

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

ШКОПИНСЬКА ТЕТЯНА ЄВГЕНІВНА

УДК 604.7:57.085.2:582.929.4

ОПТИМІЗАЦІЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ КЛОНАЛЬНОГО
МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ *IN VITRO* РОСЛИН РОДУ *MENTHA L.*

03.00.20 «Біотехнологія»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата сільськогосподарських наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано у Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник

доктор сільськогосподарських наук, професор
Коломієць Юлія Василівна,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
декан факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор
Дробик Надія Михайлівна,
Тернопільський національний
педагогічний університет імені
Володимира Гнатюка МОН України,
декан хіміко-біологічного факультету

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Іванніков Роман Вікторович,
Національний ботанічний сад імені
М. М. Гришка НАН України,
провідний науковий співробітник
відділу тропічних і субтропічних рослин

Захист відбудеться «14» травня 2021 року о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.15 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 4, кімната 40

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «13» квітня 2021 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



В. І. Бондарь

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Вітчизняна промисловість відчуває гостру потребу в лікарській сировині ефіроолійних рослин, яку можна задовольнити шляхом вирощування нових високопродуктивних та генетично стійких сортів, що містять високоякісну ефірну олію. М'ята є пріоритетною культурою в ефіроолійній галузі України, що широко використовується в фармацевтичній, парфумерно-косметичній, харчовій та інших промисловостях (Кириченко Е. Б., 2008; Ткаченко К. Г., 2011; Гербіна Н. А., Рубан О. А., Гонтова Т. М., Куценко С. А., 2017; Козко А. А., 2018).

Розширення промислових площ цих культур обмежується, переважно, відсутністю достатньої кількості якісного, оздоровленого посадкового матеріалу. Нові можливості для селекції відкриваються за використання технології *in vitro*, яка дозволяє швидко розмножити унікальні генотипи або нові сорти та ввести їх у практику промислового вирощування. Літературні дані, щодо біотехнології ефіроолійних культур, зокрема м'яти перцевої, досить обмежені і не висвітлюють низку достатньо складних проблем, які пов'язані зі специфікою її метаболізму, хоча ці рослини мають величезний фармакологічний та економічний потенціал (Шелудько Л. П., Куценко Н. І., 2013; Шило М. П., Піщенко О. В., Павленко С. В., 2019).

Для отримання продуктів вторинного метаболізму використовують високопродуктивні лінії клітин, що культивуються *in vitro*. У калюсних і суспензійних культурах відбувається зниження концентрації продуктів вторинного метаболізму (Бугара І. А., Мальцева О. А., 2012; Santoro M. V., Nievas F., Zygadlo J., Giordano W., Banchio E., 2013; Егорова Н. А., 2014). Недостатня ефективність клітинних біотехнологій рослин пояснюється перш за все нестачею інформації щодо можливостей керованого біосинтезу цільових продуктів у клітинах культурах. Відомо, що лікарські рослини, а також калюсні і суспензійні культури, часто не здатні до тривалого вирощування в умовах *in vitro* (Бугара І. А., 2006; Кунах В. А., 2008; Petrunina O. I., 2014; Мубарак М. М., 2015). Для вирішення цих проблем потрібна оптимізація біотехнологічного процесу, яка передбачає підвищення ефективності отримання асептичного життєздатного матеріалу від донорних рослин, підбір складу універсального живильного середовища для культивування *in vitro* різних сортів м'яти перцевої та забезпечення умов адаптації рослин-регенерантів до умов закритого та відкритого ґрунту, що дозволить за короткий строк отримати значну кількість якісного посадкового матеріалу для створення промислових насаджень (Бугаєнко Л. А., Шило Н. П., 2012; Бушковская Л. М., 2012).

Саме тому актуальними є комплексні біотехнологічні, фізіологічні та біохімічні дослідження морфогенезу та адаптивних процесів цінних у фармакологічному відношенні рослин роду *Mentha* L.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в межах науково-дослідної роботи Національного університету біоресурсів і природокористування України

на тему: «Біотехнологічні основи розмноження ефіроолійних лікарських рослин родини Губоцвіті для одержання високоякісного садивного матеріалу» (номер державної реєстрації 0116U001994). Робота була складовою програми наукових досліджень №26 на тему: «Селекційне і технологічне забезпечення виробництва сировини ефіроолійних, лікарських і ароматичних культур» («Ефіроолійні, лікарські і ароматичні рослини») в рамках завдання П рівня 26.00.01.05.П. «Створити сорти лікарських і ефіроолійних культур з підвищеним вмістом біологічно активних речовин у фармацевтичній сировині» Дослідної станції лікарських рослин Інституту агроекології і природокористування НААН України Полтавської області.

Мета та завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи – оптимізувати технологію клонального мікророзмноження *in vitro* рослин різних сортів м'яти перцевої і м'яти довголистої української селекції та оцінити кількісний і якісний склад ефірної олії в отриманій рослинній сировині за умов вирощування рослин-регенерантів у відкритому ґрунті.

Для досягнення поставленої мети вирішували наступні завдання:

- удосконалити методику стерилізації, підібрати склад живильного середовища для введення в культуру *in vitro* та індукції морфогенезу ізольованих меристем м'яти довголистої й м'яти перцевої 6 сортів та 4-х селекційних зразків вітчизняної селекції;

- оптимізувати основні етапи технології клонального мікророзмноження м'яти перцевої шести сортів Лебедина пісня, Жовтнева, Лубенчанка, Лідія, Українська перцева, Мама, Чернолиста й чотирьох селекційних зразків, м'яти довголистої сорту Посульська ліналоольна;

- дослідити вплив наночастинок міді, кобальту та кремнію на морфогенез в культурі *in vitro* досліджуваних генотипів м'яти довголистої й м'яти перцевої;

- провести анатомічне та гістохімічне дослідження пагонів рослин м'яти перцевої на наявність крохмалю, пероксидази та лігніну;

- проаналізувати кількісний та якісний склад ефірної олії рослин м'яти перцевої та довголистої;

- оцінити економічну ефективність вирощування сортів м'яти перцевої української селекції для отримання повітряно сухої сировини при використанні садивного матеріалу за традиційного вегетативного розмноження та оздоровленого в культурі *in vitro*.

Об'єкт дослідження – процес культивування рослин сортів м'яти перцевої (*M. piperita*) і м'яти довголистої (*M. longifolia*) в умовах *in vitro* та відкритого ґрунту.

Предмет дослідження – вплив клонального мікророзмноження рослин сортів м'яти перцевої і м'яти довголистої на господарсько-цінні показники й біохімічний склад ефірної олії.

Методи дослідження: біотехнологічні методи – культура ізольованих тканин і органів, клональне мікророзмноження, біохімічні – визначення якісного і кількісного терпеноїдного складу, мікротомія рослинних матеріалів, гістохімічний аналіз тканин, світлова мікроскопія, агротехнологічні, математичні та статистичні (однофакторний, дисперсійний, Віplot аналізи).

Наукова новизна одержаних результатів. Основні положення дисертаційної роботи, які визначають наукову новизну результатів, полягають у наступному:

- для оптимізації біотехнологічного процесу отримання асептичної культури м'яти перцевої і м'яти довголистої запропоновано ступінчатий метод стерилізації експлантатів з використанням розчину сулеми та нітрату срібла при цьому ефективність стерилізації становила 88–96 %;

- встановлено терапевтичну дозу рибавірину 10 мг/л у живильному середовищі для оздоровлення сортів м'яти перцевої Лебедина пісня, Лідія, Лубенчанка, Українська перцева, Мама і Чернолиста;

- модифіковано склад живильного середовища Мурасіге-Скуга з додаванням 6-бензиламінопурину, кінетину, аденіну, індолілоцтової і гібереллової кислот для мультиплікації м'яти перцевої і м'яти довголистої, що дало змогу отримати найвищий коефіцієнт розмноження 1:8–1:18 протягом одного пасажу (30 діб);

- доведено позитивний вплив наночастинок міді, кобальту та кремнію на морфогенетичні процеси рослин м'яти перцевої і м'яти довголистої в культурі *in vitro*, що дає змогу підвищити вихід рослин-регенерантів на 27–30 %, кількість ефірної олії на 88,8–92,2 % та масову частку ліналоолу в ньому на 5,37–7,03;

- доведено переваги клонального мікророзмноження *in vitro* над традиційним вегетативним розмноженням в результаті анатомічного, цитологічного і агробіологічного аналізів за достовірним збільшенням кількості ефірної олії, врожайності повітряно-сухої сировини, біомаси кореневищ, облистяністю та інтенсивністю ксилогенезу;

- встановлено, що сорти м'яти перцевої Лебедина пісня і Мама та селекційні зразки М 01-02 і М 01-12 після застосування біотехнологічних методів вирізняються за морфологічними особливостями та урожайними характеристиками і рекомендовані для промислового вирощування в регіонах України;

- вперше встановлено біохімічні особливості рослин сортів м'яти перцевої української селекції і за високим вмістом ментолу, низьким карвону, піперитону, пулегону, відсутню пулегону, що підтверджує високу фармакологічну якість ефірної олії українських сортів;

- вперше виявлено, що до і після застосування клонального мікророзмноження превалюючими і незмінними сполуками для сортів м'яти перцевої Лебедина пісня, Лубенчанка і Мама є лімонен, піперитон, ментол, Українська перцева та Чернолиста – пулегон, цинеол і ментон, Лідія – ізоментон;

- обґрунтовано економічну ефективність використання оздоровленого розмноженого в культурі *in vitro* садивного матеріалу, що забезпечує отримання стабільно високої урожайності та високу прибутковість.

Практичне значення одержаних результатів. У результаті проведеного дослідження оптимізовано технологію клонального мікророзмноження посадкового матеріалу м'яти перцевої та м'яти довголистої, яку можна

застосовувати у виробництві для масового одержання оздоровленого посадкового матеріалу, створення маточників та прискореного розмноження унікальних генотипів. Створено колекцію оздоровлених маточних рослин м'яти перцевої сорти Лебедина пісня, Лубенчанка, Лідія, Українська перцева, Мама, Чернолиста та селекційних зразків й передано Дослідній станції лікарських рослин Інституту агроекології і природокористування НААН України Полтавської області. Садивний матеріал рослин м'яти перцевої сортів Мама і Чернолиста отриманий методом клонального мікророзмноження впроваджено у товариство з обмеженою відповідальністю «Агрофіт» Дніпровської області.

За результатами досліджень розроблено науково-методичні рекомендації «Клональне мікророзмноження і оздоровлення рослин роду *Mentha*» та впроваджено в навчальний процес під час викладання дисципліни «Мікроклональне розмноження рослин» для ОС «Магістр» за спеціальністю «Екологічна біотехнологія та біоенергетика» на факультеті захисту рослин, біотехнологій та екології Національного університету біоресурсів та природокористування України.

Особистий внесок здобувача. Здобувачу належить постановка проблеми, мети і завдань дослідження, особисто здійснено пошук та опрацьовано наукову літературу, виконано основний обсяг експериментальних досліджень, проведено статистичну обробку отриманих даних. Стратегічні планування експериментів, інтерпретацію отриманих результатів та обґрунтовано висновки за участю наукового керівника. Частина досліджень, аналіз та узагальнення за результатами дослідження проведено у співпраці з А. Ф. Ліхановим, А. А. Ключадовим, Н. І. Куценко, О. В. Середою, що підтверджують спільні наукові публікації.

Апробація результатів дисертації. Основні положення та результати дисертаційної роботи представлено на: IV Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (м. Київ, 2015 р.); XV Міжнародній науково-практичній конференції «Наука в сучасному світі» (м. Київ, 2016); 3rd International conference «Nanotechnology and Nanomaterials (NANO 2015)» (Lviv, 2015 р.); II Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених «Перспективні напрямки наукових досліджень лікарських та ефіроолійних культур» (м. Березоточа, 2015 р.); Міжнародній конференції «Онтогенез – стан, проблеми та перспективи вивчення рослин в культурних та природних ценозах» (м. Херсон, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні наукові дослідження та розробки: теоретична цінність та практичні результати – 2016» (м. Братислава, 2016 р.); Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию ВИЛАР «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине» (г. Москва, 2016 г.); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання сучасних технологій вирощування сільськогосподарських культур в умовах змін клімату» (м. Кам'янець-Подільський, 2017 р.); II Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Перспективні напрямки наукових досліджень лікарських та ефіроолійних

культур» (м. Березоточа, 2017 р.); IV Міжнародній науковій конференції, присвяченій 140-річчю з дня народження П. І. Гавсевича «Лікарські рослини: традиції та перспективи досліджень» (м. Березоточа, 2019 р.).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 17 наукових праць, з яких 2 статті у наукових фахових виданнях України, 2 статті у наукових фахових видання України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 2 статті у інших наукових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 10 тез наукових доповідей, науково-методичні рекомендації.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотацій, вступу, шести розділів, висновків, рекомендацій виробництву, списку використаних джерел та додатків. Обсяг дисертаційної роботи 211 сторінок. Основний текст містить 29 таблиць і 31 рисунок. Список використаних джерел включає 273 найменування (з них 112 латиницею).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ КУЛЬТИВУВАННЯ В УМОВАХ *IN VITRO* СОРТІВ ТА СОРТОЗРАЗКІВ М'ЯТИ ПЕРЦЕВОЇ ТА М'ЯТИ ДОВГОЛИСТОЇ (огляд літератури)

Проведено огляд наукових першоджерел стосовно сучасного стану культивування м'яти. В цьому аспекті особливу увагу привертає хімічний склад і використання м'яти та її метаболітів для рентабельного виробництва медичних препаратів. Це вимагає високоякісного садивного матеріалу – рослин з цінним комплексом господарсько-цінних ознак, розширення площі під цією культурою та розробки екологічно безпечних технологій її вирощування. Тому є необхідним оптимізація біотехнологічної схеми для українських сортів та перспективних селекційних зразків м'яти на всіх етапах мікроклонального розмноження із застосуванням хемотерапії *in vitro*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріалом для досліджень слугували рослини м'яти довголистої сорту Посульська ліналоольна, модельні сорти м'яти перцевої Лебедина пісня, Лубенчанка, Лідія, Українська перцева, Мама і Чорнолиста та чотири селекційні зразки. Загальну схему дисертаційного дослідження представлено на рис. 1.

Для отримання стерильної культури обирали однорічні пагони рослин-донорів м'яти перцевої та м'яти довголистої, які впродовж експерименту культивувалися в умовах закритого ґрунту. Експлантати – апікальні й латеральні меристеми по 30–50 шт. кожного сорту або селекційного зразка вводили в культуру *in vitro* з січня по травень, коли рослини найактивніше реалізують свій морфогенетичний потенціал (Mehta J., 2012; Бугара І. О., 2013).

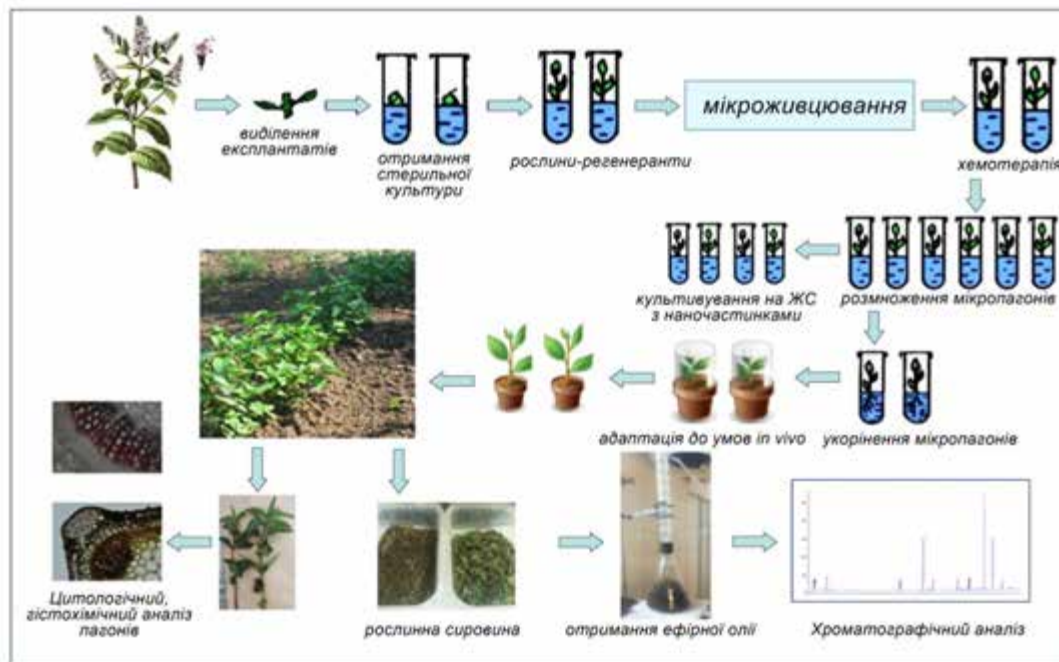


Рис. 1. Схема дисертаційного дослідження

Для стерилізації фрагменти з одним вузлом відмивали у проточній воді, занурювали у розчини Твін-20, 70 % розчин етилового спирту, 0,1 % розчин сулеми, 0,05 % розчині нітрату срібла з різною експозицією. Повторюваність дослідів 3–10-кратна. Послідовність та строки проходження етапів морфогенезу для контрольного варіанту м'яти відзначали на безгормональному середовищі Мурасіге-Скуга (Murashige T., Scoog F., 1962) на 30 добу.

За другого пасажу у живильне середовище додавали віроцид рибавірин (1- β -D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамід, «Sigma-Aldrich», США) у концентрації 10 мг/л, використовуючи фільтри Millex-GV ($d = 0,22$ мкм) з метою позбавлення рослин вірусної інфекції. Тривалість хемотерапії – 30 діб. Після чого зрізали апікальні частини пагонів розміром до 3 мм та пасирували на середовища для мультиплікації з різними регуляторами росту, зокрема 6-бензиламінопурин, кінетин, аденін, індолілоцтова, індолілмасляна і гіберелова кислот. Для ризогенезу застосовували живильні середовища $\frac{1}{2}$ MS, 2 % цукрози та регулятори росту ауксинової природи індолілоцтову, індолілмасляну та нафтилоцтову кислоти.

Наночастинки міді, кобальту та кремнію було надано Інститутом електрозварювання імені Є. О. Патона НАН України (Ustinov A. L. et al, 2013). Середній розмір яких складав 2,0–2,5 нм. Для встановлення впливу наночастинок на морфогенетичні процеси рослин-регенерантів в культурі *in vitro* їх додавали у живильне середовище MS на етапі мультиплікації у концентраціях 0,4–1,6 мг/л. Для дослідження впливу наночастинок кремнію на процес ризогенезу застосовували їх у концентрації 5–15 мг/л. Фіксували біометричні показники на 28–30 добу культивування. Коефіцієнт розмноження розраховували як кількість мікророслин (вузлів) у розрахунок на один експлантат, які можна отримати за одне субкультивування. Повторюваність дослідів 3–5-ти кратна.

Адаптацію рослин до умов *in vivo* проводили на субстраті : торф : ґрунт універсальний : перліт : пісок у співвідношенні 2:1:1:1, ефективність якої (%) визначали на 30 добу.

Польові дослідження проходили в умовах селекційно-насінницької сівозміни Дослідній станції лікарських рослин Інституту агроекології і природокористування НААН України, яка розташована в селі Березоточа Лубенського району Полтавської області. Ґрунтово-кліматичні умови даного району сприятливі для культивування м'яти. Постановка польових дослідів здійснювалась згідно методик (Молоцького М. Я. 2006; Шелудько Л. П., Куценко Н. І., 2013; Єщенко В. О., 2014). Розсадним способом було закладено 11 дослідів. Контролем були варіанти, закладені вегетативно розмноженим садивним матеріалом. Розсада м'яти відповідала вимогам нормативного документу «Розсада м'яти» ТУ 10-04-13-48-88. Її оцінку проводили в період технічної придатності до висадки (друга декада травня). Відбір садивного матеріалу для аналізу проводили шляхом хаотичного накладання рамки. Одночасно проводили підрахунок густоти стояння рослин на 1 м² та визначали вихід кондиційної розсади з 1 м². Садивний матеріал вивчали за параметрами: довжина, діаметр, відстань між ростовими бруньками, розгалуженість, виповненість. Урожайність кореневищ визначали восени після завершення вегетаційного періоду методом пробних ділянок (1 м²) по діагоналі ділянки.

Ефірну олію отримували шляхом перегонки з водяною парою (Hefendehl F. W. et al, 1967). Сировину відбирали в фазу масового цвітіння згідно з технологічним регламентом (Губаньов О. Г., 2013). Компонентний склад ефірної олії м'яти довголистої визначали методом хромато-мас-спектрометрії на хроматографі Agilent Technology 6890 з масспектрометричним детектором 5973 в Національному інституті винограду і вина «Магарач». Колонка HP-1 довжиною 30 м; внутрішній діаметр – 0,25 мм. Температура термостата – 50 – 250 °С зі швидкістю 4 °С/хв. Температура інжектора – 250 °С. Газ носій – гелій, швидкість потоку 1 см³/хв. Для ідентифікації компонентів використали базу бібліотеки мас-спектрометрів NIST05 і WILEY 2007 за загальною кількістю спектрів більш 500000 за допомогою програми AMDIS і NIST (Sychoy C. S. et al, 2004).

Аналіз компонентів ефірної олії м'яти перцевої проводили методом капілярної газової хроматографії на хроматографі Agilent 7890A з полуменево-іонізаційним детектором з автоматичним вводом проби. Колонка: DB-WAX (Agilent) 60м * 0,25 мм; нерухома фаза макрогол 20000 (0,25 мкм). Газ-носіє: гелій 1,5 мл/хв., поділ потоку 1:50. Для хроматографування 25 мкл ефірної олії розчиняли у 1,5 мл н-гексану, об'єм інжекції: 1 мкл. Ідентифікація компонентів проводилася шляхом порівняння хроматограм з типовою хроматограмою м'ятної олії, що відповідає вимогам монографії ЕР «Peppermint oil». Розрахунок співвідношення компонентів проводили методом внутрішньої нормалізації, результати порівнювали з відповідними інтактними рослинами.

Анатомічні, цитохімічні та гістохімічні дослідження пагонів виконували згідно з стандартних методик (Клейн Р. М., Клейн Т. Д., 1974; Паушева З. П., 1988; Фурст Г.Г., 1979) на нативних препаратах поперечних зрізів стебел,

між 2 і 3 вузлами за допомогою мікроскопу *Nikon Eclipse E-200* (Japan). Фотодокументацію здійснювали за допомогою програмного забезпечення *Camera Control Pro 2* Nikon Corporation (Japan). Для морфометричного аналізу клітин і тканин пагонів використовували спеціалізоване програмне забезпечення *Image-Pro Premier 9.0* (Media Cybernetics, (США)).

Для статистичного опрацювання отриманих даних використовували пакет програм MS Excel, Statistica 10.0. У таблицях наведено середні арифметичні значення та їх основні похибки. Для Biplot аналізу використовували пакет прикладних програм, які побудовано на R-програмуванні (<http://www.r-project.org>). Застосовували однофакторний дисперсійний аналіз, відмінності між середніми значеннями обчислювали методом ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ КУЛЬТИВУВАННЯ В УМОВАХ IN VITRO СОРТІВ ТА СОРТОЗРАЗКІВ М'ЯТИ ПЕРЦЕВОЇ

Найбільший відсоток життєздатних стерильних експлантатів м'яти перцевої 96 % отримано при застосуванні ступінчастої стерилізації: сегменти м'яти розміром близько 1,5 см з одним вузлом промивали проточною водою – 20 хв, занурювали у розчин Твін-20 – 10 хв, поміщали у 70 % розчин етилового спирту – 1 хв., витримували у 0,1 % розчині сулеми – 4 хв та у 0,05 % розчині нітрату срібла 5 хв. Ступінчаста стерилізація м'яти довголистої вирізнялася експозицією 0,1 % розчину сулеми – 3 хв та 0,05 % розчину нітрату срібла – 4 хв. Завдяки чому отримали 88 % життєздатних експлантатів.

Найбільш чутливими до дії рибавірину (10 мг/л) виявилися сорти, створені понад 30 років тому – Українська перцева, Чорнолиста та Лубенчанка. Зокрема, кількість життєздатних експлантатів останнього – 55,6 % свідчить, що обрана концентрація рибавірину для цього сорту є напівлетальною (ЛД₅₀). Натомість у сортів більш молодих у селекційному плані – Лебедина пісня, Лідія і Мама втрати експлантатів складали від 21,1 до 25,6 %. Всі рослини-регенеранти протягом хіміотерапії мали низькі темпи росту та змінену форму листової пластинки відносно контролю без дії антивірусної речовини, що свідчить про фітотоксичний ефект, який підтверджують (Медведева Т. В. Тряпичина Н. В., 2012; Баматов И. М., 2018), але на наступному пасажі рослини відновлювали свої морфологічні ознаки. При концентрації рибавірину 20 мг/л розвиток експлантатів жодного сорту не відбувався.

Перші ознаки росту основного пагону у рослин м'яти виявлено на 5–7 добу культивування. Найінтенсивніше морфогенетичні процеси ініціювали на живильному середовищі з концентрацією 6-бензиламінопурину 0,75 мг/л, аденіну – 0,1, кінетину – 0,01, індолілоцтової кислоти – 0,05 та гіберелової кислоти – 0,5–1,0 мг/л. Подальшу роботу з клонування проводили з використанням даного середовища (рис. 2).

За культивування м'яти довголистої найбільший коефіцієнт розмноження 1:18 підтверджено на живильному середовищі: 6-бензиламінопурин – 0,75 мг/л,

кінетин – 0,01 мг/л, аденін – 0,1 мг/л, індолілоцтової кислоти – 0,1 мг/л та гіберелової кислоти – 0,5 мг/л.



Рис. 2. Рослини м'яти перцевої сорт Лебедина пісня на 10 (А) та 28 (Б) добу культивування на живильному середовищі МС 2

Наночастинки кобальту (0,4 мг/л) у живильному середовищі сприяли збільшенню довжини пагонів у сорту Лідія на 54 % і кількості вузлів у сорту Мама на 49 %, наночастинки міді (0,8 мг/л) у живильному середовищі стимулювали збільшення кількості пагонів у сорту Мама на 50 % та вузлів на 29 %, у сорту Чернолиста – 43 і 31 % відповідно, а концентрація наночастинок міді 1,2 мг/л у сорту Лідія достовірно збільшила кількість пагонів на 43 %, вузлів – 24 % (табл. 1).

Отримано на 27 % більше рослин-регенерантів м'яти перцевої, що можна пояснити біодоступністю наночастинок, легшим та швидким використанням рослинами для ростових процесів в онтогенезі.

Для мультиплікації м'яти довголистої оптимальна концентрація наночастинок міді – 0,5 мг/л та 0,8 мг/л для наночастинок кобальту, завдяки яким достовірно збільшилася висота рослин на 45–48,5 %, кількість вузлів на 29,4–33,9 %, кількість пагонів на 55,6–66,2 %. Коефіцієнт розмноження збільшився на 30 % відносно контролю.

Для ініціації ризогенезу використовували середовища $\frac{1}{2}$ МС з ауксинами та 2 % цукрози. На МС 21 (0,5 мг/л індолілоцтової кислоти) мікророслини утворювали корені на 1–2 доби повільніше, ніж на МС 24 (по 0,5 мг/л індолілоцтової та індолілмасляної кислот) та одночасно формували по 4–8 корінців. Частота ризогенезу рослин м'яти перцевої на досліджуваних середовищах склала 84–100 %.

М'ята довголиста сорту Посульська ліналоольна на середовищі з 0,5 мг/л індолілоцтової кислоти мала довжину коренів $3,79 \pm 0,4$ см ($p < 0,01$), але їхня кількість в середньому склала $10,94 \pm 1,2$ шт ($p < 0,05$) частота ризогенезу склала 100 %. За комбінації двох ауксинів у середовищі Мурасіге-Скуга

24 спостерігали зменшення частоти ризогенезу – 94 %, при середній довжині коренів $4,88 \pm 0,6$ см та кількості $8,02 \pm 1,1$ шт.

Таблиця 1

**Вплив наночастинок на розвиток рослин м'яти перцевої (28 доба)
культивування**

Живильне середовище	Концентрація наночастинок, мг/л	Довжина пагону, мм			Кількість пагонів, шт.			Кількість вузлів, шт.		
		Мама	Лідія	Чорнолиста	Мама	Лідія	Чорнолиста	Мама	Лідія	Чорнолиста
Конт- роль	-	41,1± 2,6	38,2± 4,7	46,1± 3,9	4,9± 0,8	4,8± 0,8	5,0± 0,7	11,1± 1,0	9,1± 1,1	11,3± 1,4
Со	0,4	44,9± 5,4	40,1± 4,5	48,0± 3,2	6,2± 1,0	6,4± 1,0	5,9± 0,8	13,4± 1,0	11,3± 1,4	12,8± 1,2
	0,8	45,8± 4,4	39,2± 4,9	48,2± 3,6	6,0± 1,1	6,1± 0,8	5,7± 0,8	12,5± 1,3	11,3± 1,1	12,8± 1,4
	1,2	45,4± 4,8	37,6± 4,1	47,2± 3,8	5,5± 1,1	6,0± 0,7	5,7± 0,7	11,6± 1,0	11,0± 0,9	12,2± 1,0
	1,6	44,8± 5,2	37,6± 3,2	47,3± 3,1	5,4± 1,4	5,8± 0,7	5,4± 0,6	11,5± 1,1	10,8± 1,0	12,3± 1,0
Cu	0,4	44,3± 3,1	38,9± 4,8	48,5± 2,5	5,9± 0,8	6,6± 0,8	6,2± 0,7	13,1± 1,0	10,5± 0,9	13,8± 1,1
	0,8	48,2± 3,9	40,3± 4,8	49,3± 2,7	7,3± 0,9*	6,8± 1,0	7,2± 0,9*	14,3± 1,2*	11,1± 1,0	14,9± 1,0*
	1,2	52,4± 4,5*	43,0± 3,4	47,7± 2,6	5,6± 0,7	7,1± 0,9*	6,0± 0,9	12,5± 1,1	13,0± 1,4*	14,0± 1,0
	1,6	48,3± 4,9	40,9± 4,9	47,6± 2,9	5,1± 0,8	6,7± 0,9	5,7± 0,8	11,7± 1,2	11,2± 1,2	12,6± 1,2

Примітка: *вказано статистично достовірні відмінності між експериментом і контролем ($p < 0,05$)

На живильних середовищах, що містили наночастинок кремнію, початок ризогенезу спостерігали в середньому на 2 доби раніше. Концентрація наночастинок кремнію 5 мг/л у живильному середовищі $\frac{1}{2}$ МС (по 0,5 мг/л індолілоцтової та індолілмасляної кислот) призвела до збільшення середньої довжини коренів від 26 до 107 % та кількості коренів від 20 до 31 %, залежно від сорту (табл. 2).

Більша концентрація наночастинок кремнію у живильному середовищі знижує показники ризогенезу та приживлення рослин на субстраті за рахунок формування коренів з аномальною будовою, наявності калюсу, який ускладнював перенесення рослин на субстрат. З 26 доби культивування рослини-регенеранти мали оптимально сформовані корені і були готові до адаптації (рис. 3).

**Показники коренеутворення рослин м'яти перцевої
на 28 добу культивування**

Сорт м'яти	Варіант середовища	Частота ризогенезу, %	Кількість коренів, шт.	Довжина кореня, см
Лідія	MSi0	92	8,81±1,52	3,11±0,38
	MCSi1 (5 мг/л)	100	11,19±1,43	5,74±0,40*
	MCSi2 (10 мг/л)	88	7,40±1,17	2,03±0,34**
	MCSi3 (15 мг/л)	68	6,23±1,20	1,67±0,29**
Мама	MSi0	96	10,23±1,32	2,06±0,35
	MCSi1 (5 мг/л)	100	12,34±1,46	4,28±0,40*
	MCSi2 (10 мг/л)	86	7,23±1,10	1,87±0,30
	MCSi3 (15 мг/л)	64	5,94±1,13**	1,61±0,27
Чорнолиста	MSi0	100	9,72±1,05	6,23±0,43
	MCSi1 (5 мг/л)	100	12,79±1,30	7,90±0,40*
	MCSi2 (10 мг/л)	86	6,79±1,19	4,55±0,49**
	MCSi3 (15 мг/л)	52	5,43±1,05**	2,78±0,45**

Примітка. *різниця статистично достовірна ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольним середовищем без наночастинок

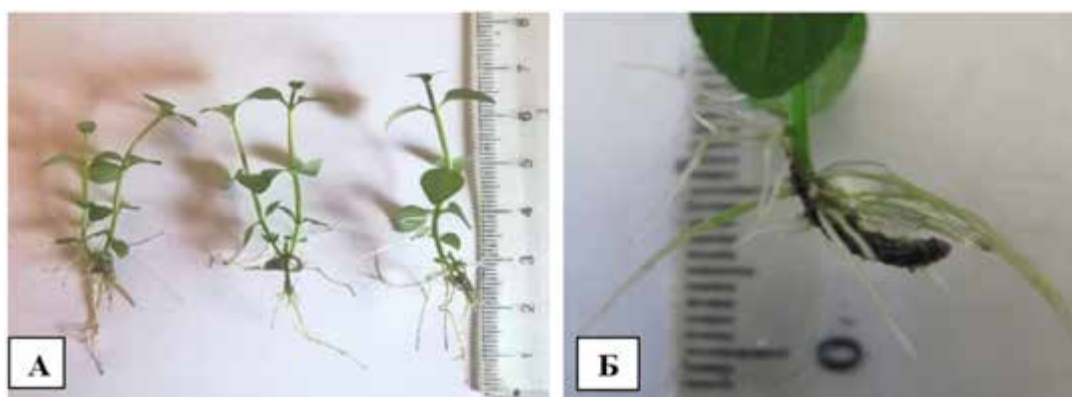


Рис. 3. Рослини сорту м'яти перцевої Лебедина пісня зі сформованою кореневою системою

Відмивали корені від залишків агару дистильованою водою, 1%-м розчином перманганату калію та висаджували в мініпарник зі стерильним субстратом: торф : ґрунт універсальний : перліт : пісок у співвідношенні 2:1:1:1. Парник закривали напівпрозорою кришкою для підтримання відносної вологості повітря на рівні 90–95 %. Кожного дня контейнери відкривали й поступово збільшували час для адаптації. Через 12–14 діб рослини збільшувалися у висоту на 2,3–3,7 см і на п'ятому тижні від початку адаптації були висаджені у відкритий ґрунт.

**АГРОБІОЛОГІЧНА ТА ФІТОХІМІЧНА ОЦІНКА ВПЛИВУ ОЗДОРОВЛЕННЯ
ТА МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ НА ОСНОВНІ ГОСПОДАРСЬКО-
ЦІННІ ПОКАЗНИКИ СОРТІВ ТА СОРТОЗРАЗКІВ М'ЯТИ ПЕРЦЕВОЇ**

У всіх сортів та селекційних зразків м'яти перцевої спостерігали достовірне збільшення довжини кореневищ від 10,9 до 18 %, діаметру на 8,5–14,3 %. Найбільша біомаса кореневищ зафіксована у сортів Мама і Лебедина пісня 40,1 та 40,4 % відповідно. Тобто, у перерахунку на гектар, біомаса кореневищ у сортів збільшилася від 0,35 до 7,02 т/га. У селекційних зразків після клонального розмноження біомаса кореневищ достовірно збільшилася на 2,2–3,82 %.

Обліки густоти стояння рослин на 1 м² показали, що цей показник у варіантах закладених матеріалом після клонального розмноження збільшується від 10,7 до 26,5 %. Максимальне збільшення густоти стояння 26,5 % відмічено у сорту Чорнолиста. Вихід кондиційної розсади з 1 м² відображає реальний рівень виходу садивного матеріалу. Проходження культурою м'яти перцевої клонального мікророзмноження збільшило вихід садивного матеріалу на 15–51,3 % (табл. 3).

Таблиця 3

Вихід кондиційного садивного матеріалу та його параметри

Сорти м'яти перцевої	Варіанти	Густота стояння на 1 м ²	Вихід кондиційної розсади з 1 м ² шт.	Висота рослин, см
Лебедина пісня	контроль	198±9,9	152±7,0	23±3,4
	<i>in vitro</i>	229±14,7	214±10,1**	26±1,4
Лубенчанка	контроль	134±7,8	102±8,0	24±3,8
	<i>in vitro</i>	164±7,3*	142±6,2**	27±1,2
Лідія	контроль	169±8,0	136±8,4	24±4,6
	<i>in vitro</i>	201±11,7*	198±7,0**	27±1,0
Українська перцева	контроль	174±10,1	146±8,7	26± 4,9
	<i>in vitro</i>	219±9,8**	218±7,7**	29± 1,5
Мама	контроль	289±13,2	267± 9,4	21±3,0
	<i>in vitro</i>	320±8,4*	307±8,9**	25±1,4
Чорнолиста	контроль	196±9,2	160±9,3	23±3,2
	<i>in vitro</i>	248±8,4**	242±8,5**	27±1,1

Примітка. Контроль – вегетативно розмножені рослини; *in vitro* – рослини вегетативно розмножені та попередньо оздоровлені в культурі *in vitro* (*P≤0,05; **P≤0,01).

Висота рослин на час технічної стиглості розсади є одним із критеріїв, який враховується при визначенні її кондиційності. При формування партій садивного матеріалу м'яти звертають увагу на її вирівняність за даним показником. Так, рослини після клонального розмноження рівномірно розвинені, про що свідчить відхилення висоти на 1–2 см, натомість варіанти контролю зі значним розмахом (7–5 см) та на контрольних ділянках відмічені

рослини з різним рівнем затримки в рості, листові пластинки яких мали зморшкуватість та були значно дрібніші, міжвузля укорочені.

Врожайність повітряно-сухих листків та кореневищ – найважливіші складові, що обумовлюють вихід ефірної олії з одиниці площі і є основою формування кількості та якості отримуваної продукції. За вмістом ефірної олії найвищі показники відмічено у сортів Лубенчанка, Мама, Лебедина пісня та Чернолиста – 4,02 %; 3,98 %; 3,84 та 3,83 % відповідно (табл. 4).

Таблиця 4

Показники господарсько-цінних ознак зразків м'яти перцевої

Зразок, сорт м'яти перцевої	Варіанти	Врожайність, т/га	Вміст ефірної олії, %	Облиствіння, %
Лебедина пісня	контроль	1,86±0,06	3,81±0,17	31
	<i>in vitro</i>	2,55±0,07**	3,84±0,17	52
Лубенчанка	контроль	1,73±0,03	3,99±0,18	32
	<i>in vitro</i>	2,01±0,05**	4,02±0,18	47
Лідія	контроль	2,62±0,04	3,22±0,14	40
	<i>in vitro</i>	2,82±0,04*	3,34±0,15	49
Українська перцева	контроль	1,52±0,04	3,64±0,15	38
	<i>in vitro</i>	2,05±0,05**	3,69±0,17	46
Мама	контроль	1,88±0,04	3,92±0,17	39
	<i>in vitro</i>	2,38±0,05**	3,98±0,18	52
Чернолиста	контроль	1,41±0,03	3,76±0,15	33
	<i>in vitro</i>	2,12±0,04**	3,83±0,16	49
М 01-02	контроль	2,69±0,06	3,68±0,14	57
	<i>in vitro</i>	2,77±0,07**	3,73±0,13	60
М 01-03	контроль	2,74±0,07	3,61±0,11	55
	<i>in vitro</i>	2,80±0,06*	3,65±0,12	57
М 01-04	контроль	2,87±0,06	3,82±0,18	55
	<i>in vitro</i>	2,99±0,08**	3,89±0,14	57
М 01-12	контроль	2,94±0,06	3,97±0,18	59
	<i>in vitro</i>	3,15±0,07**	4,02±0,19	62

Примітка. контроль – вегетативно розмножені рослини; *in vitro* – рослини розмножені *in vitro* (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$).

Після клонального розмноження у рослин сортів м'яти перцевої спостерігалася чітка тенденція до збільшення облиствіння на 8–21 % й селекційних зразків на 2–3 %. Врожайність повітряно-сухого листя достовірно збільшилася у сортів від 7,6 % до 51,4 %, у селекційних зразків від 2,2 до 7,1 %. Необхідно відмітити селекційний зразок М 01-12, облиствіння якого після клонального мікророзмноження склало 62 %.

АНАТОМІЧНІ ТА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ УКРАЇНСЬКИХ СОРТІВ РОСЛИН *M. PIPERITA*

У рослин м'яти перцевої пагін чотиригранний. Провідна система колатерального типу, судинно-волокнисті пучки більш розвинуті на ребрах пагону. Особливістю рослин р. *Mentha* є наявність секреторних структур

епідермального походження на листках, пагонах та кореневищах рослини. У досліджених нами рослин м'яти перцевої було виявлено наявність покривних волосків, залозистих трихом з одноклітинною голівкою та багатоклітинні залозисті трихоми (рис.4).

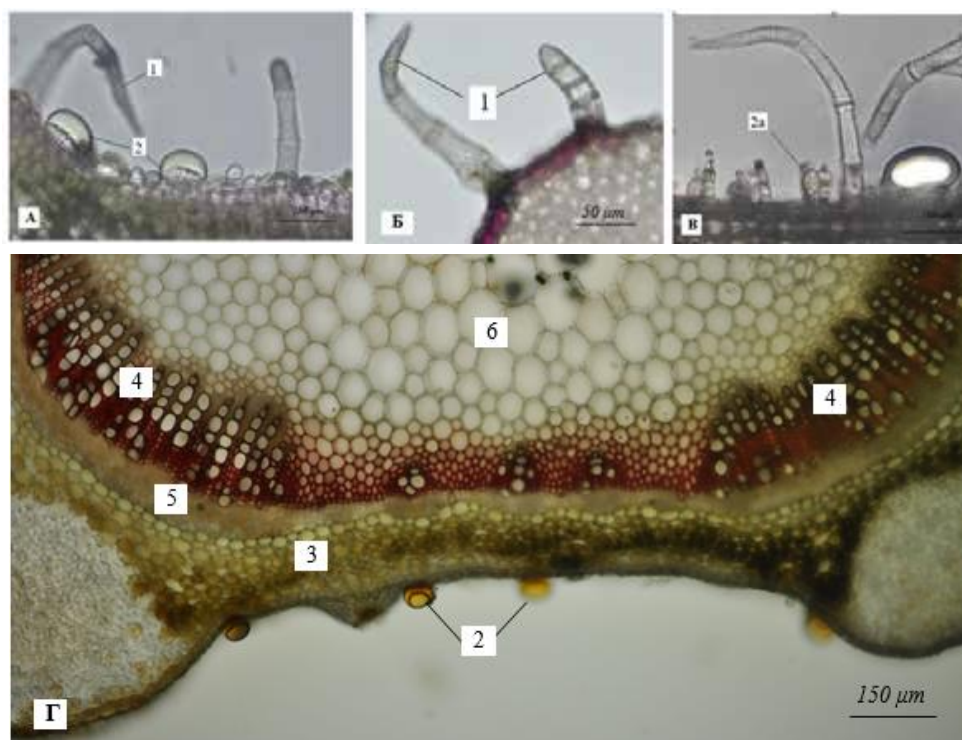


Рис. 4. Анатомічний зріз стебла м'яти перцевої сорт Українська перцева: А, Б, В – секреторні структури на поверхні стебла м'яти перцевої; Г – поперечний зріз стебла: 1 – залозисті волоски; 2 – головчасті залозисті трихоми; 2а – ефіроолійні залозки; 3 – кора; 4 – ксилема, 5 – флоєма; 6 – паренхіма

При забарвленні свіжого зрізу бензидином спостерігали гістохімічну реакцію тканин, яка свідчить про локалізацію пероксидази (рис.5).

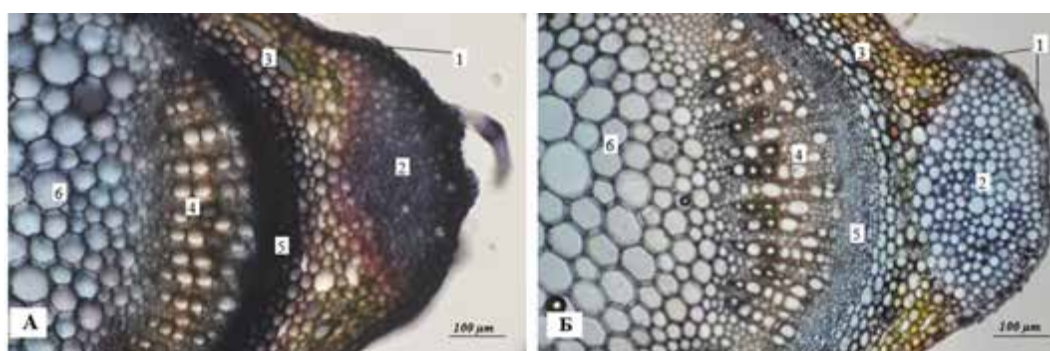


Рис. 5. Локалізація пероксидаз у тканинах стебла м'яти перцевої (бензидинова реакція з утворенням продуктів синього забарвлення) А – вегетативно розмножені рослини; Б – рослини розмножені *in vitro*; 1 – епідерміс; 2 – коленхіма; 3 – кора; 4 – ксилема; 5 – флоєма; 6 – паренхіма

Активніше фермент проявляє себе у тканинах флоєми, клітинах коленхіми й кори і більш інтенсивне забарвлення у вегетативно розмножених рослин. Гістохімічна реакція клітинних стінок судин на М-лігнін (реакція Меуле) у всіх вегетативно розмножених рослин досліджуваних сортів м'яти перцевої інтенсивніша у порівнянні з клонованими рослинами. Припускаємо, що рослини після клонального розмноження містять менше інфекційних агентів, стійкіші до абіотичних факторів, тому у них знижена потреба інтенсивного синтезу пероксидази, як антиоксиданта, що активується внаслідок стресів. Активність пероксидази також тісно пов'язана з лігніфікацією клітинних стінок, яка у рослин, після культури *in vitro*, менше виражена.

У рослин м'яти перцевої після клонального розмноження спостерігали зміни ширини кори, ксилеми та флоєми (табл. 6). Індекси співвідношення ксилема/кора та ксилема/флоєма коливалися у сортів м'яти перцевої від 2,3–4,7. Збільшення індексу ксилема/флоєма свідчить про посилення адаптивної стратегії рослин до полягання. Збільшення інтенсивності ксилогенезу після клонального розмноження (крім сортів Лідія та Українська перцева). підтверджує переваги клонального розмноження над традиційним вегетативним розмноженням за достовірним збільшенням показників: кількість ефірної олії, урожайність повітряно-сухої сировини, біомаси кореневищ, облиствіння, інтенсивністю ксилогенезу, що вказує на інтенсивніший вторинний ріст клонованих рослин.

В ефірній олії м'яти перцевої нами ідентифіковано: лімонен, цинеол, ментон, ментофуран, ізоментон, ментил ацетат, β -каріофілен, ізоментол, ментол, пулегон, гермакрен, піперитон, карвон (табл. 5, 6).

Таблиця 5

Компонентний склад ефірної олії (%) сортів вегетативно розмноженої м'яти перцевої

Компонент ефірної олії	Нормативні показники ЄФ, %	Сорти м'яти перцевої					
		Лебедина пісня	Лубенчанка	Лідія	Українська перцева	Мама	Чорнолиста
лімонен	1,0–5,0	3,2	3,5	1,3	0,9	3,2	1,1
цинеол	3,05–14,0	0,2	0,3	0,1	2,8	0,2	3,8
ментон	14,0–32,0	14,9	9,3	12,6	18,8	12,6	23,5
ментофуран	1,0–9,0	0,5	4,4	0,0	9,3	0,5	4,8
ізоментон	1,5–10,0	2,8	2,5	17,6	5,3	2,7	4,0
ментилацетат	2,8–10,0	2,4	3,3	2,9	8,5	2,6	3,1
β -каріофілен	–	0,5	0,6	0,5	1,0	0,8	1,1
ізоментол	–	2,0	3,1	1,1	2,5	2,0	6,5
ментол	30,0–55,0	70,1	68,0	60,5	38,4	72,0	30,7
пулегон	до 4,0	0,0	0,0	0,0	6,1	0,0	11,1
піперитон	–	0,6	0,8	0,3	0,4	0,7	0,4
карвон	до 1,0	0,0	0,1	0,2	0,1	0,0	0,6
мінорні сполуки	–	2,7	4,2	3,0	5,0	2,6	9,5

Згідно з хроматографічним аналізом, найбільший вміст ментолу, як основного маркерного компоненту ефірної олії, серед сортів української

селекції містять рослини сортів Лебедина пісня – 70,1–74,1 %, Мама – 72,0–72,6 %, Лубенчанка – 68,0–68,8 %, Лідія – 60,5–61,4 %.

Таблиця 6

**Компонентний склад ефірної олії (%) сортів м'яти перцевої
після культивування *in vitro***

Компонент ефірної олії	Нормативні показники ЄФ, %	Сорти м'яти перцевої					
		Лебедина пісня	Лубенчанка	Лідія	Українська перцева	Мама	Чорнолиста
лімонен	1,0–5,0	2,9	3,5	1,5	0,7	1,9	1,0
цинеол	3,05–14,0	0,2	0,3	0,1	3,3	0,5	3,1
ментон	14,0–32,0	8,8	8,9	11,0	20,1	12,9	21,8
ментофуран	1,0–9,0	0,3	3,8	0,2	6,8	0,3	4,5
ізоментон	1,5–10,0	2,8	2,8	16,8	6,8	1,5	3,3
ментілацетат	2,8–10,0	3,7	3,1	2,8	5,8	1,0	2,9
β-каріофілен	–	1,3	0,7	0,8	0,9	0,8	1,6
ізоментол	–	2,0	2,8	1,2	2,5	4,3	6,4
ментол	30,0–55,0	74,1	68,8	61,4	44,2	72,6	33,3
пулегон	до 4,0	0,0	0,0	0,0	3,1	0,0	11,9
піперитон	–	0,7	0,9	0,4	0,7	0,6	0,4
карвон	до 1,0	0,0	0,2	0,2	0,1	0,2	0,9
мінорні сполуки	–	3,2	4,3	3,6	5,1	1,3	8,9

Спостерігали збільшення кількості ментолу у всіх рослин після застосування культури *in vitro*. Особливістю рослин сортів м'яти перцевої української селекції є високий вміст ментолу, низький вміст карвону, піперитону, пулегону (крім сортів Чорнолиста, Українська перцева) та ментофурану (крім сортів Чорнолиста, Українська перцева та Лубенчанка). Проведений аналіз головних компонент та Biplot аналіз відокремлюють клоновані та не клоновані *in vitro* сорта Українська перцева та Чорнолиста від Лебедина пісня, Лубенчанка, Лідія, Мама. Останні вирізняються відсутністю пулегону і відносно високим вмістом ментолу, що є ключовою ознакою якості рослинної сировини. Множинний кореляційний аналіз за 12 показниками виявив наявність високо достовірних ($p \leq 0,001$) коефіцієнтів кореляції між ментолом і співвідношенням ксилема/кора, а також між ментолом і врожайністю кореневищ. Натомість, проведений кореляційний аналіз тих же показників у рослин м'яти перцевої, що пройшли мікророзмноження, виявив більшу кількість високо достовірних ($p \leq 0,001$) коефіцієнтів кореляції, в тому числі між показниками ширини кори і висоти епідермісу, ксилеми і облистяності, ментолу і врожайністю кореневищ. Виявлено позитивну кореляцію між показниками висоти епідермісу та шириною кори та негативну кореляцію між епідермісом та співвідношеннями ксилема/кора та ксилема/флоема, оскільки вторинне потовщення стебла відбувається за рахунок відкладання камбієм елементів провідної системи, в першу чергу, ксилеми, тоді як клітини епідермісу та товщина корової паренхіми майже не змінюються. Такі кореляційні показники вказують на інтенсивніший вторинний ріст у рослин після культури *in vitro*. Позитивна кореляція між висотою клітин

епідермісу і шириною кори у рослин після клонального мікророзмноження показує узгодженість та впорядкованість росту й розтягнення клітин.

Встановлено вихід ефірної олії з сировини м'яги довголистої клонально розмноженої на живильному середовищі без наночастинок – 1,16 %, на середовищі з наночастинами міді (0,5 мг/л) – 2,23 та кобальту (0,8 мг/л) – 2,19 %. За результатами хроматографічного аналізу превалюючими сполуками в усіх трьох варіантах ефірної олії м'яги довголистої є ліналоол і ліналіл ацетат. Крім того, у м'яги довголистої, що культивувалася на середовищі з додаванням наночастинок кобальту β -мірцен у кількості 1,04 % та 1,8-цинеол – 1,57 %, всі інші компоненти у кількості менше 1 %. Сумарний вміст кетонів був найнижчий у зразку ефірної олії, отриманої з м'яги довголистої, що культивувалася на середовищі з наночастинами кобальту (0,8 мг/л) – 0,07 %.

В отриманій нами ефірній олії з рослин м'яги довголистої сорту Посульська ліналоольна переважають спирти, зокрема ліналоол, кількість якого у зразку ефірної олії рослин розмножених на середовищі без наночастинок – 85,97 %, що культивувалися на живильному середовищі з наночастинами міді – 91,34 %, кобальту – 93,0 %, тобто збільшується на 5,36 та 7,03 % відповідно. Терпінен, транс-сабіненгідрат, терпінен-4-ол, гераніаль виявлено тільки у зразках олії рослин м'яги довголистої, які культивувалися на живильних середовищах з наночастинами, а кетони пулегон і піперитон повністю відсутні, на відміну від контрольного зразка ефірної олії отриманого з рослин, що проходили клональне розмноження без наночастинок. У досліджених нами зразках ефірної олії м'яги довголистої превалюють монотерпенові спирти – один з найцінніших класів речовин, які проявляють бактерицидну та противірусну дію.

ЕКОНОМІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИРОЩУВАННЯ СОРТІВ М'ЯГИ ПЕРЦЕВОЇ ЗА УМОВИ ЗАСТОСУВАННЯ ОЗДОРОВЛЕННЯ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Економічну ефективність вирощування сортів м'яги перцевої визначали порівнянням застосування базової технології (вегетативне розмноження розсадою) та садивного матеріалу після оздоровлення і клонального розмноження. При розрахунку собівартості створення плантації культури м'яги перцевої виходили із того, що норма висадки на 1 га – 100000 тисяч штук. Розсадник розмноження при *in vitro* технології формували садивним матеріалом «супереліта» (вартість 1 саджанця 2,7 грн). Економічну ефективність вирощування сортів м'яги перцевої для отримання врожаю сировини – лист м'яги перцевої, порівнювали використання садивного матеріалу вищої категорії, отриманого за традиційного вегетативного розмноження (вартість 1 саджанця 0,15 грн.) та «еліта» – репродукція від «супереліти» (залежно від сорту вартував 0,21–0,36 грн). Собівартість сировини м'яги перцевої після культури *in vitro* значно нижче за рахунок збільшення врожайності досліджуваних сортів в середньому на 29,0 %. Рентабельність вирощування м'яги перцевої для отримання сировини збільшилася в середньому на 51,9 %. Так, врожайність повітряно-сухої сировини м'яги перцевої сорту Чорнолиста на

першому році за базовою технологією склала 1,41 т/га, а за застосування оздоровлення отримали врожайність листків 2,12 т/га. Виробництво садивного матеріалу є досить прибутковим для суб'єктів насінництва. Найвищий прибуток отримали при виробництві оздоровленого садивного матеріалу сорту Мама – 100417 грн. і відповідно найвищий рівень рентабельності – 179,1 %. Технологія вирощування садивного матеріалу м'яти перцевої з введенням ланки *in vitro* є економічно доцільною, так як за її впровадження збільшується вихід саджанців з одного гектара в середньому на 61333 шт., що в середньому складає 42,0 %.

Клональне мікророзмноження зумовило підвищення врожайності сировини (лист м'яти перцевої) у сортів на 7,6 – 50,4 %, завдяки чому рівень рентабельності вирощування м'яти перцевої на аптечний лист збільшився на 19,8–79,5 % ніж при вирощуванні м'яти за традиційною технологією.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено підхід щодо оптимізації біотехнологічних етапів отримання високопродуктивного посадкового матеріалу визнаних в Україні сортів та перспективних селекційних зразків м'яти перцевої, м'яти довголистої із врахуванням морфогенетичного і адаптаційного потенціалу рослин *in vitro*.

1. Оптимізовано технологію клонального мікророзмноження шести сортів та чотирьох селекційних зразків м'яти перцевої й м'яти довголистої сорту Посульська ліналоольна на основі культури бруньок *in vitro* на етапах отримання стерильної культури із застосуванням ступінчастої стерилізації, мультиплікації і ризогенезу.

2. Встановлено оптимальні концентрації наночастинок міді (0,5 мг/л) та кобальту (0,8 мг/л) у живильному середовищі Мурасіге-Скуга на етапі власне мікророзмноження м'яти довголистої, які достовірно збільшували висоту рослин на 45–48,5 %, кількість вузлів – 29,4–33,9 % та кількість пагонів – 55,6–66,2 %, коефіцієнт розмноження – 30–40 %.

3. Показано переваги клонального розмноження над традиційним вегетативним розмноженням за достовірним збільшенням кількості ефірної олії у сортів рослин м'яти перцевої на 11,6–54,2 %, у селекційних зразків на 4–8,5 %, врожайністю повітряно-сухої сировини у сортів 7,6–51,4 % й у селекційних зразків 2,2–7,1 % та біомаси кореневищ в середньому на 2,2–40,4 %, облистяністю 57–62 %, інтенсивністю ксилогенезу, що вказує на інтенсивніший вторинний ріст у клонованих рослин.

4. З'ясовано, що в чотирьох сортах м'яти перцевої Лебедина пісня, Лубенчанка, Лідія та Мама є високий вміст ментолу, низький вміст карвону, піперитону, пулегону та ментофурану, що є ключовою ознакою якості лікарської рослинної сировини. Превалюючими сполуками для сортів м'яти перцевої Лебедина пісня, Лубенчанка і Мама є лімонен, піперитон, ментол, Українська перцева та Чернолиста – пулегон, цинеол і ментон, для сорту Лідія

– ізоментон, що підтверджує позитивний вплив клонального мікророзмноження на терпеноїдний склад ефірної олії м'яти перцевої.

5. В ефірній олії м'яти довголистої сорту Посульська ліналоольна переважають спирти, зокрема ліналоол, масова частка якого у рослин, що культивувалися на живильному середовищі з наночастинками кобальту (0,8 мг/л) та міді (0,5 мг/л) збільшується на 5,37 та 7,03 відповідно, що підтвердило доцільність застосування наночастинок на етапі мультиплікації.

6. Визначено, що рівень рентабельності вирощування м'яти перцевої за використання оздоровленого садивного матеріалу для отримання лікарської сировини сортів становив 157,0–239,4 %, що на 19,8–79,5 % більше ніж за традиційною технологією. Максимальний рівень підвищення рентабельності у порівнянні з контролем відмічено у сорту Чорнолиста, який склав 79,5 %.

7. Встановлено, що клональне розмноження та противірусна терапія препаратом рибавірин в культурі *in vitro* у сортів м'яти перцевої є необхідним заходом в системі її насінництва для отримання вищих урожаїв якісних кореневищ у межах вимог чинного стандарту та збільшення виходу кондиційної розсади в середньому на 60 тисяч штук з 1 га, зумовлює інтенсивніше галудження пагонів, збільшення облистяності і відповідно врожайності повітряно-сухої сировини в середньому на 338 кг/га, поліпшується якість лікарської сировини м'яти перцевої.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Для виробництва оздоровленого високоякісного садивного матеріалу промислових сортів м'яти перцевої рекомендуємо:

1. На етапі введення в культуру рослин м'яти перцевої необхідно проводити ступінчасту стерилізацію: розчин Твін-20 – 10 хв., 70 % розчин етилового спирту – 1 хв., 0,1 % розчин сулеми – 4 хв, 0,05 % розчин нітрату срібла – 5 хв.

2. Для противірусної терапії культивувати експлантати протягом одного пасажу (30 діб) на живильному середовищі МС з препаратом рибавірин у концентрації 10 мг/л.

3. На етапі власного мікроклонального розмноження використовувати модифіковане живильне середовище МС з 0,75 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л аденіну, 0,05 мг/л ІОК та 0,5 мг/л ГК, ризогенезу – ½ МС з 0,5 мг/л ІОК та ½ МС по 0,5 мг/л ІОК та ІМК.

4. Для промислового вирощування запропоновано високоментольні сорти Лебедина пісня і Мама, що характеризуються найбільш інтенсивним розвитком за всіма показниками після культури *in vitro* та селекційний зразок М 01-12, що містить найбільше ефірної олії та М01-02, який за якісними показниками відповідає нормативним критеріям європейської фармакопеї.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Таланкова-Середа Т. Є. (Шкопинська Т. Є.) Вплив наночастинок біогенних металів на ефективність морфогенетичних процесів м'яти перцевої (*Mentha piperita* L.) у культурі *in vitro*. Агроекологічний журнал. 2016. № 2. С. 149–155.

2. Таланкова-Середа Т. Є. (Шкопинська Т. Є.) Вплив наночастинок кремнію на ризогенез м'яти перцевої в умовах *in vitro*. Таврійський науковий вісник. 2016. Вип. 96. С. 112–119.

**Статті у наукових фахових виданнях України,
включених до міжнародних наукометричних баз даних:**

3. Таланкова-Середа Т. Є. (Шкопинська Т. Є.), Коломієць Ю. В., Григорюк І. П. Клональне мікророзмноження сортів м'яти перцевої (*Mentha piperita* L.) української селекції. Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. 2016. №2 (31). С. 50–56. (Здобувачем отримано асептичний матеріал, підібрано живильні середовища та їх компонентний склад для мікророзмноження та ризогенезу, адаптовано рослини до умов *in vivo*, написано статтю).

4. Shkopynska T. Ye., Kolomiets Yu. V., Hryhoriuk I. P., Kucenko N. I. Economic valuable traits of promising breeding samples and 'Chornolysta' variety of *Mentha piperita* L. after *in vitro* sanitation and micropropagation. Plant Varieties Studying and protection. 2019. №15(4). P. 424–433. (Здобувачем отримано, статистично оброблено та проаналізовано показники врожайності рослин м'яти перцевої, кількісний вміст і якісний склад компонентів ефірної олії, підготовлено матеріали до друку).

Статті у інших виданнях України,**включених до міжнародних наукометричних баз даних:**

5. Talankova-Sereda T. E. (Shkopynska T. Ye.), Kolomiets J. V., Likhanov A. F., Sereda A. V., Kucenko N. I., Shkopinskiy E. O. Effect of clonal reproduction on quantitative indices and component composition of essential oil of peppermint varieties. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2018. №3. P. 340–346. (Здобувачем відібрано проби рослинної сировини, отримано ефірну олію та зроблено статистичну обробку отриманих в ході експерименту даних).

6. Talankova-Sereda T. E. (Shkopynska T. Ye.), Kolomiets J. V., Holubenko A. V., Nuzhyna N. V. The influence of clonal micropropagation on productivity and differentiation of *Mentha piperita* plant tissues. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2019. №10(3). P. 337–344. (Здобувачем зроблено нативні препарати, фотодокументацію матеріалу, отримані результати статистично оброблено та підготовлено матеріал до друку).

Тези наукових доповідей:

7. **Таланкова-Середа Т. Є. (Шкопинська Т. Є.),** Коломієць Ю. В., Куценко Н. І. Клональне мікророзмноження в культурі *in vitro* м'яти перцевої. Біотехнологія: звершення та надії: IV Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених, м. Київ, 21–22 травня 2015 року: тези доповіді. Київ, 2015. С. 112–113. (Здобувачем підібрано живильні середовища та регулятори росту для мікророзмноження та ризогенезу, підготовлено тези до друку)

8. **Таланкова-Середа Т. Є. (Шкопинська Т. Є.),** Коломієць Ю. В., Куценко Н. І., Шкопинський Є.О. Застосування біотехнологій *in vitro* для мікророзмноження селекційних зразків м'яти перцевої (*Mentha piperita* L.). Наука в современном мире: XV Международная научно-практическая конференция, г. Киев, 20 декабря 2016 года: тезисы доклада. Мультидисциплинарный научный журнал «Архивариус». 2016. С. 54–58. (Здобувачем отримано асептичний матеріал, підібрано живильні середовища мікророзмноження, рослини адаптовано до умов *in vivo*, підготовлено тези до друку).

9. **Talankova-Sereda T. E. (Shkopynska T. Ye.),** Liarina K. V., Shkopinskij E. A., Ustinov A. I., Kovalyova A.V., Dulnev P. G., Kucenko N. I. The influence of Cu and Co nanoparticles on growth characteristics and biochemical structure of *Mentha longifolia in vitro*. Nanotechnology and Nanomaterials (NANO 2015): 3rd International conference, Lviv, August 26–30, 2015: abstracts book. Lviv, 2015. P. 427–439. (Здобувачем підібрано живильні середовища з наночастинками для мікророзмноження, адаптовано рослини-регенеранти до умов *in vivo*, написано тези).

10. **Таланкова-Середа Т. Є. (Шкопинська Т. Є.),** Куценко Н. І. Клональне мікророзмноження сортів м'яти перцевої. Перспективні напрямки наукових досліджень лікарських та ефіроолійних культур: II Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених, м. Березоточа, 4–5 червня 2015 року: тези доповіді. Лубни, 2015. С. 111–115. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).

11. **Таланкова-Середа Т. Є. (Шкопинська Т. Є.)** Вплив наночастинок кремнію на ризогенез м'яти перцевої в умовах *in vitro*. Онтогенез – стан, проблеми та перспективи вивчення рослин в культурних та природних ценозах: Міжнародна конференція, м. Херсон, 10–11 червня 2016 року: тези доповіді. Херсон, 2016. С. 264.

12. **Таланкова-Середа Т. Є. (Шкопинська Т. Є.)** Вплив наночастинок кобальту на клональне мікророзмноження в культурі *in vitro* *Origanum vulgare* L. Сучасні наукові дослідження та розробки: теоретична цінність та практичні результати – 2016: Міжнародна науково-практична конференція, м. Братислава, 15–18 березня 2016 року: тези доповіді. Київ, 2016. С. 136–139.

13. **Мищенко Л. Т., Куценко Н. И., Таланкова-Середа Т. Е. (Шкопинська Т. Є.)** Особенности диагностики вирусных болезней (*Mentha piperita* L.) и оптимизация микроклонального размножения для оздоровления растений. Биологические особенности лекарственных и ароматических

растений и их роль в медицине: Международная научно-практическая конференция, посвященная 85-летию ВИЛАР, г. Москва, 23–25 июня 2016 года: тезисы доклада. М., 2016. С. 283–288. (*Здобувачем підібрано живильні середовища та їх компонентний склад для оздоровлення методом хемотерапії та мікророзмноження, адаптовано рослини до умов in vivo*).

14. **Таланкова-Середа Т. Є. (Шкопинська Т. Є.)**, Коломієць Ю. В., Шкопинський Є. О. Кількісна та якісна характеристика ефірної олії селекційних зразків м'яти перцевої. Актуальні питання сучасних технологій вирощування сільськогосподарських культур в умовах змін клімату: Всеукраїнська науково-практична конференція, м. Кам'янець-Подільський, 15–16 червня 2017 року: тези доповіді. Тернопіль, 2017. С. 220–223. (*Здобувачем особисто отримано ефірну олію, підготовлено тези до друку*)

15. **Таланкова-Середа Т. Є. (Шкопинська Т. Є.)**, Коломієць Ю. В., Куценко Н. І. Клональне мікророзмноження в культурі *in vitro* *Mentha longifolia*. Перспективні напрямки наукових досліджень лікарських та ефіроолійних культур: II Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених, м. Березоточа, 20–21 липня 2017 року: тези доповіді. Лубни, 2017. С. 106–109. (*Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей*).

16. **Таланкова-Середа Т. Є. (Шкопинська Т. Є.)**, Гречкосій А. О., Куценко Н. І. Вплив клонального мікророзмноження на кількісний вихід та якість садивного матеріалу сортів м'яти перцевої. Лікарські рослини: традиції та перспективи досліджень: IV Міжнародна наукова конференція присвячена 140-річчю з дня народження П. І. Гавсевича, м. Березоточа, 13–14 червня 2019 року: тези доповіді. Київ, 2019. С. 122–125. (*Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей*).

Науково-методичні рекомендації:

17. **Шкопинська Т. Є.**, Коломієць Ю. В., Григорюк І. П. Клональне мікророзмноження і оздоровлення рослин роду *Mentha*: [науково-методичні рекомендації]. К., 2020. 52 с. (*Здобувачем отримано асептичний матеріал, підібрано живильні середовища та їх компоненти для клонального мікророзмноження рослин, адаптовано рослини до умов in vivo, зроблена статистична обробка даних, підготовлено матеріали до друку*).

АНОТАЦІЯ

Шкопинська Т. Є. Оптимізація біотехнологічного процесу клонального мікророзмноження та оздоровлення *in vitro* рослин роду *Mentha L.* – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.20 «Біотехнологія». Національний університет біоресурсів та природокористування України, Київ, 2021.

Оптимізовано біотехнологічний процес клонального мікророзмноження рослин сортів м'яти перцевої української селекції в культурі ізольованих тканин і органів з застосуванням хемотерапії *in vitro*, а також біометалів міді,

кобальту і кремнію у наноформі. Встановлено біохімічний склад ефірної олії, маркерні компоненти, що визначають фармакологічну якість ефірної олії м'яти перцевої та м'яти довголистої. Достовірне збільшення виходу кондиційної розсади в середньому на 60 тисяч штук з 1 га, кількості ефірної олії, урожайності повітряно-сухої сировини в середньому на 338 кг/га, біомаси кореневищ від 0,35 до 7,02 т/га, облиствіння та інтенсивність ксилогенезу вказує на переваги клонального розмноження над традиційним вегетативним розмноженням.

Ключові слова: м'ята перцева, *in vitro*, рослини-регенеранти, капілярна газова хроматографія, вторинні метаболіти, господарсько цінні показники.

АННОТАЦІЯ

Шкопинская Т. Е. Оптимизация биотехнологического процесса клонального микроразмножения и оздоровления *in vitro* растений рода *Mentha L.* – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 03.00.20 «Биотехнология». – Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 2021.

Оптимизирован биотехнологический процесс клонального микроразмножения растений сортов мяты перечной украинской селекции в культуре изолированных тканей и органов с применением химиотерапии *in vitro*, биометаллов меди, кобальта и кремния в наноформе. Применение наночастиц меди (0,5 мг/л) и кобальта (0,8 мг/л) в питательной среде Мурасиге-Скуга на этапе собственно микроразмножения мяты длиннолистной, которые достоверно увеличивали высоту растений на 45-48,5 % , количество узлов на 29,4-33,9% и побегов на 55,6-66,2 %, коэффициент размножения при этом увеличился на 30-40%. Для мультипликации растений мяты перечной предлагаем использовать питательную среду Мурасиге-Скуга с регуляторами роста 0,75 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,1 мг/л аденина, 0,05 мг/л индолилуксусной и 0,5 мг/л гиббереллиновой кислот, а для мяты длиннолистной: 6-бензиламинопурина – 0,75 мг/л, кинетина 0,01 мг/л, аденина 0,1 мг/л, индолилуксусной кислоты 0,1 мг/л и гиббереллиновой кислоты 0,5 мг/л. Для химиотерапии *in vitro* рекомендуем вирицид *Ribavirin* (1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид, «Sigma-Aldrich», США) в концентрации 10 мг/л. Высокие показатели по содержанию эфирного масла отмечены для сортов Лубенчанка, Мама, Лебединая песня и Чернолистная - 4,02%; 3,98%, 3,84 и 3,83% соответственно. В эфирном масле сортов мяты перечной Лебединая песня, Лубенчанка и Мама преобладают лимонен, пиперитон, ментол, у сортов Украинская перечная и Чернолиста – пулегон, цинеол и ментон, а у сорта Лидия – изоментон. Установлен биохимический состав эфирного масла, маркерные компоненты, определяющие фармакологическое качество эфирных масел мяты перечной и мяты длиннолистной. Достоверное увеличение выхода кондиционной рассады в

среднем на 60 000 штук с 1 га, количества эфирного масла у сортов мяты перечной на 11,6–54,2 %, урожайности воздушно-сухого сырья в среднем на 338 кг/га, биомассы корневищ от 0,35 до 7,02 т/га, облиственности на 8 – 21 % и интенсивность ксилогенеза указывает на преимущества клонального размножения над традиционным вегетативным размножением. Рассчитана экономическая эффективность выращивания сортов мяты перечной на аптечный лист для фармацевтической и эфирного масла для парфюмерно-косметической промышленности.

Ключевые слова: мята перечная, *in vitro*, растения-регенеранты, капиллярная газовая хроматография, вторичные метаболиты, хозяйственно ценные показатели.

ANNOTATION

Shkopinska T. E. *Mentha L.* genus plants *in vitro* clonal microreproduction and improvement biotechnological process optimisation. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

The dissertation for the candidate of agricultural sciences degree in specialty 03.00.20 – biotechnology. National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

Ukrainian selection peppermint plants breeds clonal microreproduction biotechnological process is optimised in isolated tissues and organs culture using *in vitro* chemotherapy, and also copper, cobalt and silicon biometals in nanoform. Essential oil biochemical composition, marker components, that determine peppermint and long-leaved mint essential oil pharmacological quality, have been established. Conditioned seedlings yield significant increase by 60 thousand pieces per 1 ha in average, essential oil amount, air-dried raw materials yield by 338 kg/ha in average, rhizome biomass from 0.35 to 7.02 t/ha, leaf coverage and xylogenesis intensity point to clonal reproduction advantages over traditional vegetative reproduction.

Key words: peppermint, *in vitro*, plants-regenerants, capillary gas chromatography, secondary metabolites, economic-valuable indices.

Підписано до друку 13.04.2021 року. Формат 60x84\16
Ум. друк. арк. 0,9 Обл.-вид.арк. 0,9
Наклад 100 прим. Зам. № 210242

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041, тел.: 527-81-55, e-mail: nubip_druk@ukr.net
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4097 від 17.06.2011

