

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07. – М. 1730 «С». 2021.10.13. 02 ПЗ

НУБІП України

БАС ОЛЕКСАНДРИ ЮРІВНИ

НУБІП України ²⁰²²

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 606:631.528:633.812

ПОГОДЖЕНО

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Декан факультету

Завідувач кафедри

захисту рослин, біотехнологій та екології

Екобіотехнології та біорізноманіття

Коломієць Ю.В.

Кваско О.Ю.

(підпис)

(підпис)

“ ” 2022 р.

“ ” 2022 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Отримання суспензійної культури лаванди вузьколистої (*Lavandula angustifolia* Mill)»

Спеціальність 162 біотехнології та біоінженерія

(код і назва)

Освітня програма Екологічна біотехнологія та біоенергетика

(назва)

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми

Проф., д. с-г. наук

Лісовий М.М.

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

(ПІБ)

Керівник бакалаврської роботи

к. б.н.,

Кваско О.Ю.

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

(ПІБ)

Виконала

Кваско О.Ю.

(підпис)

(ПІБ студента)

КИЇВ – 2022

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

Кафедра екобіотехнології та біорізноманіття

Освітній ступінь «Магістр»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

2022 р.

ЗАВДАННЯ

НА ВИПУСКНУ

МАГІСТЕРСЬКУ КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ

Бас Слєксандри Юривни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Отримання суспензійної культури лаванди вузьколистої (*Lavandula angustifolia* Mill)

керівник роботи к.б.н., Кваско О.Ю.

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь,

вчене звання)

затверджені наказом НУБіП України від «13» жовтня 2021 р. № 1730 «С»

2. Строк подання студентом роботи 11 листопада 2022

3. Вихідні дані до роботи орієнтовані літературні джерела, методики введення культури в умови *in vitro* та отримання суспензійної культури, орієнтований склад агаризованого та рідкого середовищ для культивування клітин лаванди вузьколистої.

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): Підбір експлантів та умов для отримання асептичних рослин лаванди вузьколистої; стимулювання калусогенезу, підбір методу отримання суспензійної культури *Lavandula angustifolia*; аналіз її кількісних характеристик

5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата завдання видав	Підпис, дата завдання прийняв
1	к.б.н., Кваско О.Ю.	15.10.21	15.10.21
2	к.б.н., Кваско О.Ю.	01.03.22	01.03.22
3	к.б.н., Кваско О.Ю.	15.08.22	15.08.22
Висновки	к.б.н., Кваско О.Ю.	29.09.22	29.09.22

6. Дата видачі завдання 01 жовтня 2021

НУБІП України

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

Назва етапів випускної магістерської кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1. Розділ 1. Огляд літературних джерел згідно обраної тематики	01.04.2022	
2. Розділ 2. Матеріали та методи дослідження	10.05.2022	
3. Розділ 3. Результати дослідження	20.09.2022	
4. Висновки та оформлення списку літератури	25.10.2022	

Студент _____
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____

_____ (підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Магістерська кваліфікаційна робота на тему «Отримання суспензійної культури лаванди вузьколистої (*Lavandula angustifolia* Mill.)» виконана на 58-ми сторінках друкованого тексту. Містить у собі 28 рисунків та 3 таблиці.

Опрацьовано 30 літературних джерел.

Робота складається з таких розділів: зміст, вступ, огляд літератури, матеріали та методи, результатів дослідження, висновків та списку використаної літератури.

Дослідження проводилось в навчально-науковій лабораторії біотехнології та клітинної інженерії кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП.

Метою роботи було отримати суспензійну культуру *Lavandula angustifolia* та визначити її ростові характеристики.

Завдання роботи:

1. Проаналізувати літературні джерела стосовно особливостей клітинної культури *Lavandula angustifolia*.
2. Визначити тип експланту та схему введення культури в умови *in vitro*
3. Підібрати склад агаризованого та рідкого поживних середовищ.
4. Отримати суспензійну культуру *Lavandula angustifolia*.
5. Оцінити якісні і кількісні показники отриманої суспензійної культури лаванди.

Предметом дослідження була культура Лаванда вузьколиста (*Lavandula angustifolia* Mill.)

Об'єктом дослідження був процес отримання суспензійної культури цінної ефірноолійної рослини лаванди вузьколистої (*Lavandula angustifolia*)

Зміст	
СПИСОК СКОРОЧЕНЬ	7
ВСТУП	8

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
----------------------------	----

1.1. Ботанічна характеристика та опис культури лаванди вузьколистої (<i>Lavandula angustifolia</i>)	10
1.2. Анатомічна будова культури <i>L. angustifolia</i>	13

1.3. Культура <i>L. angustifolia</i> в умовах <i>in vitro</i>	17
---	----

1.3. Індукція каллусогенезу у рослин виду <i>Lavandula angustifolia</i>	19
1.5. Суспензійна культура	22

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	26
------------------------------	----

2.1. Методи стерелізації	26
--------------------------	----

2.2. Підбір живильних середовищ	28
2.3. Умови отримання суспензії	32

2.4. Методи кількісної оцінки суспензійної культури	36
---	----

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ	39
----------------------	----

3.1. Ефективність стерилізації насіння та умов введення культуру <i>in vitro</i>	39
3.2. Результати та оцінка калюсу та суспензійної культури <i>L. angustifolia</i>	43

3.3. Результати кількісної характеристики отриманої суспензійної культури	
---	--

<i>Lavandula Angustifolia</i>	46
ВИСНОВКИ	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	51

НУБІП України

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

НУБІП України
L.a. - (*Lavandula angustifolia*)
ІОК - індол-3-оцтова кислота

НУБІП України
ІМК - індол-3-масляної кислота
2,4-Д / 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота
НАК - α -нафталінооцтова кислота

НУБІП України
БАП - 6- бензиламінопурин
Кін - кінетин
MS - Murashige and Skoog (Мурашіге і Скуга)

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВСТУП

Актуальність. Лаванда (*Lavandula angustifolia* Mill.) – лікарська ефірноолійна рослина, яка містить багато цінних компонентів, таких як ліналоол та ліналілацетат. Цей вид рослин вважається однією з найважливіших лікарських рослин у світі. Ефірна олія лаванди складається з 60 хімічних сполук, включаючи ліналоол, ліналілацетат, 1,8-цинеол, бурнеол, терпен-4-л і камфору. Олія цієї рослини відома як заспокійливий засіб і широко використовується при лікуванні депресії. Її антидепресивна активність вважається еквівалентною хімічним препаратам. Цей вид рослини також використовується як болезаспокійливий, протигрибковий, знеболюючий та антибактеріальний засіб і застосовується при лікуванні опіків та укусів комах[9].

Вегетативне розмноження видів роду *Lavandula* традиційними методами обмежене низьким коефіцієнтом розмноження, поганою здатністю до вкорінення стеблових живців. Тому, з цієї причини та з метою економії цінної площі посівних ділянок, запропоновано культуру рослинних клітин як ефективна альтернатива традиційним методам польового культивування. Крім того, продукування рослиною вторинних метаболітів, окрім генетичних властивостей залежить від багатьох факторів навколишнього середовища, які можуть впливати як на якість, так і на кількість фармацевтичних препаратів [10]. Посилення виробництва вторинних метаболітів може бути досягнуто за допомогою суспензійної культури дедиференційованих клітин, умови культивування яких можна контролювати та змінювати.

Лаванда (*Lavandula angustifolia*) є одним з найважливіших видів лікарських рослин, для яких також розглядалося виробництво її вторинних метаболітів через культуру тканин.

Об'єкт дослідження – процес отримання суспензійної культури цінної ефірноолійної рослини лаванди вузьколистої (*Lavandula angustifolia*)

Предмет дослідження – Лаванда вузьколиста (*Lavandula angustifolia* Mill.)

Мета дослідження – отримати суспензійну культуру *Lavandula angustifolia* та визначити її ростові характеристики

Завдання дослідження:

6. Проаналізувати літературні джерела стосовно особливостей клітинної культури *Lavandula angustifolia*.

7. Визначити тип експланту та схему введення культури в умови *in vitro*

8. Підібрати склад агаризованого та рідкого поживних середовищ.

9. Отримати суспензійну культуру *Lavandula angustifolia*.

10. Оцінити якісні і кількісні показники отриманої суспензійної культури лаванди.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Ботанічна характеристика та опис культури лаванди вузьколистої

(*Lavandula angustifolia*)

Лаванда вузьколиста (Л. справжня, Л. лікарська), *Lavandula angustifolia* Mill. — вічнозелений напівкущ з родини губоцвіті *Lamiaceae*. Рід *Lavandula* нараховує близько 28 видів, у більшості поширених у Середземномор'ї, але їх ареал простягається від Сомалі в Африці до Індії. В дикому вигляді росте в горах південної Франції, Іспанії, Італії, Греції, Алжири, на півдні України.

Культивується в Криму, Грузії, Молдові. [1]

Біологічна класифікація: домен — Ядерні; царство — Рослини; відділ — Покритонасінні; клас — Еудикоти; підклас — Айстериди; порядок — Губоцвіті; родина — губоцвіті; рід — Лаванда; вид — Лаванда вузьколиста (*Lavandula angustifolia*). [2]

Ароматний сірувато-опушений, вічнозелений напівчагарник 30–60 см заввишки, дуже розгалужений, кулеподібною форми, пагонів налічується близько 300–1000 штук. Коренева система мичкувата, являє собою сильно розгалуження дерев'янисті корінні, які близько розташовані до поверхні ґрунту. Листки — супротивні, сидячі, лінійні або лінійно-ланцетні, края загорнуті донизу, пластинка вузька (звідси назва рослини). Молоді листки — сірувато-зелені, а старіші — зеленого відтінку, опушені зісподу залозистими волосками. Квітки лаванди зібрані кільцями, що утворюють переривчасті верхівкові колосоподібні суцвіття. Віночок двогубий блакитний, світло-синій, фіолетовий, чашечка — трубчаста фіолетового або блакитно-сірого кольору, густо опушена волосками. Плід — цинобій, який розпадається на 4 горішки (ереми). Цвіте лаванда з червня по липень, а насіння дозріває з середини серпня по вересень. [11] (рис. 1.1).



Рис. 1.1. Будова Лаванди вузьколистої. А – рослина в стадії цвітіння; 1 - квітка; 2 – квітка в поздовжньому розрізі; 3 - тичинка; 4 - пилляк; 5 - нижня частина пилляка з нектаром, в розрізі; 6 - насіннина; 7, 8 – насіннина в поздовжньому та поперечному розрізі. [16]

Як лікарську рослинну сировину використовують квітки Лаванди вузьколистої, рідше траву. В усіх частинах рослини міститься етерна олія: в свіжих суцвіттях знаходиться близько 0,8–1,2% етерної олії, в листках — 0,37%, в стеблах — 0,19%. Також в квітках є урсолова кислота, флавоноїди: акацетин, лютеолін, вітексин; кумарини; фенілкарбонові, жирні і органічні кислоти; дубильні речовини та каротиноїди. Головною складовою етерної олії є естери ліналолового спирту та кислот таких як: оцтова, масляна, валеріанова та капронова. виявлені гексенілбутират, гераніл-, лавандуліл-, терпініл-, нерил-ацетати, нерол, гераніол, лавандулол, ліналілмоноксид, амільовий спирт,

борнеол, цитраль, куміновий спирт, коричний та валеріановий альдегіди, цинеол, оцимен, α -пінен, α -феландрен, α - і β -каріофіленоксид, камфен, бісаболен та цедрен. [1]

Таблиця.1.1 Хімічний склад ефірних олій *L. Angustifolia* [4]

Порядковий номер	Компонент	%
1	α -туйен	0.09
2	α -пінен	0.21
3	Камфен	0.2
4	β -пінен	0.14
5	β -Мірцен	2.75
6	p-цимен	0.25
7	Лімонен	0.62
8	1,8-цинеол	2.25
9	Ліналоол оксид E	0.9
10	Фенхон	0.21
11	Ліналоол	32.23
12	α -Камфоленал	0.14
13	транс-пінокарвеол	1.25
14	цис-Вербенол	0.12
15	Камфора	4.21
16	Лавандулол	1.6
17	Терпінен-4-ол	3.4
18	Борнеол	2.01
19	цис-Пінокарвон	0.25
20	P-цимен-8-ол	0.09
21	Криптон	0.12
22	α -терпінеол	0.92
23	Міртенал	2.62
24	Міртенол	1.44
25	Вербенон	0.85
26	транс-карвеол	0.09
27	Гераніол	5.8
28	Ліналілацетат	14.23

29	Карвон	0.06
30	Лавандуліацетат	4.8
31	Геранілацетат	1.7
32	β -каріофілен	4.2
33	Каріофілен оксид	2.12
34	γ -кадинол	1.6
35	β -евдесмол	0.54
36	α -бісаболол	0.37
37	β -бісаболол оксид А	0.33

1.2. Анатомічна будова культури *L. angustifolia*

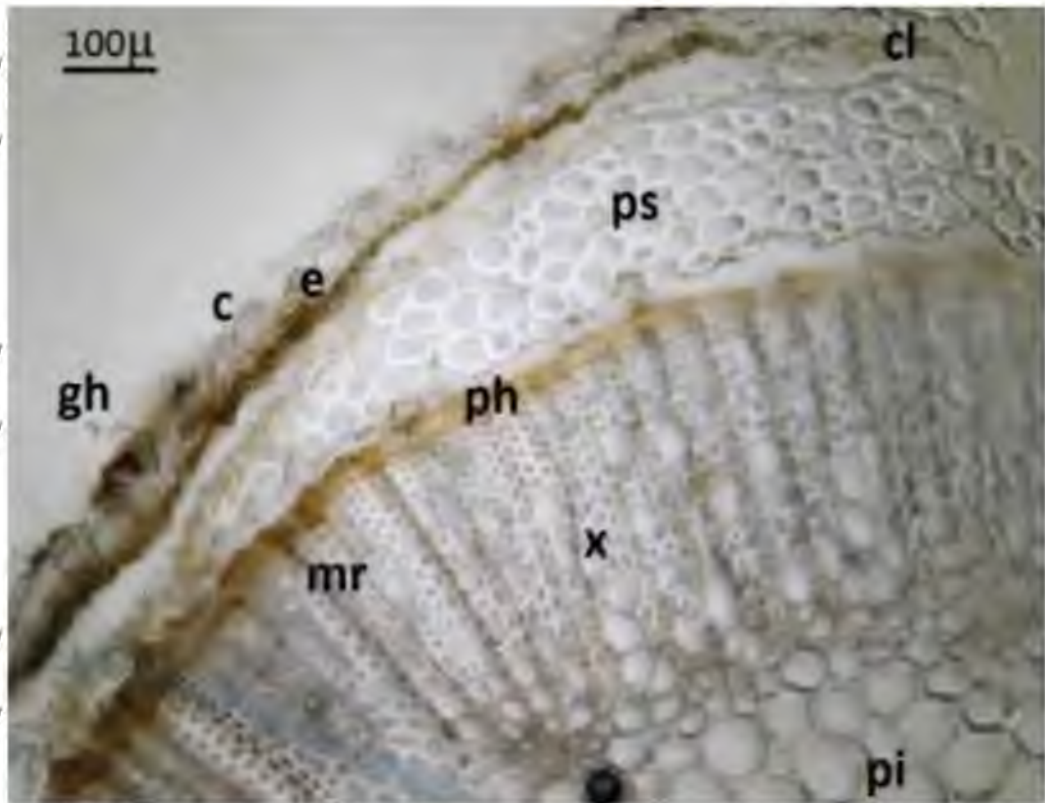
На поперечних зрізах стебло прямокутне (рис. 1.2, 1.3 А, Б). Епідерма одношарова, з товстою кутикулою, округло-овальної форми. Зовнішня і внутрішня тангенціальні стінки товщі за антиклінальну. На епідермісі є покривні та залозисті волоски. Покривні волоски: зазвичай зірчасті, розгалужені і багатоклітинні, 2-7-клітинні з гладенькою кутикулою, рідше однорядні, прямі або закручені. Залозисті волоски п'яти типів: головка 1 стебло 1-клітинна, головка 2 стебло 1-клітинна, головка 1 стебло 2-клітинна, головка 3 стебло 1-клітинна і головка 8-клітинна (тип Labiatae) (рис. 1.2, 1.3 А, Б).

У чотирьох кутах виявлено 3-4 ряди коленхімної тканини. Корінь паренхіматозний паренхіматозна до ендодерми. Ендодерма складається зі сплюснених клітин, які ледве відрізнити від паренхіми кори. Перицикл складається з циліндричної багатшарової склеренхіми. Судинна система: складається з повного циліндра ксилеми, оточеного флоемою. Камбій: нечіткий, серцевинні промені: 1-2 клітини завширшки. М'якоть: Паренхіматозна і займає велику площу. В окремих клітинах спостерігалось крохмальне зерно (рис. 1.2, 1.3 А, Б) [27]

НУ

НУ

НУ



И

И

И

Рис. 1.2. *L. angustifolia*. поперечний розріз стебла трав'янистої рослини

Н

(фотографії тринокулярного мікроскопа Olympus BX 51)с: кутикула, е: епідерміс, gh: залозисті волоски, mr: серцевинний промінь, ph: флоема, рі: серцевина, ps: перициклічна склеренхіма, х: ксилема[27]

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

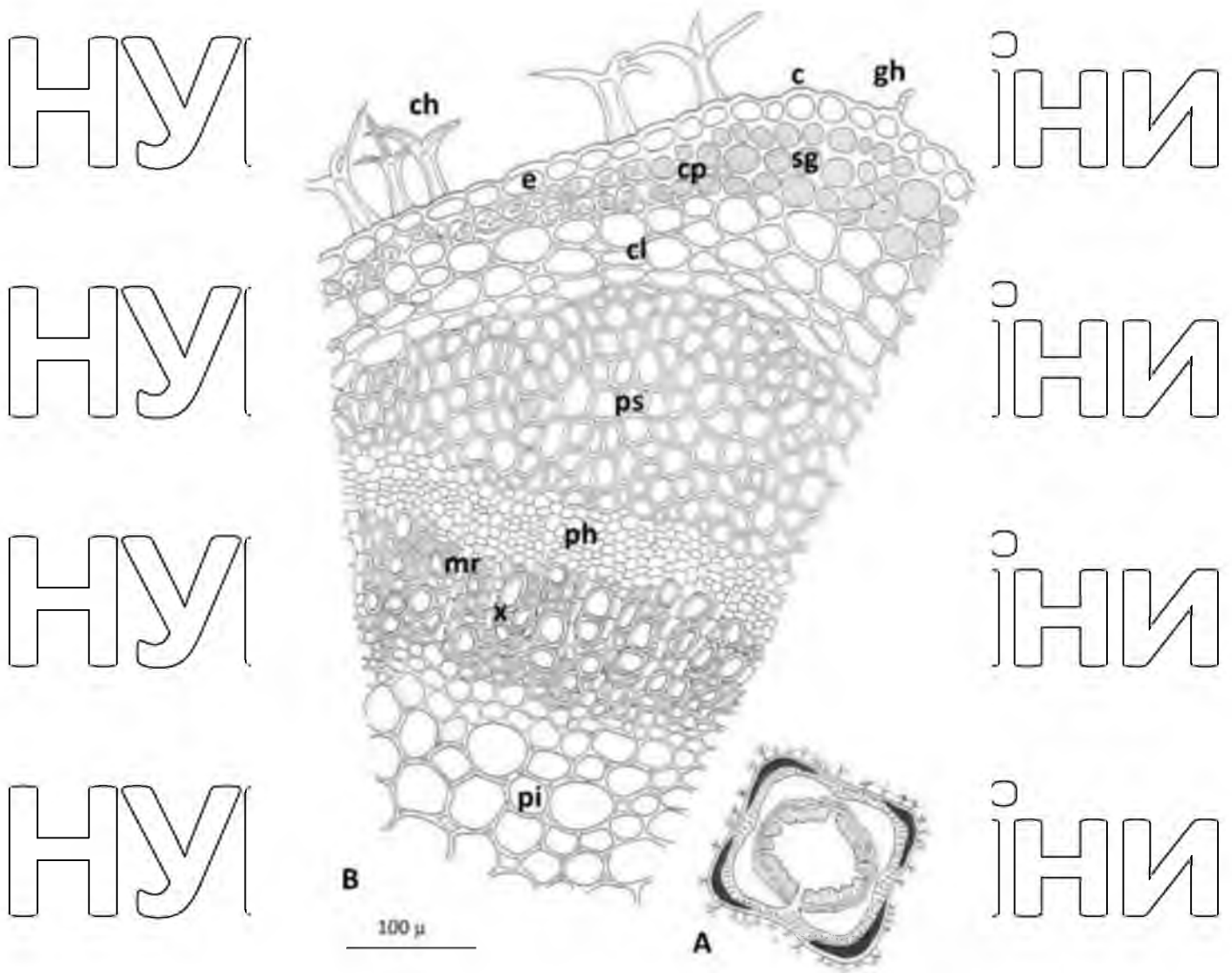


Рис. 1.3. А, В. *L. angustifolia*. поперечний розріз стебла трав'янистої рослини. А - схематичний, В деталізований, с: кутикула, cl: коленхіма, ch: покривні волоски, ср: паренхіма кори, е: епідерміс, gh: залозисті волоски, mr: серцевинний промінь, ph: флоема, рі: серцевина, ps: перициклічна склеренхіма, sg: крохмальне зерно, х: ксилема.[27]

Листок (рис. 1.4, 1.5 А, Б, В, Г, Д,)

На поперечних зрізах епідерма одношарова, має округлі або прямокутні клітини з тонкою кутикулою, клітини верхньої сторони більші, ніж нижньої, зовнішні тангенціальні стінки потовщені (рис. 1.4, 1.5А, Б, В, Г), антиклінальні стінки клітин звивисті на нижній стороні та майже прямі на верхній стороні

Покривні та залозисті волоски спостерігалися як на верхньому, так і на нижньому епідермісі.

Покривні волоски: зазвичай зірчасті, розгалужені та багатоклітинні, 2-7 клітинні з гладенькою кутикулою, рідше - непарноперисті, прямі або рекурентні.

Залозисті волоски п'яти типів: головка 1-го стебла 1-клітинна, головка 2-го стебла 1-клітинна, головка 1-го стебла 2-клітинна, головка 3-го стебла 1-клітинна і головка 8-клітинна (тип *Labiatae*).

Продихи: листки амфістоматичні, з діацитарними продихами, надлишковими або злегка піднятими над рівнем епідермісу (рис. 1.4, 1.5 А,В,С,Д) і більш численними на нижньому боці листка. Мезофіл: двошаровий, палисадна тканина 1-2-шарова, губчаста паренхіма 3-4-шарова (біфасціальна) (рис. 1.4, 1.5 А,Б,В,С,Д). Середне черевце: дугоподібно вигнуте в нижній частині. Під верхнім і нижнім епідермісом розташована багат шарова коленхімна тканина.

Судинні пучки колатеральні, флоєма в абаксальному, ксилема в адаксіальному напрямку. Ковпанки коленкімних пучків присутні в полюсах ксилеми флоєми. [3]

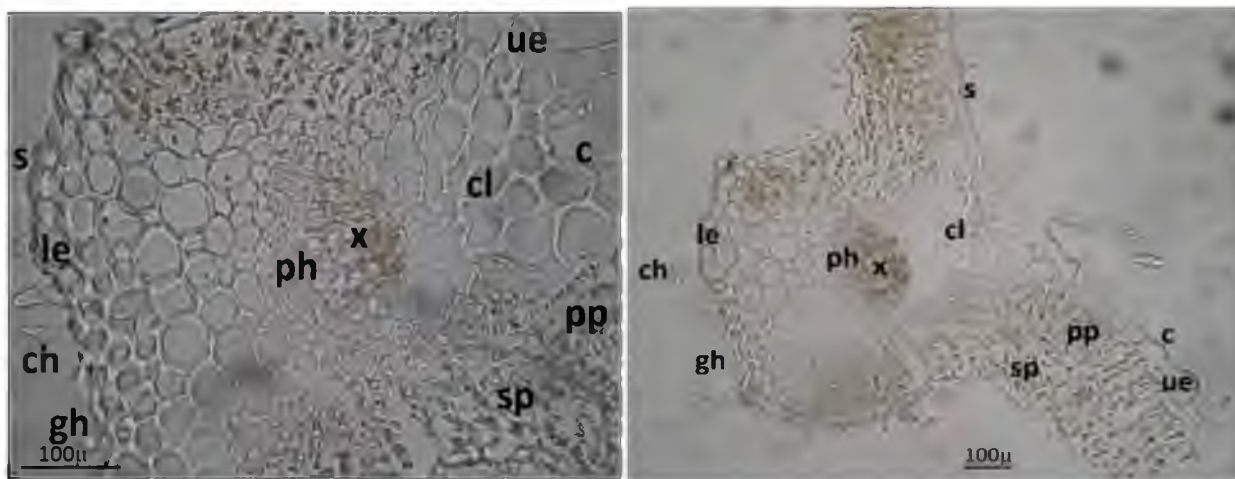


Рис. 1.4. *Lavandula angustifolia*.. Поперечний зріз листка: деталізований вигляд з міжклітинника; поверхневі види епідермісу; ue: верхній епідерміс, m: мезофіл,

le: нижній епідерміс, c: кутикула, cl: коленхіма, gh: залозисті волоски, ch: покривні волоски, p: паренхіма, pc: коленхіма флоєми, ph: флоєма, x: ксилема,

хс: коленхіма ксилеми, с: кутикула, pp: палисадна паренхіма, s: стома, sp: губчаста паренхіма, vb: судинний пучок .[3]

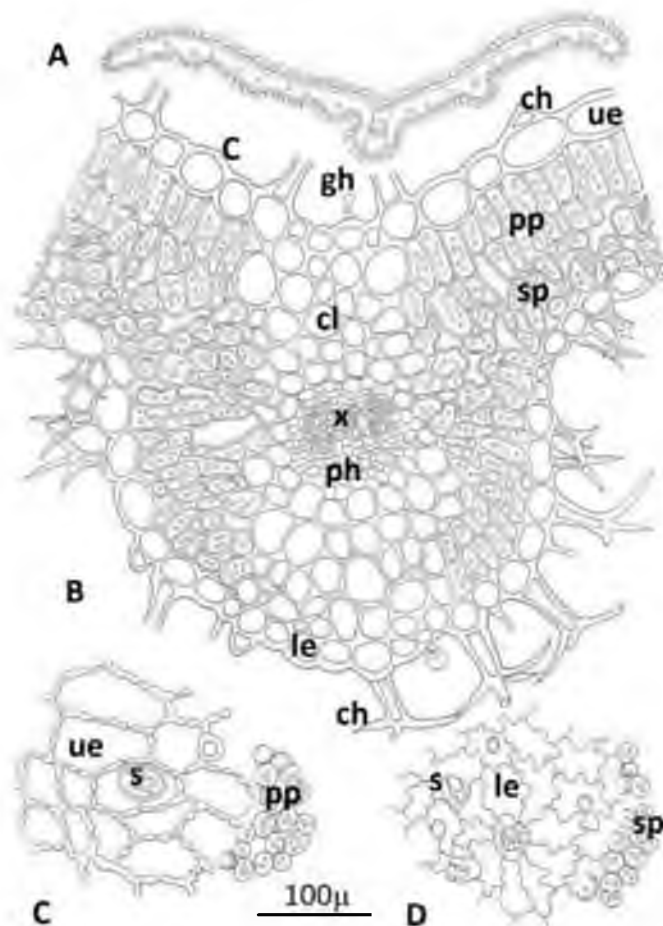


Рис.1.5. *Lavandula angustifolia*. Поперечний зріз листка: А – схематичний, В – деталізований вигляд (намальований від руки), С - поверхневий вигляд верхньої епідерми, D - поверхневий вигляд нижньої епідерми. [3]

1.3.Культура *L. angustifolia* в умовах in vitro

Успіх мікроклонального розмноження залежить від складу живильного середовища, концентрації живильного середовища, концентрації та комбінації регуляторів росту рослин (PPP), середовища культивування, генотипу та фізіологічного стану рослини-донора, а також відповідного вибору експланта.

Вибір експлантів для ініціювання культури залежить від типу необхідної культури, її призначення та виду. Мікроклональне розмноження може бути досягнуто за допомогою трьох типів експлантів: кінчиків меристем, кінчиків

пагонів або вузлів (одичичних або множищих), плодами (насінням). Ініціювання культури лаванди *in vitro* передбачає поверхневу стерилізацію початкових експлантів. Дезинфекція спочатку етанолом, а потім потім розчином гіпохлориту натрію, як правило, ефективна для ініціювання асептичних культур більшості видів лаванди. [12]

Базове середовище MS (Murashige and Skoog, 1962) широко використовується для досліджень *in vitro* за участю *L.a.* але деякі дослідники віддають перевагу використанню менш концентрованих середовищ або середовища MS зі знизеним вмістом макроелементів (1/2 MS). Цитокініни необхідні для розмноження пагонів, іноді в поєднанні з низькими концентраціями ауксинів. Живильне середовище, доповнене або лише 6-бензиламінопурином (6-БАП), або в комбінації з ауксинами (індол-3-оцтовою індол-3-оцтовою кислотою, ІОК; індол-3-масляною кислотою, ІМК; α -нафталінооцтовою кислотою, НАК) використовується для створення культур *in vitro* у кількох видів (*L. Angustifolia*, *L. stoechas*, *Lavandula viridis* і *L. vera*). Іноді спостерігається побуріння середовища, але цьому можна запобігти, включивши аскорбінову кислоту в середовище і часто оновлюючи його. Отже, за численними дослідженнями, доведено, що регулятор росту 6-БАП (цитокінін) сприяє розмноженню та збільшенню кількості пагонів у декількох видів *Lavandula spp.* в культурі *in vitro* [13, 28]



Рис.1.6. Асептичні рослини *Lavandula angustifolia*



Рис.1.7. Утворення бічних пагонів культури *Lavandula angustifolia* в умовах *in vitro*

1.3. Індукція калюсогенезу у рослин виду *Lavandula angustifolia*

Серед різних методів *in vitro*, культура калюсу була успішно використана для отримання лікарських засобів рослинного походження. Крім того, отримання

калосу є необхідною умовою для культивування клітинних суспензій з подальшим виділенням вторинних метаболітів, а також ця недиференційована клітинна маса широко використовується в генетичній трансформації, метаболічних трансформаціях генів, маніпулюванні з метаболічними шляхами та виявленні біосинтетичних шляхів, особливо в лікарських рослинах. Лаванда (*Lavandula angustifolia*) є одним з найважливіших видів лікарських рослин, для яких також розглядається виробництво вторинних метаболітів через клітинну культуру [15]

Згідно з дослідженням [14] максимальний відсоток калосу, як у перерахунку на свіжу, так і на суху масу, можливо отримати з листових експлантів на середовищі MS з додаванням 2 мг/л 2,4-Д та 2 мг/л БАП, вирощених в умовах темряви. Тип рослинної тканини також значною мірою впливає на калусоутворення. Кількість калосу в листових експлантах зазвичай більша або така ж, як у стеблових експлантах. Крім типу експланта, різні гормональні обробки регуляторами росту також викликали відмінності у свіжій та сухій масі калосу. Обробка гормоном 2,4 – Д у кількості 2 мг/л показує найбільший відсоток отримання калосу в культурі *Lavandula angustifolia*. Тип і концентрація регуляторів росту цитокінінового ряду також ефективно впливають на отримання найбільшої маси свіжих і сухих калусів, так що в присутності 2,4-Д використання 6-БАП у кількості 2 мг/л та викликає значне збільшення маси індукованого калосу, порівняно з іншими гормональними обробкам.[29]

В загальному отриманий калюс культури *L.a* має коричневий, коричнево-зелений, коричнево-красовий та кремовий кольори, консистенція тканини м'яка та компактна. Тип експланта не впливає значною мірою на забарвлення калюсу. А в присутності у середовищі різних гормональних сполук дає різні результати кольору калюсу. Так, при наявності регулятора росту 2,4-D експланти забарвлюються у кремовий та коричневий колір. Тип ауксину найбільший важливий фактор в індукованому забарвленні калюсів. Умови освітлення також впливають на відмінність в кольорі, але меншою мірою ніж ауксини. Так, наприклад, в умовах освітленості переважає коричневе забарвлення над кремовим, в той час як в темряві навпаки. Колір калюсу може бути використаний як індикатор якісної ознаки для подальших досліджень. [14]

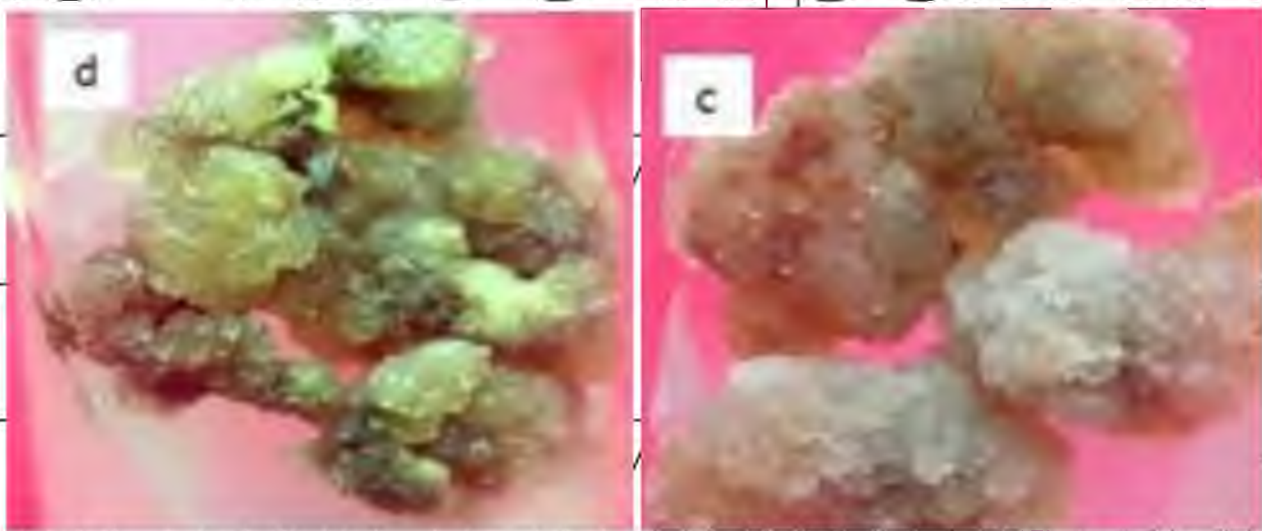


Рис.1.8 Утворення калюсної тканини культури *Lavandula angustifolia*[14]

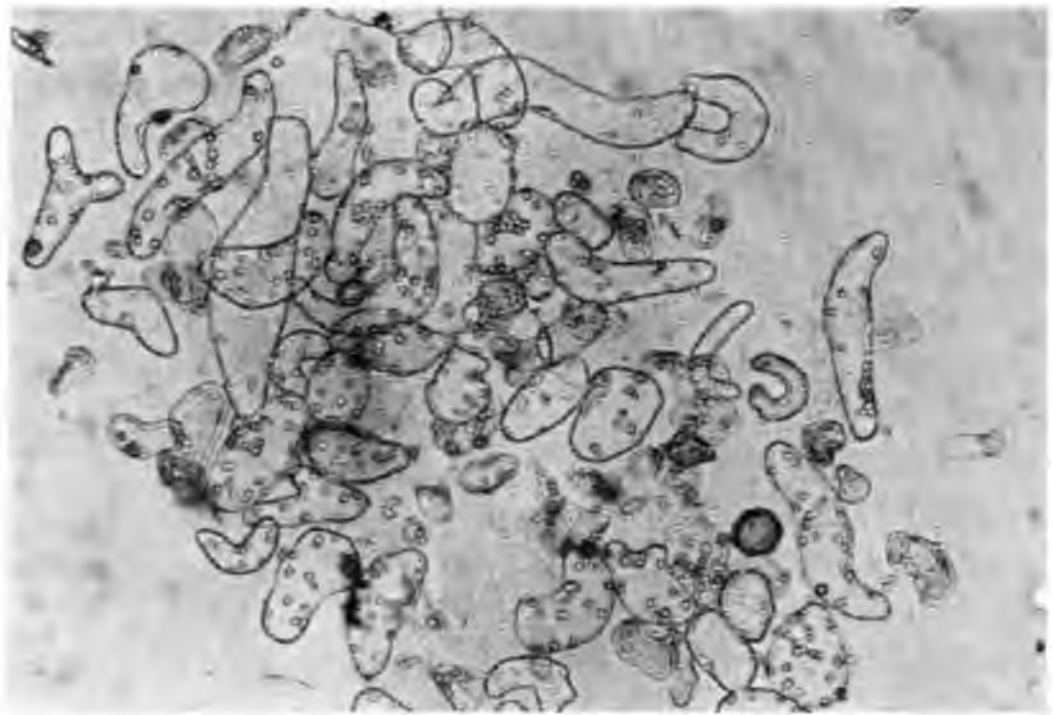


Рис. 1.9 Свіжоізолювані калюсні клітини культури *Lavandula angustifolia*

[17]

1.5. Суспензійна культура

Рослинна суспензійна культура гомогенна популяція

диференційованих клітин та їх агрегатів у керованому калюсогенному

середовищі. Одним з способів отримання суспензійної культури є перенесення

невеликої кількості диференційованого калюсу в рідке поживне середовище,

що перемішується. Рідше в якості ініціалі суспензійної культури

використовують стерильні експлантати тканин, наприклад, листки, стебла,

корені, що при культивуванні в рідкому поживному середовищі

диференціюються з утворенням калюсу, який в свою чергу, розпадається на

клітинні агрегати та окремі клітини. [5]

Суспензійні культури рослинних клітин широко використовуються в

біології рослин як зручний інструмент для дослідження широкого кола явищ,

минаючи структурну складність рослинного організму *in vivo*. Однерідність

клітинної популяції *in vitro*, велика доступність матеріалу, висока швидкість

росту клітин і хороша відтворюваність умов роблять суспензійні культури клітин

придатними для аналізу складних фізіологічних процесів фізіологічних процесів на клітинному та молекулярному рівнях. Крім того, культури рослинних клітин забезпечують цінну платформу для виробництва високоцінних вторинних метаболітів та інших речовин, що представляють комерційний інтерес, наприклад, такі як речовини вторинного обміну, що входять до складу ефірної олії лаванди.[18] Для таких цілей зазвичай використовують суспензійні культури, які культивують у колбах Ерленмейера на гіраційному шейкері та підтримують шляхом регулярного пересіву через невеликі проміжки часу.[6,7,8]

Такий показник, як встановлення кривої росту є дуже важливим при роботі з лікарськими та ароматичними рослинами. Це необхідно не тільки для кращого визначення правильного часу заміни середовищ та можливості використання таких клітин у суспензіях, але й у випадках, коли метою є отримання вторинних метаболітів. [6]

Ріст популяції клітин у суспензійному середовищі виражається S-подібною кривою, що виражають на графіку. Під час культивування клітини проходять такі фази росту:

1. Лаг-фаза (латентна) – початковий період, під час якого клітини не діляться та не збільшуються в розмірах, адаптуються. Протягом цього періоду в клітинах проходять підготовку до фази активного ділення.
2. Логарифмічна (експоненціальна) фаза – під час даної фази збільшується кількість клітин та сухої речовини в них. Активізується клітинний метаболізм, вміст білку збільшується, також збільшується кількості рибосом і мітохондрій та цитоплазми в клітинах. Клітини починають активніше поглинати кисень.
3. Лінійна фаза. Період характеризується сповільненням швидкості росту та клітинного ділення, збільшується розмір клітини. Накопичується біомаса завдяки розтягненню клітин.
4. Рання стаціонарна фаза. Період за який середній розмір клітин збільшується, відповідно, збільшується вміст сухої речовини на одну клітину,

при цьому кількість самих клітин не змінюється. Клітини досягають свого потенційного максимуму. Ця фаза обумовлена виснаженням поживного середовища.

5. Стационарна фаза. Об'єм цитоплазми клітин різко зменшується, а вакуоля, навпаки, максимально велика, руйнуються органели, активність дихання клітин зменшується. Це призводить до старіння та загибелі популяції [5]

Отримання суспензійної культури *Lavandula angustifolia* відбувається в рідкому поживному калюсогенному середовищі MS (без агару) з додаванням сахарози та регуляторів росту та розвитку таких як, 2, 4-D. рН середовища перед автоклавуванням становить 5,6–5,8. Культивування суспензії проводиться в колбах Ерленмейера на шейкері (100-120 об./хв) при температурі 25-28 °С в темряві. Субкультивування проводять через певні проміжки часу, в залежності від постановки дослідження. [6,7,8]



Рис. 1.10 Клітинна суспензія *Lavandula angustifolia* на рідкому середовищі MS + 1 мг/л- 2,4-Д + 0,5 мг/л Г₃ [6]

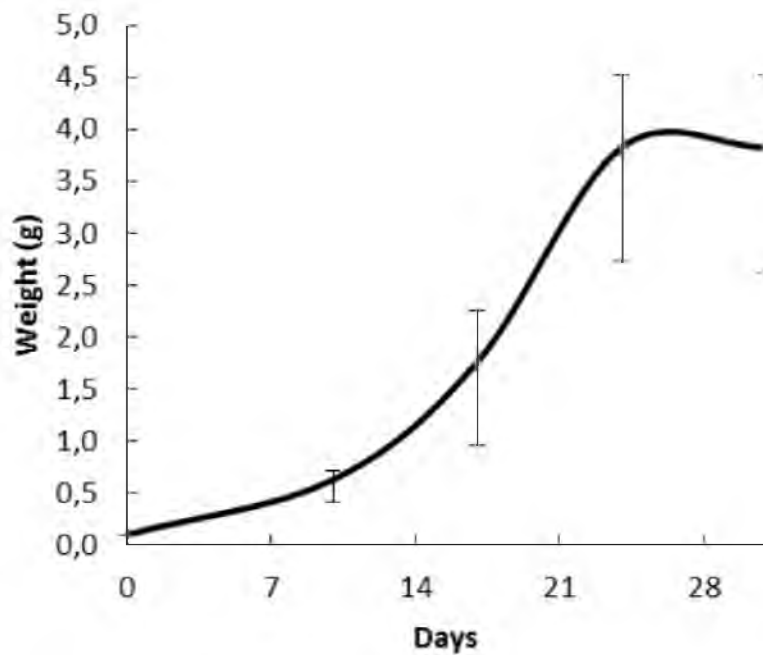


Рис.1.11 S-подібна крива росту клітин калюсу культури *Lavandula angustifolia* культивованих на середовищі MS + 1 mg.L-1 2,4-D + 0.5 mg.L-1 GA3 в дослідженні[6]

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

НУБІП УКРАЇНИ

2.1. Методи стерелізації

Для успішного проведення дослідження необхідно дотримуватися умов стерильності протягом усіх етапів роботи в лабораторії: підготовка інструментів та обладнання, ламінар-боксу та операційної кімнати, підготовка досліджуваного рослинного матеріалу та під час приготування поживних середовищ.

Стерилізація посуду та інструментів. Перед стерилізацією лабораторний посуд необхідно ретельно вимити. Культуральні посудини (чашки Петрі, колби та пробірки), а також інструменти (пінцети, скальпелі та ножиці), попередньо поміщені в бокси, стерилізували сухим жаром в сухожаровій шафі. Тривалість становила 2 години при температурі 150-170 0C. Металеві інструменти не допускається стерилізувати в автоклаві, так як вони швидко тупляться та іржавіють під дією насиченої пари. Безпосередньо перед початком роботи в ламінар-боксі та перед кожною операцією, інструменти стерилізували 70%-етилловим спиртом та обпалювали в полум'ї спиртівки.

Стерилізація ламінар-боксу. Перед початком роботи ламінар бокс опромінюють ультрафіолетовим світлом впродовж 2-ох годин. Це забезпечує стерильність робочої поверхні. Також мікробіологічний фільтр, який завжди обладнено в ламінар-боксі, забезпечує надходження чистого, стерильного повітря всередину ламінарним потоком.

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ



Рис.2.1.Робота в стерильному ламінар-боксі. Рис. 2.2. Вертикальний автоклав

Стерилізацію асаризованого та рідкого поживного середовища гарячою насиченою паром в автоклаві при температурі 1210С, під тиском 1 атмосфера протягом 40 хв. Стерилізацію під тиском проводять в горизонтальних автоклавах (тип ГК-100).

Стерилізація рослинного матеріалу. Оскільки на поверхні рослинного матеріалу завжди присутня епіфітна мікрофлора, необхідно проводити стерилізацію перед введенням в культуру *in vitro*, для уникнення контамінації.

Перед стерилізацією обрані експланти мнуть в мильному розчині, ретельно відмивають від нестерильних тканин, таких як зайві шкірки, кора з пагонів, покривні луски з бруньок.

Рослинні матеріали стерилізують 70% етиловим спиртом, розчинами в складі яких наявний активний хлор (9% гіпохлорид кальцію, 0,5-5% гіпохлорид натрію, «Білизною», хлораміном), ртутними препаратами (сулема, дібілд, фаносепт), 1% бромною водою, перекисем водню в концентрації від 5% до 20%

та 0,5-2% азотнокислим сріблом, антибіотики (якщо матеріал заражено бактеріями).

Вищеперераховані речовини також негативно впливають на самі рослинні клітини, тому вид стерилізуючої речовини, її концентрацію та час обробки підбирають експериментально в залежності від типу експланта та культури, його фізіологічного стану. [19]

В якості експланта нами було обрано насіння *Lavandula angustifolia* Mill для введення культури в умови *in vitro*. В якості стерелізуючих речовин обрали 70% етиловий спирт та комерційну стерилізуючу речовину «Білизна», в концентрації 1:2 з стерильною дистильованою водою.

Етапи стерилізації насіння:

1. Спочатку, помістили насіння в марлевий мішечок, оскільки розмір насіння *L. Angustifolia* дрібний, до 2 мм, та занурили у 70% етиловий спирт на 1 хв.
2. Промили насіння в стерильній дистильованій воді, зануренням на 5 хв.
3. Перенесли насіння у хімічний стакан з розчином комерційної стерилізуючої речовини «Білизна» в пропорції 1:2 з дистильованою водою. Час експозиції становив 15 хвилин.
4. Насіння промивали в стерильній дистильованій воді в трьохкратному повторені. Витримували по 10 хв у кожній посудині.

2.2 Підбір живильних середовищ.

Фізичні і хімічні властивості компонентів, що входять до складу поживних середовищ, являються однією з найголовніших умов для успішного культивування органів, тканин рослин, а також їх ізольованих клітин.

Середовище (MS) Мурасіге і Скуга – вважається одним із найуніверсальніших і багатощільових середовищ, що є оптимальним для клітин більшості видів рослин. В залежності від складу може викликати

капсулоутворення або індукувати морфогенез у багатьох видів дводольних рослин.

На сьогоднішній день, для культивування клітин, органів та тканин використовуються різні модифікації середовища Мурасіге і Скуга, в залежності від поставленої мети, типів експлантів та виду рослини.

Поживне середовище будь-якого типу завжди складається з таких компонентів:

- макроелементи
- мікроелементи
- амінокислоти
- вуглеводи
- вітаміни
- регулятори росту та розвитку (синтетичного і природного походження)
- агар (крім рідких середовищ)
- дистильована вода

Азот, калій, фосфор, кальцій, магній, залізо, натрій, сірка, хлор – макроелементи, що входять до складу поживного середовища.

Азот. Завдяки неорганічній формам азоту, тканини рослин синтезують органічні сполуки азоту, необхідного для нормальної життєдіяльності. Нітрати являються найкращою формою азотного живлення.

Фосфор. В поживних середовищах найчастіше використовується фосфор у вигляді ортофосфату (PO_4^{3-}).

Іони Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} необхідні рослинам в невеликих кількостях і вносяться в середовище при регулюванні його рН.

Сірка вноситься у вигляді сульфідів, сульфатів або амінокислот цистеїну, метіоніну, глутатіону.

Мікроелементи. Наявність в поживному середовищі таких мікроелементів як Mn, Cu, Co, Mo, Zn дуже важливе, особливо при культивуванні в рідких середовищах, оскільки в ньому відсутній агар-агар, який, завдяки своєму складу компенсує нестачу мікроелементів і твердих середовищах. [20]

Для швидкості приготування живильних середовищ, напередодні готують маточні розчини макро- та мікроелементів в мірних колбах. Концентрація макроелементів перевищує робочу в 10 разів. Кожну наважку солі зважують та розчиняють в новій порції дистильованої води, окремо. Зберігаються такі маточні розчини при температурі +4°C в холодильній камері. Концентрація маточних розчинів мікроелементів перевищує одноразову в 100 разів перевищуючи. Температура збурігання така ж як і в розчинів макроелементів. [21]

Джерелом вуглецевого живлення і енергії виступають гексози: глюкоза та сахароза, як їх вносять в кількості 20-40 г/л.

Вітаміни входять до складу багатьох ферментів та ко-ферментів, як каталізують важливі реакції обсіну в тканинах рослин. Вітаміни групи В (В0 - В12) відіграють одну з найважливіших ролей в процесі росту та розвитку рослинного організму. Також вносяться жиророзчинні вітаміни Д, Е, К, А та водорозчинні, такі як: ніотинова кислота, пантотенат кальцію, інозитол, фолієва кислота, біотин, аскорбінова кислота, рибофлавін. [20]

Як регулятори росту до поживного середовища додають наступні фітогормони: ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизинову кислоту. Ауксини – фітогормони, що регулюють процеси розтягнення клітин, сприяють апікальному домінуванню та формуванню кореневої системи. В дуже високих концентраціях провокують дедиференціацію клітин, що індукує калусогенез. Найбільш поширеними в практиці фітогормонами ауксинового типу є: індолілоцтова, нафтілоцтова, індолілмасляна кислоти, 2,4Д.

Цитокініни стимулюють процес ділення калюсних клітин, диференціації, сприяють індукції морфогенезу. Також пригнічують апікальне домінування. Найчастіше в поживних середовищах використовуються наступні цитокініни: БАП - 6-бензиламінопурин, зеатин та кінетин. [22]

Для введення культуру *L. Angustifolia* в умови *in vitro* ми використовували модифікацію середовища MS, наступного складу:

Таблиця 2.1. Склад поживного агаризованого середовища

Компоненти	Кількість на 0,5 л
Макро MS	50 мл
Мікро MS	0,5 мл
Вітаміни MS	0,5 мл
CaCl ₂ * 2H ₂ O	50 мл
Fe-хелат	2,5 мл
Інозитол	0,05 г
Сахароза	15 г
БАП	0,25 мл
Гліцин	0,5 мл
Агар-агар	3,4 г
pH	5,7-5,8

Етапи приготування середовища:

1. На магнітний змішувач помістили мірний стакан з 200 мл дистильованої води. Відміряли та додали 50 мл маточного розчину макро MS, 50 мл CaCl₂ * 2H₂O, самплером відміряли та додали 0,5 мл мікро MS, 0,5 мл вітамінів MS, 2,5 мл Fe-хелату, 0,25 мл БАП.
2. На хімічних вагах зважували 0,05 г інозитулу, 15 г сахарози. Кожну з наважок додали до стакану на магнітній мішалці з іншими компонентами.

3. Зважили 3,4 г агар-агару та пересипали у термомітку колбу. Наважку залили 200 мл дистильованою водою на 15 хв для набування.

4. Помістили колбу з агаром у мікрохвильову піч і, постійно помішуючи, доводимо розчин до повного розчинення агару.

5. Розчинений агар додали до стакану з попереднім розчином, що був на мішалці, суміш довели до необхідного нам об'єму дистильованою водою.

6. За допомогою рН-метра виміряли рН розчину та, використовуючи NaOH довели до значення 5,7.

7. Розлили готове поживне середовище по пеніцилінкам, які щільно закрили фольгою, автоклаували 40 хв при температурі 121°C, тиск – 1 атм.

2.3. Умови отримання суспензії.

Суспензійна культура рослин – це поодинокі клітини або їх агрегати, що вирощуються в рідкому поживному середовищі у підвищеному стані та при умовах постійної аерації та перемішуванні.

Головними перевагами вирощування клітин глибинним методом у рідкому середовищі перед вирощуванням калюсу поверхневим методом на агаризованому середовищі є: полегшений вплив на метаболізм, ріст та розвиток клітинних популяцій, суспензійна культура дає можливість для біохімічних і молекулярно-біологічних досліджень. [23]

Зазвичай, суспензійну культуру одержують шляхом занурення шматочку калюсної тканини в рідке поживне середовище, що перемішується.

Калюс повинен легко розпадатись на клітини (тобто фрагментуватись) та бути пухким. Також, іноді, суспензійну культуру клітин одержують з безпосереднього фрагменту органа рослини (експланта) – стебла, листки, коріння, методом занурення його у рідке середовище. Утворюється дедиференційована калусна тканина на експланті та, через деякий час, калюс відокремлюється і розпадається на агрегати різного розміру та окремі поодинокі клітини. Для полегшення фрагментації клітин, до середовища додають ферменти, наприклад пектиназу.

Даний фермент забезпечує руйнування пектат кальцію, що має здатність склеювати клітини.

Також, однією з основних умов при культивуванні в рідкому середовищі – це умови аерації та постійного перемішування. Для досягання цих



умов, колбу з суспензійною культурою поміщають на шейкер зі швидкістю перемішування 100-120 об/хв. (рис.2.3)

Рис. 2.3. Приклад шейкери KS 130 basic.

В основному, клітинні суспензії вирощують на живильних середовищах того ж складу, що і калусні тканини, так як суспензійні культури представлені калусними клітинами і мають властивості, характерні для типу цих клітин. Тому для досягнення пухкосо типу калусу, що легко розділяється та підтримки поділу калусних клітин, в рідкому середовищі повинні бути присутні певне співвідношення регуляторів росту та розвитку рослин. Зокрема, до поживного середовища додають високі концентрації фітогормонів ауксинового типу (наприклад, 2,4Д - 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота), а концентрації

фітогормонів цитокинінової природи зменшують, або їх взагалі вилучають з середовища.

В даній роботі для культивування суспензійної культури *L. angustifolia* нами було обрано рідке поживне середовище наступного складу:

Компоненти	Кількість на 0,5 л
Макро MS	50 мл
Мікро MS	0,5 мл
Вітаміни MS	0,5 мл
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50 мг
Fe-хелат	2,5 мл
Інозитол	0,05 г (50мг)
Сахароза	15 г
2,4-D	1,5 мл
Гліцин	0,5 мл
pH	5,7-5,8

Оскільки, клітини рослин розмножуються не так швидко як мікроорганізми, то час подвоєння їхньої кількості може становити від 1 до 3 діб. Тому, для досягання біомасою рослинних клітин стаціонарної фази росту – фаза максимального показника сухої біомаси, необхідно зазвичай 2-3 тижні. В результаті, в зв'язку виснаження середовища та наявності в ньому великої кількості продуктів життєдіяльності популяції, необхідно пересівати культуру на свіже культуральне середовище. Тому, тривалість пасажування при культивуванні суспензій становить 14-18 діб. В цей проміжок часу густина популяції сягає 10^6 – $5 \cdot 10^6$ клітин на 1 мл. [20,23]

Послідовність етапів для отримання суспензійної культури *L. Angustifolia*

1. Приготували рідке поживне середовище, об'ємом 0,5 л, вищевказаного складу, та розлили у термостійкі колби Ерленмеєра, об'ємом 250 мл, які щільно накрили фольгою, стерелізували в автоклаві при температурі 121, тиск 1 атм., 40 хв.

2. В ламінар-боксі дістали з пробірки на чашку Петрі рослини *L. angustifolia*, з яких отримали експланти (листя, стебла та корені). Пошкодили їх надрізами скальпелем та внесли в рідке поживне середовище в колби Ерленмеєра.

3. Колби помістили на качалку шейкерного типу, швидкість обертання якого була 120 об/хв, температура вирощування $+24^{\circ}\text{C}$, при умовах темряви.

4. Після утворення на експлантах калюсної тканини, культуру профільтрували крізь нейлон для кращого розділення клітинних агрегатів та відділення залишків експлантів. До отриманого фільтрату доливали свіже рідке середовище, того ж складу.

5. Колби з суспензійною культурою знову поміщали на шейкер при таких же оборотах та умовах.

6. Пасажування суспензії (субкультивування) на свіже поживне середовище проводили через кожні 18 днів.



Рис. 2.4. Стерильне рідке поживне середовище в колбах Ерленмеєра.

2.4. Методи кількісної оцінки суспензійної культури.

Ріст суспензійної культури *L. angustifolia* можна оцінити за декількома кількісними параметрами: життєздатність клітин, кількість клітин в одиниці об'єму (щільність в культурі), сира та суха маса, пігментація швидкість росту.

Сирю і суху масу культури клітин зважують декілька раз через певні проміжки часу. Методика зважування сирої та сухої маси наступна:

1. За допомогою стерильної піпетки відбираємо пробу суспензійної культури об'ємом 1 мл та переносимо до пробірки
2. Центрифугуємо на повній швидкості протягом 1 хв
3. Шприцом об'ємом 1 мл видаляємо всю рідину, що залишилося зверху.
4. Зважуємо пробірку з клітинами та віднімаємо масу тари

Сушу масу визначаємо аналогічно, але перед зважуванням, клітини сушать разом з фільтром в термостаті при 60°C до досягання постійної маси. [24]

Ростовий індекс клітин калусного типу (відносний приріст маси суспензійної культури) визначається за формулою:

$$I = (W_t - W_0) / W_0,$$

де I – ростовий індекс, W_t – початкова маса клітин, W_0 - маса через певний час культивування t.

Життєздатність клітин також дуже важливий показник для кількісних параметрів суспензійної культури. Даний показник визначаємо методом оцінки співвідношення кількості живих клітин до загальної їх кількості.

Життєздатні культури характеризуються рухом цитоплазми та присутністю клітин з ядрами при їх фарбуванні 0,1% водним розчином метиленового синього протягом 2 хв.

Підрахунок кількості клітин методом Брауна (щільності суспензії), збільшення біомаси суспензійної культури відбувається або за рахунок поділу клітин, або за рахунок їх розтягнення. Тому підрахунок кількості в одиниці об'єму дає змогу визначити, які саме процеси переважають при зростанні значення ваги біомаси [22]. Методика проведення підрахунку наступна:

1. Перед безпосереднім підрахунком, вміст колби з культурою ретельно, але обережно перемішують, щоб досягти рівномірного розподілу клітин по об'єму. В ламінар-боксі, стерильною піпеткою відібрати невелику кількість проби суспензійної культури.

2. Краплю суспензії розташовують на предметне скло з лічильтком сітки камери Горяєва, накривають покривним скельцем, при цьому притирають його до бічних граней сітки, аж поки не з'являться кілеця Ньютона. При великому збільшенні під мікроскопом (x30) проводиться підрахунок формених елементів (клітин) над великим квадратом. (рис.).

3. Після підрахунку кількості клітин, можна вирахувати щільність даної суспензійної культури за наступною формулою:

$$X = M \cdot 2,5 \cdot 10^5,$$

де X- це кількість формених елементів/л; M – це кількість менних елементів над квадратом.

4. Для повторення підрахунку клітин, камеру промивають дистильованою водою або 70-% етиловим спиртом, висушують фільтрувальним папером та знову заповнюють суспензією [22].

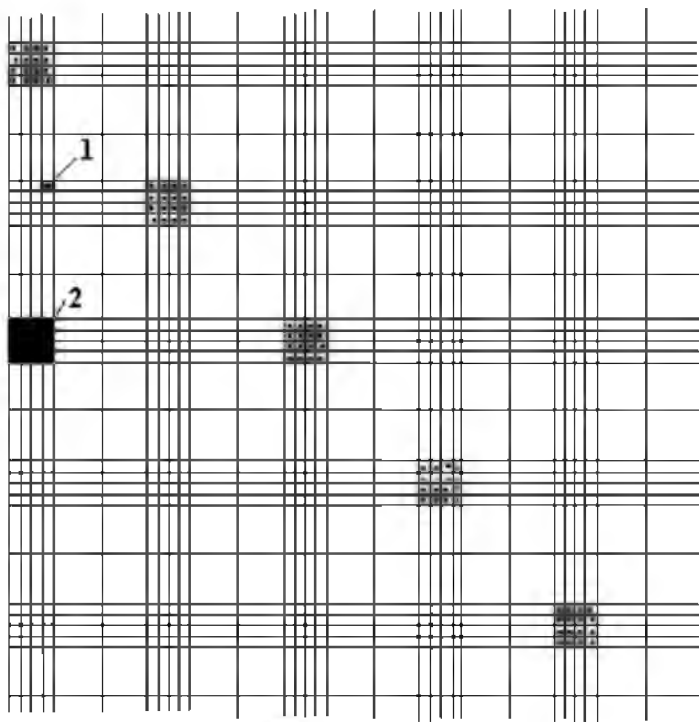


Рис. 2.5. Розмірна сітка камери Горяєва, 1 – малий квадрат, 2 – великий квадрат.[25]

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ

3.1. Ефективність стерилізації насіння та умов введення культуру *in vitro*.

На ефективність стерилізації насіння рослин при введенні в культуру *in vitro* впливає факторів. Крім фізичних чинників, перешкоджання процесу проростання та нерівномірність розвитку рослин *Lavanda angustifolia* можуть спричинити і біологічні особливості, такі як стан спокою насінини. Стан спокою не дає можливості проростати насінині через внутрішні умови, навіть якщо зовнішні, такі як температура, вологість та атмосфера, є оптимальними. У таких випадках не активується гідроліз ендосперму і, намагаючись вирішити цю проблему, застосовують регулятори росту та розвитку рослин. Зазвичай насіння лаванди досить довгий період часу зберігає свою схожість. [17]

В нашій роботі було введено в умови *in vitro* культуру *Lavanda angustifolia* методом поверхневої стерилізації насіння на модифікаційне середовище MS з додаванням фітогормонів цитокінінового типу 6-БАПв концентрації 0,1 та 0,5 мг/л. Оскільки насіння лаванди дрібне, всього було посаджено 60 насінин по 3 насінини у флакон.(рис.3.1.)

НУ
НУ
НУ



Рис.3.1. Асептичне насіння рослин *Lavanda angustifolia*.

Через 2 тижні було оцінено ефективність обраного методу поверхневої стерилізації насіння. По одній насінині в двох флаконах було виявлено ознаки грибокового зараження, тому вважаємо, що два флакони (6 насінин) є не придатними для подальшого дослідження.

Розраховали відсоток зараженого насіння:

$$\begin{aligned} 60 \text{ насінин} &= 100\% \\ 6 \text{ заражених} &= X\% \end{aligned}$$

$$X = 6 * 100 / 60 = 10\% \text{ зараженого насіння від загальної кількості.}$$

Ефективність стерилізації становить: $100\% - 10\% = 90\%$, що являється достатньо високим показником.

Через 18 днів спостерігалось початок проростання перших насінин лаванди вузьколистої (рис. 3.2. А,Б).

НУ
НУ
НУ



Рис. 3.2. А – Культура *L. angustifolia* на 18 день, Б – 3-тижневі рослини

Загалом, ми отримали 32 рослини *L. angustifolia*, успішно введені в умови *in vitro*, що характеризувалася хорошим ростом та розвитком. (рис.3.3)



Рис.3.3. Асептичні рослини лаванди вузьколистої через 3 місяці

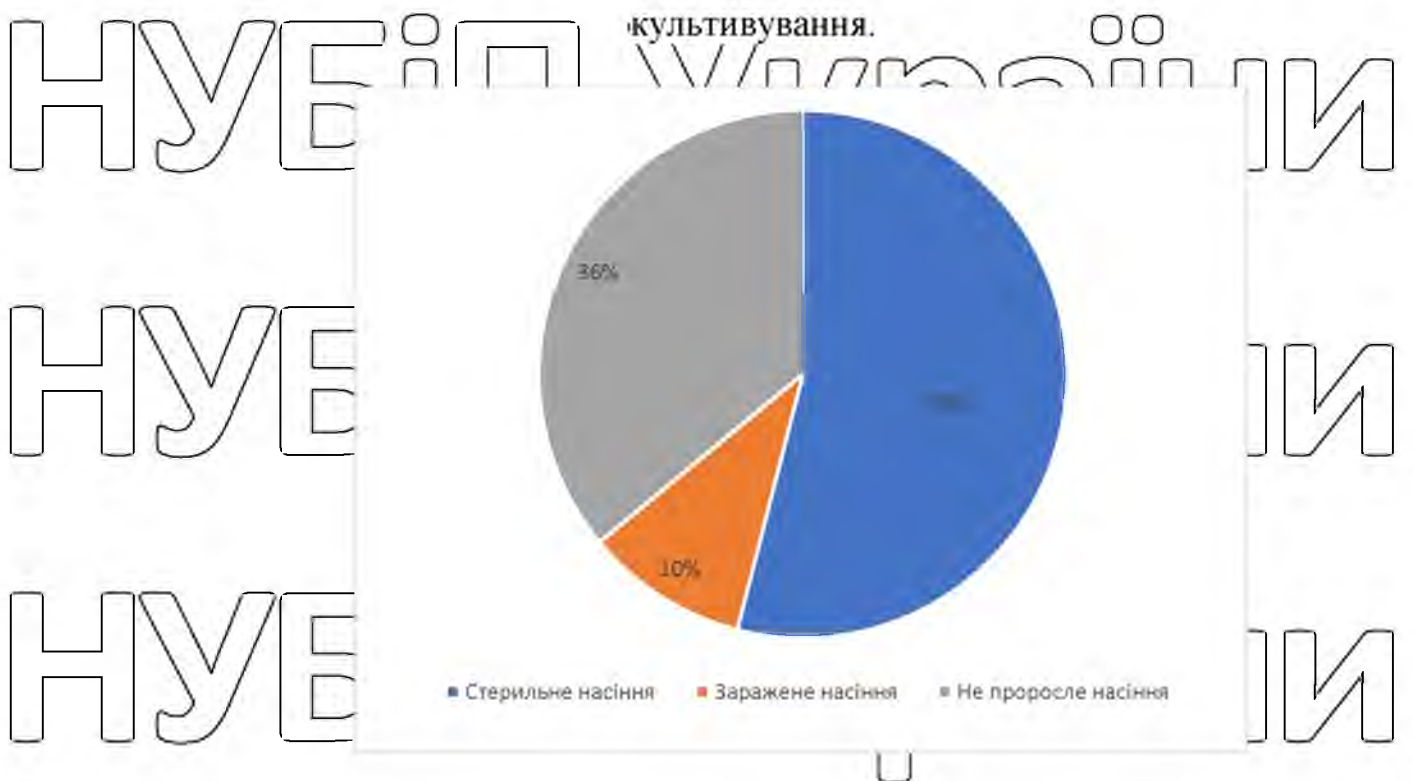


Рис.3.4. Відсоткове співвідношення між стерильними пророслим, зараженим і непророслим насінням

Отже, найкращим для росту і розвитку культури *L. angustifolia* виявилася середовище MS з додаванням 0,5 мл цитокініну 6-БАП. Згідно з результатами,

відсоток схожого насіння становив 54 %, що є досить низьким показником. Для підвищення відсотка схожості насіння можна використовувати метод попередньої обробки їх гіберелінами.

3.2. Результати та оцінка калосу та суспензійної культури *L. angustifolia*

Калусна тканина – це поліферуюча, неорганізована тканина рослинного походження, яка складається з недиференційованих клітин. Даний тип клітин можливо отримати з будь якої тканини чи органу рослини, використовуючи різні методи *in vitro*. [26]

Для ініціації калусогенезу, в даній роботі, ми використовували рідке живильне середовище MS з додаванням 3 мл/л регулятора росту ауксинового ряду – 2,4-Д. В якості експланту ми використовували листки, стебла та корені з культури *L. angustifolia in vitro*, методом занурення їх в живильне середовище (рис.3.5.).



Рис. 3.5. Введення експлантів в рідке поживне середовище з 2,4-Д для індукції калусогенезу.

Утворення первинного калюсу на експлантах спостерігали через 30 днів з моменту введення в рідке середовище. (рис.3.6.)



Рис. 3.6. Утворення первинного калюсу культури *L. Angustifolia* в рідкому середовищі.

Нам було здійснена якісна оцінка калюсу культури *L. Angustifolia*. Калюсна тканина характеризувалася аморфністю, не мала конкретної анатомічної структури, за щільністю клітин, класифікували як калюсну тканину пухкого типу, що легко піддавалася розділенню на окремі малі клітинні агрегати. Колір кремовий або кремово-коричневий. В зв'язку з цим, можна зробити висновки, що рідке середовище з додаванням 2,4-Д добре підходить для ініціювання калюсу пухкого типу. Даний тип є найкращим для отримання суспензійної культури.

Суб-культивування на свіже живильне середовище того ж складу було проведено через 3 тижні культивування калюсної тканини, попередньо профільтрувавши її через нейлон для розділення агрегатів клітин на дрібні. Культивування суспензії проводилось на качалці шейкерного типу (120об/хв), при температурі +24 °С. За ступенем агрегованості оцінили суспензію як дрібноагреговану, адже, в загальному, культура складалася з окремих

поодиноких клітин та невеликих агрегатів. (рис.3.7). В основному клітини калюсу належали до меристематичних та паренхімних типів. Більша частина клітин були оводненними, вакуалізованими та розділені великими міжклітинниками. Форма клітин округла, ядра були достатньо виражені. (рис.3.8)



Рис.3.7. Суспензійна культура *Lavandula angustifolia*

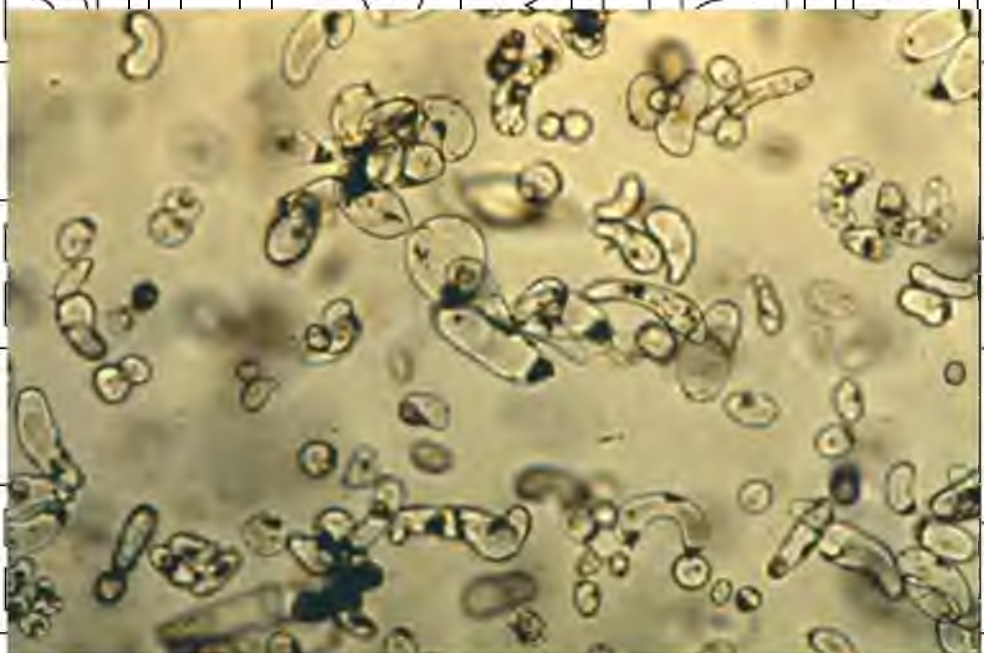


Рис 3.8. Капоєні клітини в суспензійній культурі *Lavandula Angustifolia*

3.3. Результати кількісної характеристики отриманої суспензійної культури *Lavandula Angustifolia*.

Кількісні параметри росту та характеристики знімалися з проб суспензійної культури *Lavandula angustifolia* кожні 7 днів.

Оцінку життєздатності проводили методом фарбування клітин 0,1% водним розчином метиленового синього. За отриманими значеннями зробили висновок, відсоток життєздатних клітин під час всього періоду культивування дорівнював $83\% \pm 1\%$ (рис. 3.9).

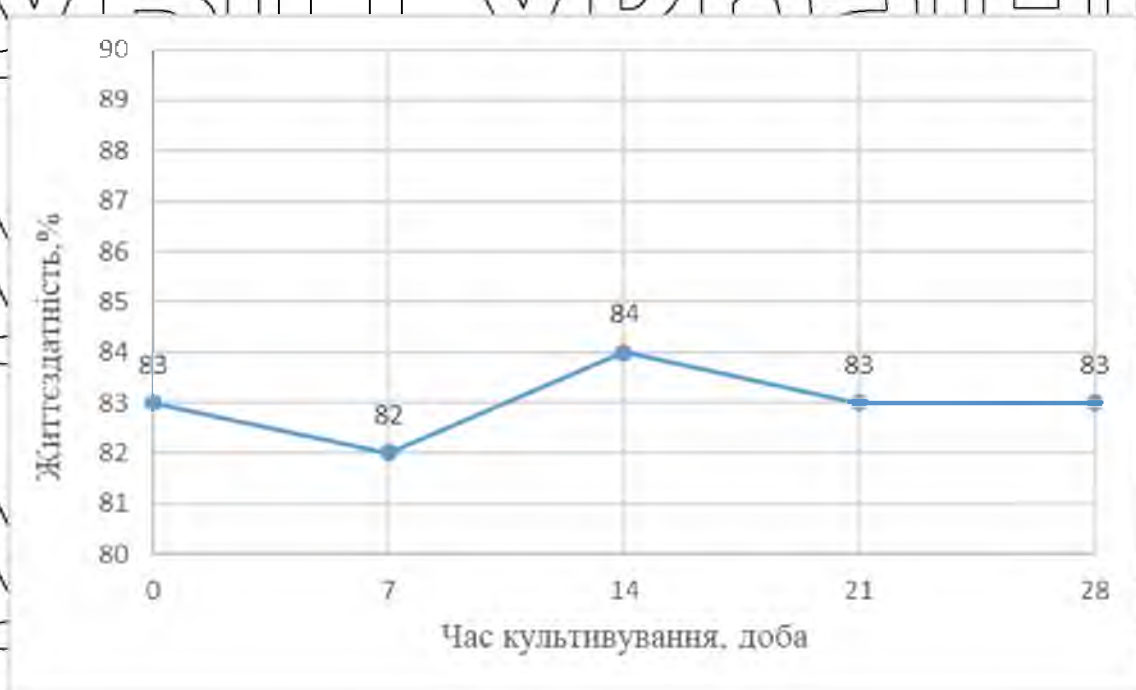


Рис. 3.9. Графік життєздатності клітин в різний період культивування.

Проаналізувавши динаміку зміни кількості клітин, накопичення сирої та сухої біомаси в різні періоди культивування суспензійної культури *Lavandula angustifolia* вирахували кількісні параметри росту культури. Питома швидкість росту (μ , доба^{-1}) для кількості клітин становила 0,11; для сирої біомаси – 0,13; для сухої біомаси – 0,13. (рис.3.10)

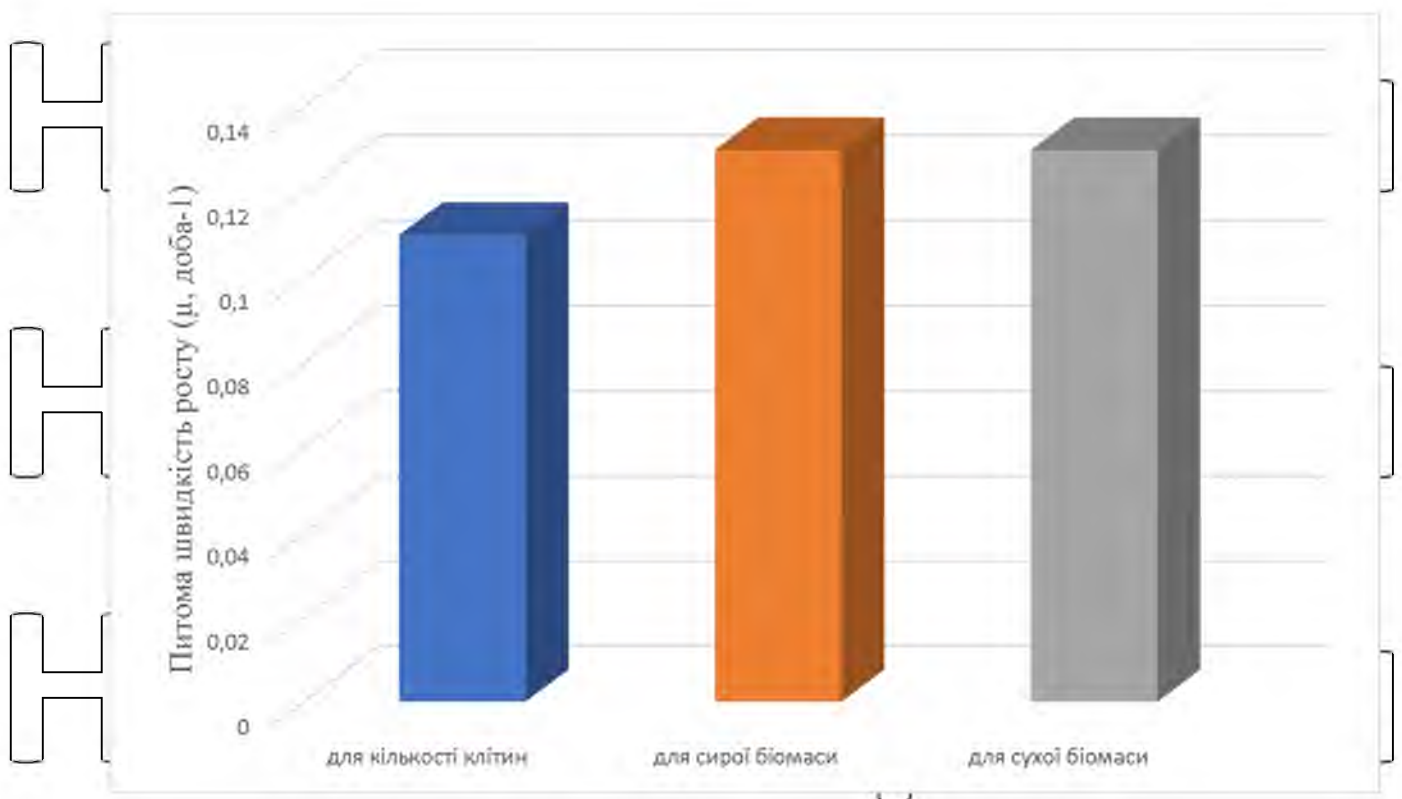


Рис. 3.10. Діаграма питомої швидкості росту (μ , доба⁻¹) для різних параметрів росту суспензійної культури.

Також нами було встановлено час подвоєння культури клітин — параметр, що вказує за який період часу відбувається подвоєння кількості клітин. Для отриманої суспензійної культури цей час становив 4,5 діб. Розрахували індекси росту суспензійної культури за кількістю клітин дорівнює $2,65 \pm 0,7$; за сировою біомасою - $3,01 \pm 0,9$, за сухою біомасою - $3,32 \pm 0,8$. (рис. 3.11).

НУ
НУ
НУ

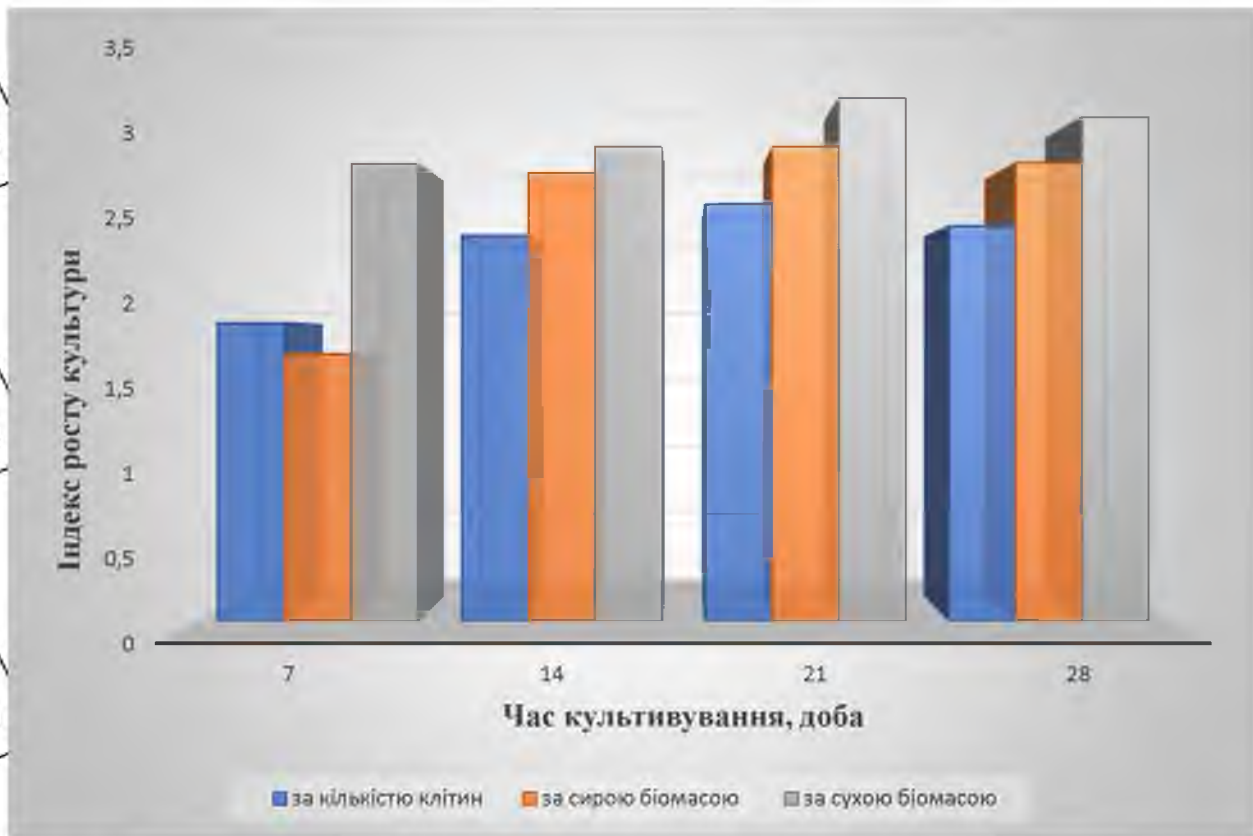


Рис. 3.11. Діаграма ростових індексів суспензійної культури *Lavandula Angustifolia* за різний період часу.

Розбіжності по ростовим індексам не є суттєвими, тому робимо висновок про стабільність отриманої суспензійної культури *Lavandula Angustifolia*.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВИСНОВКИ:

За результатами опрацьованої літератури та проведеного нами дослідження, можемо зробити наступні висновки.

1. Отримано асептичні рослини *Lavandula angustifolia* Mill. шляхом поверхневої стерилізації насіння хлоридовмісним розчином «Білизна» у концентрації 25%. Коефіцієнт схожості насіння становив 54%, що не є достатнім показником, тому доцільним є застосування методу попередньої обробки насіння гібереліновою кислотою.

2. Визначено оптимальні умови вирощування та склад живильного середовища. Такими умовами є середовище Мурасиге та Скуга з додаванням регулятора росту цитокінінового типу – 6-БАН, у кількості 0,5 мг/л для культивування асептичних рослин *Lavandula angustifolia*.

3. Показано, що додавання регулятора росту ауксинового ряду – 2,4 – Д, до рідкого живильного середовища Мурасиге та Скуга у концентрації 3 мг/л є оптимальним для ініціювання калусогенезу та утворення калюсу пухкого типу *Lavandula angustifolia*. Калюс було отримано через 30 днів після введення експлантів в рідке поживне середовище та культивування в колбах на шейкері при 120 об/хв, 24 °С.

4. Отримано суспензійну культуру *L. Angustifolia*, яка за ступенем агрегованості характеризується як дрібноагрегована, оскільки складається з окремих поодиноких клітин та невеликих агрегатів. Клітини були оводненими, наявні великі вакуолі та виражені ядра, між собою були розділені великими міжклітинниками.

5. Виміряно та розраховано кількісні характеристики суспензійної культури *L. angustifolia*: в середньому життєздатність клітин становила 83%; питомі швидкості росту на добу для кількості клітин становила 0,11; для сирої біомаси – 0,13; для сухої біомаси – 0,13; індекси росту за кількістю клітин дорівнює 2,65+/- 0,7; за сирою біомасою - 3,01+/-0,9; за сухою біомасою - 3,32+/-

0.8. Дані показники вказують на стабільність отриманої суспензійної культури

Lavandula Angustifolia.

НУБІП УкРАЇНИ

НУБІП УкРАЇНИ

НУБІП УкРАЇНИ

НУБІП УкРАЇНИ

НУБІП УкРАЇНИ

НУБІП УкРАЇНИ

НУБІП УкРАЇНИ

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

НУБІП УКРАЇНИ

1. Солодовниченко Н. М. Лаванда вузьколиста (Л. лікарська, Л. справжня, Л. колоскова) // Фармацевтична енциклопедія / гол. ред. ради та автор передм.

В. П. Черних. – К.: «МОПІОН», 2005. – 848 с

2. *Lavandula angustifolia* Taxonomy PubChem (nih.gov)

3. Morphological, anatomical and phytochemical characterizations of *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas* Growing in Turkey Sevim Küçük¹, Ayhan Altıntaş², Betül Demirci², Fehmiye Koca¹, Kemal Hüsnü Can Başer³

4. Chemical Composition and Larvicidal Activity of *Lavandula angustifolia* Subsp. *angustifolia* and *Lavandula dentata* Spp. *dentata* Essential Oils against *Culex pipiens* Larvae, Vector of West Nile Virus (Chemical Composition and Larvicidal Activity of *Lavandula angustifolia* Subsp. *angustifolia* and *Lavandula dentata* Spp. *dentata* Essential Oils against *Culex pipiens* Larvae, Vector of West Nile Virus (hindawi.com))

5. Навчальне видання Біотехнологія рослин: КЛЯЧЕНКО ОКСАНА ЛЕОНІДІВНА, 2009

6. d de Bona, Claudine M.; Santos, Gabriel D.; Biasi, Luiz A. *Lavandula calli* induction, growth curve and cell suspension formation *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, vol. 7, núm. 1, 2012, pp. 17-23

7. Nutrient Medium Optimization for Rosmarinic Acid Production by *Lavandula vera* MM Cell Suspension Atanas I. Pavlov,* Mladenka P. Ilieva, and Ivan N. Panchev. 2000

8. : M.I. Georgiev & A.I. Pavlov (2009) Physiological Peculiarities of *Lavandula Vera* MM Cell Suspension Culture in Stirred Tank Reactor, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*

9. Exploring Pharmacological Mechanisms of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Essential Oil on Central Nervous System Targets. López V, Nielsen B, Solas M, Ramírez MJ, Jäger AK, 2017

- Н 10. Lavandula angustifolia L. plants regeneration from in vitro leaf explants-derived callus as conservation strategy, L. Devasigamani, R. Loganathan, Biotechnología Vegetal Vol. 20 No. 2: 75 - 82, 2020
- Н 11. Mill, R.R. (1982). Lavandula L. In: P.H. Davis (Ed.) Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 7, Edinburgh University Press, 76-78.
- Н 12. Zuzarte MR, Dinis AM, Cavaleiro C, Salgueiro LR, Canhoto JM. Trichomes, essential oils and in vitro propagation of Lavandula pedunculata (Lamiaceae). Ind Crop Prod 2010;32:580–7.
- Н 13. Gonçalves, Sandra; Romano, Anabela (2013). *In vitro culture of lavenders (Lavandula spp.) and the production of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 31(2), 166–174.*
- Н 14. Keykha, Fatemeh; Khadem, Azade; Bagheri, Abdolreza; Sharifi, Ahmad; Ameri, Maryam (2015). Optimization of lavender (Lavandula angustifolia) callus culture. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 24(2), 279
- Н 15. Parkash V and Singh H (2013) Lavandula angustifolia L. (lavender): An important aromatic medicinal shrub and its in vitro micro-propagation for conservation. J. Agril, Technol. 9: 701-712.
- Н 16. Prusinowska, Renata & Śmigielski, Krzysztof. (2014). Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (Lavandula angustifolia L). A review. Herba Polonica. 60. 10.2478/hepo-2014-0010.
- Н 17. J. Segura, M.C. Calvo. Lavandula spp. (Lavender): In Vitro Culture, Regeneration of Plants, and the Formation of Essential Oils and Pigments, Biotechnology in Agriculture and Forestry 15, Medicinal and Aromatic Plants III, 1991
- Н 18. Maathuis, Frans J.M. (2013). Plant Mineral Nutrients // Plant Cell Suspension Cultures. , (Chapter 5), 77–93.
- Н 19. Методичні рекомендації. СУЧАСНІ МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЇ В РОСЛИННИЦТВІ, Т. М. Манушкіна, 2017
- Н 20. Біотехнологія рослин, Курс лекцій, Кляченко О.Л., 2009, Київ - 28, а. с. 2

21.М.Д. Мельничук, О.Л. Кляченко, Ю.В. Коломієць, І.О. Антіпов
Біотехнологія: Практикум. – К.: ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2013. – 120 с.

22.М.Д. Мельничук, О.Л. Кляченко Біотехнологія в агросфері. Навчальний
посібник для студентів вищих навчальних закладів. – Київ, 2014. – 247 с.

23.Л. О. Рябовол, Я. С. Рябовол КАЛЮСНА КУЛЬТУРА ТА КУЛЬТУРА
КЛІТИННИХ СУСПЕНЗІЙ Методичні рекомендації для проведення
лабораторно заняття аспірантам з дисципліни «Біотехнологія в селекції і
насіництві сільськогосподарських культур» зі спеціальності 201
«Агрономія» освітнього рівня доктор філософії. Умань: УНУС, 2020. 18 с

24.Loyola-Vargas, Víctor M.; Vázquez-Flota, Felipe (2005). Plant Cell Culture
Protocols Volume 0 || Callus and Suspension Culture Induction, Maintenance,
and Characterization.

25.С.В. Шмалей М.І. Гайдай Ю.В. Кравченко О.М. Гасюк, МЕТОДИЧНІ
РОЗРОБКИ ЛАБОРАТОРНИХ ЗАНЯТЬ З ФІЗІОЛОГІЇ ЛЮДИНИ ТА
ТВАРИН (частина II), від 8.01.2002.

26.Кляченко О. Л., Коломієць Ю.В., Нилипенко Л. А., Постєєнко В. О.,
Екологічна біотехнологія та біоінженерія. К.: ЦП «Компринт», 2018. 567 с.

27.Du, B., & Rennenberg, H. (2018). Physiological responses of lavender
(*Lavandula angustifolia* Mill.) to water deficit and recovery. South African
Journal of Botany, 119, 212-218.

28.Георгієва Є. І. Вплив концентрації цитокинінів і ауксинів на ріст і розвиток
лаванди (*Lavandula Angustifolia* mill.) в умовах *in vitro* / Є. І. Георгієва //
Студентський науковий вісник [МНАУ]. Сільськогосподарські науки. -
2018. -Вип. 1 (11). - С. 46-53.

29.Латушкіна Т. М. Перспективи використання та особливості розмноження
в культурі *in vitro* *Lavandula angustifolia* Mill. / Т. М. Латушкіна, А. В.
Дробітько // Вісник аграрної науки Причорномор'я. – 2007. – Вип. 2. – С.
223/227.