

МОН УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
(УНУ)

Факультет агрономії
Кафедра генетики, селекції рослин та біотехнології

Допущено до захисту

« ____ » _____ 2025 р.

Зав. кафедри, д. с.-г. н., професор

_____ Людмила РЯБОВОЛ

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
ступеня вищої освіти магістр

**ПІДБІР УМОВ ІНДУКУВАННЯ І ПРОГРАМОВАНОГО РОЗВИТКУ
КАЛЮСНОЇ ТКАНИНИ РИЖНЮ ПОСІВНОГО В НАВЧАЛЬНО-
НАУКОВІЙ ЛАБОРАТОРІЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ УНУ**

Виконав: студент 2 курсу, 24 м-а групи

спеціальності 201 Агрономія

МАРІКОВСЬКИЙ Артем Олександрович

Керівник – ЛЮБЧЕНКО Андрій, к. с.-г. н., доцент

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
РОЗДІЛ 1. АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ В СЕЛЕКЦІЇ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР (огляд літератури).....	5
1.1. Напрями використання культури <i>in vitro</i> в генетично- селекційній роботі.....	5
1.2. Культура калюсних тканин в біотехнологічних дослідженнях рослин.....	6
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ	12
2.1. Характеристика вихідного сорту.....	12
РОЗДІЛ 3. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	13
3.1. Параметри культивування рослинного матеріалу <i>in vitro</i> ..	13
3.2. Опис базових живильних середовищ.....	13
3.3. Схема досліду та розміщення варіантів.....	15
3.4. Програма досліджень і методика їх проведення	15
РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	17
4.1. Ініціація калюсогенезу та субкультивування калюсних тканин рижію посівного.....	17
4.2. Індукування морфогенезу калюсних тканин рижію посівного та отримання рослин-регенерантів.....	23
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА	31
5.1. Моделювання виробничих небезпек під роботи в біотехнологічній лабораторії.....	31
5.2. Охорона навколишнього природного середовища	32
ВИСНОВКИ.....	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	35
ДОДАТКИ.....	40

ВСТУП

Збільшення різноманіття технічних виробів та харчових продуктів зумовлює необхідність розширення спектра сировинних ресурсів для їх виробництва. Це стосується й технічних і харчових олій, адже наявні сьогодні натуральні рослинні олії не повною мірою покривають потреби численних галузей національної економіки.

Висока стійкість до хвороб і шкідників, здатність добре розвиватися за різних умов вирощування, коротка вегетація та значний уміст олії в насінні визначають ріжій посівний (*Camelina sativa* L.) як перспективну олійну культуру. Завдяки екологічно безпечній технології вирощування та низьким виробничим витратам ріжій має потенціал стати альтернативою традиційним олійним культурам — ріпаку та соняшнику. Проте, незважаючи на високу господарську цінність цієї культури, масштаби її вирощування в Україні залишаються незначними. Тому подальше збільшення посівних площ ріжію посівного неможливе без активізації селекційної та насінницької роботи.

Останнім часом у селекційно-насінницькій науці та практиці все ширше впроваджуються біотехнологічні підходи. Застосування культури *in vitro* забезпечує можливість проводити дослідження протягом усього року незалежно від погодних умов, добирати рослинний матеріал із цінними ознаками та розмножувати його без генетичних змін, отримувати велику кількість копій з мінімальної кількості вихідного матеріалу, швидко відновлювати та розмножувати рослини з низькою фертильністю чи життєздатністю, а також формувати *in vitro* банки рослин із господарсько цінними властивостями.

Одним із основних видів біоматеріалу при проведенні досліджень *in vitro* є калюс. Розроблення ефективних методів індукції та керованого розвитку калюсної тканини є ключовим чинником, що визначає успішність подальших біотехнологічних робіт. Процес калюсогенезу є складним і специфічним

явищем, залежним від численних внутрішніх і зовнішніх чинників, тому потребує індивідуального підходу для кожного виду рослин.

Мета і завдання дослідження. Метою нашої роботи було підбір умов для індукування, пасажування та морфогенезу калюсної тканини рижію посівного. Для досягнення мети було поставлено на вирішення наступне завдання:

– визначити умови (тип експланту, склад живильного середовища, концентрація регуляторів росту) для індукування та програмованого розвитку калюсної тканини рижію посівного;

Об'єкт дослідження: закономірності індукування калюсної маси, пасажування калюсних тканин, особливості проходження морфогенезу та отримання рослин-регенерантів рижію посівного.

Предмет дослідження: біотехнологічні методи, індуковані калюсні лінії рижію посівного та отриманні з них рослини-регенеранти.

Наукова новизна роботи. Встановлено умови індукування, морфогенезу та культивування калюсної тканини рижію посівного, підібрано тип експланту, оптимальний склад живильного середовища, вміст та співвідношення регуляторів росту.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено технологію отримання та пасажування калюсної тканини рижію посівного, активації її морфогенного потенціалу шляхом регенерації, що може бути використано за проведення біотехнологічних досліджень з цією культурою.

Особистий внесок автора полягає в опрацюванні даних літературних джерел стосовно вказаної теми, закладанні дослідів, проведенні обліків та спостережень, їх аналізі, узагальненні результатів досліджень і оформленні дипломної роботи.

Апробація результатів дипломної роботи. Основні результати та положення дипломної роботи оприлюднено на науковій студентській конференції Уманського національного університету та засіданнях

студентського наукового гуртка кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського НУ.

РОЗДІЛ 1

АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ В СЕЛЕКЦІЇ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР (огляд літератури)

1.1. Напрями використання культури *in vitro* в генетично-селекційній роботі

Біотехнологія рослин — це комплекс технологічних підходів, спрямованих на модифікацію, удосконалення, створення та розмноження рослинних організмів з метою отримання корисної продукції. Інакше кажучи, це вирощування та маніпуляції з клітинами, тканинами й органами рослин поза межами цілісного організму на штучних живильних середовищах за контрольованих умов [1].

Сучасні дослідження в галузі біотехнології рослин умовно поділяють на три провідні напрями:

Технології, що ґрунтуються на використанні культур клітин, тканин та органів рослин (*in vitro*);

ДНК-технології — молекулярно-генетичні методи аналізу та модифікації рослин;

Технології створення трансгенних рослин [2].

Застосування культур *in vitro* робить можливим регулювання параметрів вирощування біологічного матеріалу та здійснення маніпуляцій на клітинному й молекулярному рівнях. Крім того, цей підхід дозволяє моделювати стресові фактори для добору резистентних генотипів та швидко отримувати нові форми з цінними властивостями, що практично недосяжно при роботі з інтактними рослинами [3].

Біотехнологічні підходи в селекційно-генетичних дослідженнях і насінницькій практиці використовують переважно для:

- прискореного масового розмноження цінних генотипів;

- отримання оздоровленого, безвірусного посадкового матеріалу;
- формування банків генетичних ресурсів;
- дослідження процесів клітинної диференціації, росту й розвитку рослинного організму, а також метаболічних шляхів і механізмів їх регуляції у клітинах та тканинах;
- створення нових генотипів сільськогосподарських культур із комплексом бажаних господарсько цінних ознак [3, 4].

Отже, використання біотехнологічних методів у селекційному процесі істотно прискорює створення нових сортів, гібридів та форм сільськогосподарських культур, виводячи селекцію на якісно новий технологічний етап розвитку.

1.2. Культура калюсних тканин в біотехнологічних дослідженнях рослин

Відбір сільськогосподарських культур починається зі створення вихідного матеріалу, тобто добору об'єкта, який надалі підлягатиме селекційному вдосконаленню. У біотехнологічних дослідженнях характер та форма вихідного матеріалу визначаються умовами проведення експерименту, застосованими методами та поставленою метою. Найчастіше використовують такі типи біоматеріалу:

- калюсну тканину;
- суспензійну культуру клітин;
- культуру ізольованих протопластів;
- незрілі зародки;
- окремі клітини;
- незапліднені насіннєві зачатки;
- пиляки та пилкові зерна [5].

Калюсна тканина є провідним видом матеріалу для проведення досліджень *in vitro*. Калюс може бути використаний як безпосередній об'єкт експерименту або як вихідна субстанція для отримання інших культур та

систем [2, 3].

Калюс являє собою неорганізовану клітинну масу, що утворюється в результаті проліферації та дедиференціації тканин. На подальших етапах калюс здатний до диференціації та набуття спеціалізації [6]. Зовні калюс зазвичай має білуватий чи жовтуватий, рідше — зеленуватий відтінок, складається з паренхімних клітин різних розмірів із великими ядрами та відносно товстими клітинними стінками, які безладно розміщені у тканинному масиві [2, 3].

Калюсна тканина на первинних експлантах формується внаслідок поділу меристематичних клітин та набуття здатності до поділу вакуолізованими клітинами паренхіми. У природних умовах калюс виникає сприяючи загоєнню ран шляхом утворення пробкової тканини [7].

Біотехнологічні дослідження [8–13] свідчать, що реалізація морфогенетичного потенціалу клітин та тканин *in vitro* визначається сукупністю чинників:

Внутрішні чинники:

- генотипова характеристика виду та сорту рослини-донора;
- вік та фізіологічний стан експланту;
- тип, розмір та сезонність отримання експланту.

Зовнішні чинники:

- хімічний і гормональний склад живильного середовища;
- фізичні параметри культивування (температура, освітлення, газовий режим, аерація, осмотичний тиск, рівень рН та ін.).

Вирішальним фактором успішної індукції калюсогенезу в умовах *in vitro* є оптимальна концентрація та співвідношення регуляторів росту ауксинової та цитокінінової природи у живильному середовищі. Ауксини забезпечують процес дедиференціації клітин та їх підготовку до поділу, тоді як цитокініни стимулюють проліферацію дедиференційованих клітин. Необхідні концентрації регуляторів росту залежать від біологічних особливостей рослини та типу експланту [14, 15].

Дослідники також відзначають [8, 16], що культивування різних типів ізольованих соматичних тканин однієї рослини часто потребує індивідуального корегування складу живильного середовища. Крім того, швидкість росту калюсної тканини визначається інтенсивністю, тривалістю та спектром освітлення, температурою, особливостями газового середовища й аерації, осмотичними умовами, показником кислотності та загальним хімічним складом середовища.

Для більшості трав'янистих видів оптимальна освітленість під час формування калюсних структур становить приблизно 1000 люкс, а рекомендована тривалість фотоперіоду — близько 16 годин. Відхилення від цих показників істотно впливає на темпи росту та морфогенетичний розвиток тканинних культур [17, 18].

Підбираючи оптимальний температурний режим для культивування клітин і тканин *in vitro*, необхідно враховувати температурні потреби виду в умовах природного зростання (*in vivo*) [19]. Для більшості рослин помірної кліматичної зони комфортний діапазон температур знаходиться в межах 20–25 °C, тоді як для субтропічних видів оптимальні показники становлять близько 29–30 °C [20].

У процесі дедиференціації клітин виникає соматична мінливість, яка є джерелом генетичного різноманіття як у калюсних тканинах, так і в рослин-регенерантів, отриманих із них. Серед характеристик соматоклональної мінливості відзначають зміни у кількості та структурі хромосом, точкові мутації, транспозиції мобільних генетичних елементів, ампліфікацію генів, зміни експресії в мультигенних локусах, перебудови цитоплазматичних геномів і соматичний кросингвер.

Причини виникнення соматоклональної мінливості поділяють на дві основні категорії:

1. Генетична гетерогенність соматичних клітин експланту вихідної рослини.

2. Генетичні та епігенетичні зміни, індуковані умовами культивування *in vitro* [2, 6–10, 21–24].

У ході дослідження [25] було проаналізовано кількісні та якісні показники соматклонів першого покоління (SC1), отриманих із культури незрілих зародків 11 сортів ярої м'якої пшениці різного походження. Було встановлено, що 28,7 % рослин-регенерантів демонстрували фенотипові відхилення від батьківських форм.

Серед виявлених змін у соматклонів було зафіксовано таке:

- рослини формували стерильні колосся або давали нежиттєздатне зерно (понад 46 %);
- у регенерантів спостерігалася посилена куцистість — від 8 до 17 продуктивних стебел (17 %);
- рослини відзначалися зміною забарвлення колоса (10 %);
- були карликовими соматклони, безостими або характеризувалися укороченим колосом (6–8 %);
- найрідше (близько 3 %) реєструвалися варіанти із зігнутим, зміненим забарвленням стебла або булавовидною формою колоса.

Розподіл частоти прояву ознак та їх різноманітність були унікальними для регенерантів кожного окремого сорту. Встановлено, що фенотипові прояви зумовлені не лише генотипом донорної рослини, але й специфікою умов культивування на клітинному рівні. Це підкреслює важливість точного контролю фізико-хімічних параметрів середовища для одержання стабільних і господарсько-цінних рослин-регенерантів.

Культивування соматичних тканин у системах *in vitro* дає можливість отримувати рослини-соматклони, що відрізняються від вихідних форм як фенотипово, так і генетично. У таких варіантів можуть змінюватися як моногенні, так і різні генні ознаки [20].

Мінливість *in vitro* зумовлює морфологічні, фізіологічні та біохімічні перебудови, які можуть бути як позитивними, так і негативними. Для багатьох сільськогосподарських культур виділено соматклональні варіанти з підвищеною

продуктивністю, покращеними якісними показниками продукції та підвищеною стійкістю до абіотичних і біотичних стресових чинників [3, 24].

Калюсна тканина завдяки тотипотентності клітин здатна формувати будь-який тип тканини, орган або навіть повноцінну рослину [20].

У умовах *in vitro* розрізняють наступні основні типи морфогенезу:

- органогенез — утворення органів (бруньок, пагонів);
- гістогенез — формування специфічних тканин із калюсних клітин;
- ембріоїдогенез — розвиток різних соматичних структур, подібних до зародків, які містять зачатки основних органів [2].

Здатність диференційованих вегетативних клітин до відновлення цілісного організму або його частини визначається комплексом чинників, серед яких ключове значення має генотип біоматеріалу. У пшениці встановлено окремі хромосомні локуси, що контролюють морфогенетичні властивості, а в інших видів ідентифіковано гени та цитоплазматичні фактори, які істотно впливають на регенераційну здатність [26].

Встановлено, що ступінь регенерації значно варіює як між видами, так і між сортами. Низькою здатністю до відновлення відзначаються представники айстрових, бобових та злакових культур [27–31].

За даними наукових досліджень [1, 20, 32], калюсні тканини *in vitro* можуть проявляти такі морфогенні особливості:

1. Розпушені, сильно обводнені тканини, легко діляться на дрібні агрегатні клітини; характеризуються швидким ростом та здатністю до тривалого підтримання в культурі за регулярного субкультивування;
2. Тканини середньої щільності з чітко вираженими меристематичними осередками;
3. Компактні калюси, у яких відбувається диференціація елементів камбію та провідної системи; ростуть повільно, швидко вступають у фазу регенерації, але не придатні для тривалого субкультивування.

До основних переваг використання калюсної тканини як об'єкта біотехнологічних досліджень належать:

- відносна простота отримання та культивування;
- можливість отримання рослин з покращеними господарсько-цінними ознаками;
- формування рослин, стійких до біотичних та абіотичних стресових чинників;
- здатність до інтенсивного синтезу біологічно активних сполук [33, 34].

Водночас дослідження калюсних культур виявили й певні обмеження [35]:

- повільний темп росту тканини;
- нерівномірний вплив токсичних або селективних чинників на окремі клітини;
- поступова втрата регенераційної здатності під час тривалого культивування.

Незважаючи на перспективність клітинних технологій, головною проблемою практичного використання культур ізольованих тканин і органів у селекції залишається розробка ефективних методів надійного отримання рослин-регенерантів із експлантів різного походження. Методи індукції морфогенезу універсальні лише у частині загальних закономірностей: система, успішна для одного генотипу, не завжди придатна для інших сортів того ж виду або споріднених видів [20].

Отже, калюсна тканина є одним із ключових типів вихідного матеріалу для клітинної селекції. Процеси калюсогенезу, культивування та морфогенезу визначаються низкою внутрішніх і зовнішніх чинників, а їх оптимальний підбір є запорукою успішності подальших досліджень.

РОЗДІЛ 2.

ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика вихідного сорту

Сорт Перемога. Заявник – Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка НАН України. Рослина формує округле стебло висотою 75–80 см, з 10–12 гілками. Суцвіття – довжиною 20 см. Плід – грушоподібний стручок, у якому розміщується 8–10 насінин світло-жовтого кольору. Маса 1000 насінин – 1,9 г. Сорт відзначається стійкістю до вилягання, розтріскування стручків і осипання насіння. Урожайність насіння – 1,8 т/га, вміст олії – 40 %, вміст ерукової кислоти – 1,3 %. Сорт занесений до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні у 2015 році [36–39].

РОЗДІЛ 3.

УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Параметри культивування рослинного матеріалу *in vitro*

Дослідження проводили у навчально-науковій лабораторії «Біотехнології» Уманського національного університету впродовж 2024–2025 років. У роботі застосовували методи культивування тканин *in vitro* відповідно до рекомендацій Р. Г. Бутенка [40].

Біоматеріал вирощували в культуральних кімнатах за наступних умов:

- Фотоперіод – 16 годин на добу;
- Інтенсивність освітлення – 4 кЛк;
- Температурний режим – 20–24 °С;
- Відносна вологість повітря – 75 %;
- Тривалість міжпасажного періоду – 30–35 діб.

3.2. Опис базових живильних середовищ

У роботі використовували живильні середовища за прописами Мурасіге–Скуга, Гамборга та Шенка–Хільдебрандта. Середовища відрізнялися між собою складом та співвідношенням макро- і мікроелементів (табл. 3.1).

В якості джерела вуглеводів застосовували сахарозу у концентрації 30 г/л. Кислотність (рН) живильного середовища підтримували на рівні 5,5–6, яку перевіряли за допомогою іонометра перед автоклавуванням та при необхідності коригували 1 н розчином HCl або KOH.

Для надання середовищу гелеподібної консистенції використовували агар-агар у концентрації 8 г/л. Стерилізацію середовищ проводили в автоклаві під тиском 1,5 атм протягом 20 хвилин.

Таблиця 1

Склад основного живильного середовища

Компоненти середовища	Кількість речовини, мг/л		
	Середовище Мурасіге–Скуга (MS)	Середовище Гамборга (B ₅)	Середовище Шенка–Хильдебранта (SH)
Основні неорганічні поживні речовини:			
NH ₄ NO ₃			
KNO ₃	1650	–	–
CaCl ₂ * 2H ₂ O	1900	2500	2500
MgSO ₄ * 7H ₂ O	440	150	200
(NH ₄) ₂ SO ₄	370	250	400
KH ₂ PO ₄	–	134	–
Na ₂ H ₂ PO ₄ * H ₂ O	170	–	170
NH ₄ H ₂ PO ₄	–	150	–
	–	–	300
Об'єм вихідного розчину на 1 л середовища, мл	50	50	50
Джерело мікроелементів:			
H ₃ BO ₃	6,2	3,0	5,0
MnSO ₄ * H ₂ O	22,3	10,0	10,0
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,025	0,25	0,1
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,025	0,25	0,2
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	8,6	2,0	1,0
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,25	0,25	0,1
KJ	0,83	0,75	1,0
Об'єм вихідного розчину на 1 л середовища, мл	1	2	2
Джерело заліза F-хелат:			
FeSO ₄ * 7H ₂ O	27,8	27,8	15,0
Na ₂ -ЕДТА * 2H ₂ O	37,3	37,3	20,0
Об'єм вихідного розчину на 1 л середовища, мл	5	5	7

3.3. Схема досліду та розміщення варіантів

Для індукції калюсогенезу та розвитку калюсної тканини рижію посівного базові середовища модифікували регуляторами росту ауксинової (2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота) та цитокінінової (6-бензиламінопурин) природи у різних концентраціях: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 та 2,0 мг/л.

У кожному варіанті досліду використовували 50 пробірок із об'ємом живильного середовища 15–20 мл. Дослід проводили тричі для забезпечення статистичної повторності.

3.4. Програма досліджень і методика їх проведення

Ефективність живильного середовища оцінювали за відсотком експлантів, на яких спостерігали наростання калюсної тканини, відносним приростом біомаси, морфогенними характеристиками та напрямками розвитку трансплантів.

Для визначення інтенсивності наростання калюсів біоматеріал зважували на початку та в кінці кожного пасажу. Інтенсивність наростання визначали за формулою Кепліна [41]:

$$\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0}, (1)$$

де ΔW – відносний приріст маси;

W_0 – початкова маса калюсу;

W_t – кінцева маса калюсу;

Такий спосіб оцінки дає можливість уникнути помилок від впливу на ріст тканин величини експланту.

Морфогенні характеристики калюсів визначали за шестибальною шкалою.

Таблиця 2

Шкала визначення морфогенних показників калюсних тканин рижію посівного

Бал	Характеристика калюсу
5	Тканина жовтого або світло-жовтого забарвлення із зеленими осередками, цілком структурована без розпушених водянистих ділянок
4	Тканина жовтого або світло-жовтого забарвлення із зеленими осередками, структурована, але має 20–30 % розпушених ділянок
3	Тканина на 70,0 % складається з обводнених клітин, частково містить жовті структуровані ділянки без зелених осередків
2	Тканина має розпушену і обводнену консистенцію
1	Лише невелика частина експланту утворює морфогенний калюс
0	Експлант гине, калюсогенез не відбувається

За оцінки калюсної тканини враховували її консистенцію, забарвлення та регенераційну здатність. Морфогенними вважалися калюси, оцінені на 5–3 бали за відповідною шкалою.

Інтенсивність морфогенезу визначали за часткою мікрокалюсів, на яких спостерігали новоутворення, а також за кількістю рослин-регенерантів, що формувалися з одного транспланту.

Ці показники дозволяють оцінити здатність калюсної тканини до диференціації та ефективність регенераційних процесів у культурі *in vitro*.

РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1. Ініціація калюсогенезу та субкультивування калюсних тканин рижію посівного

Одним із ключових типів рослинного біоматеріалу, що використовується у дослідженнях *in vitro*, є калюсна тканина. Калюс виступає вихідним матеріалом для формування різних біооб'єктів, таких як ембріоїди, ізолювані протопласти, суспензійні культури тощо. Розробка ефективних методів отримання та контрольованого культивування калюсу є визначальною для успішності подальших біотехнологічних досліджень із ізолюваними культурами [2, 3].

Процес калюсогенезу залежить від багатьох внутрішніх і зовнішніх чинників, включаючи генотип рослини, тип експланту, фізичні умови культивування, склад живильного середовища, а також концентрацію та співвідношення регуляторів росту. Параметри індукції калюсу підбираються експериментально для кожного виду рослин окремо [42, 43].

За даними Л. О. Рябовол і А. І. Любченка [44], при індукції калюсогенезу цикорію коренеплідного перевагу слід надавати експлантам із молодими, мітотично активними клітинами. Тому у наших дослідженнях калюсогенез рижію посівного вивчали на проростках сорту Перемога.

Живильні середовища за модифікованими рецептами Мурасіге-Скуга, Гамборга та Шенка-Хильдебранта додатково збагачували регуляторами росту ауксинової та цитокінінової природи у різних концентраціях і співвідношеннях. На 8–12 добу культивування на модифікованих середовищах спостерігали потовщення гіпокотеля та сім'ядолей, а згодом — утворення первинного калюсу на поверхні експлантів. Надалі відбувалася хаотична проліферація калюсної тканини (рис. 1). Отримані результати свідчать про залежність інтенсивності калюсогенезу рижію посівного від складу живильного

середовища та його модифікації фітогормонами, що підтверджує важливість індивідуального підбору умов культивування для кожного виду та сорту.



*Рис. 1 Формування калюсної тканини з експлантів
рижію посівного.*

Найінтенсивніше індукування калюсної тканини рижію посівного було отримано на модифікованому живильному середовищі за прописом Мурасіге-Скуга, де проліферацію калюсної маси відзначено у 25,3 % висаджених експлантів. За використання культуральних субстратів, склад яких базувався на макро- та мікроелементах за прописами Шенка-Хильдебранта та Гамборга, середня інтенсивність індукції калюсогенезу становила 18,8 % та 17,5 % відповідно (табл. 1).

Отримані дані свідчать про суттєвий вплив вмісту регуляторів росту у живильному середовищі на проліферацію калюсної тканини, що підтверджує необхідність оптимізації складу та співвідношення ауксинів і цитокінінів для

На безгормональних живильних середовищах (контроль) ініціація калюсних тканин рижію посівного не спостерігалася. Найбільш інтенсивний калюсогенез відбувався при додаванні до живильного субстрату 0,1 мг/л 2,4-Д та 1,0 мг/л 6-БАП. На середовищі за рецептурою Мурасіге-Скуга частка експлантів із проявами дедиференціації та проліферації калюсної тканини становила 76,6 %, тоді як при використанні середовищ за рецептами Шенка-Хильдебранта та Гамборга цей показник складав 55,9 % та 52,1 % відповідно.

Підвищення концентрації 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти призводило до пригнічення тканин експлантів та значного зниження інтенсивності калюсогенезу. Водночас, при співвідношенні 1,0 мг/л ауксинів та 1,0 мг/л цитокінінів спостерігалось підвищення інтенсивності формування калюсу до 31,8–46,7 %.

Одним із ключових параметрів, що визначає придатність калюсу для подальших біотехнологічних досліджень, є його морфогенний потенціал. Морфогенний калюс характеризується світло-жовтим забарвленням, середнім рівнем обводнення та напівцільною консистенцією. При створенні оптимальних умов культивування, зокрема збалансованого гормонального складу живильного середовища, на поверхні тканини формуються меристемоактивні осередки (рис. 2), які слугують базою для подальшого органогенезу та ембріоїдогенезу.

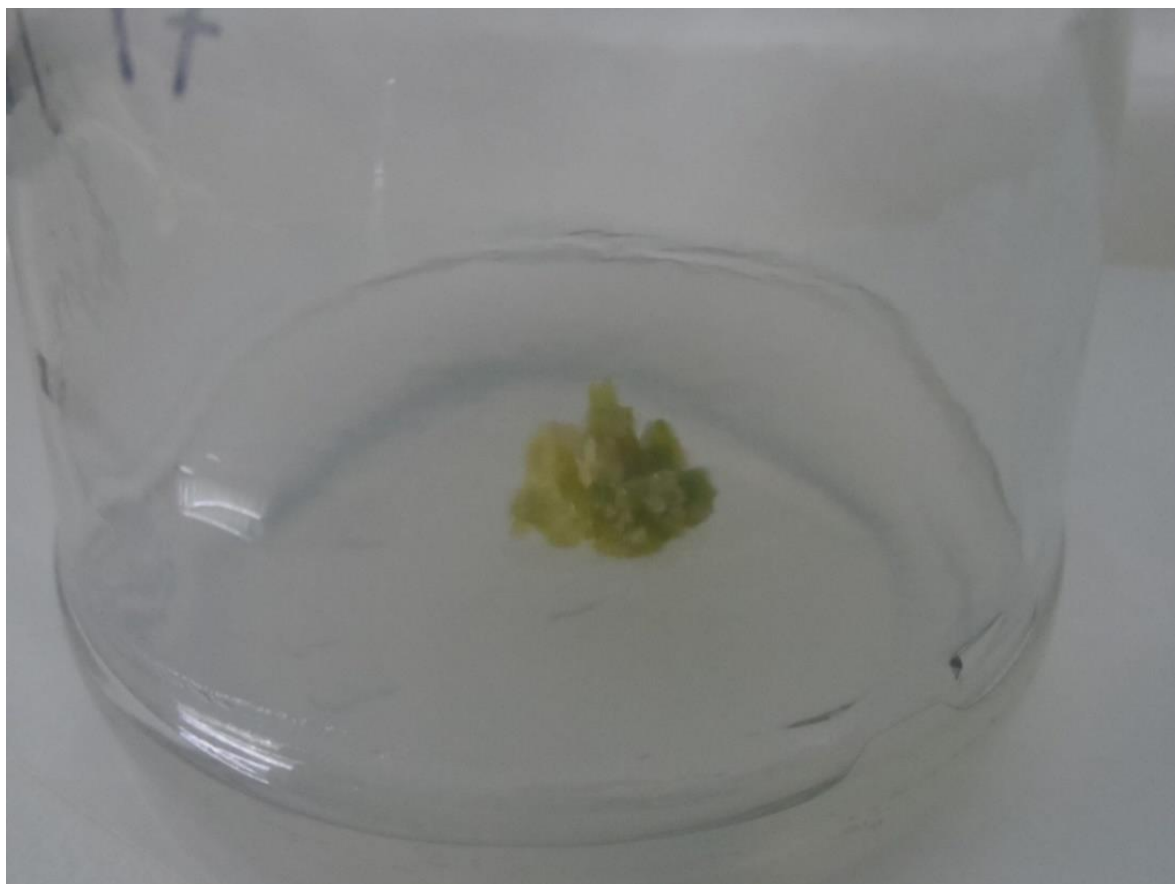


Рис. 2 Морфогенно активна калюсна тканина рижію посівного

Найвищий рівень індукції морфогенного калюсу спостерігався при модифікації живильного середовища невисокими концентраціями ауксинів (0,1 мг/л) та підвищеними концентраціями цитокінінів (1,0 мг/л). За такого співвідношення регуляторів росту 73,4 % експлантів, висаджених на середовище за рецептурою Мурасіге-Скуга, формували морфогенну калюсну тканину. Для середовищ за рецептами Шенка-Хильдебранта та Гамборга цей показник становив 46,2 % та 42,4 % відповідно. Калюси мали середній рівень обводнення, біле або світло-зелене забарвлення, напівщільну консистенцію та велику кількість морфогенно активних осередків.

Підвищення концентрації 2,4-Д до 1,5 мг/л пригнічувало індукцію морфогенного калюсу. Утворені мікрокалюси відзначалися білим забарвленням, розпушеною або обводненою структурою та низьким регенераційним потенціалом.

Проведений порівняльний аналіз дозволив оцінити вплив досліджуваних

факторів — складу живильного середовища та концентрацій 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти і 6-бензиламінопурину — на показники проліферації калюсної тканини рижію посівного (рис. 3).

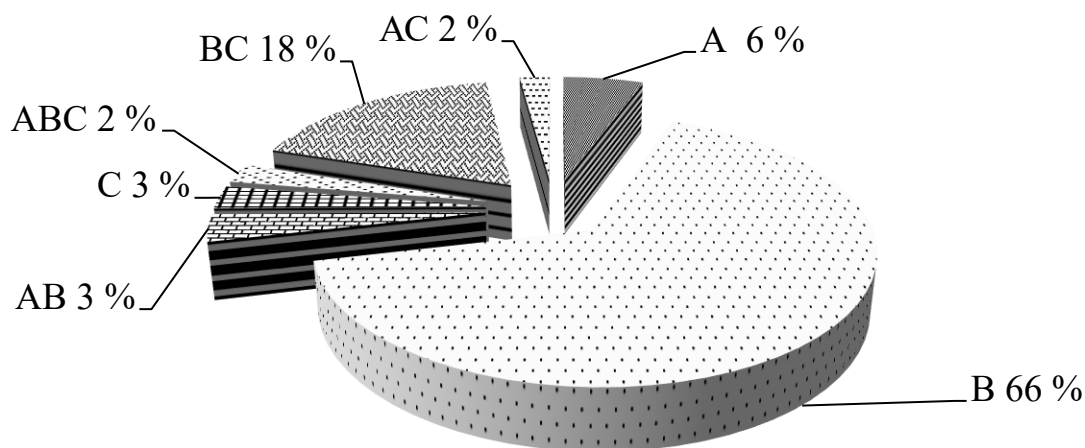


Рис. 3 Частка впливу досліджуваних чинників на індукцію калюсогенезу рижію посівного

фактор А — склад базового живильного середовища; фактор В — концентрація 2,4-Д; фактор С — концентрація 6-БАП; АВ, АС, ВС, АВС — взаємодія факторів.

На основі трьохфакторного дисперсійного аналізу встановлено, що на індукцію калюсогенезу рижію посівного істотно впливають вміст і співвідношення регуляторів росту в живильному середовищі. Найбільший ефект мала концентрація 2,4-Д, яка визначила 66 % варіації процесу проліферації калюсної тканини. Взаємодія факторів В і С (концентрації ауксинів та цитокінінів) впливала менше — 18 %, а склад живильного середовища визначав лише 6 % варіації.

Таким чином, розроблено оптимізоване живильне середовище для індукції та проліферації морфогенної калюсної тканини рижію посівного. Використання модифікації 0,1 мг/л 2,4-Д та 1,0 мг/л 6-БАП на середовищі MS дозволяє стимулювати формування калюсу у 73,4 % експлантів, що є найвищим показником серед досліджуваних варіантів.

4.2. Індукування морфогенезу калюсних тканин рижію посівного та отримання рослин-регенерантів

В умовах *in vitro* розвиток калюсних клітин може відбуватись різними шляхами: вторинна регенерація цілої рослини; за органогенезу чи соматичного ембріодогенезу; проліферація калюсної тканини; втрата клітинами морфогенних властивостей; звикання рости на безгормональних середовищах [47, 48].

У наших дослідженнях, залежно від морфологічних особливостей первинної культури та впливу зовнішніх чинників відмічено чотири типи розвитку калюсних тканин рижію посівного (рис. 4)

За стаціонарного стану морфогенні програми не реалізовувались, проліферація була незначна або повністю відсутня, проте мікрокалюси зберігали життєздатність. Проліферація калюсної біомаси була пов'язана з інтенсивним поділом дедиференційованих клітин і хаотичним наростанням тканин. Морфогенез супроводжувався новоутворенням диференційованих структур (тканин, органів, соматичних ембріодів) із маси недиференційованих клітин.



Рис. 4 Напрямки розвитку калюсної тканини рижію посівного залежно від умов культивування *in vitro*

У контексті розвитку клітинних технологій особливу увагу приділяють вивченню та оптимізації умов активації морфогенного потенціалу калюсних тканин і формуванню рослин-регенерантів. Цей етап біотехнологічних досліджень є досить складним, оскільки тривале культивування калюсної маси в стресових умовах *in vitro* може призводити до зниження або повної втрати регенераційної здатності [45].

Фундаментальною основою регенерації *in vitro* є тотипотентність — здатність соматичних клітин рослин реалізовувати свій потенціал розвитку, формуючи цілий організм, тобто фенотипово виявляти генетичну інформацію, закодовану в ДНК [2, 3].

Дослідження на різних біовидах показали, що на морфогенез впливають:

- генотипові особливості рослини;
- тип калюсних тканин;
- тривалість і умови культивування;
- склад та гормональний баланс живильного середовища [20].

У культуральних умовах виділяють такі типи морфогенезу:

- органогенез — утворення органів (бруньок, пагонів, коренів);
- гістогенез — утворення калюсними клітинами елементів тканин;
- ембріоїдогенез — формування біполярних (подібних до зиготного зародка) соматичних структур, що мають зачатки головних органів [46].

У наших дослідженнях морфогенез калюсів рижію посівного здійснювався шляхом гомогенезу — адвентивні пагони утворювалися на поверхні тканини (рис. 5).



Рис. 5 Утворення адвентивних пагонів з калюсної маси рижію посівного

За результатами проведених досліджень встановлено, що регенераційна здатність калюсної тканини рижію посівного безпосередньо залежить від концентрації регуляторів росту в живильному середовищі (рис. 6).

На безгормональних середовищах частка мікрокалюсів, на яких відмічено морфогенез, залежно від базового складу субстрату змінювалася від 9,1 до 24,6 %. У цьому варіанті реалізація морфогенного потенціалу біоматеріалу відбувалася переважно за рахунок активації внутрішніх чинників.

Активному проходженню морфогенезу сприяли:

- повна відсутність ауксину 2,4-Д у середовищі;
- підвищена концентрація цитокініну 6-БАП.

Найінтенсивніше морфогенез відбувався за концентрації 1,0 мг/л 6-БАП. Інтенсивність формування морфогенних структур на різних живильних середовищах становила:

- Мурасіге-Скуга — 75,8 %;

- Шенка-Хильдебрант — 62,7 %;
- Гамбург — 57,2 %.

Таким чином, регенераційна здатність калюсної тканини рижію посівного визначається співвідношенням і концентрацією регуляторів росту, при цьому підвищення концентрації цитокінінів у поєднанні з відсутністю ауксинів стимулює морфогенез найефективніше.

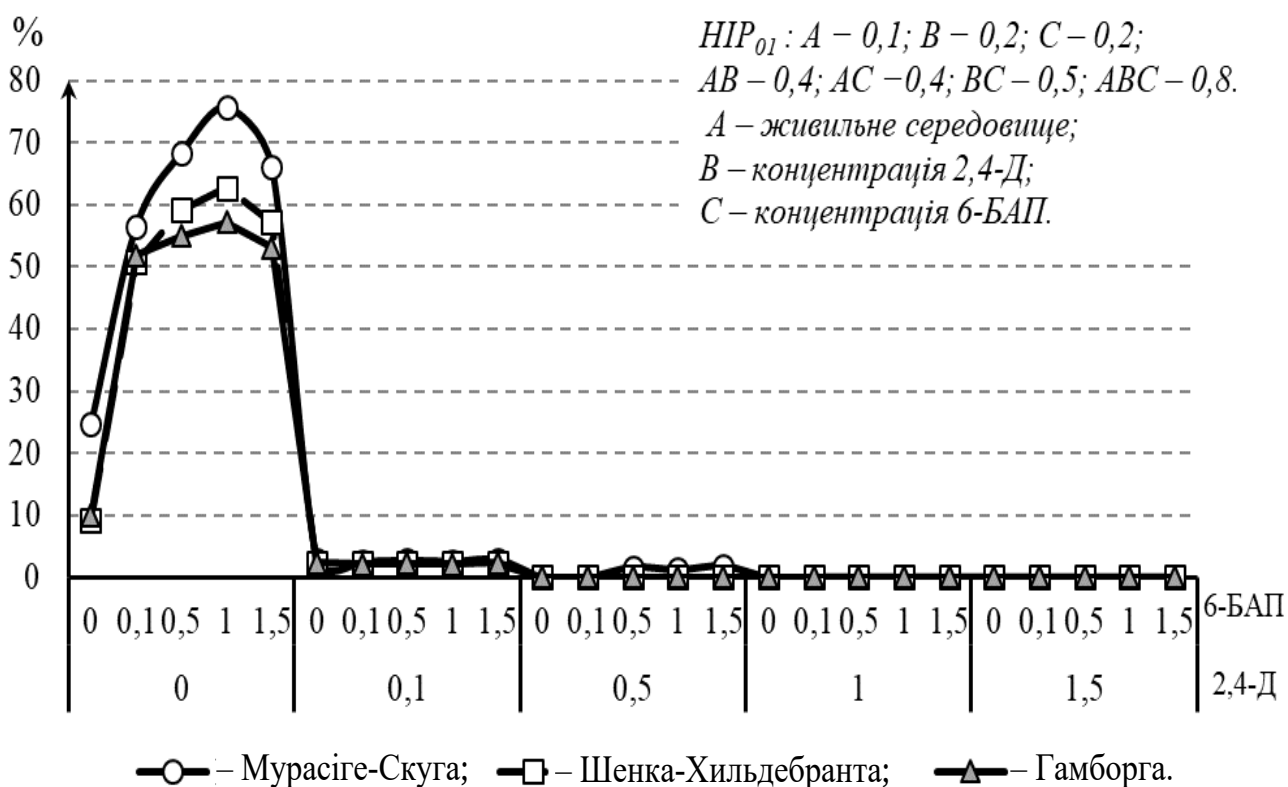


Рис. 6 Морфогенез калюсної тканини рижію посівного залежно від модифікації живильних середовищ регуляторами росту, %

Вплив концентрації регуляторів росту на морфогенез калюсної тканини рижію посівного

Зменшення вмісту 6-бензиламінопурина (6-БАП) у живильному середовищі призводило до зниження морфогенної активності калюсу. Частка мікрокалюсів, на яких спостерігали формування новоутворень при концентрації 0,1 мг/л 6-БАП, становила:

- Мурасіге-Скуга — 56,5 %;

- Шенка-Хильдебранта — 50,8 %;
- Гамборга — 51,9 %.

Цей показник у середньому був на 6,5 % нижчий порівняно з найефективнішим варіантом. При концентрації 6-БАП 0,5 мг/л частка морфогенних мікрокалюсів становила відповідно 68,4 %, 59,2 % та 55,0 %. Підвищення концентрації до 1,5 мг/л знижувало інтенсивність морфогенезу в середньому на 9,9 %.

Навіть незначна присутність 2,4-Д у живильному середовищі різко сповільнювала регенераційні процеси: за концентрації ауксину 0,1 мг/л частка мікрокалюсів із диференціацією не перевищувала 2,8 %.

Склад базового живильного середовища виявився менш значущим для інтенсивності регенерації *in vitro*. Середньоморфогенна активність калюсу становила:

- Мурасіге-Скуга — 12,4 %;
- Гамборг — 9,5 %;
- Шенка-Хильдебранта — 10,0 %.

При оцінці придатності живильних субстратів враховували не лише відсоток калюсів із морфогенезом, але й кількість регенерантів з одного мікрокалюсу (табл. 4).

На модифікованих живильних середовищах з одного мікрокалюсу масою 30–40 мг було регеновано в середньому 3,3 мікропагона. На середовищі MS цей показник становив 4,1 мікропагона, а на субстратах Шенка-Хильдебранта і Гамборга інтенсивність регенерації була нижчою на 29,5 % і 27,5 % відповідно.

На безгормональних середовищах інтенсивність морфогенезу варіювала від 2,5 до 3,8 регенерантів на мікрокалюс, залежно від складу субстрату.

На регенераційних середовищах, що не містили 2,4-Д, в середньому формувалося 4,2 регенеранти з одного мікрокалюса:

- MS — 5,3 регенеранти;
- SH — 3,7;

- B5 — 3,6.

Присутність у субстраті ауксину у концентрації 0,1 мг/л знижувала інтенсивність регенерації калюсу у середньому на 45,3 % (MS — 2,9 регенеранти; SH і B5 — 2,1 регенеранти).

Таблиця 4

Інтенсивність морфогенезу калюсної тканини ріжю посівного залежно від модифікації живильного середовища, шт. рослин-регенерантів на мікрокалюс

Концентрація регуляторів росту, мг/л		Базове живильне середовище (A)		
2,4-Д (B)	6-БАП (C)	<u>Мурасіге-Скуга</u>	<u>Шенка-Хильдебранта</u>	<u>Гамборга</u>
0,0	0,0	3,8±0,2	2,7±0,7	2,5±0,6
	0,1	4,6±0,6	3,2±0,3	3,4±0,5
	0,5	5,8±0,2	4,1±0,4	4,0±0,4
	1,0	6,3±0,5	4,4±0,3	4,0±0,4
	1,5	6,0±0,8	4,2±0,7	4,4±0,1
0,1	0,0	2,0±0,1	1,4±0,4	1,5±0,4
	0,1	2,5±0,4	1,8±0,6	2,0±0,5
	0,5	3,0±0,1	2,1±0,1	2,5±0,4
	1,0	3,6±0,4	2,5±0,5	2,5±0,4
	1,5	3,4±0,3	2,4±0,1	2,0±0,4
<i>НІР₀₁ факторів: A – 0,3; B – 0,2; C – 0,4;</i> <i>взаємодії факторів: AB – 0,4; AC – 0,6; BC – 0,5; ABC – 0,9</i>				

Вихід рослин-регенерантів та вплив регуляторів росту на морфогенез калюсної тканини ріжю посівного

Найвищий вихід рослин-регенерантів з одного мікрокалюса спостерігався за концентрації 1,0 мг/л 6-БАП при повній відсутності 2,4-Д у живильному середовищі. Інтенсивність регенераційних процесів складала:

- MS (Мурасіге-Скуга) — 6,3 мікропагона на один калюс;

- SH (Шенка-Хильдебранта) — 4,4 мікропагона;
- B5 (Гамборга) — 4,0 мікропагона.

Результати дисперсійного аналізу підтвердили, що найбільший вплив на морфогенез калюсної тканини ріжю посівного має концентрація цитокініну 6-БАП, тоді як присутність ауксину 2,4-Д у субстраті значно знижує регенераційну здатність.

Проведений аналіз дозволяє кількісно оцінити вплив усіх досліджуваних факторів на процес морфогенезу калюсних тканин та визначити оптимальні умови для отримання високої продуктивності рослин-регенерантів (рис. 7).

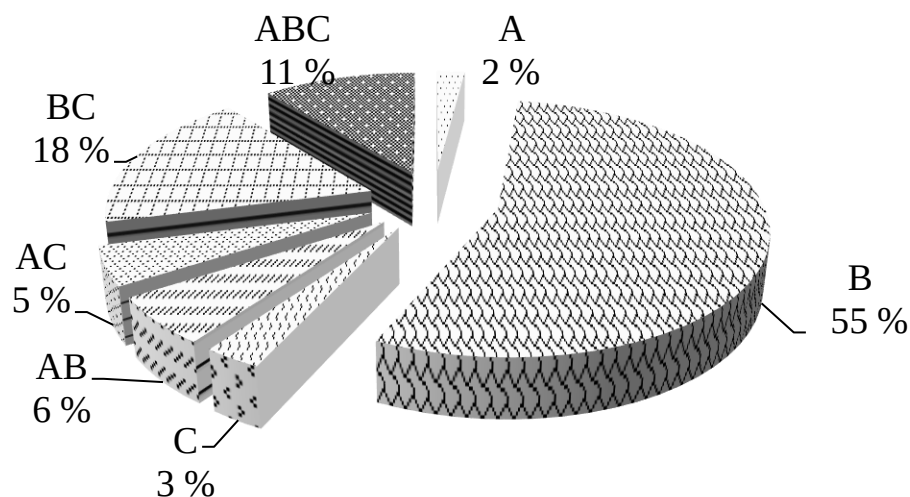


Рис. 7 Частка впливу досліджуваних чинників на інтенсивність проходження морфогенезу калюсної тканини ріжю посівного

фактор А – склад базового живильного середовища; фактор В – концентрація 2,4-Д; фактор С – концентрація 6-БАП; АВ, АС, ВС, АВС – взаємодія факторів.

На підставі проведених досліджень встановлено, що найбільший вплив на індукцію морфогенезу біоматеріалу ріжю посівного має концентрація 2,4-Д у живильному середовищі, що визначає 55 % варіації процесу.

Другорядними, але суттєвими чинниками є:

- співвідношення ауксинів та цитокінінів — 18 %;

- взаємодія всіх трьох досліджуваних факторів — 11 %.

Вплив основного складу живильного середовища виявився незначним і становив лише 2 %.

Таким чином, оптимізація морфогенезу калюсної тканини рижію посівного повинна першочергово враховувати регулятори росту, особливо концентрацію 2,4-Д та співвідношення цитокінінів і ауксинів.

РОЗДІЛ 5

ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1. Моделювання виробничих небезпек під роботи в біотехнологічній лабораторії

Роботи в біотехнологічних лабораторіях повинні виконуватися відповідно до НПАОП 73.1-1.06-77 «Основні правила безпечної роботи в біотехнологічних лабораторіях» [47].

Основні правила зберігання та організації простору:

- Заборонено зберігання реактивів без етикеток.
- Не допускається захаращення коридорів і проходів, а також підходів до засобів пожежогасіння.
- Заборонено зберігати та споживати їжу у лабораторії.
- Горючі рідини не можна зберігати в поліетиленовому посуді.
- Отруйні та сильнодіючі речовини (СДОР), такі як миш'як, синильна кислота, повинні зберігатися в опломбованих шафах або металевих ящиках під замком з яскравою етикеткою «Отрута!».
- Відповідальність за облік і використання СДОР покладається на призначену наказом особу.

Приміщення та обладнання:

- Біотехнологічні лабораторії відносяться до категорії В — пожежонебезпечне виробництво (СНиП 11-90-81).
- Клас електроустановок — В-16, оскільки роботи з горючими речовинами виконуються у витяжних шафах без відкритого вогню.
- Стіни та підлога покриті плиткою для запобігання адсорбції токсинів і полегшення очищення.
- Робочі столи — з негорючих або важкогорючих антикорозійних матеріалів, обладнані водою, електропостачанням і стисненим повітрям.

- Вентиляція — загальнообмінна припливно-витяжна, з місцевими витяжками від робочих стендів.

Робота з лабораторним обладнанням та речовинами:

- Скляний посуд обробляти з рушником або захисними щитками; тверді луги брати лише щипцями або у рукавичках.
- Розлив і переливання їдких та сильнодіючих рідин проводити гумовими грушами, шприцами або сифонами; заборонено засмоктувати рідини ротом.
- Концентровані кислоти, луги та димучі речовини переливати лише у витяжних шафах.
- При ураженні їдкими речовинами — швидко змити водою і звернутися до лікаря.
- Горючі рідини зберігати у товстостінному склі з притертими пробками, у металевих ящиках з піском; зливати у каналізацію заборонено.
- Після роботи залишки реактивів збирати в окрему тару, посуд ретельно мити та дезінфікувати.

5.2. Охорона навколишнього природного середовища

Біотехнологія виникла на перетині біологічних, хімічних та технічних наук і інтегрувала результати досліджень цих галузей. У прикладному значенні біотехнологія розглядається як сукупність промислових методів, що використовують живі організми, клітини, тканини, продукти їх метаболізму та біологічні процеси для виробництва продукції, цінної для національної економіки.

В Україні біотехнологічні дослідження останнім часом спрямовані на:

- виробництво екологічно безпечних продуктів харчування;
- створення медичних препаратів;
- отримання енергетичних матеріалів.

Пріоритети розвитку біотехнології визначаються стратегією соціально-економічного розвитку суспільства. Все більша увага приділяється збереженню та відтворенню природних ресурсів та розробці природоохоронних технологій, серед яких:

- біологічне очищення стічних вод і повітря;
- біовідновлення ґрунтів;
- знешкодження токсичних речовин.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено живильні середовища для проліферації калюсної тканини рижію посівного та встановлено, що найінтенсивніше калюсогенез проходить на живильному середовищі Мурасіге-Скуга за модифікації 0,1 мг/л 2,4-Д і 1,0 мг/л 6-БАП.
2. Підібрано живильне середовище для морфогенезу калюсних тканин рижію посівного. На живильному середовищі Мурасіге-Скуга за відсутності 2,4-Д та додаванні 6-БАП в концентрації 1,0 мг/л активність морфогенезу становила 75,8 %, а з одного мікрокалюса в середньому регенеровано 6,3 пагона.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Мусієнко М. М., Панюта О. О. Біотехнологія рослин: навчальний посібник. Київ: Київський університет, 2005. 114 с.
2. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 730 с.
3. Dahleen L. S., Bregitzer P. An improved media system for high regeneration rates from barley immature embryo-derived callus culture of commercial cultivars. *Crop Science*. 2002. № 42. P. 934–938.
4. Kuznetsov V. V., Rakitin V. Yu., Borisova N. N., Rotschupkin B. V. Why does heat shock increase salt resistance in cotton plants? *Plant Physiology and Biochemistry*. 1993. Vol. 31. № 2. P. 181–188.
5. Hussey G., Falavigna A. Origin and production of *in vitro* adventitious shoots in the onion *Allium cepa* L. *Journal of Experimental Botany*. 1980. Vol. 31. P. 1675–1686.
6. Fonnesebech A., Fonnesebech M. *In vitro* propagation of *Monstera dolichosa*. *Horticultural Science*. 1980. Vol. 15. P. 740–741.
7. Чеченева Т. М. Спонтанна та індукована мінливість кукурудзи *in vitro*: автореф. дис. ... докт. біол. наук. Київ, 2003. 43 с.
8. Berrios E. F., Gentzbittel L., Alibert G., Griveau Y., Berville A., Sarrafi A. Genetic control of *in vitro*-organogenesis in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breeding*. 1999. 118. № 4. P. 359–361.
9. Machii H., Mizuno H., Hirabayashi T., Li H., Hagio T. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1998. Vol. 53, № 1. P. 67–74.
10. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження рослин, теорія і практика. Київ: Наукова думка, 2005. 270 с.
11. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин: підручник. Київ: Поліграфконсалтинг, 2003. 520 с.
12. Henkel P. A. Adaptation of plants to extreme environmental conditions.

Physiology of plants. 1978. Vol. 25. No. 5. S. 889–902.

13. Калашніков С. Г., Кулик О. П. Вивчення впливу озонування на процеси клітинного метаболізму. Місце озонування серед індукторів активності ендогенних цитокінінів. *Вопросы химии и химической технологии*. 2009. № 2. С. 37–43.
14. Hughesn M. A., Dunn M. A. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *Journal of Experimental Botany*. 1996. Vol. 47. № 296. P. 291–305
15. Dahleen L. S., Bregitzer P. An improved media system for high regeneration rates from barley immature embryo-derived callus culture of commercial cultivars. *Crop Science*. 2002. № 42. P. 934–938.
16. Geiken B., Masoj Ídek J., Rizzuto M., Pompili M. L., Giardi M. T. Incorporation of [³⁵S] methionine in higher plants reveals that's timulation of the D1 reaction centre II protein turno veracompanies tolerance to heavy metal stress. *Plant, Cell and Environment*. 1998. Vol. 21. № 12. P. 1265–127
17. Murashige T. Plant propagation through tissue cultures. *Plant Physiology*. 1974. Vol. 25. P. 135-166.
18. Hussey G., Falavigna A. Origin and production of *in vitro* adventitious choots in the onion *Allium cepa* L. *Journal of Experimental Botany*. 1980. Vol. 31. P. 1675-1686.
19. Fonnesbech A., Fonnesbech M. *In vitro* propagation of *Monstera dolieuosa*. *Horticultural Science*. 1980. Vol. 15. P. 740-741.
20. Foyer C. H., Noctor G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist*. 2000. Vol. 146. № 2. P. 359–388.
21. Shimazaki Y., Ookawa T., Hirasawa T. The root tip and accelerating region suppress elongation of the decelerating region without any effects on cell turgor in primary roots of maize under water stress. *Plant Physiology*. 2005. Vol. 139. № 2. P. 458–465.
22. Wilkinson S., Davies W. J. ABA-based chemical signaling: the coordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment*. 2002. Vol. 25. № 1. P. 195–210.

23. Колупаєв Ю. Є., Косаківська І. В. Роль сигнальних систем і фітогормонів у реалізації стресових реакцій рослин. *Український ботанічний журнал*. 2008. Т. 65. № 3. С. 418–430.
24. Larkin P. G., Scorcoft W. R. Somaklonal variation – source of variability from cell cultures for improvement. *Theoretical and Applied Genetics*. 1981. № 4. P. 197–214.
25. Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І. І. Добір та цитологічний аналіз стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis var. tritici* клітинних ліній пшениці та регенерантів з них. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2008. Т. 6. № 2. С. 191–200.
26. Волощук С. І. Клітинна селекція пшениці на стійкість до *Fusarium graminearum* Schwabe: автореф. дис. ... канд. с.-г. наук. Київ, 2006. 16 с.
27. Бавол А. В., Зінченко М. О., Дубровна О. В. Молекулярно-генетичний поліморфізм клітинних ліній пшениці, стійких до метаболітів збудника офіобольозу, за дії осмотичного стресу. *Цитология и генетика*. 2014. Т. 48. № 1. С. 60–66.
28. Кондратенко С. І., Гарт О. Ю., Черненко О. В. Оцінка стійкості ліній перцю солодкого (*Capsicum annuum* L.) до фузаріозного в'янення на рівні *in vitro* та *in vivo*. *Наукові доповіді НУБіП України*. 2017. № 4. (68). С. 23–35.
29. Чеченева Т. М. Спонтанна та індукована мінливість кукурудзи *in vitro*: автореф. дис. ... докт. біол. наук. Київ, 2003. 43 с.
30. Berrios E. F., Gentzbittel L., Alibert G., Griveau Y., Berville A., Sarrafi A. Genetic control of *in vitro*-organogenesis in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus annuum* L.). *Plant Breeding*. 1999. 118. № 4. P. 359–361.
31. Machii H., Mizuno H., Hirabayashi T., Li H., Hagio T. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1998. Vol. 53, № 1. P. 67–74.

32. Любченко А. І., Рябовол Л. О., Єщенко О. В. Використання біотехнологічних методів для отримання вихідного матеріалу цикорію коренеплідного резистентного до абіотичних стресових чинників. Матеріали міжвузівської наукової конференції *Екологія – шляхи гармонізації відносин природи та суспільства*. Умань, 2009. С. 61.
33. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження рослин, теорія і практика. Київ: Наукова думка, 2005. 270 с.
34. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин: підручник. Київ: Поліграфконсалтинг, 2003. 520 с.
35. Рябовол Л. О., Любченко А. І. Вплив сольового стресу на індукування клітинних ліній цикорію коренеплідного. *Збірник наукових праць УДАУ*. Умань, 2007. Вип. 65. С. 142–146.
36. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2019 рік. <http://sops.gov.ua/reestr-sortiv-roslin>
37. Каталог сортів і гібридів ІОК НААН України. <http://imk.zp.ua/index.php/kataloh-sortiv-ta-hibrydiv/ryzhii/146-stepovyy-1>
38. Реєстр сортів і заявок ННЦ «Інститут землеробства НААН». <http://zemlerobstvo.com/wp-content/uploads/Реєстр-сортів-2018.pdf>
39. Сорти нових високоолійних культур, як джерело біодизеля. <http://files.nas.gov.ua/NASDevelopmentsBook/PDF/0812.pdf>.
40. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. Москва: Наука, 1964. 272 с.
41. Caplin S. M., Steward F. C. Effect of coconut water on the growth of explants from carrot root. *Science* 108, 1948. P. 655-657.
42. Гонтаренко С. М., Герасименко Г. М. Шляхи андрогенезу пиляків цукрових буряків у культурі *in vitro*. Тези доповідей міжнародної науково-практичної конференції присвяченої 95-річчю ІБКіЦК НААН. Вінниця, 2017. С. 189–191.

43. Подгаєцький А. А., Мацкевич В. В., Подгаєцький А. А. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин: монографія. Біла Церква : БНАУ, 2018. 208 с.
44. Рябовол Л. О., Любченко А. І. Умови індукції та культивування морфогенної калусної тканини *Cichorium intubus* L. Матеріали всеукраїнської наук. конференції молодих вчених. Умань, 2006. С. 32–33.
45. Mohamed A. E. Somaclonal variation in micro-propagated strawberry detected at the molecular level. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2007. Vol. 9 (5). pp. 721–725.
46. Derkach K. V., Abraimova O. E., Satarova T. M. Morphogenesis *in vitro* in maize inbred lines from the Lancaster heterotic group. *Cytology and Genetics*. 2017. Vol. 51, № 1, P. 48–53.
47. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю: ДСП 9.9.5.-080-02 [Чинний від 2002-01-28]. Київ : МОЗ України, Державна санітарноепідеміологічна служба, 2002. 39 с.
48. Романенко В. Д., Крот Ю. Г., Киризій Т. Я. Природні і штучні біоплато: фундаментальні і прикладні аспекти: монографія [Текст]. К.: Наук. думка, 2012. 110 с.
49. Ісаєнко В. М., Войціцький В. М., Бабенюк Ю. Д. Екологічна біохімія [Текст] : навч. Посібник. К.: Книжкове вид-во НАУ, 2005. 647 с.

ДОДАТКИ