МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА

Факультет агрономії

Кафедра агрохімії і ґрунтознавства

ДОПУЩЕНО ДО ЗАХИСТУ

«_____»_____2024 р.

Зав. кафедри, к. с.-г. н. доцент

_____ Олена ЧЕРНО

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
ступеня вищої освіти магістр

РОЗМНОЖЕННЯ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ КАШТАНА ЇСТІВНОГО (*CASTANEA SATIVA* L.) *IN VITRO* В НАВЧАЛЬНО-НАУКОВІЙ ЛАБОРАТОРІЇ «БІОТЕХНОЛОГІЇ» УНУС

Виконав: студент ІІ курсу, групи 23м-а
спеціальності 201 Агрономія
ВОЛОШИН Назарій Вікторович
Керівник:
СЕРЖУК Олександр, к. с.-г. н., доцент

ЗМІСТ

		стор.
ВСТУП ……		3
РОЗДІЛ 1.	**СУЧАСНИЙ СТАН ТА ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ КАШТАНА ЇСТИВНОГО В УКРАЇНІ (огляд літератури)** ……	5
	1.1. Каштана їстивного (систематика, походження) та його значення…….....	5
	1.2. Перспективи розвитку каштанових садів в Україні …	7
	1.3. Прискорене розмноження вихідного матеріалу каштана їстивного ……...	9
РОЗДІЛ 2.	**ОБЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ** ……..……	14
	2.1. Ботанічна і біологічна характеристика Каштана їстивного ……...	14
	2.2. Особливості досліджуваних видів каштана ……	17
РОЗДІЛ 3.	**УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ** ……	20
	3.1. Лабораторні умови й методика проведення досліджень.	20
	3.2. Схема досліду ……..……...	22
РОЗДІЛ 4.	**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ** ……...…	23
	4.1. Розробка технологій стерилізації експланту (насіння, живців)……	23
	4.2. Удосконалення складу живильного середовища для розмноження ……..	32
РОЗДІЛ 5.	**ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА** ……	39
ВИСНОВКИ ……...		47
РЕКОМЕНДАЦІЇ СЕЛЕКЦІЙНІЙ ПРАКТИЦІ ……		48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ……...		49
ДОДАТКИ ……...		55

ВСТУП

Рід Каштан (*Castanea* (Tourn.).) належить до родини Букових (*Fagaceae*), який включає близько 14 видів однодомних, роздільностатевих листопадних дерев або кущів. Вперше цей рід був описаний Турнефором у 1700 році. Згодом К. Ліней (1753) об'єднав його види в склад роду *Fagus*. У 1759 році Міллер знову запропонував його як самостійний рід *Castanea,* що отримало загальне визнання ботаніків.

Промислове виробництво багатьох малопоширених, але цінних, таких як каштан, рослин, стримується недостатньою інформованістю населення про корисні їх властивості, невеликою кількістю сортів і гібридів, що внесені до Реєстру сортів рослин України [1-3].

Актуальність теми. Перші описи каштана їстивного у флорі України були зроблені в XIX столітті переважно в лісах Закарпаття та в Криму. В інших регіонах країни каштан їстівний зустрічається лише в ботанічних садах.

Каштана їстивного вивчався багатьма авторами основною метою яких було вивчення умов зберігання та проростання насіння каштану в умовах бувшого Центрального ботанічного саду академії наук УРСР.

Багаторічними дослідженнями, проведеними Клименко С.В. підтверджено, що каштан може витримувати метеорологічні умови усіх ареалів України, де поширений горіх волоський. Це дає підстави більш глибокого вивчення каштану та інших близьких видів як горіхоплідної так і декоративної культури.

Однак, враховуючи господарсько-цінні ознаки каштана їстивного, актуальним залишається опрацювання широкого кола питань, пов'язаних з вивченням внутрішньовидового поліморфізму регенераційної здатності *in vivo* та *in vitro*. Вивчення регенераційних процесів *in vivo* каштана їстивного та культивування його в культурі *in vitro* дозволить значно збагатити рослинні ресурси України новими цінними матеріалами.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше для представників роду *Castanea* Mill. як елемент технології розмноження садивного матеріалу каштану, а також найбільш цінних вихідних селекційних матеріалів відпрацьована

техніка *in vitro* з удосконаленими нами живильними середовищами DKW_{48}, MS_{31}, WPM_{40} та MS_{68}.

Практичне цінність одержаних результатів. На основі результатів досліджень підтверджено можливість мікроклонального розмноження генотипів каштана їстивного.

Матеріали досліджень використано в Національному дендрологічному парку „Софіївка” НАН України.

Апробація результатів досліджень. Основні результати досліджень обговоренні на студентських гуртках та засіданні кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології. Оформлено у вигляді тезісів (Мікроклональне розмноження нетрадиційних плодових культур) і подано до друку в збірник матеріалів VII-ї Міжнародної наукової конференції «Селекційно-генетична наука і освіта (Парієві читання)».

РОЗДІЛ 1.
СУЧАСНИЙ СТАН ТА ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ КАШТАНА ЇСТИВНОГО В УКРАЇНІ (огляд літератури)

1.1. Каштан їстівний систематика, походження та його значення

Рід Каштан (*Castanea* (Tourn.).) належить до родини Букових (*Fagaceae*), який включає близько 14 видів однодомних, роздільностатевих листопадних дерев або кущів. Вперше цей рід був описаний Турнефором у 1700 році. Згодом К. Ліней (1753) об'єднав його види в склад роду *Fagus*. У 1759 році Міллер знову запропонував його як самостійний рід *Castanea,* що отримало загальне визнання ботаніків.

За Ю.Л. Меницьким рід *Castanea* Mill нараховує близько 12 видів, з яких у культурі вирощують п'ять видів каштана: *Каштана їстивного* — каштан їстівний, *C. dentata* — каштан зубчатий, *C. crenata* — каштан городчатий, *C. mollissima* — каштан м'який та *C. pumila* — каштан низькорослий. Всі ці види використовують як плодові дерева. З них перші три види дали початок головним культурним сортам; другі два види використовували в основному у схрещуваннях.

Соматичне число хромосом 2n = 24. Однак серед самосіву та посадок виявлені поліплоїдні форми.

Геологічні дані про рід *Castanea* не дають повної оцінки його еволюції. C.S. Sargent вважає що до середини третинного періоду рід існував у Північній Гренландії та на Алясці, де були знайдені сліди листків та плодів *Castanea Ungeri Heef.* Відбитки листків одного, а можливо двох видів, знайдені в міоценових породах Орегону та в породах пізнього міоцену в Колорадо, вказують, що рід, який ріс в Європі ще в крейдовий період колись був розповсюджений на заході Північної Америки, де він зараз не зустрічається.

До кінця третинного періоду рід *Castanea* був розповсюджений у Європі від Арктичної області до Середземного моря, в Америці — від Гренландії до Техасу та в Азії — від малої Азії до острова Сахалін.

Р.А. Джейнс стверджує, що батьківщиною каштанів були країни Сходу. Там росте каштан китайський (*C. mollissima*). В Японії та Кореї

розповсюджений каштан японський (*C. crenata Sieb.*) поширення якого на заході Європи дало початок каштану їстівному (*Каштана їстивного*). Вперше його введено в культуру в 1575 р.

Батьківщиною каштана їстивного Mill. є Мала Азія, з якої він був завезений у Європу і поступово поширився в Греції, а пізніше в Італії, Іспанії та Франції. У дикому стані росте на Кавказі, Середземномор'ї (крім Сірії, Палестини і Єгипту), Південній Швейцарії, Франції, Італії, Греції. На Кавказі має розірваний ареал, переважно на південних схилах Головного Кавказького хребта, досить вузькою смугою, віддаленою від берега, на висоті до 700-1800 м над рівнем моря, переважно на затінених схилах.

Сучасне поширення каштана (*Каштана їстивного* Mill.) представлено трьома відокремленими ареалами: середземноморським, який простягається від Атлантичного побережжя Європи до Каспійського моря, східноазійським, який охоплює північну частину Азії, зокрема східний Китай, Корею і Японію, і північноамериканським, який займає східну частину США.

В кожному з них зростають ендемічні види каштана, зокрема у середземноморському – *C. sativa* Mill., східноазійському – *C. mollissima* Blume, *C. crenata* Sieb. et Zucc., *C. seguinii* Dode, *C.henryii* Rehd. et Wils та північноамериканському – *C. dentata* Borkh., *C. pumilla* Mill. (в південній частині ареалу росте, крім того, декілька низькорослих видів каштана, надзвичайно близьких до *C. pumilla*, які мало поширені і не мають господарського значення: *C. aschei* Sudw., *C. floridana* Asche, *C. ozarkensis* Asche, *C. alnivolia* Nutt., *C. paucispina* Asche).

В Україну каштан їстівний інтродукований в першій половині XIX ст., як декоративне дерево, що вирощується у парках, садах та вздовж доріг (переважно на Півдні України). У лісовій культурі на Україні каштан їстівний зростає у Закарпатті (в містах Берегово, Мукачево) – віком від одного до 100 років і більше, Вінницькій та Одеській областях – до 70 років. Окремими деревами і групами зустрічається в парках і присадибних ділянках у західних областях України [4].

1.2. Перспективи розвитку каштанових садів в Україні

Походження культурного каштана їстивного легко пов’язується з дикорослим каштана їстивного. На спонтанне походження каштана їстивного від дикорослого вказує ряд авторів (А.А. Гросейм (81), А.К. Сейїдов, Ф.Н. Касумова (26,245) та інші). Оскільки *Каштана їстивного* не пройшов довгого шляху селекції, ми не спостерігаємо таких разючих відмінностей культурних форм від дикорослих, як у інших плодових. Каштан їстівний являється рідкою породою на Україні, зустрічається в якості додавання в дубових лісах та невеликими насадженнями [5].

Вивчення акліматизації та інтродукції каштана їстивного на Україні має вікову давність. Поблизу с. Куклябаня Берегівського району Закарпатської області вік каштана їстивного більше 100 років. Старі каштанові дерева можна зустріти в західних областях, а також на Поділлі,. На Південному березі Криму та в Одеській області. В Києві в Ботанічному саду імені О.В. Фоміна каштана їстивного росте протягом 100 років.

С.С. Харкевич та В.І. Чопик згадують гаї каштана їстивного в Закарпатті по пониззях і передгірському лісовому поясі. Вони вважають, що колись висіяні й вирощені к каштана їстивного в теперішній час розселяються за допомогою птахів та тварин, самосівом і входять до складу місцевої флори.

Біля с. Щасливого Мукачівського району в Нижньо-Вязницькому лісництві за даними М.А. Федорова каштана їстивного росте на площі 3 га. Дане угрупування налічує близько 180 дерев, які досягають висоти 24м та до 2м в діаметрі з щорічною урожайністю більше 1000 кг [6].

Мукачівський лісокомбінат з успіхом вирощує каштана їстивного в мішаних лісокультура з породами, які ростуть більш повільно. Зараз ці культури займають площу більше 100 га.

У 1965 році на Веселооковеньківській селекційно-дендрологічній дослідній станції було посіяна насіння каштана їстивного мукачівського походження. Посів здійснювали рядовим способом на постійне місце після

зимової стратифікації. Догляд за рослинами полягав лише у періодичному підпушуванні ґрунту в рядах. У 20-річному віці дерева досягали висоти 5м і діаметр стовбура становив 17см. Вони рясно плодоносять, плоди достигають в кінці вересня. Цей дослід дає повну можливість вирощування каштана їстивного на території України.

Дослідження інтродукції каштана їстивного в Донецькій області на Маріупольській лісовій дослідній станції Волноваського району також виявились позитивними. Дерева каштана їстивного в 10-річному віці досягали висоти 4–5м, плодоносять [7].

Короткий огляд та аналіз сучасного стану вирощування каштана їстивного в різних умовах розповсюдження показали, що до теперішнього часу створений єдиний та штучний ареал його розповсюдження на території України, а саме в Нижньо-Вязницькому лісництві (малюнок).

Однак, існуючі методи розмноження каштана їстивного не враховують в достатній мірі особливості сучасного вирощування каштана їстивного. Заготовка горіхів каштана їстивного, яка проводиться в основному в лісових насадженнях потребує перспективи розвитку за рахунок збільшення промислових садів каштана їстивного.

До тепер каштана їстивного розмножували переважно насіннєвим шляхом, тому в зв’язку з його гетерозиготністю виникло велике різноманіття форм. Результатами даного процесу виявилось створення багатьох місцевих сортів народної селекції, які розосереджені в окремих господарствах [8].

Для закладки нових високопродуктивних та стійких насаджень каштана їстивного необхідний відбір серед існуючих насаджень найбільш цінних форм та сортів. Виробництво плодів цієї цінної рослини можна збільшити шляхом розмноження найбільш цінного маточного матеріалу.

Тому виникла необхідність розробки наукових основ розведення каштана їстивного та технології вирощування, яка б враховувала реальні ситуації при вирощуванні, а також процеси, які визначають оптимальне та успішне виконання поставленого завдання в конкретних умовах.

1.3. Прискорене розмноження вихідного матеріалу *Castanea sativa*

Каштан їстівний добре розмножується як генеративно (насінням), так і вегетативно (вкоріненням кореневої поросл і та щепленням). Проте при розмноженні насінням найцінніші ознаки не завжди успадковуються: рослини, вирощені з насіння різняться морфо біологічними особливостями та господарськими показниками. Окрім цього, при насіннєвому розмноженні плодоношення настає пізно. Тому виникає необхідність розмножувати культурні форми каштана їстивного як і інші гетерозисні плодові культури частинами вегетативних органів.

Для отримання однорідного сортового посадкового матеріалу від отриманих дерев при створенні плодових плантацій важливе значення має подальша розробка раціональних прийомів вегетативного розмноження [9, 10].

К.Л. Тугуші, Б.Т. Тодуа та інші багато років займаються селекцією каштана та його вегетативним розмноженням. На їхню думку найкращим способом такого роду розмноження є окулірування проростаючим вічком та щепленням живцем.

В останні роки серед сучасних напрямків біологічної науки біотехнологія визнана однією з пріоритетних. Основу біотехнології рослин складають культура клітин, органів і тканин, клітинна та генетична інженерія. У багатьох країнах світу розвитку біотехнології надається першорядне значення у зв'язку з її перевагами перед іншими видами технологій [11–22].

По-перше, біотехнологічні процеси мають низьку енергоємкість, практично безвідходні, екологічно чисті. Разом з тим, ці технології передбачають використання стандартного обладнання і препаратів, а також проведення досліджень протягом цілого року, незалежно від кліматичних умов, займаючи при цьому незначні площі [23–25].

Основними перевагами мікророзмноження перед традиційними методами вегетативного розмноження є масове отримання садивного

матеріалу, звільнення рослин-регенерантів від вірусів і хвороб, можливість тривалого збереження меристемних рослин, проведення робіт протягом всього року, економія робочого простору та економічність. Метод клонального мікророзмноження рослин в культурі *in vitro* на рівних входить до сучасних біотехнологій, а іноді є їх основою [26–28].

Не зважаючи на велику кількість експериментальних робіт, присвячених мікророзмноженню [29–40], технологія клонального мікророзмноження ще не розроблена для великої кількості сільськогосподарських культур і, зокрема, для деревних культур. Це пов’язано, по-перше, з відсутністю чітких, відтворюваних методик, їх трудоємкістю та складністю, а також недостатністю знань морфогенетичних потенцій рослин та способів управління ними в культурі тканини. Переваги клонального мікророзмноження настільки вагомі, що слід очікувати отримання цим способом садивного матеріалу багатьох плодових культур. в тому числі і каштана їстивного [41].

Процес вегетативного розмноження деревних рослин має тривалий період і трудомісткий, а для деяких порід звичайне вегетативне розмноження неможливе і пов’язане, як правило, з процесом укорінення. Метод клонального мікророзмноження рослин у культурі *in vitro*, сутність якого складає здатність меристемних тканин утворювати на поживних середовищах з фітогормонами калюс, ембріоїди, адвентивні пагони, дозволяє реалізувати всі великі потенційні можливості кожної рослини.

Методи мікроклонального розмноження окремих рослин відрізняються певною специфічністю, однак загальними для всіх є такі етапи: обстеження маточних рослин, стерилізація вихідного матеріалу, культивування рослин регенерантів, адаптація рослин до умов *ex vitro* [42–45].

Перший етап цього процесу полягав в отриманні чистих, стерильних експлантів. Всі типи експлантів (апекс, бруньки, листя, пагони, насіння,

зародки) отримували від здорових вегетуючих рослин, піддаючи відповідним режимам стерилізації.

Наступним важливим етапом є вибір експланта. При цьому враховували таке: фазу розвитку материнської рослини, орган, який слугує джерелом тканини та його вік, розмір експланта, пору року. Експланти від молодих ювенільних дерев мали більшу морфогенну здатність, ніж експланти від старих дерев. Експланти, отримані від дорослих дерев розвивалися дуже повільно або зовсім не росли.

Більшість методик розроблено для тканин сіянців деревних рослин, які добре стерилізуються та вводяться в культуру *in vitro*. Крім того, з них легше отримати калусні культури, але значно важче індукувати морфогенез та регенерацію рослин. Тому індивідуальний характер реакцій різних видів рослин на умови культивування і відсутність чіткої теорії морфогенезу *in vitro* зумовлюють використання емпіричних підходів при розробці технології клонального розмноження [46].

На підставі аналізу наукової літератури складається враження, що основні принципи методу клонального розмноження деревних рослин розроблено. Встановлено, що калусні і суспензійні культури використовують, переважно, для листяних порід. При цьому необхідним є цитологічний контроль рослин, які утворились. В той же час необхідно зауважити, що літературні дані іноді не повністю підкріплені матеріалами впровадження. Потребують подальшої розробки питання режиму стерилізації експлантів та умов їх культивування. Значного вдосконалення потребують питання оптимізації живильних середовищ та співвідношення фітогормонів на всіх етапах розмноження і стосовно конкретних генотипів.

Культивування рослин каштана їстивного залежало від фізичних умов, складу живильного середовища, генотипу, а також з’ясовано що і від сезону культивування. Період коли найменший регенераційний потенціал каштана їстивного в культурі *in vitro* — від жовтня до березня. Підвищення

регенераційного потенціалу спостерігали від березня до червня, причому найвищу регенерацію експлантів фіксували у травні. З червня по серпень місяць в середньому регенерація у всіх видів і сортів була стабільною, а в середині серпня спостерігали другу хвилю підвищеного потенціалу. З вересня регенераційний потенціал у видів каштана їстивного зменшувався, а з жовтня до березня стабілізувався. Аналогічні дві хвилі спостерігали *in vivo*. Перехід до стану спокою в рослині супроводжується зниженням гормонів стимуляторів, накопиченням інгібіторів і підсиленням їх активності. Спочатку інгібітори накопичуються в листках, а потім переміщаються в бруньки, забезпечуючи перехід рослин у спокій. Стан спокою і інгібітори росту захищають багаторічні і зимуючі рослини і їх органи розмноження від несприятливих умов, перешкоджають несподіваному розвитку ростових процесів [47]. Тому при культивуванні меристем каштана їстивного в період спокою (жовтень-лютий) коефіцієнт розмноження був значно менший у порівнянні з весняно-літнім строком ізолювання меристем. Відмінність у регенерації *in vitro* полягала в тому, що в умовах *in vivo* друга хвиля іноді мала вищий бал регенерації на що впливали погодні умови (опади, тепло) та зовсім не спостерігались регенераційні процеси у період з жовтня по березень. Натомість регенераційні процеси *in vitro* стабільно проходили дві хвилі підвищення регенераційного потенціалу причому перша постійно була більшою від другої.

Дослідження з клонального мікророзмноження каштана їстивного також були проведені з метою розробки технології розмноження, яка дозволила б вирішити основне завдання цієї культури — інтенсивно розмножувати вихідний селекційний матеріал для забезпечення колекційного і первинного сортовипробування, а також для прискореного впровадження нових сортів у виробництво. У процесі селекції необхідно розмножувати унікальні генотипи для забезпечення селекційних програм. У відповідності до поставленої задачі було вибрано метод клонального мікророзмноження на основі культури ізольованих апікальних меристем, який забезпечує максимальну генетичну

стабільність і оздоровлення одержаних рослин-регенерантів.

РОЗДІЛ 2.
ОБЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Ботанічна і біологічна характеристика каштана їстивного

Культура каштана їстивного вивчена досить детально. Так, питання походження, ботанічного складу, інтродукції, біології розвитку викладені в працях J.C. Loudon, C.S. Sargent, A. Camus, В. Тунєва, А.В. Альбенського, С.Я. Соколова, А. К. Сейїдов, Ф.Л. Щепотьєва, А.А. Ріхтера, Ф.А. Павленко, К.Л. Тугуші [48].

В межах свого ареалу каштана їстивного формує великі дерева вистою 35 (40-45) м, діаметром стовбура 2 (3,5) м. в насадженні утворює прямо стовбурні дерева з високопіднятою кроною. Кора стовбура темно-бура, поздовжньо-тріщинувата. Пагони зелено-коричнюваті, лише ранньою весною опушені, потім голі, круглі або слабо ребристі. Бруньки зеленуваті слабо опушені, яйцеподібні, завдовжки 5 мм.

Форма крони буває вузько пірамідальна та широкопірамідальна.

Листя видовжено-еліптичне до широколанцетого, завширшки 5–8см, завдовжки 8–22см, темно-зелене, блискуче зверху та світло-зелене знизу.

У молодих листків основа овальна, без зубців, у старих — з клиноподібною чи серцевидною виїмкою, частіше зубчаста. По краях листка виїмчато-пильчаті, з довгими, серповидними, загнутими догори, сильно загостреними зубцями. Вершина листка закінчується шилоподібно. Молоді листки червонуватого кольору.

Відомо, що каштана їстивного однодомна, в молодому віці інколи дводомна рослина. Чоловічі та жіночі квітки зібрані в суцвіття — сережки, які розвиваються в пазухах листків. Суцвіття бувають як одностатеві так і двостатеві. У двостатевих суцвіть в верхній частині розташовані чоловічі, а в нижній жіночі дихазії.

Квітка складається з 8–12 тичинок з білими нитками і жовтими пиляками.

Пилкові зерна каштана їстивного майже однакові по довжині. По формі вони різняться, можуть бути округлими, еліптичними та видовженими. У досліджуваних нами сортів та форм каштана їстивного форма пилкових зерен округла. Для пророщування пилку використовували 1%-вілсотковий розчин сахарази з експозицією 24 години.

Маточкові квітки у вигляді клубочків в одній обгортці з сімома зав'язями. Зустрічаються також з двостатевими квітками, які розташовані посередині осі. Маточкові розташовуються в основі, а тичинкові на кінці сережки. Дерева з дихогамією — протоандричні та протогінічні.

Цвітіння починається на початку липня і продовжується протягом місяця. Квітки медоносні, принаджують бджіл.

Плід — горіх у гостроколючій плісці, кулястий, або з плоским боком. Пліска містить 3–4 плоди і більше. Розмір горіха 5–6см. Маса 1000 плодів коливається від 2 до 8 кг, маса одного плоду 7–10 г. Горіхи каштана їстивного мають приплюснуту яйцевидну-шароподібну форму. Ступінь приплюсну тості, як правило, прямо залежить від кількості горіхів в плюсці. Вершина плоду опушена, витягнута у вигляді носика і закінчується так званим факелом, який складається зі здерев'янілих залишків оцвітини.

Плоди багаті на вітаміни С і В, також яблучну та лимонну кислоти. У ядрах плодів міститься велика кількість мікроелементів К, Mg, Na, Ca, та 14 амінокислот, з яких 8 найважливіші (лізин, гістидин, аргінін та інші).

Деревина високих технологічних якостей, багато в чому схожа з деревиною дуба. Дуже еластична, міцна і досить тверда, піддається згину, при підвищеній вологості міцна. Широко використовується у будівництві та для виготовлення різних виробів. У деревині та корі міститься велика кількість танідів які використовують для дублення і фарбування шкір.

Коренева система добре розвинена, глибоко і широко розгалужена, в результаті дерево вітростійке. Ґрунти для каштану потрібні глибоко родючі, пухкі, свіжі й вологі, добре дреновані, багаті на перегній, калій та фосфор з

кислотністю pH 4,5–6,5. Здорові корені каштана їстивного зазвичай вкриті коричневою корою з червонуватим відтінком.

При проростанні насіння спочатку з'являється корінчик завдовжки 8-10см, а потім стебло. В перший рік головний корінь заглиблюється на глибину до 30см та більше. На другому році життя продовжується інтенсивний ріст головного кореня та утворюються багато чисельні бокові корені [49].

Ф.С. Баришман виявив у однорічних саджанців каштана їстивного три типи кореневих систем: стрижневий тип, у якого при середній висоті надземної частини 13,3см добре виражений один головний корінь від якого під прямим кутом відходили бокові корені; без стрижневий тип з потовщеним зачатком стрижневого кореня завдовжки до 4см; напівстрижневий тип, який відрізняється потовщеним стрижнем завдовжки до 10-12 см і різко закінчується.

Крона одного дерева покриває ділянку розміром близько 310 м^2. Дерева каштана їстивного, які виросли в природі зазвичай мають могутні крони. Так, Н.А. Тхагуше стверджує що дерево каштана їстивного в віці 200-250 років мало крону в діаметрі 28м, основні скелетні гілки у цього дерева заввишки 2-3м.

Однорічні прирости, як правило, ребристі, мають в поперечному розрізі форму зіркоподібних п'ятикутників.

Відомо, що каштана їстивного володіє великою поросльовою здатністю. Поросль може з'являтись як за життя, так і після того як дерево зрубали.

Згідно даних П.А. Ісінського після рубки столітнього дерева каштана їстивного в середньому на пеньку нараховувалось більше 60 поросель.

Серед горіхоплідних каштана їстивного вважають одним із морозостійких рослин.

Н.П. Бедриківська звернула увагу на різну морозостійкість старих дерев, які ростуть в плодовому саду с. Лавки Мукачівського району Закарпатської області. Так у дерев з маленькими плодами приріст пагонів був уражений на 25-30%, у крупноплідних пошкоджень майже не було або вони були незначними.

В.С. Чепурний стверджує що при правильному виборі екотипу каштана їстивного цілком можливе створення насаджень, які будуть стійкі до 30-ти градусних морозів.

Як відомо, не менш важливу роль для розвитку любої рослини має волога.

В.С. Чепурний вважає що в умовах Чорноморського узбережжя каштана їстивного проявив себе як посухостійка рослина.

В.А. Колєсніков та L. *Soliqnat* вважають що сильна спека та довготривала посуха шкідливо впливають на дерево каштана їстивного [50].

В багатьох джерелах вказується, що закордоном каштана їстивного не розвивається, якщо в ґрунті міститься вапно, а найкращий ефект досягається на багатих гумусом, добре дренованих глибоких ґрунтах з найменшим вмістом вапна.

Ф.С. Баришман та М.І. Пекшибаєв вважають що каштана їстивного досить пластичною породою, здатною в межах природного ареалу успішно рости як на не глибоких, бідних кам’янистих, так і на глинистих ґрунтах.

Інші дослідники А.А. Ріхтер, В.А. Колесников, Н.Г. Калгін, Ф.С. Баришман М.А. Соловйова та інші на виключаючи можливості вирощування каштана їстивного на бідних та не глибоких ґрунтах, вважають, що найкращими для нього є багаті основними елементами живлення та перегноєм рихлі, кислі та слабо кислі ґрунти з оптимальною кислотністю pH 4,5–6,5.

В.Д. Гаджієв вважає, що найкращими для культури каштана їстивного є свіжі гумусова ні без карбонатні ґрунти [51].

2.2. Особливості досліджуваних видів каштана

Castanea Mill. — каштан їстівний або посівний належить до родини Букових (*Fagaceae*), роду Каштан (*Castanea* Mill.) який включає біля 14 видів однодомних, роздільностатевих листопадних дерев та кущів. Дерево заввишки 30–35 м з великою яйцеподібною або кулеподібною кроною з глибоко

проникаючою кореневою системою. До 25 річного віку кора на стовбурах гладенька, сіро-червонувата, а пізніше стає темно-коричневою з глибокими поздовжніми тріщинами. Листки великі, завдожки 8–25 см, довгасто-яйцеподібні-ланцентні. Квітки зібрані у колосоподібні суцвіття, які утворюються на кінцях пагонів минулого року. Плоди — горіхи одно-двонасінні, великі з шкірястим оплоднем каштанового кольору. Рослини швидкоростучі та досить довговічні. На Кавказі трапляються дерева, вік яких становить 200–300 років [52].

Castanea dentata Mill. — каштан зубчатий або американський, представник роду *Castanea* Mill. Являється ендемічним видом Північної Америки. Досягає висоти 30 м і 1,5 м у діаметрі, кора коричнювата, яка глибоко розтріскується, бруньки яйцеподібні, загострені, пагони голі. Листя широколанцетне завдовжки 12-24 см, завширшки 4-5 см, гострозубчасте, голе, лише знизу по жилках слабо опушене. Тичинкові сережки завдовжки 15-20 см, двостатеві з маточковими квітками в основі. Плід 1-2,5 см в діаметрі з довго відтягнутою опушеною верхівкою [53].

Належить до світлолюбних швидкоростучих порід. У північних частинах свого ареалу витримує морози до -30°С.

В колекції НДП «Софіївка» знаходиться з 2011 року для використання в якості підщепи.

C. pumila Mill. (каштан низькорослий). Дерево заввишки 2,5–3,5 м з кулеподібною кроною в діаметрі 3,5–4 м. Кора сіро-червонувата, гладенька. Листя велике, завдовжки 10–20 см, довгасте. Квітки у вигляді колосоподібного суцвіття. Плоди — горіхи. Рослини швидкорослі та довговічні. Природним ареалом поширення є південна частина Середземномор’я (Колесніков, 1974).

У 2011 р. було отримано найбільш поширені форми: 'Пірамідальна' (*C. sativa* 'Pyramidalis') — з гілками, спрямованими майже вертикально вгору, які утворюють пірамідальну крону; 'Круглолиста' (C. sativa 'Rotundifolia') — з листям округлої форми; 'Золотисто-плямиста' (C. sativa 'Aureo-maculata') - з

жовтими плямами на листках, 'Гола' (C. sativa 'Glabra') - з великими, щільними, голими, блискучими листям.

Сортове різноманіття колекції представлене сортами європейської селекції. Сорт *C. sativa* 'Napoleon' французької селекції. В колекцію НДП «Софіївка» був отриманий у 2011 р. з приватного розсадника міста Кламсі. Сорт ранньоспілий. Масове дозрівання плодів спостерігається в кінці вересня. Сорт в умовах країни походження стійкий до *Marssonina potentilla* (бура плямистість).

C. sativa 'Karlovo -1' та *C. sativa* 'Karlovo -3' — сорти болгарської селекції отримані у 2011 році з державного лісорозсадника Вінницької області Немирівського району (с. Благодатне). Сорти середньо спілі. Масове дозрівання спостерігається у середині жовтня. Сорти стійкі до *Phytophthora infestans* (бура серцевинна гниль деревини).

C. sativa 'Da Vinchi' — сорт французької селекції. Створений шляхом гібридизації *C. sativa*, *C. pumila* та *C. crenata*. Сорт поєднує в собі як декоративні ознаки (низькорослість та об'ємна шароподібна крона) так і господарськоцінні (висока врожайність, стійкість до *Marssonina potentilla* та до ендотієвого раку, збудником якого є сумчастий гриб *Endothia parasitica*). Отриманий в колекцію у 2011 р. з французького міста Кламсі. Сорт середньоспілий.

C. sativa 'Sitsiliysky' — сорт італійської селекції отриманий шляхом гібридизації *C. sativa* та *C. crenata*. Сорт швидкорослий з прямим стовбуром та пірамідальною кроною. Використовується переважно деревина для виготовлення меблів. Даний сорт добре переносить міське середовище, тому його використовують і в озелененні промислових зон. Отриманий у 2011 р. з італійського міста Ночі.

РОЗДІЛ 3.
УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили протягом 2023–2024 рр. в умовах *in vitro* в Уманському НУС — в умовах лабораторій мікроклонального розмноження кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології і НДП „Софіївка” — у лабораторії мікроклонального розмноження відділу фізіології, генетики, селекції та біотехнології рослин та умовах *in vivo* в колекційній ділянці нетрадиційних плодових культур кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології та в інтродукційно-виробничому розсаднику НДП „Софіївка”, які розміщенні в околиці м. Умань, що у південно-західній частині Черкаської області.

3.1. Лабораторні умови й методика проведення досліджень

При проведенні мікроклонального розмноження в якості вихідного матеріалу використовували однорічні пагони досліджуваних видів з умов *in vivo*.

Рослинний матеріал перед введенням у культуру мили господарським милом та промивали проточною водою. Перед основною стерилізацією об’єкт занурювали на 5 секунд в 96,0 % етанол. Стерилізували експланти стерилізаторами хімічного походження з різними експозиціями. Після завершення стерилізації живці тричі промивали в стерильній дистильованій воді і висаджували на живильні середовища.

Культивування рослинного матеріалу проводили при 16-годинному фотоперіоді з інтенсивністю освітлення 2 кЛк, температурному режимі 20–24^{0}С та відносній вологості повітря 75%. Тривалість одного пасажу становила 30–35 діб.

Розробку технологій мікроклонального розмноження розпочинали з обстеження маточних рослин і підбору типу експланта. Донорні рослини *Каштана їстивного* вирощували в умовах розсадника НДП «Софіївка». За

експланти використовували апікальні меристеми висотою 0,5–0,7мм, які виділяли з верхівкових та пазушних бруньок однорічних пагонів, та насіння.

При відпрацювання технології з мікроклонального розмноження керувались загальними принципами та методиками роботи з культурами рослинних тканин, розробленими Р.Г. Бутенко (1989) [54–58], В.В. Калініним, В.В. Сарнацькою, В.Е. Поліщуком (1980) [59]. Для стерилізації рослинних матеріалів при введенні в культуру *in vitro* використовували водні розчини дихлориду ртуті (сулеми) 0,1 %, нітрату срібла 1 % та мертиолята натрію 0,1 % з різними експозиціями та обов'язковим додаванням 1–2 краплі Твину-80 для ефективнішої дії стерилізатора. Простерилізований рослинний матеріал висаджували на живильні середовища і вирощували при 16-годинному фотоперіоді з інтенсивністю освітлення 2 кЛк, температурному режимі 20–24^{0}С та відносній вологості повітря 75%. Тривалість одного пасажу становила 30–35 днів. На кожному етапі мікроклонального розмноження (введення рослинного матеріалу в культуру *in vitro*, розмноження, ризогенез) вивчали склад живильного середовища та його фітогормональну оптимізацію. В основу живильного субстрату входили макро- і мікроелементи за прописами Драйвера і Куніюкі (DKW), Кнудсона (Kn), Ллойда і Мак Коуна (WPM) та Мурасіге–Скуга (MS), що містили глюкозу та/або сахарозу та 7–8 г/л агар-агару [60–64]. Модифікували живильні середовища цитокінінами (6-бензиламінопурин (БАП), ауксинами (α-нафтилоцитова кислота (НОК), β-індолилмасляна кислота (ІМК), β-індолилоцитова кислота (ІОК).

Статистичну обробку результатів досліджень виконували методами дисперсійного, кореляційного та регресійного аналізу згідно рекомендацій Г.М. Зайцева (1981, 1984) [65, 66], В.О. Єщенка, з співавторами (2005) [67] з використанням прикладної програми «Statistica–6».

3.2. Схема досліду

Дослід з вивчення ефективності різних стерилізаторів при різних експозиціях стерилізації експлантів каштана при введенні в культуру *in vitro* включатиме по 9 варіантів для кожного генотипу: сулема ($HgCl_2$), (контроль) — 0,07%; 0,04%; 0,1%; нітрат срібла ($AgNO_3$) — 0,5%; 1,0%; 1,5%; хлорамін — 5%; 10 %; 15%.

Дослід з вивчення впливу дати введення в культуру *in vitro* на кількість макроструктур включає 3 варіанти з подекадними датами введення.

Мікроклональне розмноження та вивчення ефективності впливу складу живильного середовища на вихід макроструктур рослин каштана в культурі *in vitro* включає 3 базових середовища з нашими модифікаціями.

Досліди — одно- та двохфакторні, закладали в 3-кратній повторності.

РОЗДІЛ 4.
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Підчас розробки основних етапів клонального мікророзмноження видів і сортів каштана їстивного керувалися принципом, що технологія повинна відповідати таким вимогам: забезпечувати високий коефіцієнт розмноження, бути універсальною, технологічною, рентабельною [68]. У результаті роботи було вивчено 4 базових живильних (Додаток А).

4.1. Розробка технологій стерилізації експланту (насіння, живців)

Каштан їстівний добре розмножується як генеративно (насінням), так і вегетативно (вкоріненням пневої поросли та щепленням). Проте при розмноженні насінням найцінніші ознаки не завжди успадковуються, тому для їх збереження виникає необхідність застосування методу мікроклонального розмноження у культурі *in vitro* [9].

Останнім часом визнано, що саме цей метод розмноження дозволяє у повній мірі реалізувати морфогенетичний потенціал рослинного організму. Використання методу культури *in vitro* сприяє оздоровленню рослин від патогенів, особливо вірусних, уникненню дефектних ознак, які виникли у генотипі під впливом дії негативних мутацій, хвороб або патогенних організмів [5]. Особливої актуальності такий спосіб оздоровлення та прискореного розмноження рослин каштана їстивного набуває через значне поширення в Європі та Азії грибкового захворювання крифонектрії (*Cryphonectria parasitica* Murr.) [3].

Однією з головних проблем, яку було розв’язано при застосуванні культури *in vitro* каштана їстивного, це дезинфекція стартового матеріалу перед тим, як він буде розміщений на живильне середовище. На поверхні вегетуючої рослини і її частин, пагонів, бруньок, проростків та інших джерел експлантів, знаходиться велика кількість різноманітних мікроорганізмів. Ці мікроорганізми здатні рости і розмножуватись на живильному середовищі. В процесі свого

росту і розвитку гриби і бактерії не тільки поглинають поживні речовини живильного середовища, а також гальмують ростові процеси в експлантах і в наступному, якщо рослина не загинула, всі біологічні процеси рослини. Тому стерилізація експлантів повинна бути виконана якомога якісніше [47].

Стерилізацію починали з дезінфекції приміщення і інструментів, а потім стерилізували рослинний матеріал (табл. 1).

Таблиця 1

Вихід стерильних–життєздатних живців залежно від експозиції, дати введення та стерилізатора, %

Експозиція стерилізації, хв.	Період введення		
	перша декада квітня	перша декада травня	перша декада червня
дихлорид ртуті ($HgCl_2$)			
1	0	0	0
5	25,4	44,4	35,4
10	56,4	85,6	65,7
15	8,6	21,3	17,2
20	0	0,2	0
25	0	0	0
нітрат срібла ($AgNo_3$)			
1	0	0	0
5	24,4	38,6	26,6
10	30,7	49,7	33,8
15	45,3	63,4	58,7
20	24,5	42,1	37,5
25	0	0	0
мертиолят натрію ($C_9H_9AgNaO_2S$)			
1	0	0	0
5	0,9	8,6	0,4
10	7,6	16,4	15,3
15	32,4	51,8	27,6
20	21,7	33,7	17,4
25	0	0	0
$НІР_{05}$	*3,6*	*4,1*	*3,9*

При введенні живців каштана їстивного в культуру *in vitro* вихід стерильних експлантів також залежав не тільки від експозиції, а й від стерилізаторів.

Стерилізація живців досліджуваних видів відбувалась не так легко, як

насіння і вихід стерильних експлантів не завжди був задовільним.

Дослідження показали, що при експозиції стерилізації до однієї хвилини вихід стерильних живців не перевищував нуля. Від однієї до п’яти хвилин майже на одному рівні були стерилізатори дихлорид ртуті і нітрат срібла, вихід стерильних–життєздатних експлантів становив близько 40 %, а стерилізація рослинного матеріалу мертиолятом натрію давала найменший вихід живців біля 20 % (рис. 1).



Рис. 1. **Інфікований експлант**

Найефективнішою стерилізуючою речовиною для введення мікроживців в ізольовану культуру визначено 0,1 %-ий водний розчин дихлориду ртуті за експозиції 10 хвилин. Вихід стерильних–життєздатних експлантів у цьому варіанті досліду в середньому складає 85,6 %.

При збільшенні експозиції стерилізації вихід стерильних експлантів становить 100 %, однак вони є не життєздатними. Кращі результати у

стерилізаторів нітрат срібла та мертиолят натрію показали за експозиції 15 хвилин, вихід стерильних–життєздатних експлантів відповідно становив 63,4 % та 51,8 %. Підчас збільшення експозиції, як і у першому варіанті, тканини рослин не витримували навантаження і гинули (рис. 2).

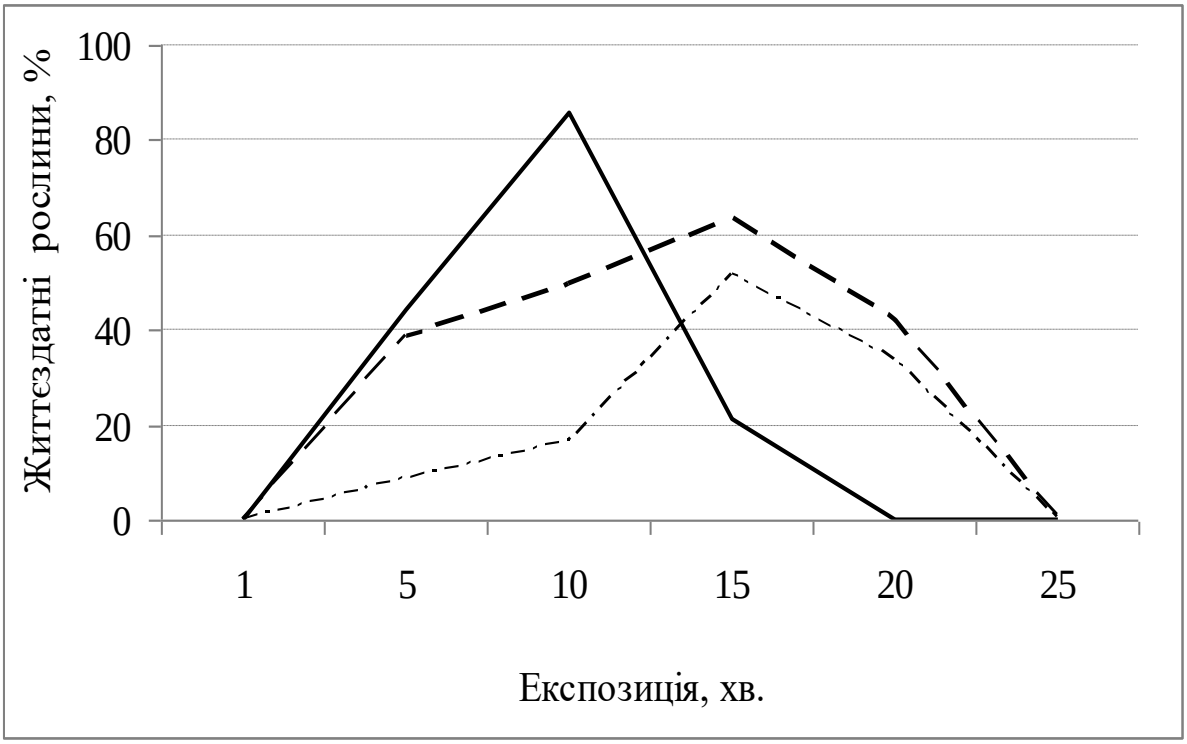


Рис. 2. **Життєздатність експлантів залежно від типу стерилізатора і експозиції, %:**

—— дихлорид ртуті (0,1%); — — нітрат срібла (1%);

-·-·- мертиолят натрія (0,1%).

Порівнюючи строки введення живців в культуру *in vitro* слід зауважити, що живці взяті на початку вегетації були менш заражені. Однак фізіологічний стан був близький до трав'янистих рослин. Тому вихід стерильних, але не життєздатних експлантів був значно більший.

При введенні рослинного матеріалу у культуру *in vitro* першого квітня, вихід стерильних-життєздатних експлантів у середньому складав 44,7 %. При введенні і аналогічній стерилізації живців каштана їстивного першого травня вихід стерильних експлантів був більшим і в середньому складав — 86,6 %. Стерилізація рослинного матеріалу першого червня дала змогу отримати вихід

стерильних-життєздатних живців — 50,7 %. В результаті досліджень встановлено, що при введені першого квітня більшість живців були стерильними, але не життєздатними (рис. 3).

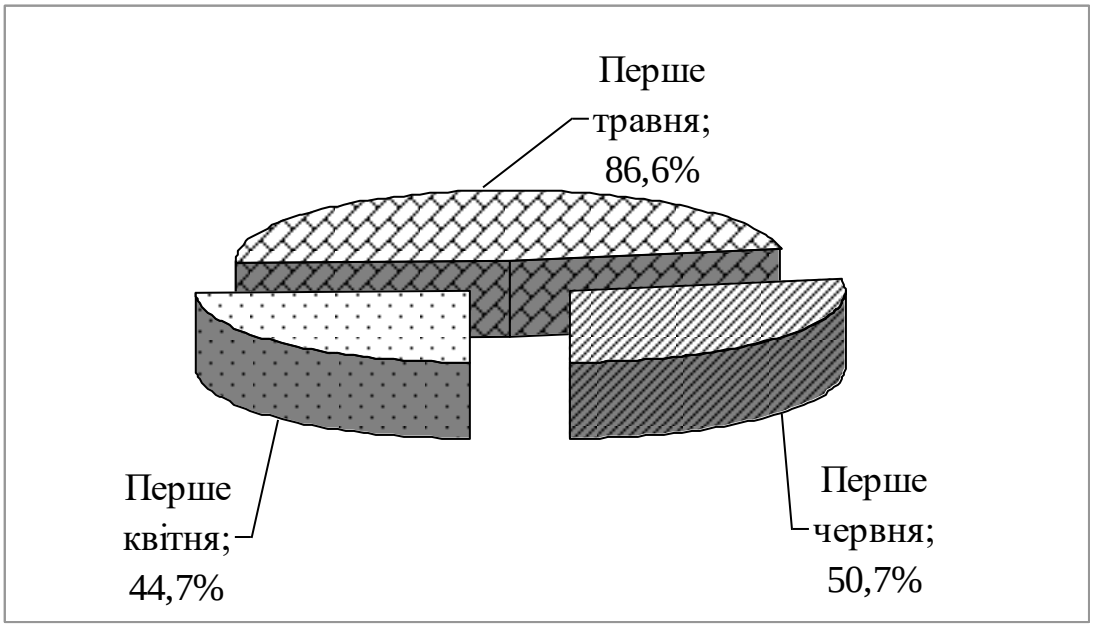


Рис. 3. **Вихід стерильних-життєздатних експлантів за однакових умов стерилізації і різних дат введення рослинного матеріалу в культуру *in vitro***

При стерилізації рослинного матеріалу першого червня за тієї ж експозиції, більшість живців було інфіковано. Тому кращими строками для введення була перша декада травня при якій отримано найвище поєднання стерильних і життєздатних живців — 66,9 % (рис. 4).

Розвиток меристем, експресія або пригнічення тотипотентності значною мірою залежали від умов, у які експланти потрапляли *in vitro*. Серед них найважливішими фізичними факторами є освітлення, температурний режим, вологість. У наших дослідженнях кращі результати були, коли після стерилізації рослинний матеріал висаджували на живильне середовище і культивували при температурі 25±1°С, 16-ти годинному фотоперіоді з інтенсивністю освітлення 3–5 кілолюксів і відносній вологості 75 %.

Вивчення і підбір фізичних умов вирощування рослин *in vitro* є важливим етапом роботи, проте основним і найскладнішим залишається підбір

компонентів живильного середовища, концентрації та співвідношення регуляторів росту у їх складі, які і визначають напрями розвитку введеного біоматеріалу.



Рис. 4 **Розвиток стерильного живця**

Як відомо, у стовбурах, гілках, пагонах та листках *C. sativa* міститься велика кількість дубильних речовин — танінів (Григорюк І.П., 2005), які в умовах *in vitro* виділяються з експлантів у живильне середовище, що призводить до їх загибелі. Надлишкова кількість фенольних речовин при окисленні утворює продукти, що не лише спричинюють потемніння живильного середовища та тканин, але й пригнічують ріст рослини.

Під час проведення досліджень з розробки ефективних прийомів стерилізації експлантів виду *C. sativa*, при введенні *in vitro*, проведено спостереження за процесом розпаду фенолів у залежності від типу стерилізаторів.

У дослідах було випробувано водні розчини хімічних реагентів, зокрема 2,5% гіпохлорит натрію (NaOCl) та 0,1% дихлорид ртуті ($HgCl_2$). Після обробки реагентами експланти тричі промивали дистильованою стерильною водою протягом 10–15 хв., після цього висаджували на безгормональне живильне середовище Мурасіге і Скуга (T. Murashige, F. Scoog, 1962). Як первинні експланти використовували пагони 1,0–1,5 см завдовжки з однією пазушною брунькою. Повторність досліду — 3-кратна.

На 5-ту добу після введення, нами було зафіксовано виділення фенольних сполук у живильне середовище з 83,8% експлантів, які були оброблені 0,1% дихлоридом ртуті.

Зразки, які були простерилізовані 2,5% гіпохлоритом натрію майже не виділяли фенольних сполук у середовище. Загальна кількість середовищ зі слідами фенольних сполук не перевищувала 6%.

Це можна пояснювати тим, що гіпохлорит натрію спроможний поєднувати функції стерилізатора і антиоксиданта, що запобігає фенольному окисненню рослин, які містять фенольні сполуки, на початковому етапі введення експлантів *in vitro*.

Отже, для стерилізації експлантів *C. sativa* рекомендуємо використовувати 2,5% водний розчин гіпохлоритом натрію.

Також метою наших досліджень була розробка ефективних прийомів стерилізації насіння виду *C. sativa* при введенні в умови *in vitro* для отримання стерильних рослин з подальшим підбором оптимального живильного середовища для індукції морфогенезу.

Як первинні експланти використовували насіння каштана їстивного, яке збирали в період повної стиглості у Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України.

При культивуванні рослин *in vitro* використано метод індукції морфогенезу рослин під дією регуляторів росту.

Пророщування насіння і культивування експлантів проводили у культуральній кімнаті з кондиційованим повітрям, на скляних стелажах, при

температурі 25±1°С, відносній вологості повітря 70–75%, фотоперіоді 16 годин і штучному освітленні інтенсивністю 3–5 тис. люкс. Посуд, матеріали, інструменти та живильні середовища стерилізували згідно загальновживаних методик [2, 5].

У дослідах було випробувано водні розчини хімічних реагентів, зокрема 2,5% гіпохлорид натрію (NaOCl) та 0,1% дихлорид ртуті ($HgCl_2$) при різних експозиціях. Для більш ефективної дії до кожного із реагентів додавали емульгатор «Твін 80». Після обробки реагентом експланти тричі промивали дистильованою стерильною водою протягом 10–15 хв., після цього висаджували на безгормональне живильне середовище Мурасіге і Скуга. У кожному варіанті було посіяно 25 шт. насінин. Повторність досліду — 3-кратна.

Впродовж 7 діб у кожному з варіантів визначали ефективність стерилізації, підраховуючи відсоток стерильних та інфікованих експлантів (табл. 2).

Таблиця 2

Ефективність введення в культуру *in vitro* насіння *C. sativa*

Експлант	Реагент	Експозиція стерилізації, хв.	Середня кількість			
			стерильних насінин		життєздатних насінин	
			шт.	%	шт.	%
насіння з перикарпієм	0,1% $HgCl_2$	2	16,7	66,7	0	0
		4	17,4	69,7	0	0
		6	17,5	70,0	0	0
насіння без перикарпію	0,1% $HgCl_2$	2	11,4	45,8	0	0
		4	14,7	58,9	0	0
		6	15,6	62,3	0	0
зародки	0,1% $HgCl_2$	0,5	20,6	82,4	20,0	80,0
		1,0	22,4	89,6	14,2	56,7
		1,5	22,8	91,3	0,4	1,7
зародки	2,5 % NaOCl	0,5	16,7	66,8	14,6	58,3
		1,0	24,5	98,0	23,3	93,3
		1,5	21,2	84,8	19,9	79,7

Життєздатність введених експлантів оцінювали через 25 діб 0,1 % розчином дихлориду ртуті (*$HgCl_2$*) обробляли плоди та насіння без перикарпію, при цьому відсоток стерильних експлантів складав 45,8–70%, але їх

життєздатність після 25 доби культивування на живильному середовищі дорівнювала нулю (рис. 5. А, Б). Ймовірно відсутність життєздатного насіння можна пояснити тим, що при проростанні проростка відбувається вихід грибкової інфекції з ендосперму.



А Б

Рис 5. Інфіковане насіння *C. sativa* після проростання:
А — з перикарпієм; Б — без перикарпію

З метою уникнення даного явища нами було закладено експеримент, де в якості експлантів використовували зародки, які були виділені з насіння. Для їх стерилізації застосовували як 0,1% дихлорид ртуті, так і 2,5% гіпохлорид натрію. При обробці зародків розчином 0,1% $HgCl_2$ з експозицією 0,5 хв. стерильних експлантів у середньому було отримано 22,1 шт. (82,4%), а життєздатних — 20 шт. Збільшення терміну стерилізації до 1,0–1,5 хв. викликає збільшення виходу стерильних експлантів, проте значно знижує їх життєздатність. Це пояснюється тим, що при підвищенні терміну дії дихлорид ртуті згубно впливає на життєздатність зародків і приводить до загибелі рослин.

При стерилізації зародків водним розчином 2,5% NaOCl загальна кількість стерильних експлантів та їх життєздатність в цілому була вища ніж при використанні 0,1% розчину $HgCl_2$. Найкращі результати, при застосуванні 2,5% розчину NaOCl, були отримані за експозиції 1,0 хв. (рис. 6) . При даній

обробці стерильних зародків одержано 24,5 шт. (98,0%), а життєздатних — 23,3 шт. (93,3%).



Рис. 6. **Проростання насіння в культурі**

4.2. Удосконалення складу живильного середовища для розмноження

Важливим аспектом біотехнологічної роботи є правильний підбір живильного середовища у відповідності з задачами на кожному етапі культивування експланту. Основою росту тканин і органів рослини є утворення і ріст клітин апікальної меристеми, що проходять ряд послідовних етапів: поділу, росту розтягненням і диференціювання [49, 60]. Реалізація морфогенетичних потенцій апікальних меристем каштана їстивного *in vitro* залежала від балансу в живильному середовищі компонентів, що забезпечують трофічну (макро- і мікросолі, вуглеводи, амінокислоти) та регуляторну (гормони, вітаміни) функції клітин.

На етапі введення, розмноження і укорінення меристем каштана їстивного в культуру *in vitro* підбір оптимальної концентрації гормонів

проводили на основі базових живильних середовищ DKW, MS, WPM. В роботі вивчали вплив різних концентрацій цитокінінів (БАП), ауксинів (НОК, ІМК, ІОК), вітамінів тощо.

Не дивлячись на велику кількість експериментальних робіт, присвячених мікророзмноженню, технологія клонального мікророзмноження ще не розроблена для великої кількості сільськогосподарських культур і, зокрема, для деревних культур. Це пов'язано, по-перше, з відсутністю чітких, відтворюваних методик, їх трудоємкістю та складністю, а також недостатністю знань морфогенетичних потенцій рослин та способів управління ними в культурі тканини.

Вирішальним етапом, від якого залежить успіх мікророзмноження рослин, є вибір оптимального живильного середовища для кожного етапу цього процесу. Вибір середовища в значній мірі залежить від типу бажаного морфогенезу. При цьому досягти позитивних результатів для кожної культури можливо лише підібравши відповідне оптимальне живильне середовище та співвідношення ауксинів та цитокінінів у ньому.

Слід зазначити, що на даний час є декілька різних розроблених методів мікроклонального розмноження деревних рослин. Відрізняються вони лише станом вихідних клітин та тканин, які використовуються для отримання рослин. В одному випадку вихідні тканини знаходяться у стані активного клітинного поділу, а в іншому вихідним матеріалом є диференційовані клітини. У першому випадку меристематичні клітини регенерують калюс, проходять первинну диференціацію, інтенсивний органо- і гістогенез, формуються ембріоїди, бруньки, пагони і утворюються рослини. У другому випадку спочатку розпочинається процес дидеференціації і лише потім проходять поетапно процеси, які згадувались у першому випадку.

При створенні живильного середовища враховували те, що живці будуть культивуватись не більше семи діб. В кращому випадку їх пересаджували на інше живильне середовища, у гіршому їх вибраковували з досліду. В більшості

випадків вибраковували ті, що були не стерильними або ж не життєздатними.

Створення живильного середовища для введення в культуру *in vitro* насіння каштана їстивного розраховували з врахуванням того, що проросле насіння не так легко перенести на інше живильне середовище після введенння, як це робили з живцями каштана їстивного, тому його потрібно було залишати на одному і тому ж середовищі до утворення справжніх листків.

На етапі власне мікророзмноження каштана їстивного як експланти використовували живці, які одержували при розділенні основного пагону меристемних рослин на фрагменти довжиною 10–15 мм з однією-двома бруньками та відокремленні додаткових пагонів довжиною 10–15 мм з однією-двома бруньками.

В основі клонального мікророзмноження рослин *in vitro* лежить регулювання морфогенезу з допомогою екзогенних гормонів. Встановлено, що ініціація розвитку меристем каштана їстивного — цитокінінзалежний процес.

У наших дослідах було випробувано різні поєднання фітогормонів, які відіграють основну роль у регуляції росту рослин. У результаті вдалого підбору БАП, ІМК, ІОК та/або НОК та кількісного їх співвідношення у деяких варіантах спостерігали формування адвентивних бруньок (рис. 7).



Рис. 7. **Морфогенез рослин каштана**

Це слугувало початком прямого морфогенезу, при якому шляхом активації меристемних тканин починали формуватись додаткові пагони. З усіх вивчених базових і модифікованих живильних середовищ, високий коефіцієнт розмноження був досягнутий на DKW_{48}, MS_{31}, WPM_{40}.

Коефіцієнт розмноження видів каштана їстивного залежав від модифікацій живильного середовища. Високі коефіцієнти розмноження адвентивних пагонів зафіксовано на живильному середовищі DKW_{48} у *Каштана їстивного* і каштана американського, які складали 7,9 і 8,4.

На живильному середовищі MS_{31} зафіксовано високі коефіцієнти у *Castanea dentata* Mill., *Castanea pumila* Mill., C. sativa 'Aureo-maculata', C. sativa 'Pyramidalis', C. sativa 'Napoleon' і C. sativa 'Karlovo -3', що становили відповідно 9,4, 8,9, 9,7, 8,1, 8,3, 8,8 (табл. 3).

Таблиця 3

Коефіцієнт розмноження видів *Каштана їстивного* залежно від модифікацій живильного середовища

Вид(*фактор А*)	Модифіковані живильні середовища(*фактор В*)								
	DKW			MS			WPM		
	№38	№48	№58	№21	№31	№41	№30	№40	№50
Castanea sativa Mill.	2,3	3,7	5,5	2,0	4,1	6,2	3,9	7,2	10,1
Castanea dentata Mill.	2,7	4,9	6,1	4,7	9,4	11,7	2,2	4,6	6,8
Castanea pumila Mill.	2,8	4,8	5,9	4,6	8,9	10,8	1,8	3,5	6,1
C. sativa 'Aureo-maculata'	2,5	4,4	5,7	4,9	9,7	12,1	2,0	3,7	6,4
C. sativa 'Glabra'	2,1	3,5	5,3	1,9	4,0	7,3	4,3	7,5	9,9
C. sativa 'Rotundifolia'	4,2	7,9	8,2	2,2	4,8	7,5	2,4	4,6	6,9
C. sativa 'Pyramidalis'	3,1	4,5	5,6	4,5	8,1	10,4	1,6	3,7	6,0
C. sativa 'Napoleon'	2,9	4,7	5,8	4,7	8,3	10,6	1,9	4,2	6,6
C. sativa 'Karlovo -1'	4,4	8,4	10,1	2,8	5,1	7,9	1,7	4,2	6,3
C. sativa 'Karlovo -3'	3,3	4,2	5,9	4,8	8,8	10,5	2,0	3,6	6,3
C. sativa 'Da Vinchi'	2,3	3,7	5,5	2,0	4,1	6,2	3,9	7,2	10,1
$НІР_{05}$ факторів: А – 0,28; В – 0,26; взаємодії факторів: АВ – 1,26;									

Живильне середовище WPM_{40} підвищувало регенераційну здатність втім числі і збільшувався коефіцієнт розмноження у *Castanea sativa* Mill. — 7,2, та C. sativa 'Glabra' — 7,5.

Коефіцієнт розмноження каштана їстивного також залежав від компонентів живильного середовища. На DKW_{48} високий коефіцієнт розмноження мав сорт C. sativa 'Karlovo -1' — 8,5. У сортів C. sativa 'Napoleon', C. sativa 'Karlovo -3', Середовище WPM_{40} було кращим для сорту C. sativa 'Da Vinchi', коефіцієнт розмноження в яких становив 8,1; (табл. 4).

Таблиця 4

Коефіцієнт розмноження сортів каштана залежно від модифікацій живильного середовища

Сорт (*фактор А*)	Модифіковані живильні середовища (*фактор В*)								
	DKW			MS			WPM		
	№38	№48	№58	№21	№31	№41	№30	№40	№50
C. sativa 'Napoleon'	2,2	4,9	6,7	5,1	9,6	12,8	1,8	4,1	6,9
C. sativa 'Karlovo -1'	4,8	8,5	10,3	3,5	5,6	8,5	2,5	4,7	7,2
C. sativa 'Da Vinchi'	1,8	3,8	5,9	2,7	4,9	7,8	5,2	8,1	10,8
C. sativa 'Karlovo -3'	2,2	4,7	6,5	4,8	9,3	11,7	1,9	4,3	7,1
$НІР_{05}$ факторів: А – 0,28; В – 0,28; взаємодії факторів: АВ – 1,34;									

При збільшенні в живильному середовищі БАП спостерігали утворення ветрифікованих пагонів. Не існує єдиної думки про причини появи вітрифікованих пагонів при клональному мікророзмноженні. Серед факторів, які викликають вітрифікацію пагонів, вчені називають наступні: 1) висока вологість в культиваційних посудинах; 2) накопичення етилену та вуглекислого газу в культиваційних посудинах; 3) високий вміст у живильних середовищах солей амонію, сахарози, вітамінів; 4) високі дози екзогенних гормонів.

Стимуляція вітрифікації відбувається під дією високих концентрацій екзогенних цитокінінів. Припускається, що в пагонах в процесі культивування поступово накопичуються цитокініни і гормональний баланс порушується в сторону збільшення їх частки. Непрямим доказом цього припущення служить відсутність у вітрифікованих пагонів апікального домінування і втрата здатності до укорінення.

В наших експериментах з *Castanea sativa* також виявлена залежність формування вітрифікованих пагонів від виду і концентрації цитокінінів в живильному середовищі. Підвищення доз гормонів призводило до збільшення проліферації пагонів і їх вітрифікації, причому значна активізація цих процесів відбувалася при найбільших випробуваних концентраціях цитокінінів.

Відмічено загальну закономірність розвитку культивованих рослин всіх генотипів *Castanea sativa*: на другому етапі клонального мікророзмноження відбувався інтенсивний ріст основних пагонів з пазушних бруньок живця, тим більш встановлено, що рослини близького походження успішно культивувались на однакових живильних середовищах. Для одержання максимальної кількості мериклонів при подальшому субкультивуванні поєднували мікроживцювання основних пагонів та відділення додаткових пагонів. Встановлено вплив складу живильного середовища на регенераційні процеси у рослин, найбільший коефіцієнт розмноження рослин *Castanea sativa* був відмічений на живильному середовищі доповненому 1,5–2 мг/л БАП, після четвертого пасажу. Дані середовища виявились універсальним: DKW_{48} для каштанів європейського походження, WPM_{40} для каштанів азійського походження. Оскільки розрахунок коефіцієнту розмноження за сукупністю біометричних параметрів показав, що саме при такому поєднанні гормонів можна одержати максимальну кількість мікроживців на один експлант. Такі результати також підтверджуються при обробці даних методом двофакторного дисперсійного аналізу, оскільки не виявлено впливу на біометричні параметри взаємодії факторів.

РОЗДІЛ 5.
ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

В сучасних умовах, коли широко впроваджуються нові технології та нові технічні засоби механізації виробничих процесів, індустріальні технології виробництва сільськогосподарської продукції, використовують новітні біотехнологічні методи, особливого значення набула проблема охорони праці.

Охорона праці — це система правових, соціально-економічних, організаційно-технічних, санітарно-гігієнічних і лікувально-профілактичних заходів та засобів, спрямованих на збереження життя, здоров'я і працездатності людини у процесі трудової діяльності [52].

Законодавча база охорони праці України налічує ряд законів, основними з яких є Закон України «Про охорону праці» та Кодекс законів про працю (КЗпП). До законодавчої бази належать також закони України: «Про загальнообов’язкове соціальне страхування від нещасних випадків на виробництві та професійних захворювань, які спричинили втрату працездатності», «Про охорону здоров’я» і «Про загальнообов’язкове соціальне страхування у зв’язку з тимчасовою втратою працездатності та витратами, зумовленими народженням та похованням». Їх доповнюють державні міжгалузеві й галузеві акти — це стандарти, інструкції, правила, норми, положення, статути та інші документи, яким надано чинність правових норм, обов’язкових для виконання усіма установами і працівниками України [53].

Безпека робіт в лабораторіях мікробіологічного профілю (далі лабораторії) повинна забезпечуватись відповідно до вимог ГОСТ 12.3.00275, 12.1.008–76. ДСП №9.9.5.035.99, цих правил та інших чинних нормативних актів [54].

При виконанні робіт в лабораторії на працюючих можуть впливати небезпечні та шкідливі виробничі фактори:

- біологічні (мікроорганізми: бактерії, віруси, рикетсії, спірохети, хламідії, гриби; гельмінти, найпростіші та ін., а також продукти їх

життєдіяльності; макроорганізми: тварини, людина і продукти їх життєдіяльності; культури клітин і тканин, генетичні фрагменти, діагностичні препарати, тощо);

- хімічні (реактиви, дезінфекційні засоби, канцерогенні, подразнюючі, сенсибілізуючі, мутагенні, алергенні та інші речовини);
- механічні: виробниче обладнання (обладнання, що працює під тиском, центрифуги, лабораторне скло, ріжучий, колючий інструментарій, гострі краї, задирки та ін.);
- фізичні (електричний струм, ультрафіолетове, електромагнітне випромінювання, недостатня освітленість, відхилення вологості і температури робочої зони від встановлених норм, підвищена (занижена) рухомість повітря, підвищений вміст шкідливих речовин у повітрі робочої зони, підвищений шум, гаряча вода та пара);
- людські (нервово-психічні, фізичні (перевантаження персоналу), акти вандалізму та ін);
- пожежонебезпека.

Для запобігання нещасним випадкам під час роботи в лабораторії всі працівники повинні обов’язково дотримуватись правил охорони праці і проводити профілактичні заходи для їх попередження.

Рівні концентрацій шкідливих виробничих факторів повинні відповідати чинним санітарним нормам, лабораторія — забезпечена водопроводом, каналізацією, електрикою, засобами зв'язку, вентиляцією, опаленням, газифікована.

При роботі з культурами мікроорганізмів, та в усіх інших випадках, пов'язаних з їх зберіганням і рухом в межах та поза межами лабораторії, працівники повинні керуватися « Положенням про порядок обліку, зберігання, обігу, відпуску та пересилки культур бактерій, вірусів, рикетсій, грибів, найпростіших, мікоплазм, бактерійних токсинів біологічного походження».

Особливими повинні бути також вимоги до приміщення лабораторії. Поверхня стін у лабораторних приміщеннях повинна бути водостійкою, легко

митися; на висоту 1,5 м стіни облицовують глазурованою плиткою або фарбують олійною фарбою світлих тонів; у автоклавних, боксах, віварії — на всю висоту — світлою глазурованою плиткою або іншими облицювальними матеріалами, дозволеними МОЗ України для цієї мети. Підлога в лабораторних приміщеннях має бути гладкою, легко митися, стійка до дії деззасобів, при цьому покриття не повинно бути слизьким. Лінолеумні покриття не повинні мати дефектів (щілини, тріщини, дірки, тощо). Шви листків лінолеуму, що прилягають один до одного, повинні бути ретельно пропаяні. Стики опорядження стін, підлоги, стелі повинні мати закруглення (галтелі) для зручності санітарної обробки та прибирання. Підвісні стелі повинні бути герметичними. При цьому конструкція підвісної стелі повинна забезпечувати можливість її прибирання, очищення, дезінфекції. Ширина основних проходів до робочих місць або між двома рядами обладнання має бути не менше 1,5 м з урахуванням виступаючих конструкцій. Двері всіх виробничих приміщень повинні бути гладкими, без виступів. Вікна і двері приміщень "заразної" зони повинні бути герметичними [54].

Бокс для досліджень повинен бути з двох відділень: бокс і передбоксник, відділені скляною перегородкою. Передбоксник призначається для одягання стерильного одягу і проведення допоміжних робіт. В ньому розміщують медичну шафу для зберігання стерильного матеріалу та шафу для спецодягу. Бокси обладнують припливно-витяжною вентиляцією, в них подається стерильне повітря, що проходить через бактеріальні фільтри. Місця роботи з мікробіологічним матеріалом обладнують ультрафіолетовими лампами. Вимикачі їх повинні знаходитися поза боксом і передбоксником. Знаходитися в приміщенні під час роботи ультрафіолетових ламп забороняється.

Персонал лабораторій забезпечується медичними халатами, шапочками, змінним взуттям та іншими засобами індивідуального захисту залежно від характеру робіт, що виконуються, згідно діючих галузевих норм. Спеціальний одяг, взуття та інші засоби індивідуального захисту повинні відповідати

характеру та умовам роботи, забезпечувати безпеку праці, підбиратися індивідуально для кожного працівника, закріплюватися за ним і зберігатися окремо від особистого одягу. Спеціальний одяг підбирається таким чином, щоб краї подолу та рукавів повністю закривали власний одяг. Взуття повинно бути з таких матеріалів, що легко миється та обробляється. Забороняється носити взуття із тканини та з відкритим носком. Зміна робочого одягу повинна проводитись в міру забруднення, але не рідше ніж 1 раз на тиждень. Для роботи в боксі, крім основного спецодягу, необхідно мати стерильний комплект: халат, шапочку, маску, гумові рукавички, бахіли, які зберігаються у передбокснику. Оптимальним є використання одноразового стерильного одягу [54].

Зберігання хімічних реактивів здійснюють згідно методичних вказівок №2684-73.

Особи, які не досягли 18-річного віку, а також вагітні до роботи не допускаються. Працівники, які мають безпосереднє відношення до експлуатації автоклавів або балонів із стиснутим або скрапленим газами, повинні пройти підготовку і мати посвідчення про допуск їх до роботи з автоклавами (балонами). Навчання та атестація персоналу, який обслуговує посудини, що працюють під тиском, проводяться у професійно-технічних училищах, учбово-курсових комбінатах (курсах) або на спеціальних курсах, створених за узгодженням з місцевими органами Держнагляд охорони праці. Індивідуальна підготовка не допускається [55, 56].

Відповідальність за організацію та додержання біологічної безпеки в установі несе керівник, а в підрозділах — їх завідувачі (керівники). Контроль за виконанням вимог даних правил покладається на заступника керівника установи [55, 56].

Відповідно до Закону України «Про охорону праці» керівник установи (власник) зобов'язаний забезпечити:

- дотримання правил чинного законодавства, з питань охорони праці, техніки безпеки, протиепідемічного режиму та виробничої санітарії, створення безпечних умов праці у цілому по установі і в лабораторіях;

- складання планів (узгоджень) на проведення заходів з охорони праці, протиепідемічного режиму, техніки безпеки та виробничої санітарії і контроль за їх виконанням і звітністю;
- здійснення контролю за підготовкою та виконанням працівниками лабораторій правил та інструкцій з протиепідемічного режиму і техніки безпеки;
- проведення передбачених чинним законодавством обов'язкових попередніх та періодичних медичних оглядів працівників;
- забезпечення працюючих спецодягом, спецвзуттям, засобами індивідуального захисту, спецхарчуванням, дезінфікуючими та миючими засобами у відповідності до затверджених норм;
- своєчасне розслідування та облік нещасних випадків і професійних захворювань в лабораторіях відповідно до "Положення про порядок розслідування та ведення обліку нещасних випадків, професійних захворювань і аварій на виробництві", затв. Постановою Кабінету Міністрів України від 30.11.11, №1232.

На завідуючого (керівника) лабораторії покладається:

- контроль за дотриманням працівниками лабораторії правил охорони праці, біологічної та пожежної безпеки і прийняття заходів до порушників згаданих правил (через керівника установи);
- розробка і забезпечення робочих місць відповідними інструкціями та правилами, що визначають безпеку роботи;
- систематичне проведення на робочому місці інструктажу з працюючими щодо безпечних методів роботи;
- створення умов безпечної експлуатації лабораторного обладнання, заборона роботи на несправному або не оснащеному пристроями, що забезпечують безпечність роботи, обладнанні;
- організація та проведення систематичного профілактичного огляду, ремонту обладнання лабораторії з реєстрацією;

- контроль за безпечним отриманням, транспортуванням, зберіганням, видачею біологічного матеріалу, сильнодіючих отруйних хімічних речовин, концентрованих кислот та лугів;
- своєчасне розслідування (протягом 24 годин) обставин та причин нещасних випадків, що мали місце в лабораторії, вживання заходів щодо попередження виробничого травматизму та професійних отруєнь і захворювань;
- недопущення до роботи осіб, які не пройшли відповідної підготовки та інструктажу і не мають (або мають прострочені) посвідчення про допуск до роботи, а також осіб, які не пройшли медичний огляд; контроль за правильним застосуванням, зберіганням, пранням та ремонтом спеціального (захисного) одягу і спецвзуття;
- контроль наявності укомплектованої аптечки першої медичної допомоги.

Для того, щоб підвищити рівень роботи і усунути недоліки та покращити умови праці необхідно:

1. Відновити техніку, щоб підвищити її надійність;
2. Після проведення інструктажів організувати перевірку знань працівників;
3. Організувати зберігання спецодягу і засобів індивідуального захисту в легкодоступних місцях і у достатній кількості;
4. Провести атестацію умов праці з метою виявлення показника шкідливості роботи для виплати грошової компенсації за шкідливі умови;
5. Покращити якість харчування та умови відпочинку в зв’язку з складними умовами праці;
6. Посилити контроль за дотриманням правил безпеки праці працівниками під час проведення робіт в біотехнологічній лабораторії.

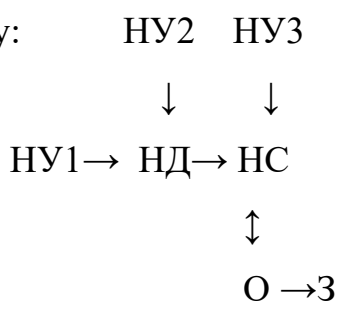
Маючи певні знання і уміння з охорони праці з високою підготовкою працівників біотехнологів, високою дисципліною і розумінням за доручену

справу дає можливість відповідальним працівникам за охорону праці, досягати вагомих результатів.

Блок-схема процесу формування та виникнення небезпечних ситуацій:

- НУ1 – не працює витяжна шафа
- НУ2 – лаборант працює із високотоксичною речовиною (ZnSO4)
- НУ3 – лабораторія не забезпечена індивідуальними засобами захисту (респіратори У2-К, марлеві пов'язки)
- НД – лаборант працює без засобів захисту органів дихання
- НС – У зону дихання працівника потрапляють пари кислого цинку (ZnSO4)
- О – отруєння
- З – захворювання

Модель процесу:



Тому, для використання безпечних умов праці в лабораторії потрібно:

– вчасно проводити засідання з працівниками;

– виконувати санітарно-гігієнічних норми;

– забезпечувати робітників харчуванням в зв'язку з вредними умовами і створювати сприятливі умови відпочинку;

- контроль зі сторони спеціалістів за виконання правил безпеки і охорони праці робітниками [35,42].

Пестициди як біологічно активні речовини часто мають негативний вплив на навколишнє середовище. Не відмінною умовою захисту довкілля є бездоганне дотримання всіх регламентів щодо застосування їх норм внесення, строків, способів тощо.

Промисловим насадженням горобини великої шкоди завдають шкідники, зокрема це — Горобиновий кліщ (*Eriophyes goniothorax sorbeus Nal*.),

Грушевий кліщ (*Epiophyes piri Pgst*.), Горобинова тля (*Dentatus sorbi Kalt*.). Тому тут не обійтися без захисту інсектицидами. Дієвими засобами захисту для горобини є: Аполло, Цезарь, Бі-58, Ламдекс.

Важливим аспектом у застосуванні інсектицидів є строге дотримання ГДК — гранично допустимих кількостей препаратів у продукції, ґрунті, воді, робочій зоні застосування препарату. Це запобігає можливому негативному впливу на здоров'я людей, що працюють на обробленій території, споживають продукцію із зони застосовування інсектицидів, а також унеможливлює перенесення препаратів з місць з високою у місця з меншою концентрацією.

Значна увага надається дотриманню положень МДР — максимально допустимих рівнів дозволених препаратів безпосередньо в продукції продуктах харчування.

Застосування хімічних речовин для захисту рослин з кожним роком збільшується і, як наслідок, спостерігається посилена негативна дія на зовнішнє середовище: забруднюються атмосфера, ґрунти, водні басейни і річки; залишки хімічних речовин нагромаджуються в продуктах харчування та кормах. У той же час часто створюються нові форми організмів, стійких до дії препаратів.

ВИСНОВКИ

1. При збільшенні експозиції стерилізації вихід стерильних експлантів становить 100 %, однак вони є не життєздатними. Кращі результати у стерилізаторів нітрат срібла та мертиолят натрію показали за експозиції 15 хвилин, вихід стерильних–життєздатних експлантів відповідно становив 63,4 % та 51,8 %.

2. Кращими строками для введення була перша декада травня при якій отримано найвище поєднання стерильних і життєздатних живців — 66,9 %

3. Для стерилізації експлантів *C. sativa* рекомендуємо використовувати 2,5% водний розчин гіпохлоритом натрію.

4. Високі коефіцієнти розмноження адвентивних пагонів зафіксовано на живильному середовищі DKW_{48} у каштана їстивного і каштана американського, які складали 7,9 і 8,4.

РЕКОМЕНДАЦІЇ СЕЛЕКЦІЙНІЙ ПРАКТИЦІ

На живильному середовищі MS_{31} зафіксовано високі коефіцієнти у *Castanea dentata* Mill., *Castanea pumila* Mill., C. sativa 'Aureo-maculata', C. sativa 'Pyramidalis', C. sativa 'Napoleon' і C. sativa 'Karlovo -3', що становили відповідно 9,4, 8,9, 9,7, 8,1, 8,3, 8,8. Живильне середовище WPM_{40} підвищувало регенераційну здатність втім числі і збільшувався коефіцієнт розмноження у *Castanea sativa* Mill. — 7,2, та C. sativa 'Glabra' — 7,5

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бессонова В. П. Эффективность осаждения пылевых частиц листьями древесных и кустарниковых растений // Сб. научн. тр. Вопросы защиты природной среды и охрана труда в промышленности. 1993. С. 34 – 37.

2. Баран Е.И., Федоровская Я.А. Влияние промышленных газов на содержание хлорофилла, интенсивность фотосинтеза и дыхания у древесных растений // Всесоюз. конф. Растения и промышленная среда. Днепропетровск. 1990. С. 69 – 70.

3. Азизбекова З.С. Физиология набухания и прорастания семян некоторых кормовых трав в солевых растворах // Изв. АН АзССР. Сер. биол. и с.-х. наук. 1959. – № 2. С. 113–122.

4. Кузнецов С.І., Клименко Ю.О., Біоекологічні основи створення садово-паркового ландшафту // Інтродукція рослин. 2002. № 2. С. 104 – 108.

5. Клименко С.В., Джан Т.В. Новые и нетрадиционные плодовые растения украины. Перспективы использования в фармации // Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет». 2014. с. 134.

6. Колесніченко О.В. Особливості будови генеративної сфери каштана їстивного (Castanea sativa mill.) в умовах лісостепу України // Наукові доповіді НУБіП України. 2015. №. 4. С. 26-26.

7. Клименко С.В. Нетрадиционные плодовые растения в свете органического садо-водства // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2012. №. 180. С. 156-165.

8. Клименко С.В. Интродукция и селекция нетрадиционных плодовых растений в Украине // Труды Никитского ботанического сада. 2008. Т. 130. С. 83-95.

9. Абашидзе Я.Л. Прививка каштана съедобного на дуб // Лес и степь. 1951. № 7. С. 10–12.

10. Барышман Ф.С. Опыт выращивания орехоплодных в лесных культурах // Москва. 1968. 135 с.

11. Барышман Ф.С., Чепурной В.С. К вопросу о плодоношении каштана съедобного в Прикубанье // Тр. Кубан. СХИ. 1970. Вып. 177. С. 71–86.

12. Барышман Ф. С. Культура каштана съедобного в Прикубанье // Краснодар. 1982. Вып. 217 (245). С. 31–45.

13. Басманова Н. Н. Особенности выращивания каштана съедобного в Закарпатье // Лесное хозяйство. 1972. № 8. С. 39–40.

14. Басманова Н. Н. Культуры каштана съедобного в Закарпатье // Лесное х-во. 1974. Вып. 3. С. 74–77.

15. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е., Маматьева Т.Б. Проблемы морфогенеза *in vivo* и *in vitro* (эмбриоидогенез у покрытосеменных) // Ботан. журн. 1978. Т. 63, № 1. С. 87–111.

16. Генкель П. А. Современное состояние проблемы засухоустойчивости растений и дальнейшие пути её изучения // Физиология устойчивости растений. М. 1960. С. 385–401.

17. Кохно Н.А. Об оценке успешности интродукции древесных растений // Сб. науч. тр. К. 1983. С. 3–8.

18. Красильников Н.А. Определитель бактерий и актиномицетов // М. 1949. 839 с.

19. Криган Т.Г. Каштан съедобный // Садоводство и виноградарство Молдавии. 1989. № 8. С. 47.

20. Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю. Каллусогенез как путь морфогенеза в культуре изолированных пыльников злаков // Усп. соврем. биол. 1997. Т. 111. Вып. 1. С. 83–94.

21. Кузнецов С.И. Основы интродукции и культуры хвойных древнего средиземноморья на Украине и в других районах юга СССР // К. 1984. 124 с.

22. Кулагин Ю.З. Древесные растения и промышленная среда: // М. 1974. 124 с.

23. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений // М. 1988. С. 7–24.

24. Власюк П.А. Биологические элементы в жизнедеятельности растений // К. 1969. 515 с.

25. Войников В.К. Реакция генома клетки на температурный стресс // Рост и устойчивость растений. Новосибирск. 1988. С. 154–163.

26. Максимов Н.А. Избранные работы по засухоустойчивости и зимостойкости растений // М. 1952а. Т. 2. 215 с.

27. Мецлер Д. Биохимия // М. 1980. Т. 3. 488 с.

28. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян: справочник // Л. 1985. 347 с.

29. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии // Киев. 1982. 583 с.

30. Мусієнко М. М. Фізіологія рослин // К. 1995. 503 с.

31. Шищенко П.Г. Національна доповідь про стан навколишнього природного середовища в Україні // К. 1993. 290 с.

32. Неверова О.А., Холмогорова Е.Ю. Ксерофитизация листьев древесных растений как показатель загрязнения атмосферного воздуха // Лесной журнал. 2002. № 3. С. 29–33.

33. Некрасов В.И. Основы семеноведения древесных растений при интродукции // М. 1973. 279 с.

34. Нестеров Я. С. Методические рекомендации по селекции плодовых и ягодных культур в связи с периодом их покоя // Тамбов. 1971. 94 с.

35. Несторова Л.А., Беляева Л.В. Некоторые физиологические особенности газоустойчивости древесных растений // Науч. тр. Моск. лесотехн. ин-та. 1985. Вып. 167. С. 107–109.

36. Никитинский Ю.И., Соколова Т.А. Декоративное древоводство // М. 1990. 255 с.

37. Николаевский В. С. Биологические основы газоустойчивости растений // Новосибирск. 1979. 280 с.

38. Николаевский В.С. Научные основы регулирования газоустойчивости растений // Науч. тр. Моск. лесотехн. ин-та, 1985. Вып. 167. С. 97–99.

39. Онкина Е. З. Физиолого-биохимическая диагностика зимостойкости и морозоустойчивости плодовых культур // Науч. конф. по вопросам морфо-физиологической периодичности и зимостойкости древесных раст. Уфа. 1959. С. 85–86.

40. Доброчаева Д.Н. и др. Определитель высших растений Украины // К. 1987. 548 с.

41. Веселова Т.В., Веселовский В. А., Чернавский Д. С. Стресс у растений // М. 1993. 144 с.

42. Бараненко В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология. 2006. Т. 48, № 6. С. 465–474.

43. Батыгина Т. Б. Эмбриоидогения – новая категория способов размножения цветковых растений // Тр. Ботан. ин-та им. В. Л. Комарова. СПб. 1993. Вып. 8. С. 15–25.

44. Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю. Андрогенез *in vitro* у злаков // Цитология. 1994. Т. 36, № 9–10. С. 993–1005.

45. Белицкая Э.Н. Особенности загрязнений атмосферного воздуха промышленного региона // Лікарська справа. 1996. № 5–6. С. 74 – 78.

46. Вінниченко О.М. та ін. Гетерогенність запасних білків насіння гіркокаштана звичайного (*Aesculus hippocastanum L.*) за дії полютантів металургійного виробництва // Доп. НАН України. 2008. № 9. С. 181–184.

47. Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю. Культура изолированных пыльников злаков с позиции экспериментальной эмбриологии растений (методологические аспекты) // Уфа. 1992. 32 с.

48. Щепотьєв Ф. Л., Павленко Ф. А., Ріхтер О. А. Орехоплодовые лесные и садовые культуры. // М. 1985. 37 с.

49. Lauteri M. et al. Genetic variation in photosynthetic capacity, carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in provenances of Каштана

їстивного adapted to different environments //Functional ecology. 1997. Т. 11. №. 6. С. 675-683.

50. Колесников В.А. Методы изучения корневой системы древесных растений //М. 1972. Т. 152. С. 2011.

51. Рихтер А.А. Использование в селекции взаимосвязей биохимических признаков //Труды Никит. ботан. сада. 1999. Т. 118. С. 121-129.

52. Щепотьев Ф. Л. и др. Орехоплодовые лесные культуры // М. Лесная промышленность. 1978. 115 с.

53. Соколова В.В. Редкая орехоплодная культура Castanea dentata (Marshall) Borkh. в коллекции Главного ботанического сада РАН //Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. 2016. №. 12. С. 61-63.

54. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе // М., 1999. 160 с.

55. Бутенко Р.Г., Шалина З.Б., Фролова Л.В. Индуцированый органогенез и характеристика растения, полученных в культуре тканей табака // Генетика. 1967. №3. С. 23–29.

56. Бутенко Р.Г. Культуры изолированных тканей и физиология морфогенеза растений //М. 1964. 272 с.

57. Бутенко Р.Г. Рост и дифференциация в культуре клеток и тканей // Рост растений и природные регуляторы. М. 1977. С. 6–21.

58. Бутенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений // М. 1975. 50 с.

59. Калинин Ф.Л., Сарнацька Л.А., Полищук К.П. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растеней // К. 1980. 488 с.

60. Lane W. Meristem tip culture of pear breeding prospects // Procuring of Eucarpia fruit action symposiym. Angels. 1970. P. 181–188.

61. Mosyakin S.L., Fedoronchuk M.M. Vascular plants of Ukraine. // A nomenclatural checklist. Kyiv. 1999. 345 p.

62. Phipps J.B. Studies in Crataegus (Rosaceae: Maloideae). 18. Typification of Crataegus crus-galli L. (Rosaceae) and nomenclatural notes on some related species of hawthorn // Bot. J. Linn. Soc. 1988. Vol.96. P. 359–369.

63. Qrunfleh M.M. Studies on the hawthorn (Crataegus azarolus L.). 3. A potential rootstock for 'Golden Delicious' apple and 'Williams' pear // J. Hort. Sci. 1993. Vol. 68. №6. P. 983–987.

64. Smith P. Plant tissue culture: Techniques and experiments // Texas: A. and M. Univer., 1992. 171 p

65. Зайцев Г.Н. Фенология древесных растений //М. 1984. 120 с.

66. Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике // М. 1984. 424 с.

67. Єщенко В.О. та ін. Основи наукових досліджень в агрономії // К. 2005. 286 с.

68. Глухов О.З. Современные направления фитоэкологического мониторинга окружающей среды в индустриальном регионе // V наук.- практ. конфер. «Екологічна безпека техногенно перевантажених регіонів. Оцінка і прогноз екологічних ризиків» Ялта. 2010. С. 87–88.

ДОДАТКИ

Додаток А
Склад базових живильних середовищ

Елемент середовища	DKW, мг/л	WPM, мг/л
Макроелементи		
NH_4NO_3	1416,0	400,0
$(NH_4)_2SO_4$	–	–
KNO_3	–	–
$CaCl_2 \times 2H_2O$	149,0	72,5
$MgSO_4 \times 7H_2O$	740,0	180,5
KH_2PO_4	265,0	170,0
$Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$	196,9	386,8
K_2SO_4	155,9	990,0
$FeSO_4 \times 7H_2O$	33,8	–
$Na_2EDTA \times 2H_2O$	45,4	–
FeNaEDTA	–	36,7
Мікроелементи		
H_3BO_3	4,0	6,2
$MnSO_4 \times 4H_2O$	33,4	22,3
$CoCl_2 \times 6H_2O$	–	–
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,025	0,025
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	–	8,6
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0,39	0,25
KJ	–	–
$Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O$	17,0	–
Амінокислоти		
Гліцин	0,1	2,0
Вітаміни		
B_1	0,1	1,0
B_6	0,1	0,5
PP	0,1	0,5
Джерело вуглеводів		
Глюкоза	–	
Сахароза	30000,0	20000,0
pH — 5,6–5,8		