitro використовують рідкі та щільні поживні середовища. Для культивування суспензій, калюсів, ізольованих органів, тканин та рослин – регенерантів використовують рідкі середовища. Для підтримки експлантів у пробірці із середовищем поміщають із фільтрувального паперу чи синтетичних пористих

матеріалів спеціальні містки – підтримки. Задля приготування щільних поживних середовищ використовують агар – агар – полісахариду, яких входить до складу морських водоростей, що при взаємодії із водою утворює гель при рН 5,6 – 6,0. Також інколи використовують в якості ущільнювача поліакриламідні гелі (біолгелі) Р10 і Р200. Розчини макро- та мікросолей для штучних поживних середовищ готують заздалегідь та багаторазово використовують. Це маточні, тобто концентровані розчини, що зберігають при спеціальних умовах в холодильнику у посудинах зпритертими пробками при 0... + 4°C макро- і мікросолі; вітаміни, ферменти, фітогормони та рослинні екстракти – при 20 °C в невеликих по 5 – 10 мл судинах з пробками. Маточні розчини макросолей зазвичай значно перевищують загальноприйняті робочі концентрації приблизно в 10 – 40 разів, вітамінів – в 1000 разів, а мікросолей – в 100 – 1000 разів. Також безпосередньо перед роботою із поживними середовищами готують розчини фітогормонів. Задля приготування маточного розчину відважені макро- і мікросолі розчиняють в окремому стаканчику при нагріванні, потім їх зливають та доводять дистильованою водою до потрібного об'єму. Потім до охолодженої суміші мікросолей додають розчин солі молібдену, а от в макросолі – розчин солей магнію (задля запобігання випадання осаду). Від вірного вибору поживного середовища та ретельного приготування залежить успіх у культивуванні рослинного матеріалу [3].

До складу поживних середовищ включають мікро- та макроелементи: N, P, K, S, Ca, B, J, Mg, Fe, Zn, Co, Cu, Mn, Mo; вітаміни: B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, PP та інші; вуглеводи глюкоза, сахароза; фітогормони: цитокініни індукують поділ дедиференційованих клітин, що необхідні для одержання калусних тканин.

Пухкі тканини завжди ростуть та взаємодіють на середовищах без фітогормонів. Задля отримання стеблового морфогенезу значно знижують вміст ауксинів. Найчастіше використовують 2,4 – дихлорфеноксиацетову кислоту (2,4 – Д) – 0,1 – 10 мг/л, нафтилоцтову кислоту (НОК) – 0,1 – 2 мг/л, ІОК – 1 – 30 мг/л.

Пухкі тканини завжди ростуть та взаємодіють на середовищах без фітогормонів. Задля отримання стеблового морфогенезу значно знижують вміст ауксинів. Найчастіше використовують 2,4 – дихлорфеноксиацетову кислоту (2,4 – Д) – 0,1 – 10 мг/л, нафтилоцтову кислоту (НОК) – 0,1 – 2 мг/л, ІОК – 1 – 30 мг/л.

Пухкі тканини завжди ростуть та взаємодіють на середовищах без фітогормонів. Задля отримання стеблового морфогенезу значно знижують вміст ауксинів. Найчастіше використовують 2,4 – дихлорфеноксиацетову кислоту (2,4 – Д) – 0,1 – 10 мг/л, нафтилоцтову кислоту (НОК) – 0,1 – 2 мг/л, ІОК – 1 – 30 мг/л.

Пухкі тканини завжди ростуть та взаємодіють на середовищах без фітогормонів. Задля отримання стеблового морфогенезу значно знижують вміст ауксинів. Найчастіше використовують 2,4 – дихлорфеноксиацетову кислоту (2,4 – Д) – 0,1 – 10 мг/л, нафтилоцтову кислоту (НОК) – 0,1 – 2 мг/л, ІОК – 1 – 30 мг/л.

Пухкі тканини завжди ростуть та взаємодіють на середовищах без фітогормонів. Задля отримання стеблового морфогенезу значно знижують вміст ауксинів. Найчастіше використовують 2,4 – дихлорфеноксиацетову кислоту (2,4 – Д) – 0,1 – 10 мг/л, нафтилоцтову кислоту (НОК) – 0,1 – 2 мг/л, ІОК – 1 – 30 мг/л.

Пухкі тканини завжди ростуть та взаємодіють на середовищах без фітогормонів. Задля отримання стеблового морфогенезу значно знижують вміст ауксинів. Найчастіше використовують 2,4 – дихлорфеноксиацетову кислоту (2,4 – Д) – 0,1 – 10 мг/л, нафтилоцтову кислоту (НОК) – 0,1 – 2 мг/л, ІОК – 1 – 30 мг/л.

Пухкі тканини завжди ростуть та взаємодіють на середовищах без фітогормонів. Задля отримання стеблового морфогенезу значно знижують вміст ауксинів. Найчастіше використовують 2,4 – дихлорфеноксиацетову кислоту (2,4 – Д) – 0,1 – 10 мг/л, нафтилоцтову кислоту (НОК) – 0,1 – 2 мг/л, ІОК – 1 – 30 мг/л.

Пухкі тканини завжди ростуть та взаємодіють на середовищах без фітогормонів. Задля отримання стеблового морфогенезу значно знижують вміст ауксинів. Найчастіше використовують 2,4 – дихлорфеноксиацетову кислоту (2,4 – Д) – 0,1 – 10 мг/л, нафтилоцтову кислоту (НОК) – 0,1 – 2 мг/л, ІОК – 1 – 30 мг/л.

Пухкі тканини завжди ростуть та взаємодіють на середовищах без фітогормонів. Задля отримання стеблового морфогенезу значно знижують вміст ауксинів. Найчастіше використовують 2,4 – дихлорфеноксиацетову кислоту (2,4 – Д) – 0,1 – 10 мг/л, нафтилоцтову кислоту (НОК) – 0,1 – 2 мг/л, ІОК – 1 – 30 мг/л.

Пухкі тканини завжди ростуть та взаємодіють на середовищах без фітогормонів. Задля отримання стеблового морфогенезу значно знижують вміст ауксинів. Найчастіше використовують 2,4 – дихлорфеноксиацетову кислоту (2,4 – Д) – 0,1 – 10 мг/л, нафтилоцтову кислоту (НОК) – 0,1 – 2 мг/л, ІОК – 1 – 30 мг/л.

Пухкі тканини завжди ростуть та взаємодіють на середовищах без фітогормонів. Задля отримання стеблового морфогенезу значно знижують вміст ауксинів. Найчастіше використовують 2,4 – дихлорфеноксиацетову кислоту (2,4 – Д) – 0,1 – 10 мг/л, нафтилоцтову кислоту (НОК) – 0,1 – 2 мг/л, ІОК – 1 – 30 мг/л.

Пухкі тканини завжди ростуть та взаємодіють на середовищах без фітогормонів. Задля отримання стеблового морфогенезу значно знижують вміст ауксинів. Найчастіше використовують 2,4 – дихлорфеноксиацетову кислоту (2,4 – Д) – 0,1 – 10 мг/л, нафтилоцтову кислоту (НОК) – 0,1 – 2 мг/л, ІОК – 1 – 30 мг/л.

Для індукції калусогенезу застосовують вищі концентрації ауксинів, але згодом тканина може продовжувати ріст при зниженому вмісті ауксинів. У якості цитокінінів застосовують кінетин, 6-бензиламінопуридин (БАП), зеатин (0,001 – 10 мг/л); із ними кінетин найменш активний. Аденін входить до складу деяких середовищ, інколи використовують гіберілову кислоту (ГК), у якості активаторів росту застосовують дріжджовий екстракт, кокосове молоко та гідролізат казеїну [3].

Залежно від типу живлення біотехнологічних об'єктів залежить склад поживних середовищ для культивування:

- середовище без глюкози;
- середовище для хлорели, ціанобактерій;
- середовище для грибів та ряски;
- середовище без вітамінів та гормонів;
- середовище для культивування клітин та тканин вищих рослин.

Винайдено та розроблено досить велику кількість поживних середовищ, більшість із них передбачають модифікації основних: Мурасіге – Скуга (МС), Уайта, Лінсмаєра – Скуга, Шенка – Хільдебрандта, Гамборга, Хеллера та Чапека.

Середовища та їх склад, що набули найпоширенішого використання приведені в довідниках та методичках з біотехнології та фізіології рослин. Це прописи базових та основних середовищ для культивування рослинних клітин – середовище Мурасіге - Скуга та Гаїборга [2].

Азот (мінеральне живлення) – міститься в складі поживних середовищ, азот застосовується у вигляді нітрату та лише в деяких середовищах окрім нітратів застосовують солі амонію. Як основне джерело азоту застосовують нітрати вводячи в середовище у концентрації від 2 до 25 мМ. Для інтенсивного росту калусних тканин і суспензійних культур сумарну концентрацію нітрату та аміаку можливо збільшити до 60 мМ. Винайдена чітка кореляція між

збільшенням використання нітратів із середовища та збільшенням сирової маси суспензії рослинних клітин, що свідчить про перетворення в органічні сполуки нітратів. Здійснено аналіз клітинної суспензії *Nicotiana tabacum* та виявлено, що вона є активною та залежною від енергії системою надходження нітратів у клітинах. Індукується вона нітратом та пригнічується амінокислотами, якщо замінити 10-20% нітратів на солі амонію – отримаємо кращий ріст тканин [2].

Для росту калусних тканин та ізольованих органів необхідним компонентом є фосфор, що застосовується у вигляді ортофосфату. Окрім цього, досить відомим джерелом фосфорного живлення використовуються фосфати цукрів, іони  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ , відповідно потрібні для культивування тканин в незначних кількостях та дуже важливі для регулювання pH середовища. До складу поживного середовища також важливо вносити сірку у вигляді сульфату, сульфіту, глутатіону, цистеїну або ж метіоніну. Залізо вноситься у вигляді неорганічних солей ( $FeCl_2$ ,  $Fe_2(SO_4)_3$ ) та солей органічних кислот. Також слід зазначити, що доцільно водити хелатуючі реагенти, це може бути етилендіамінтетраацетат (EDTA). При наявності цієї сполуки в поживному середовищі покращується доступ заліза у широкому діапазоні pH [2].

Окрім основних мікроелементів, до складу багатьох середовищ входять і мікроелементи. До складу середовища обов'язково потрібно додати певну кількість мікроелементів, адже солі мікроелементів, що використовуються, також завжди містять суміші мікроелементів. В більшості середовищ для рослинних культур тканин джерелом вуглецю та енергії є глюкоза або сахароза (в концентрації 20-40 г/л), це являється вуглеводневим живленням. Зазвичай для поживних середовищ рослинних клітин є одразу декілька маточних розчинів – мікроелементи, макроелементи, хлористий кальцій, вітаміни та хелатне залізо, їх зберігають в окремих колбах [2].

Макросолі спочатку зважують на технічних вагах, також розчиняють в невеликій кількості дистильованого та доводять до потрібного об'єму. На 1 літр

загального об'єму поживного середовища використовують 100 мл розчину макросолей. Якщо ця пропорція змінюється та концентрація збільшується не в 10 разів, і відповідно змінюється об'єм маточного розчину, що береться для приготування 1 літра поживного середовища. Тобто, якщо готувати 1 літр маточного розчину, аналогічно збільшуючи концентрацію солей в ньому у 20 разів (загальна маса кожної солі \* 20), тоді для приготування середовища використовується 50 мл такого концентрованого розчину [17].

Після стерилізації насіння беладони наступним етапом є перенесення його до стерильних умов для проростання та подальшого росту та розвитку. Після вибору методу стерилізації ми визначили поживне середовище для культивування насіння та рослинних експлантів. Для активного проростання насіння беладони ми вирішили використовувати поживне середовище Мурасіге – Скуга (MS) з додаванням різних концентрацій GA3 та вітамінів.

Насіння занурюється на кілька міліметрів у середовище. Проростання відбувається у культуральній кімнаті за оптимальних умов температури та освітлення.



Рис 2.1; Рис 2.2 Введення насіння беладони в культуру *in vitro*

Насіння беладони має товстий покрив, і це призвело до тривалого процесу проростання який тривав 1,5 місяці. Наступним етапом у дослідженні є

проведення мікроклонального розмноження регенерантів, отриманих раніше. Головною метою є отримання великої кількості якісного посадкового матеріалу та його подальше укорінення.

Отримані рослини після першого етапу мікроклонального розмноження були перенесені до культуральних банок зі свіжим МС середовищем, але розділивши його на вісім дослідних варіантів (включно із контролем). У цьому середовищі сахароза використовувалась як джерело вуглецю (30 г/л), і для надання твердості живильного середовища – агар (6,7 г/л). Наступний крок – підготовка стерильних і неінфікованих рослин до перенесення в нові умови *in vitro*, але спочатку необхідно їх підготувати. Для цього із пенцилінок дістаємо стерильним пінцетом рослину та поміщаємо до стерильної чашки Петрі. Потім, аналогічно теж стерильним скальпелем акуратно не пошкодивши рослину відрізаємо коріння для кращої адаптації беладони в нових стерильних умовах мікроклонального розмноження. Кожну рослину заглиблюємо в живильне середовище під кутом 45°. Одержані рослини регенеранти були культивовані протягом 30 днів, результати культивування маємо як позитивні, так і негативні.

### **2.2.3. Визначення оптимальної концентрації фітогормону**

Фітогормони – це органічні сполуки зовсім різної хімічної природи, які продукують спеціалізовані тканини вищих рослин, в низьких концентраціях вони проявляють регуляторний вплив на всі процеси онтогенезу, регулюють розвиток та ріст рослин. Утворюються вони в меристематичних тканинах, які активно ростуть в зонах апексів стебел та коренів [26].

Для диференціації та росту та диференціації рослинних клітин потрібні ауксини та цитокініни, гібереліни навпаки дуже рідко використовують, адже різні клітини в культурі відрізняються здатністю автоматично синтезувати та

виконувати метаболізм окремих фітогормонів, їх ріст в достатній мірі залежить від безпосереднього постачання екзогенних регуляторів росту.

Загальні відмінності у потребі в екзогенних ауксинах та цитокінінах дозволяють розділити їх на декілька груп тканин:

- тканини, що ростуть на середовищі із додаванням ауксинів (корені цикорію, експланти топінамбура);

- тканини, для росту яких потрібні цитокініни (культура корінця білого турнепса);

- тканини, для росту яких необхідні одразу і цитокініни, і ауксини (культивовані тканини кореня моркви та первинних експлантів топіону);

- тканини, що ростуть на складних компонентовмісних середовищах;

- культури пухких тканин, що здатні функціонувати на середовищах без регуляторів росту.

Для отримання та підтримання тканинних культур використовують:

- ауксини: індолілоцтову кислоту (ІОК) в концентраціях 1 – 30 мг/л;

- $\alpha$  – нафтілоцтову кислоту (НОК) у концентраціях 0,1 – 0,2 мг/л;

- 2,4 – дихлорфеноксиоцтову кислоту (2,4 – Д) в меншій, ніж 1 мг/л концентрації.

При індукції калусоутворення використовують вищі концентрації ауксинів, а от при наступних пересадках тканина може рости у зменшеному в 10

разів вмісті ауксинів. Для росту органів та клітин рослин в культурі *in vitro*

використовують як цитокініни: 6 – бензиламінопурин (БАП), кінетин (Кін) та зеатин. Нагромаджуються ауксини взагалі у ростучих частинах рослин та сприяють надходженню в них води та речовин. Найкраще вивченим ауксином,

що було отримано також синтетичним шляхом є гетероауксин (індоліл – 3 –

оцтова кислота  $C_{10}H_9O_2N$ ). Гетероауксин та всі його хімічні аналоги

застосовують у рослинництві задля кращого коренеутворення у живців деревних порід [26].

# НУБІП УКРАЇНИ

Таблиця 2.2

Основна роль фітогормонів в процесах росту та розвитку рослин [26].

Ауксини	Цитокініни	Гібераліни
<b>Ріст стебла</b>		
Підтримують зростання розмірів клітин, розташованих нижче від зони росту. Підтримують поділ клітин в камбію.	Сприяють розділенню клітин у верхівковій меристемі та камбію. Зазвичай гальмують фазу розтягнення клітин.	Збільшують кількість клітин у присутності ауксинів. Також сприяють розділенню клітин у верхівковій меристемі та камбію. У деяких рослин з листковим розташуванням сприяють формуванню «стрілки».
<b>Ріст кореня</b>		
Стимулюють при дуже низьких концентраціях. При більш високих – пригнічують	Неактивні або стимулюють ріст первинних коренів	Неактивні
<b>Ініціація росту коренів</b>		
Сприяють утворенню коренів на живцях та калусах	Неактивні або ж сприяють росту бічних коренів	Інhibують
<b>Ініціація утворення бруньок</b>		
Використовують роль антагоністів цитокінінів, але у деяких випадках, при відсутності домінування в апікальних частинах, сприяють зростанню пагонів	Стимулюють	Стимулюють ріст пагонів при знятті апікального домінування
<b>Ріст листків</b>		

Неактивні	Стимулюють	Стимулюють
<b>Ріст плодів</b>		
Стимулюють та іноді викликають партенокарпію	Стимулюють та іноді викликають партенокарпію	Стимулюють та іноді викликають партенокарпію
<b>Домінування верхівки</b>		
Посилюють та одночасно пригнічують ріст бічних бруньок	Антагоністи ауксинів, також стимулюють ріст бічних бруньок	Посилюють ріст ауксинів
<b>Стан спокою в бруньках</b>		
Неактивні	Порушують	Порушують
<b>Стан спокою в насінні</b>		
Неактивні	Порушують	Порушують
<b>Цвітіння</b>		
Неактивні	Неактивні	У рослин довгого дня – стимулюють; У рослин короткого дня – сповільнюють
<b>Листкове старіння</b>		
В деяких рослин сповільнюють	Сповільнюють	В деяких рослин сповільнюють
<b>Опадання плодів</b>		
Сповільнюють (інколи стимулюють)	Неактивні	Неактивні
<b>Вплив на прорихи</b>		
Неактивні	Сприяють відкриванню	Неактивні

*Продовження таблиці 2.2.*

Фітогормони майже нерозчинні у воді. Саме через це попередньо 100 мг речовини в невеликих кількостях спирту розчиняють, потім підігривають до повного розчинення (окрім абсцизової кислоти та кінетину) та доводять до 100

мл об'єму (1 мл містить 1 мл речовини). В даному науковому дослідженні ми використовували різні концентрації гіберелової кислоти для дослідження найоптимальнішої кількості речовини задля отримання найкращого якісного результату [27].

Гіберелова кислота – це фітогормон класу гіберелінів, який є дитерпеноїдною тетрациклічною сполукою. Вона активно сприяє росту та подовженню клітин і стимулює швидкий ріст стебла та коренів. Гіберелова кислота також викликає мітотичний поділ клітин у листках рослин та підвищує швидкість проростання насіння. Важливою функцією цього гормону є стимулювання клітин проростаючого насіння на вироблення мРНК, яке кодує гідролітичні ферменти [27, 26].

Потім ферменти розщеплюють запасний крохмаль ендосперму на прості цукри, які використовуються для росту зародка. Додавання різних концентрацій регуляторів росту до поживного середовища призводить до виникнення різних морфологічних процесів. Наприклад, додавання ауксинів до середовища сприяє утворенню калусної тканини та кореневого росту, введення цитокінінів сприяє регенерації рослин з клітин первинного експланта, а додавання вуглеводів активує функцію фотосинтезу.

В якості основного поживного середовища було використано Мурасіге – Скуга (MS). Перед використанням середовище піддали стерилізації в автоклаві при температурі 121°C (1 атмосфера) протягом 20 хвилин. У досліді використовували 3% сахарози в якості джерела вуглеводів. Насіння було висаджене на тверде поживне середовище, де агар використовувався як ущільнювач.

Також нами було застосовано 7 варіантів поживного середовища із додаваннями різних концентрацій фітогормонів. Таких, як: індолілмасляна кислота (ІМК), комплекс банзиламінопурину (БАП) та індоліл-3-оцтової кислоти

(ІОК), індопіллоцова кислота (ІОК), комплекс 2,4-Д у концентрації і БАП та НОК ( $\alpha$ -нафтілоцова кислота).

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

### РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

# НУБІП України

Наукове дослідження було проведено на базі навчально-наукової лабораторії біотехнології та клітинної інженерії НУБіП України.

Під час наукових досліджень з мікроклонального розмноження беладони (*Atropa belladonna* L.) було встановлено та досягнуто наступні завдання:

1. Було визначено ідеальні параметри для стерилізації насіння беладони (*Atropa belladonna* L.) (Таблиці 3.1)

Таблиця 3.1

Результат стерилізації	Результат пророщення стерильного насіння на 45 добу	
	Шт	%
1	11	55
2	12	60
3	16	80

Також табличні дані ми продублювали у вигляді діаграми для того, аби продемонструвати найкращий варіант стерилізації.

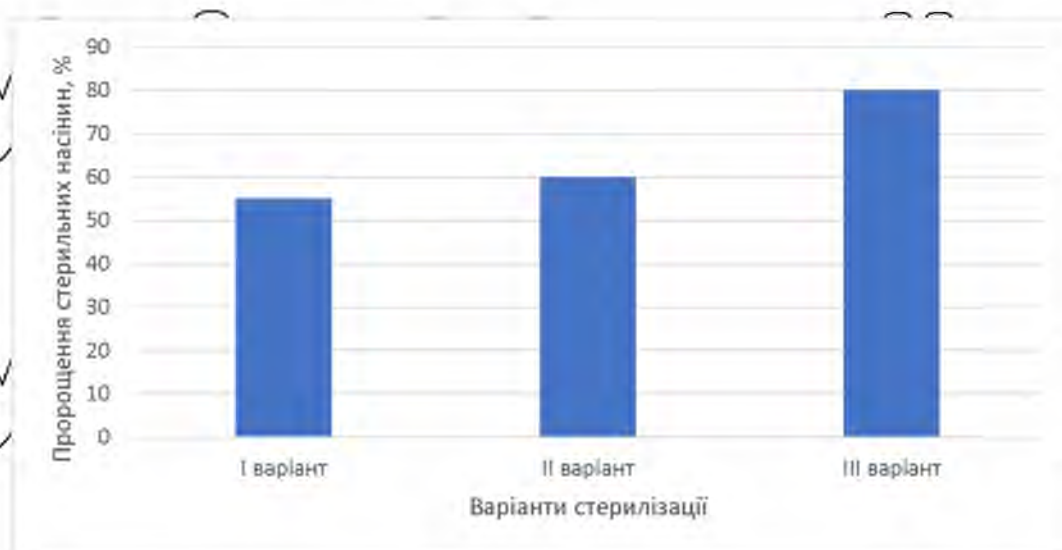


Рис 3.1 Гістограма, що відображає вплив стерилізаційних розчинів на результати отримання стерильного насіння

# НУБІП України

У першому варіанті методу стерилізації використовували розчини 70% етилового спирту та 10% білизни з часом експозиції 5 хвилин та 7 хвилин відповідно. Після цього проводили трьохкратне промивання автоклавованою дистильованою водою по 10 хвилин кожен раз. У цьому методі стерилізації отримали 55% стерильних насінин. Ймовірно причиною цього є недостатня концентрація та тривалість впливу стерилізуючих розчинів, які залишили грибкові чи бактеріальні забруднення на насінні.

У другому варіанті методу стерилізації марлеві мішечки з насінням обробляли впродовж 1 хвилини у 70% етиловому спирті та протягом 7 хвилин у розчині сулеми (0,1%). Після цього виконували трьохразове промивання дистильованою водою по 10 хвилин кожен раз. За цим методом стерилізації отримали 60% стерильних насінин. Це свідчить про те, що розчин сулеми є найбільш оптимальним для стерилізації насіння беладони.

У третьому методі стерилізації був дещо змінений час впливу стерилізуючих розчинів. Насіння обробляли протягом 3 хвилин у етиловому спирті, 10 хвилин у розчині сулеми, та відповідно проводили трьохразове промивання стерильною дистильованою водою три рази по 10 хвилин. Цей метод стерилізації виявився найбільш оптимальним, оскільки забезпечив вихід стерильних насінин на рівні 80%.

2. В експерименті використовувалось поживне середовище Мурасіге – Скуга з додаванням гібереллової кислоти для проростання асептичного насіння беладони. Гібереллова кислота є природним ростовим гормоном, який контролює ріст рослини. Основною метою використання цієї кислоти у складі поживного середовища було сприяння проростанню насіння. Висновок полягає в тому, що практично всі насінини проросли досить швидко при 80%-й концентрації GA3 (гібереллової кислоти) у поживному середовищі, виявилася значущим фактором

для однорідності проростання насіння. Ми використовували стандартні концентрації речовин при підготовці поживного середовища



Рис 3.2 Введення експлантів беладони в культуру *in vitro*

Концентрація GA3 на рівні 0,4 мг/л значно перевищує інші концентрації, та дає відсоток схожості (45%), тоді як дві інші концентрації (0 та 0,2 мг/л) – 30% та 35% відповідно. Збільшення концентрації GA3 призводить до збільшення схожості насіння.

Таблиця 3.2

Вплив різної концентрації GA3 на схожість насіння беладони

	Концентрація GA3		
	Контроль	0,2	0,4
Схожість насіння, %	30	35	45

3. Нами було проведено ряд експериментів задля визначення найоптимальнішого складу поживного середовища для отримання найкращого результату росту та функціонування рослин в умовах *in vitro*.

За основу було взято поживне середовище Мурасіге-Скуга (MS) та застосовано 7 варіантів регуляторів росту, 8 варіант – контроль. Склад та концентрацію у варіантах зображено в таблиці 3.1.

Розглянемо детальніше результати розвитку експлантів беладони

У першому варіанті поживного середовища до звичайного складу MS ми додали 2,5 мг ІМК (індолілмасляна кислота), адже саме ця кислота є важливим регулятором росту та розвитку рослин. Перенесені на дане поживне середовище стерильні експланти беладони залишаємо в культуральній кімнаті для адаптації та укорінення на місьць (періодично перевіряючи стан рослин).

Через 31 день рослини беладони показали хороший результат. Жодного патогенного мікроорганізму не зафіксовано. Коріння світлого кольору, рослина здорова та продовжує ріст без жодних негативних аспектів.

В другому варіанті поживного середовища до стандартного складу поживного середовища Мурасіге-Скуга ми додали 2,5 мг ІОК (індолілоцтова кислота) вона є подібною до індолілмасляної кислоти, але має дещо інший вплив на рослини. Стерильні експланти беладони також переносимо на дане поживне середовище та залишаємо при сприятливих умовах в культуральній кімнаті на 31 день.

Після 31 дня ми отримали також досить хороший результат. Рослини залишились в асептичних умовах та із здоровими рослинними характеристиками.

В третьому та четвертому варіанті до поживного середовища Мурасіге-Скуга ми додали БАП (бензіламінопурін) та ІОК (індоліл-3-оцтова кислота) в двох різних концентраціях. I – БАП – 0,2 мг, ІОК – 0,1 мг, II – БАП – 1,5 мг, ІОК – 0,1 мг.

Аналогічно експланти залишили в культуральній кімнаті на 31 день, після проходження часу ми отримали два кардинально різні результати. Середовище із меншим додаванням БАП не дало потрібного результату для росту та функціонування рослин, а от інший варіант із більшою концентрацією БАП дав досить гарний результат, рослини мають здоровий вид, але нові бічні листочки мають бліде забарвлення. Можемо зробити висновок, що застосування поживного середовища із додаванням БАП в концентрації 0,2 є зовсім не результативним та доцільно буде вилучити даний експеримент із дослідження.

У п'ятому варіанті дослідження до поживного середовища Мурасіге-Скуга ми додали 2,4-Д у концентрації 2,5 мг і БАП 1,5 мг та отримали досить хороший результат. Комплексна дія ауксину разом із цитокініном дала можливість рослині досить ефективно розвинутись.

У шостому та сьомому варіанті досліду ми вирішили застосувати дві дещо різні концентрації НОК ( $\alpha$ -нафтилоцтової кислоти). У першому випадку до стандартного поживного середовища МС ми додали 1,5 мг НОК, а в другому – 2,5 мг, але обидва варіанти виявились безрезультатними. Нами було вирішено вилучити дані варіанти експериментів із дослідження.

Восьмий варіант є контрольним, ми використали поживне середовище Мурасіге-Скуга без додавання інших додаткових речовин. Результатом даного експерименту є рослина, яка порівняно із вищеперечисленими позитивними дослідженнями є досить малого розміру та не подає знаків прагнення до розвитку. Склад поживних середовищ зображено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Склад поживних середовищ для отримання якісного посадкового матеріалу беладини.

Компоненти	Концентрація у варіантах, mg/L							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Макро МС	100	100	100	100	100	100	100	100
Мікро МС	10	10	10	10	10	10	10	10
Вітаміни МС	10	10	10	10	10	10	10	10
Fe – хелат	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Кілетин	0.5				0.5	0.5	0.5	
БАЦ			0.2	1.5	1.5			
2,4-Д					2.5			
ІОК		2.5	0.1	0.1				
ІМК	2.5							
НОК						1.5	2.5	
Інозитол	1	1	1	1	1	1	1	1
Сахароза	30	30	30	30	30	30	30	30
Агар	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7

Проаналізувавши дану таблицю можна зробити кілька висновків:

1. Додавання індолілмасляної кислоти (ІМК) до поживного середовища має прямий вплив на рослини в умовах *in vitro* та відображається безпосередньо на стимулювання росту та розвитку коренів та надземних частин рослин. Також ІОК використовується для покращення росту та розвитку клітин рослин, це корисно для швидкого розмноження та утримання рідкісних або цінних рослин.
2. Застосування індолілоцтової кислоти (ІОК) до поживного середовища для подальшого мікроклонального розмноження беладини допомогло стимулювати ріст коренів та стебел. Це дуже корисно для отримання сильних та здорових рослин. Також індолілоцтова кислота стимулює формування бічних пагонів та

бруньок на основних рослинах. ІОК є ключовим регулятором фізіології рослин, і його використання може впливати на гормональний баланс рослин.

3. Використання комплексу бензиламінопурину (БАП) та індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) повинен стимулювати як ріст більшої кількості пагонів із бруньками, так і коренів із стеблами. Також комплекс використовують для стимуляції галузевого росту деяких рослин, він може впливати на гормональний баланс рослини, сприяючи формуванню конкретних гормонів та фізіологічних реакцій. Вплив даних фітогормонів залежить від їх концентрації, співвідношення та виду рослин. При використаних нами концентраціях можемо зробити висновок, що значно більша концентрація є ефективнішою та відповідно підходящою для беладони.

4. Додавання до поживного середовища 2,4-дихлорфенолоцтової кислоти та бензиламінопурину завдають впливу на різні аспекти росту та розвитку рослин. 2,4-Д є гормоном росту, що впливає на диференціацію та ріст бруньок рослин. В умовах *in vitro* 2,4-Д ми використали для стимуляції росту рослини. Бензиламінопурин є цитокініном, що впливає на поділ клітин та формування нових бруньок. Ми застосували БАП для підсилення стимуляції росту беладони.

5. Застосування *o*-нафтилоцтової кислоти (НОК) здійснено для регуляції росту та розвитку рослин беладони, НОК є фітогормоном та часто використовується задля стимулювання росту коренів та утворення кореневої системи (подовження кореневої системи). При застосуванні двох різних концентрацій бажаного результату ми не отримали.

6. Контрольний варіант в мікроклональному розмноженні – це зазвичай той варіант або партія рослин, які не були піддані жодним обробкам, включаючи обробку фітогормонами. Цей варіант використовується для порівняння з іншими групами рослин, що досліджуються. Використання контрольного варіанту дає можливість визначити чи призводить обробка або вплив експериментальних факторів до змін в рості, розвитку, якості або інших характеристик рослин у

порівнянні контрольного варіанту з експериментальними групами. Також можна робити висновки щодо ефективності різних обробок або впливу факторів на рослини у контексті мікроклонального розмноження.



Рис. 3.3., Рис. 3.4.) Введення стерильних рослин беладони на поживне середовище МС із додаванням ІМК в концентрації 2,5 мг/л.



Рис. 3.5., Рис. 3.6.) Введення стерильних рослин беладони на поживне середовище МС із додаванням ІОК в концентрації 2,5 мг/л (Рис. 3.3) та 2,4-Д в комплексі із БАП в концентраціях 3,5 та 1,5 (Рис. 3.4).



Рис.3.7. Введення стерильних експлантів беладони до поживного середовища МС з додаванням БАП та ІОК в концентраціях 1,5 та 0,1

## ВИСНОВКИ

Сучасні біотехнології включають багато методів, і серед них мікроклональне розмноження набуває великої популярності, завдяки численним перевагам. Цей метод дозволяє отримувати генетично однорідний посадковий матеріал та повністю вилучає ризик зараження вірусами. Даний метод має високий коефіцієнт розмноження і сприяє підвищенню економічної ефективності генотипів. У результаті мікроклонального розмноження можна отримати здорові рослини.

Під час виконання бакалаврської дипломної роботи були визначені оптимальні умови стерилізації насіння. Встановлено, що найкращим методом стерилізації є обробка 70% етиловим спиртом та промивання дистильованою водою протягом 10 хвилин (тричі).

Встановлено, що оптимальним поживним середовищем для введення в *in vitro* стерильного насіння бекетети є середовище Мурасіге і Скуга з додаванням гіберелової кислоти.

Найефективніший відсоток проростання насіння ми одержали на середовищі MS із додаванням GA3 в концентрації 0,4 мг/л.

Саме це середовище ми вважаємо найоптимальнішим задля укорінення рослин-регенерантів. Тому, ми використали також дане поживне середовище, але без використання GA3 та додаваннями різних концентрацій фітогормонів.

Таких, як: індолілмасляна кислота (ІМК), комплекс банзиламінопурина (БАП) та індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК), індолил-оцтова кислота (ІОК), комплекс 2,4-Д у концентрації і БАП та ІОК ( $\alpha$ -нафтилоцтова кислота).

Отже, в ході виконання дипломної роботи було досягнуто всіх вищезазначених цілей та завдань.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Юлевич О. І. Біотехнологія : навчальний посібник / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль ; за ред. М. І. Гиль. — Миколаїв: МДАУ, 2012. — 476 с.
2. Мусієнко М.М. Біотехнологія рослин / М.М. Мусієнко, О.О. Панюта. – К: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. – 114 с.
3. Посібник «Біотехнологія рослин» В. П. Герасименко – 2006. [Біотехнологія рослин \(1\).pdf](#)
4. Рябовол Л.О. Калюсна культура та культура клітинних суспензій / Л.О. Рябовол // Методичні рекомендації для проведення лабораторних занять аспірантам з дисципліни «Біотехнологія в селекції і насінництві сільськогосподарських культур». — Умань: УНУС, 2020. — 18 с.
5. Олійник О. О., Кловаденко А. А., Мельничук М. Д. Покращення складу живильних середовищ для пришвидшення росту і розвитку троянди ефіроолійної в культурі in vitro. Науковий вісник НЛТУ України, 2016. Вип. 26.7. С. 134–139.
6. Кисличенко В.С., Ленчик Л.В., Новосел О.М., Кузнецова В.Ю. та ін. Ресурсознавство лікарських рослин, ВД «Райдер» Харків: 2015. 69 с.
7. Гладун Я. Д., Кит С.М., Пучинський А.Н. Зникаючі рослини Карпат (белладона звичайна і плауни). В кн. 50 років Чорноморському держзаповіднику. Слеса, 1978. С. 38–39.
8. Червона книга України. Рослинний світ/ за ред. Я.П. Дідуха. Київ: Глобалконсалтинг, 2009. 916 с.
9. Мамчур З. І., Олійцова А.В. Літня навчальна практика з ботаніки: навчально-методичний посібник для студентів біологічного факультету. Львів: Видавничий центр ЛНУ ім. Івана Франка, 2007. 176 с.
10. Попова Т. Д. Нариси про гомеопатію: записки лікаря-гомеопата. Київ: Наукова думка, 1989. 176 с.

11. Ахмедов Р. Б. У рослинах – цілюща сила. З скарбнички народних лікарів. У частинах. Київ: Байт, 1992. 56 с.

12. Фармацевтична енциклопедія. Голова ред. ради та автор передмови – В. П. Черних; Нац. фармац. ун-т України. 2-ге вид., переробл. і доповн. Київ: МОРІОН, 2010. 132 с.

13. Основи фармакогнозії і фітотерапії / Т. П. Гарник, В. М. Князевич, В. А. Туманов, Л. В. Андріюк, Я. А. Соцька, В. О. Петрищева, К. В. Гарник, Л. В. Білоусова, Т. М. Козименко. Житомир: Рута, 2015. 123 с.

14. Товстуха С. С. Фітотерапія. Київ: Оріяни, 2000. 68 с.

15. Гарна С. В., Владимірова І. М., Бурд Н. Б. та ін. Сучасна фітотерапія: навч. посіб. Харків: «Друкарня Мадрид», 2016. 280 с.

16. Кархут В. В. Ліки навколо нас. 4-е вид. Київ: Здоров'я, 2001. 232 с.

17. Ковальов В. М., Павлий О. І., Ісакова Г. І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин. Харків, 2004. 104 с.

18. Загайко А. Л., Гонтова Т. М., Ільїнська Н. Т., Гордей К. Р. Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин: матеріали III міжнародної науково-практичної інтернет-конференції (м. Харків, 26–28 листопада 2018 р.) Харків: Вид-во НФаУ, 2018. 241 с.

19. Аннамухаммедова О. О., Аннамухаммедов А. О. Навчальний посібник з нормативної дисципліни "Лікарські рослини". Житомир: Вид-во ЖДУ ім. І. Франка, 2014. 202 с.

20. Полова Н. В., Діхтярьов С. І., Литвиненко В. І. Лікарські властивості лютеоліну. Фітотерапія. URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Fch\\_2011\\_1\\_12](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Fch_2011_1_12). 2011. № 1. С.53–59.

21. Михайленко Е. Т., Радзинський В. Є., Захаров К. А. Лікарські рослини. Київ: Здоров'я, 1984. 136 с.

22. Матяш В. Г. Агротехніка вирощування лікарських рослин. URL: <https://progozitsiya.com/ua/agrotehnika-viroshchuvannya-lykarskih-roslyn>.

23. Бондаренко А. К. Біологічні особливості перспективних зразків насіння беладони звичайної. Сімферополь: СНУ, 2006. 15 с.

24. Методика проведення експертизи сортів беладони звичайної (*Atropa belladonna* L.) на відмінність, однорідність та стабільність/ під ред. Ткачик С. О. вид. Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД», 2015. 156 с.

25. Шумік С. А., Таран Н.Ю., Драта М.В., Мусієнко М. Я. Біостимулятори для рослин. Захист рослин. №2. 1998. –11 с.

26. Ярошко М. Фітогормони та фітогормональна регуляція рослин. Німецький аграрний центр, за матеріалами семінару К. Бремер, Х. Шёнберга, спеціалістів N.U. AgrarGmbH, Німеччина, 2012. С. 40 –43.

27. Рудий-Тващенко О. Г., Ярута О. Я. Ефективність застосування стимуляторів для проростання насіння беладони звичайної. Вісник аграрної науки. №4. 2016. С. 28–32.

28. Ярута О. Я. Використання біопрепаратів для розмноження беладони звичайної (*Atropa belladonna* L.) розсадним способом: матеріали науково-практичної конференції молодих учених і спеціалістів «Актуальні проблеми та інновації в сучасному землеробстві» до 100- річчя Національної академії аграрних наук України. Київ: ТОВ «ТВОРИ», 2019. С. 141 –143

29. Ярута О. Я. Біологічна класифікація лікарської рослини беладони звичайної (*Atropa belladonna* L.) поширення та застосування. (13 жовтня 2017 р.) м. Київ. Український інститут експертизи сортів рослин. Сучасний стан та гармонізація назв культурних рослин у системі UPOV. Київ, 2017. С. 56.

30. Atropine production & growth of excised belladonna root cultures G C Mitra. Indian J Exp Biol. 1972 May

31. Development of *Atropa belladonna* L. Plants with High-Yield Hyoscyamine and without Its Derivatives Using the CRISPR/Cas9 System Lingjiang Zeng, Qiaozhuo Zhang, [...], and Hongping Deng.

32. Synthesis of Atropine by Isolated Roots and Root-Callus Cultures of Belladonna Fred R. West, Jr., and Edward S. Mika.

33. *Atropa belladonna* L.: In Vitro Culture, Regeneration of Plants, Cryopreservation, and the Production of Tropane Alkaloids Y. P. S. Bajaj & L. K. Simola

34. EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF PLANT HORMONES ON SEED GERMINATION AND CALLUS INDUCTION OF ATROPA BELLADONNA IN IN VITRO CONDITIONS Plant Archives Vol. 19 No. 1, 2019 pp.1268-1274.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України