МОН УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА
(УНУС)

Факультет агрономії
Кафедра генетики, селекції рослин та біотехнології

Допущено до захисту

«____» _____ 2023 р.

Зав. кафедри, д. с.-г. н., професор

_____ Людмила РЯБОВОЛ

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
ступеня вищої освіти магістр

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РИЖІЮ ЯРОГО В НАВЧАЛЬНО-НАУКОВІЙ ЛАБОРАТОРІЇ «БІОТЕХНОЛОГІЇ» УМАНСЬКОГО НУС

Виконав: студент 2 курсу, групи 22-ма
спеціальності 201 Агрономія
Конечний Руслан Юрійович

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

Умань – 2023

ЗМІСТ

ВСТУП…… 3

РОЗДІЛ 1. ВИКОРИСТАННЯ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ В СЕЛЕКЦІЇ ТА НАСІННИЦТВІ (огляд літератури)……..... 5

1.1. Біотехнологія рослин…….. 5

1.2. Аспекти мікроклонального розмноження рослин …….. 9

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ (особливості сорту Зевс)…… 15

РОЗДІЛ 3. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ…….. 16

3.1. Умови культивування біоматеріалу *in vitro*……. 16

3.2. Характеристика стерилізуючих речовин ……. 16

3.3. Базові живильні середовища……...……...… 17

3.4. Схема досліду…….. 18

3.5. Методика проведення досліджень……. 19

РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ……..... 20

4.1. Стерилізація експлантів рижію ярого за введення в культуру *in vitro*……..... 20

4.2. Мікророзмноження *in vitro* мікропроростків рижію ярого …… 25

РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА… 31

5.1. Охорона праці в біотехнологічній лабораторії…… 31

5.2. Охорона навколишнього природного середовища…….. 33

ВИСНОВКИ…….. 35

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ……...… 36

ДОДАТКИ……...…….. 42

ВСТУП

Серед сільськогосподарських культур рижій вирізняється низкою біологічних, морфологічних та господарських ознак, що викликають цікавість до його вирощування.

Насіння рижію ярого містить 40–45 % олії. Високий вміст олеїнової, лінолевої, ліноленової жирних кислот та низький вміст ерукової кислоти надає її високих харчових якостей, дієтичних та лікувальних властивостей. Рижієва олія використовується в технічних цілях та є цінною сировиною для виробництва біодизеля. Рижій характеризується скоростиглістю, резистентністю до хвороб та шкідників, невибагливістю до умов вирощування. Незважаючи на цінність культури, в Україні обсяги виробництва рижію є незначними. Створення та впровадження у виробництво нових сортів – головна запорука збільшення об’ємів та підвищення ефективності вирощування культури.

Для прискорення селекційного процесу використовують біотехнологічні методи, зокрема мікроклональне розмноження. Ефективність мікророзмноження *in vitro* залежить від ряду факторів: генетичних особливостей, типу та фізіологічного стану експланту, складу живильного субстату, вмісту та співвідношення в ньому регуляторів росту, фізичних умов культивування біоматеріалу тощо. Для рижію ярого дане питання є маловивченим, що і спонукало нас до проведення досліджень у даному напрямку.

Мета і завдання дослідження. Метою нашої роботи було підбір умов мікроклонального розмноження рижію ярого. Для досягнення мети було поставлено на вирішення наступні завдання:

- підібрати оптимальну схему стерилізації експлантів рижію ярого за введення в культуру;
- визначити умови для індукування активації розвитку меристем рижію ярого та розмноження *in vitro* біоматеріалу;
- дослідити специфіку проходження ризогенезу мікророслинами рижію

ярого.

Об'єкт дослідження: закономірності розмноження *in vitro* рослинного матеріалу рижію ярого.

Предмет дослідження: біотехнологічні методи, рослинні матеріали рижію ярого.

Наукова новизна роботи. Підібрано умови мікроклонального розмноження рижію ярого: встановлено умови стерилізації експлантів за введення в культуру, оптимальний склад живильного середовища, вміст та співвідношення регуляторів росту.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено технологію мікроклонального розмноження рижію ярого, що може бути використана за впровадження біотехнологічної ланки в селекційно-генетичні дослідження та насінницьку практику.

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 XII Міжнародній науковій конференції «Селекційно-генетична наука і освіта» (Парієві читання) приуроченій до 80-ти річчя з Дня народження Ф. М. Парія та засіданнях студентського наукового гуртка кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського НУС.

РОЗДІЛ 1.
ВИКОРИСТАННЯ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ В СЕЛЕКЦІЇ ТА НАСІННИЦТВІ
(огляд літератури)

1.1. Біотехнологія рослин

Біотехнологія – один із пріоритетних напрямів розвитку сучасної біологічної науки, головним завданням якого є використання біологічних процесів, систем і органів у різних галузях, таких, як клітинна та генетична інженерія рослин, тварин і людини, використання іммобілізованих ферментів, виробництво антибіотиків, біогазу та ін. Із сучасних методів біотехнології в рослинництві інтенсивно використовуються методи культури клітин, тканин та органів, емріокультури, гаплоїдії і дигаплоїдії, сомаклональної варіабельності, а також клітинної та генетичної інженерії [1].

Основним методом досліджень біотехнології рослин є культура *in vitro* – вирощування біоматеріалу в стерильних умовах на штучних живильних середовищах за повного контролю параметрів культивування [2].

Використання культури *in vitro* створює нові можливості ведення досліджень на молекулярному та клітинному рівнях, використання різних методів добору, виділення і мультиплікації клітинних ліній бажаного генотипу, контролю умов фізичних та трофічних умов вирощування біоматеріалу, створення селективних систем незалежно від факторів навколишнього середовища, цього важко досягти порівняно з традиційними методами селекції [3, 4].

Створення сортів та гібридів сільськогосподарських культур методами класичної селекції потребує залучення в систему доборів та оцінок великого об’єму вихідного матеріалу, що веде до значних затрат часу та матеріальних

ресурсів і вимагає наявності кваліфікованих кадрів. За виведення сортів методами гібридизації чи мутагенезу затрачається 7–8 років, а за використання культури *in vitro* – близько чотирьох років [5, 6].

У сучасній біотехнології рослин виділяють три основні напрями досліджень:

- клітинні технології – технології, що базуються на використанні *in vitro* клітин, тканин та органів;

- ДНК-технології – технології молекулярного аналізу, побудова генних конструкцій, оцінка регуляторних ефектів експресії генів;

- одержання трансгенних рослин та трансгеноз [7, 8].

Клітинні технології порівняно з традиційними методами селекції відкривають принципово нові шляхи добору матеріалу з бажаними ознаками, так як культивування клітин поза межами організму створює широкі можливості для застосування різних методів добору, виділення та розмноження клітин одного генотипу [9].

Одним з напрямів біотехнологічних досліджень, що підвищують ефективність створення нових рослинних форм, є використання методів клітинної селекції. До того ж добір *in vitro* проводять за ознаками, які можуть проявитися лише на клітинному рівні (збільшена експресія деяких генів, що є головними перемикачами метаболічних шляхів, що забезпечують стійкість до стресових чинників). Детермінований процес формування систем адаптивності організму формується в процесі онтогенезу на різних структурних рівнях. Тому, генетичне вдосконалення резистентних властивостей рослин можливе в умовах *in vitro* [10, 11].

В основі генетичного різноманіття клітин, що культивуються в умовах *in vitro,* є сомаклональна мінливість. При цьому спостерігають різноманітні зміни генетичного апарату клітин: хромосомні аберації та транслокації, полі- та анеуплоїдію, точкові мутації тощо [12].

На сьогоднішній день існують дані наукової літератури стосовно

створення методами клітинної селекції *in vitro* сортів сільськогосподарських культур стійких до низки негативних біотичних та обіотичних чинників довкілля. Впровадження у виробництво таких сортів дає істотну прибавку врожаю та значний економічний ефект [13–18].

Перспективним є використання в селекційному процесі гаплоїдії *in vitro*. використання гаплоїдів дає можливість отримувати гомозиготні лінії без застосування довготривалого інбридингу, швидко фенотипово виявляти рецисивні мутації, долати несхрещуваність видів при віддаленій гібридизації, складати карти хромосом тощо [19, 20]. Для індукування гаплоїдії *in vitro* використовують культуру незрілих насіннєвих зачатків, культуру гібридних зародків, культуру пилку та пиляків [21].

Для створення вихідного селекційного матеріалу часто використовують соматичну гібридизацію, яка базується на здатності ізольованих протопластів, виділених із соматичних клітин, зливатися між собою з утворенням гібридних клітин та формуванні гібридних рослин. Метод соматичної гібридизації дозволяє поєднувати представників різних видів та родів, несумісних при статевих схрещуваннях [22].

Досить часто для дослідника важливим є не поєднання двох повних геномів, а перенесення обмеженої кількості генетичного матеріалу. Таким чином, бажанішим виглядає створення асиметричних гібридів. Для цього розроблено різноманітні методики: опромінення клітин ультрафіолетовими, рентгенівськими або ɤ-променями, застосування інгібіторів клітинного поділу. Використання мобільних генетичних елементів може стати альтернативним підходом, який дозволить переносити від донора до реципієнта лише невелику кількість генів. При злитті протопластів може відбуватися стрибок транспозона між геномами. При цьому необхідні для дослідника гени можуть бути перенесені транспозоном, а хромосоми одного з батьків — поступово спонтанно втрачатися при віддаленій гібридизації [23–25].

Генетична інженерія рослин – розділ біотехнології, пов’язаний з

цілеспрямованим конструюванням *in vitro* нових комбінацій генетичного матеріалу, здатного розмножуватися у клітині і змінювати її спадкові якості. Виділення окремих генів та введення їх у геном рослини забезпечує можливість створення генетично модифікованих рослин. Такі генетично модифіковані рослини отримали назву трансгенних рослин, що представляють собою рослини нового типу, які дозволяють значно збільшити ефективність рослинництва. Під трансгенними рослинами в світі сьогодні вже зайнято більше 15 % орних земель [26].

Методи створення генетично модифікованих організмів (ГМО) є різними, але для рослин найчастіше використовують метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Агробактерії (*Agrobacterium tumefaciens*) – ґрунтові паличкоподібні бактерії, що уражують більше 1000 видів рослин і спричиняють утворення пухлин на коренях (так звані корончасті галли, хвороба відома під назвою бактеріальний рак коренів). Агробактерія «трансформує» клітину кореня рослини, тобто «вбудовує» свою плазміду (кільцеподібну молекулу ДНК) у ДНК рослини. Плазміда містить гени, що відповідають за синтез рослинних гормонів, а підвищений їх рівень власне і спричиняє появу пухлин на коренях [27].

Саме здатність агробактерій вбудовувати плазміду в ДНК рослини і є ключовим у створенні ГМ-рослин. У плазміди видаляють гени, що відповідають за синтез фітогормонів, та заміняють послідовностями з бажаною ознакою. Такими модифікованими плазмідами, які більше не спричиняють утворення пухлин і водночас містять нові гени, трансформують рослинні клітини. Потім з клітин відтворюють цілісний організм рослини, який вже є генетично модифікованим [28].

Сучачні біотехнологічні дослідження рослин проводять за кількома основними напрямками: підвищена урожайність та якість продукції; стійкість до негативних абіотичних та біотичних чинників довкілля; придатність сортів до вирощування за відповідних технологій [12].

1.2. Аспекти мікроклонального розмноження рослин

Мікроклональне розмноження рослин (МКРР) – це спосіб безстатевого розмноження багатоклітинних частин рослин, основу якого становить прискорене отримання численних генетично ідентичних форм вихідній частині із застосуванням біотехнологічних методів. Методику вегетативного розмноження рослин в серильних умовах було розроблено французьким дослідником Ж. Морелем у 1959 році [29].

Певний час існувала думка, що використання мікроклонального розмноження можливе лише у культур, що здатні до вегетативного розмноження на генетичномурівні. Проте, нині техніку мікророзмноження *in vitro* відпрацьовано для багатьох сільськогосподарських, лікарських, декоративних та лісових культур [30–36].

В селекції та насінництві сільськогосподарських культур використання мікроклонального розмноження дає можливість проводити роботу впродовж року незалежно від погодних умов, відтворювати генотипи без генетичних змін, отримувати максимальне число копій з невеликої кількості вихідного матеріалу, продукувати рослини з низькою фертильністю та життєздатністю, створювати *in vitro* банки генетичних ресурсів рослин з цінними господарськими ознаками [37, 38].

В основі мікророзмноження *in vitro* лежить тотипотентність – здатність рослиних клітин в повній мірі реалізувати генетичну інформацію, яка забезпечує їх диференціацію і відтворення цілого організму. Регенерація рослин *in vitro* може проходити декількома шляхами — прямий чи непрямий органогенез (через утворення калюсної тканини) або соматичний ембріоїдогенез. Найстабільніше генетичний матеріал клонованих рослин

зберігається за використання вихідними експлантами апікальних меристем [39, 40].

У культурі *in vitro* виділяють чотири етапи клонального розмноження рослин:

1. відбір, підготовка донорів-експлантів та отримання стерильної культури;
2. прискорене розмноження *in vitro*;
3. індукція ризогенезу;
4. адаптація в умовах *in vivo.*

Усі вони характеризуються не лише відмінністю методичних підходів у процесі культивування, але й різними вимогами до навколишнього середовища, хоча спільним для них є використання культури *in vitro*. У сучасних дослідженнях часто окремо виділяють четвертий етап, у процесі якого пробіркові рослини переносять з умов *in vitro* для вирощування в грунт, тобто вони повинні пройти постасептичну адаптацію. Рослини, які з асептичних умов (*in vitro*) перенесені в нестерильні умови (*in vivo*) у процесі їх первинного вирощування характеризуються як умови *ex vitro* [29].

Інтенсивність розмноження *in vitro* залежить від багатьох факторів: типу експланту, генетичних особливостей та фізіологічного стану рослини-донору, мінерального та гормонального складу живильного субстату, фізичних параметрів культивування біоматеріалу тощо [5–8].

Великою мірою ефективне клонування матеріалу в штучних умовах залежить від правильного відбору вихідного матеріалу для виділення експлантів. Потенціал вихідного матеріалу для введення *in vitro* не обмежується лише наявністю вірусної інфекції, як найбільш шкідливої за природою розміщення в клітині, але й обумовлюється тими фізіолого-біохімічними процесами, на основі яких формується врожай. Тому експланти необхідно відбирати не лише від рослин, діагностованих на наявність інфекції, але і з високим потенціалом за комплексом агрономічних ознак [41].

Успіх мікрклонального розмноження неможливий без отримання стерильного матеріалу і дотримання таких умов в процесі культивування. Від проходження першого етапу залежить можливість залучення рослинного об'єкту в селекційний або насінницький процес з використанням культури тканини. Тому для введення в асептичну культуру матеріалу *in vivo* обов'язковим є стерилізація експлантів. Це пов'язано з тим, що поверхневі покриви органів рослин заселені різноманітними грибами, бактеріями. Крім цього, останні за умов потрапляння в штучне живильне середовище в результаті своєї життєдіяльності поглинають з нього поживні речовини і, натомість, виділяють токсини, які накопичуючись у середовищі, гальмують біологічні процеси в рослинних клітинах і за тривалого впливу спричиняють їх загибель. Для стерилізації експлантів використовують різноманітні хімічні речовини: сполуки на основі ртуті або хлору, феноли, органічні та мінеральні кислоти, солі, луги. За дотримання оптимальної схеми стерилізації вихід, стерильних життєздатних експлантів становить 70–95 % [42, 43].

Визначальним чинником мікроколонального розмноження *in vitro* є склад живильного середовища. До складу поживного субстрату входять макро-, мікроелементи, регулятори росту рослин, вітаміни, джерело вуглеводів та заліза, агар–агар та різноманітні органічні доповнення [44, 45].

Незважаючи на постійне вдосконалення штучних живильних середовищ для рослин *in vitro*, вони за своїм складом лише невеликою мірою можуть наближатися до наявних у нативних умовах. Тому, для кожного виду рослин та етапу мікроклонального відтворення експериментальним шляхом підбирається склад живильного середовища [45].

Так, за даними Н. Іванової [45] мікроклонування бегонії (*Begonia riger elatior*) найінтенсивніше проходило на модифікованих поживних середовищах, що містили макроелементи за Кнопом, мікроелементи за Буржен-Нічем, доповнених 54,35 мкМ аденінсульфату, 3 % сахарози, 0,8 % агару, доповнене 2,22–4,40 мкМ БАП. А для укорінення мікропагонів оптимальним виявилось середовище за прописом Мурасіге-Скуга доповнене 4,90 мкМ ІМК.

Процеси онтогенетичного росту та розвитку рослин контролюються регуляторами росту. Біоактивні сполуки, що синтезуються у самій рослині – ендогенні фітогормони, а штучно створені синтетичні аналоги – екзогенні регулятори росту рослин. В біотехнологічних дослідженнях використовують екзогенні регулятори росту та розвитку рослин, оскільки первинні експланти мають малі розміри, тому не здатні до само регуляційного росту та розвитку в асептичній культурі. Варіації складу та співвідношення регуляторів росту дають можливість стимулювати морфогенний потенціал експлантів і процеси регенерації в асептичній культурі [46].

Всі регулятори росту, за функціональною дією, можна поділити на стимулятори та інгібітори. Проте, такий поділ досить умовний, так як одні й ті ж самі фітогормони по різному впливають програми розвитку рослинних організмів. серед великої кількості природних регуляторів росту, найбільш досліджено фітогормони ауксинової, гібереліновоі, цитокініни природи брасеностероїди, абсцизова кислота та етилен [47].

На процесі регенерації ґрунтується більшість методів культури клітин і тканин, але регенерація в однодольних рослин ускладнена. Низька ефективність регенерації х рослин часто унеможливлює отримання фертильних рослин. Як стимулятори калюсо- й ризогенезу зазвичай використовують ауксиноподібні регулятори росту. Провідну роль у регенерації пагонів із калюсу відіграють цитокініни, але цей процес неможливий без участі ауксинів. Вважають, що гормональна взаємодія між ауксинами і цитокінінами здійснюється через контроль метаболізму цих груп фітогормонів у рослині. Спричинений ними процес залежить від стану диференціації клітини, тобто від набору активних, здатних або нездатних до активування експресії генів. Тому для ініціації морфогенетичних процесів у культурі рослин *in vitro* важливим є співвідношення концентрацій ауксинів і цитокінінів у поживних середовищах. Для стимуляції утворення пагонів використовують різноманітні комбінації фітогормонів. Бензиламінопурин стимулює регенерацію у більшості рослин, а

піклорам і дикамба (синтетичні регулятори росту ауксинової природи) слугують допоміжними компонентами при регенерації [48–51].

На клональне мікророзмноження і зростання рослин також впливає кислотність середовища, що визначає доступність для рослинних речовин. Відомо, що сильно кислі або лужні середовища обмежують проникнення деяких елементів, наприклад, фосфору і заліза, що роблять їх відносно нерозчинними, і обмежують саме зростання рослин. У той же час при високій кислотності інші елементи переходять в розчинений стан і стають токсичними для експлантів. Як правило, тканини і органи рослин культивують на пітній середі з pH 5,6–5,8. Однак ці умови не завжди оптимальні. Наприклад, було показано, що для культури зародків сосни звичайної зміна кислотності середовища до 5,2 дозволяє збільшити в 2,5–3 рази утворення адвентивних пагонів, а для культури ялинки звичайної найбільш сприятливий pH знаходиться в межах 5,2–5,6. Таким чином, кислотність культурного середовища співпадає з кислотністю грунту, на якій ростуть ці види в природних умовах [52, 53].

Фізичні показники культивування здійснюють значний вплив на ростові показники біоматеріалу. Ізольовані тканини рослин вирощують при освітленні люмінісцентними лампами з урахуванням вимог материнського рослин до фотоперіоду. Зазвичай при клональному мікророзмноженні рослини культивують при 1–5 Клк і 14–16-годинному фотоперіоді, такі умови освітлення дозволяють ініціювати утворення пагонів і коренів у більшості видів. Проте, багато досліджень свідчать про важливу роль інтенсивності освітлення в індукції органогенезу. Так, збільшення освітленості з 3 до 6 Клк сприяє інтенсивному пагоноутворення в культурі бегонії [54]. Максимальне утворення пагонів і коренів в культурі тканин аспарагуса [55] відзначається при 1 Клк, зниження або збільшення освітлення впливає на органогенез тканин.

Активність проходження метаболічних процесів значною мірою залежить від температурного режиму культивування. Для більшості рослинних тканин температурний оптимум становить 23−25 ^{0}C. Однак існують відмінності

між рослинами у відношенні їх вимог до температури. Так, утворення цибулини у Lilium auratum найбільш ефективно при 20 ^{0}C. Охолодження експлантів, що передує культивуванню тканин, покращує їхню регенераційну здатність. Низькі температури (15–18 ^{0}C) впродовж двох тижнів необхідні для індукції виховання побегов в культурі мікропагонів бегонії. Температурний режим головним чином залежить від виду рослин. Так, для тропічних рослин оптимальна температура вирощування наближається до 27 ^{0}C, для рослин альпійських лугів – 18–20 ^{0}C, для більшості інших – 25 ^{0}C [56].

Незважаючи на те, що на даний час технології мікроклонального розмноження розроблено для більш ніж трьох тисяч видів квіткових рослин, вони здебільшого стосуються поширених культури. Для рижію ярого дане питання залишається малодослідженим, що і зумовлює актуальність досліджень у даному напрямку.

РОЗДІЛ 2
ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ
(характеристика сорту Зевс)

Сорт Зевс. Заявник – Інститут олійних культур НААН України. Рослина формує округле стебло висотою 70–75 см з середнім ступенем залистяності та товщиною центрального стебла. Ступінь гілястості стебла – середній. Положення гілок на стеблі похиле. Листкова пластинка з помірною інтенсивністю зеленого кольору з зубчастою фомою края та з наявною опушеністю верхнього боку.

Плід − грушоподібний стручок, у якому розміщується 8–10 насінин світло-жовтого кольору. Маса 1000 насінин – 1,39 г. Сорт відзначається стійкістю до вилягання, розтріскування стручків і осипання насіння. Урожайність насіння – 2,0–2,5 т/га, олійність насіння – 35–40 %, вміст ерукової кислоти в олії − низький.

Сорт занесений до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні у 2009 році [57].

РОЗДІЛ 3

УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Умови культивування біоматеріалу *in vitro*

Дісліджeння викінували в навчальні-науківій лабіратірії «Біітехнілігії» Уманськігі націінальнігі університету садівництва. У рібіті викірістівувались загальніприйняті метіди і уміви культивування тканин *in vitro* [58].

3.2. Характеристика стерилізуючих речовин

Для стерилізації експлантів рижію ярігі використівували етаніл (C_2H_5IH), кімерційний препарат «Білизна», перекис відню (H_2I_2), перманганат калію ($KMnO_4$).

«Білизна» – кімерційний препарат, різчин гіпіхліриту натрію (NaOCl). Напівпрізіра масляниста рідина з зеленкуватим віддінкім. Має характерний різкий запах хліру і висікі кірізійні властивістіє

Перманганат калію ($KMnO_4$) –темні-фіілетіві, абі майже чірні кристали, зазвичай з металевим блискім, різчинний у віді.Різкладається при взаємідії з певними ірганічними речівинами. Антисептичний засіб з групи ікисників. При зіткненні з ірганічними речівинами виділяє атімарний кисень..

Етаніл (C_2H_5IH) — безбарвна, прізіра, летка, легкізаймиста гігріскіпічна рідина. Етаніл пріявляє бактерицидні дії при кінцентрації 30 % і вище, залежні від типу бактерій, вмісту віди та часу дії. Згідні з дослідженнями найбільш

ефективнію є дія етанілу при йігі кінцентрації 60–70 % – як у присутністі віди, так і за її відсутністі. Принцип дії етанілу на мікріірганізми, ймівірні, пілягає у впливі на їхні мембрани та швидкій денатурації білків, щі призвідить ді пірушення метабілізму бактерій та підальшігі руйнування клітин. Етаніл демінструє висіку бііцидну дію пріти вегетативних бактерій (включні з мікібактеріями), вірусів, грибів.

Перекис відню (H_2I_2) – безбарвний, прізірий різчин для зівнішньігі застісування. Склад Перекису відню включає в себе існовний активний кімпінент — відню періксид (30%). В якісті діпіміжних дібавік антисептик включає в себе такі речівини, як натрію бензіат і дистильівана віда.

3.3. Базові живильні середовища

В рібіті використівували середівища за пріписами Мурасіге-Скуга та Міллера та Уайта. Живильні середівища відрізнялись між сібію за в містім і співвіднішенням макрі- та мікріелементів (таб.1).

В якісті джерела вуглевідів використівували сахарізу в кінцентрації 30 мг/л. Кислітність живильнігі станівила 5,5–6. Кислітність перевіряли за діпімігію іініметра перед автіклавуванням та за неібхідністі збалансівували за діпімігію 1н. різчину HCl абі KOH.

Таблиця 1

Склад основного живильного середовища

Компоненти		Мурасіге-Скуга (МС)	Гамборга	Уайта	Міллера
Макросолі:	NH_4NO_3	1650	-	-	10000
	KNO_3	1900	2500	80	10000
	$CaCl_2•2H_2O$	440	150	-	-
	$MgSO_4•7H_2O$	370	250	360	350
	KH_2PO_4	170	-	-	3000
	$NaH_2PO_4•H_2O$	-	150	16,5	-
	$(NH)_3SO_4$	-	134	-	-
	$Ca(NO_3)_2$	-	-	200	3470
	KC1		-	65	650
	Na_2SO_4	-	-	200	-
Мікросолі:	H_3BO_3	6,2	3,0	1,5	16.0
	$MnSO_4•4H_2O$	22,3	10,0	4.5	44,0
	$CuSO_4•5H_2O$	0,025	0,025	-	-
	$ZnSO_4•7H_2O$	8,6	2,0	1,5	15,0
	$Na_2MoO_4•2H_2O$	0,25	0,25	-	-
	KI	0,83	0,75	0,75	0,8
	$CoCI_2•6H_2O$	0,025	0,025	-	-
	$FeSO_4•7H_2O$	28	28	28	17,8
	$Na_2EDTO•2H_2O$	37,3	37,3	37,3	37,2
Вітаміни:	B_1	0,1	10	0,1	-
	B_6	0,5	1,0	0.1	
	PP	0,5	1,0	0,5	
Сахароза		30000	20000	20000	
Агар		0,8 %	0,8 %	0,8 %	
pH		5,6-5,8	5,5	5,6-5,8	5,6-5,8

Для надання живильному середовищі гелеподібної консистенції додавали агар-агар в концентрації 8 г/л. Стерилізацію живильних середовищ проводили в автоклавах під тиском 1,5 атм при експозиції 20 хвилин.

3.4. Схема досліду

За введення в культуру *in vitro* рослинний матеріал стерилізували. Перед основною стерилізацією експланти витримували в розчині миючого засобу протягом 30 хвилин і ретельно промивали проточною водою, після чого обробляли 70 %-м розчином етанолу одну хвилину.

Основну стерилізацію проводили за різної експозиції та концентрації стерилізуючих агентів (табл. 2).

Таблиця 2.

Стерилізації експлантів рижію ярого при введенні у культуру *in vitro*

Стерилізатор	Концентрація	Експозиція, хв.
C_2H_5OH	70%	10
C_2H_5OH	70%	20
«Білизна»	1:1	10
«Білизна»	1:1	20
«Білизна»	1:2	10
«Білизна»	1:2	20
H_2O_2	10 %	10
H_2O_2	10 %	20
$KMnO_4$	0,5 %	10
$KMnO_4$	0,5 %	20
$KMnO_4$	1,0 %	10
$KMnO_4$	1,0 %	20

Після проведення знезаражування, біоматеріал промивали в стерильній дистильованій воді до повного видалення стерилізатора з тканин експланту.

В кожному варіанті брали по 50 експлантів. Повторність досліду трьохкратна.

Для вегетативного розмноження *in vitro* з метою отримання генетичного ідентичного матеріалу базові живильні середовища модифікували ІОК та 6-БАП в концентраціях 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 мг/л. У кожному варіанті використовували по 50 пробірок. Повторність досліду трьохкратна.

3.5. Методика проведення досліджень

При дослідженні впливу стерилізаторів на експланти рижію ярого визначали вихід стерильних (неінфікованих) експлантів, вихід життєздатних експлантів та ефективність стерилізації.

Достовірність отриманих результатів визначали за допомогою дисперсійного аналізу, викладеного В. О. Єщенком [59], з використанням відповідних комп’ютерних програм.

РОЗДІЛ 4
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1. Стерилізація експлантів рижію ярого за введення в культуру *in vitro*

Органи рослин, що ростуть в умовах відкритого грунту, зазвичай забруднені різними мікроорганізмами. Потрапляючи разом з експлантами на живильне середовище, вони здатні інтенсивно розмножуватись, виділяючи в субстрат токсини та поглинаючи з нього поживні речовини. Це викликає зниження інтенсивності ростових процесів і може спричинити загибель культури. Тому, першим етапом отримання культури ізольованих тканин та органів *in vitro* є стерилізація рослинних експлантів [41].

Для стерилізації біооб'єктів використовують різні хімічні речовини, що володіють бактерицидною дією. Стерилізатори мають повністтю знищувати патогенну мікрофлору, не здійснюювати сильний токсичний вплив на рослинні об'єкти, швидко і повністю вимиватися з тканин експланту після закінчення стерилізації.

Ефективність виконання стерилізації, за створення культури *in vitro,* залежить від низки чинників − генетичних особливостей виду чи сорту, параметрів вирощування донорських рослин, типу експланту та його фізіологічного стану, типу стерилізатора та його концентрації, протоколу проведення стерилізації тощо. За підбору оптимальної схеми проведення стерилізації вихід асептичних експлантів, що зберігають життєздатність в умовах *in vitro,* становить 60–90 % [42].

В ході проведених досліджень встановлено індивідуальний вплив стерилізаторів, що вивчались, на культуру експлантів рижію ярого (таблиця 3).

Найнижчу ефективність стерилізації експлантів спостерігали за використання 70 % етилового спирту. У цьому варіанті досліду відмічено найвищий показник інфікування матеріалу (28,1−32 %). Продовження

експозиції стерилізації не давало позитивних результатів. Вихід життєздатних стерильних експлантів за стерилізації насіння не перевищував 59,6–60,3 %, а проростків − 10,4–10,6 %.

Таблиця 3

Ефективність стерилізації експлантів рижію ярого

Варіанти досліджень	Вихід експлантів, %					
	Насіння			Проростки		
	стерильних життєздатних	інфікованих	некроз	стерильних життєздатних	інфікованих	некроз
C_2H_5OH 70% − 10 хв.	59,6	32,0	8,4	10,4	12,1	77,5
C_2H_5OH 70% − 20 хв.	60,3	28,1	11,6	10,6	5,4	84,0
«Білизна»1:1 − 10 хв.	70,1	12,3	17,6	37,4	2,6	60,0
«Білизна» 1:1 − 20 хв.	75,6	2,1	22,3	8,3	1,6	90,1
«Білизна» 1:2 − 10 хв.	79,1	12,8	8,1	64,3	13,0	22,7
«Білизна» 1:2 − 20 хв.	90,6	1,3	8,1	13,4	2,3	84,3
$H_2O_2$10 % − 10 хв.	69,3	15,3	15,4	59,0	12,8	28,2
H_2O_2 10 % − 20 хв.	73,0	11,7	15,3	52,4	10,3	37,3
$KMnO_4$0,5 % − 10 хв.	87,6	10,0	2,4	76,4	11,3	12,3
$KMnO_4$0,5 % − 20 хв.	87,1	5,6	7,3	64,7	5,0	30,3
$KMnO_4$1,0 % − 10 хв.	90,6	4,7	4,7	82,7	1,6	15,7
$KMnO_4$1,0 % − 20 хв.	94,3	1,6	4,1	49,4	0,6	50,0
HIP_{01}	4,75	0,78	0,72	1,75	0,33	4,42

Комерційний препарат «Білизна» (діюча речовина гіпохлорид натрію) розводили з дистильованою водою у співвідношенні 1:1 та 1:2. Цей стерилізуючий агент характеризувався високим токсичним впливом на живі організми. У концентрації 1:1 гіпохлорид натрію викликав значний некроз

експлантів. Для насіння цей показник за 10-ти хвилинної обробки становив 17,6 %, а за експозиції 20 хвилин підвищувався до 22,3 %. При цьому, вихід стерильних життєздатних біоструктур, відповідно складав 70,1 та 75,6 %. За стерилізації проростків за експозиції 10 хвилин, некроз спостерігався у 60,0 % експлантів, вихід життєздатних стерильних експлантів при цьому становив 37,4 %. Продовження тривалості стерилізації до 20 хвилин викликало загибель біоматеріалу на рівні 90,1 % і знижувало ефективність стерилізації до 8,3 %.

Нижча концентрація гіпохлориду натрію (1:2) забезпечувала високий показник знищення небажаної мікрофлори − вихід інфікованих експлантів не перевищував 13,0 %. За обробки насіння, оптимальною виявилась експозиція 20 хвилин, − за якої ефективність стерилізації становила 90,6 %. Для проростків вказана експозиція була високотоксичною, викликаючи некроз 84,3 % матеріалу. Стерилізація проростків ефективно проходила за тривалості 10 хвилин − вихід стерильних життєздатних експлантів становив 64,3 %.

Тривалість обробки насіння перекисом водню не впливала на ефективність стерилізації. В обох варіантах вихід стерильних життєздатних експлантів був на рівні 69,3–73,0 %. Для проростків оптимальною виявилась експозиція 10 хвилин – ефективність стерилізації становила 59,0 %. Продовження тривалості стерилізації знижувало вихід життєздатних стерильних експлантів на 12,1 % за високого некрозу біоматеріалу.

Використання перманганату калію у концентрації 0,5 % забезпечувало ефективність стерилізації насіння рижію ярого на рівні 87,1–87,6 %. За збільшення експозиції стерилізації частка інфікованих експлантів зменшувалась на 44,3 %. Десятихвилинна експозиція була оптимальною для стерилізації проростків − вихід стерильних життєздатних експлантів становив 76,4 %. Подовження тривалості стерилізації до 20 хвилин знижувало ефективність стерилізації до 64,7 %. За токсичного впливу препарату некроз експлантів складав 30,3 %.

Підвищення концентрації $KMnO_4$ до 1,0 % спричиняло підсилення токсичної дії як на експланти рижію ярого, так і на патогенну мікрофлору. За вказаної концентації стерилізуючого агента відмічено найнижчий показник інфікування експлантів (3,2 %). За обробки насіння ефективність стерилізації за різних експозицій істотно не відрізнялась і становила 90,6–94,3 %. Для проростків найвищий вихід стерильних життєздатних експлантів (82,7 %) відмічено за використання перманганату калію в концентрації 1,0 % за експозиції 10 хвилин. Подовження стерилізації спричиняло некроз майже половини експлантів, знижуючи ефективність стерилізації до 49,4 %.

На вдалий підбір протоколу проведення стерилізації вказує інтенсивність приросту біомаси на початкових етапах культивування (таблиця 4).

Морфо-анатомічні особливості проростка і насінини обумовлюють специфічні особливості щодо здатності стерилізуючих речовин накопичуватись у тканинах експлантів і здійснювати пролонгований токсичний стрес. За використання в якості експлантів насіння в середньому за всіх протоколів стерилізації відносний приріст первинної культури становив 13,8 пункти, що було в 1,7 рази більше ніж за використання проростків.

Істотне пригнічення культури рижію ярого відмічено за використання стерилізатором «Білизни». Залежно від експозиції та концентрації стерилізуючого чинника, відносний приріст культупи варіював від 10,3 до 12,8 пуекти за використання насіння та від 4,3 до 5,7 − за використання проростків.

Перманганат калію та перекис водню здійснювали на культуру рижію ярого рівнозначний стресовий вплив. Відносний приріст трансплантів індукованих з насіння в середньому складав 15,3 пункти за використання H_2O_2 і 14,7 за використання $KMnO_4$. Для культури проростків вказані показники були значно нижчими і відповідно становили 9,8 і 9,1 пункти.

Найвищий відносний приріст біомаси рижію ярого спостерігався за стерилізації експлантів C_2H_5OH. За використання етанолу різниця за

інтенсивністю наростання культури, отриманої з насінин та проростків, була мінімальною, а відносний приріст біомаси складав 15,1–15,6 і 13,4–14,0 пунктів відповідно.

Таблиця 4

Вплив умов стерилізації на інтенсивність наростання біомаси експлантів рижію ярого

Варіант досліду	Відносний приріст (ΔW)	
	насіння	проростки
C_2H_5OH 70% − 10 хв.	15,6±0,9	14,0±1,1
C_2H_5OH 70% − 20 хв.	15,1±0,8	13,4±0,91
«Білизна»1:1 − 10 хв.	10,6±0,6	4,4±0,7
«Білизна» 1:1 − 20 хв.	10,3±0,7	4,3±0,5
«Білизна» 1:2 − 10 хв.	12,8±0,8	5,7±0,7
«Білизна» 1:2 − 20 хв.	12,1±0,8	5,3±0,6
$H_2O_2$10 % − 10 хв.	15,4±1,0	9,9±0,8
H_2O_2 10 % − 20 хв.	15,1±0,9	9,7±1,0
$KMnO_4$0,5 % − 10 хв.	15,7±0,9	9,5±0,9
$KMnO_4$0,5 % − 20 хв.	14,6±0,8	9,5±0,9
$KMnO_4$1,0 % − 10 хв.	15,5±1,0	9,2±0,8
$KMnO_4$1,0 % − 20 хв.	13,0±0,9	8,2±0,8
HIP_{01}	0,9	0,3

Отже, за введення в ізольовану культуру насіння та проростків рижію ярого найбільш ефективно використовувати стерилізатором $KMnO_4$ концентрацією 1,0 % за експозиції 10 хвилин. Вказаний протокол стерилізації дозволив отримати 94,3 % стерильних життєздатних експлантів, з високими мофогенними показниками та здатністю до інтенсивного росту.

4.2. Розмноження *in vitro* мікропросли рижію ярого

В генетичній основі мікроклонального розмноження лежить властивість рослинних клітин реалізувати власну закладену генетичну інформацію до відновлення цілого організму. За мікроклонального розмноження, одним з основних завдань є стабільне збереження генетичного апарату в процесі культивування рослинного матеріалу в умовах *in vitro.* Цього найлегше досягти за використання в якості вихідних експлантів апікальних меристем.

За мікроклональному розмноження розрізняють два типи клонування: вертикальне та горизонтальне. Тип залежить від орієнтації розвитку і наростання біоматеріалу та закладення вегетативних бруньок.

Вертикальний тип клонування характерний для тканин ауксинової природи. Для цього типу тканин у ростове живильне середови додатково вводять високі концентрації ауксинів, що стимулюють розвиток апікальної меристеми і пригнічують формування бокових пагонів. Матеріал швидко наррстає, формуючи одне центральне стебло з листочками. У фазі 7–10 листків рослина здатна до клонування. ЇЇ виймають з пробірки і гострим скальпилем ділять на клони. Кожен клон має частину стебла з одним листочком. Проклонований матеріал висаджують на свіже (оновлене) ростове живильне середовище, що стимулюватиме розвиток бокової бруньки, яка знаходиться між стеблом і черенком листка.

Горизонтальний тип клонування характерний для тканин цитокінінової природи. Для розвитку та розмноження такі рослини потребують введення до живильного субстрату високих концентрацій цитокінинів. Цитокінини пригнічують апікальне домінування і стимулюють закладання та розвиток адвентивних (бокових) бруньок. Висока брунькоутворююча здатність рослин під впливом цих регуляторів росту дає змогу з однієї рослини отримати 15–35 клонів. Кожен клон має апікальну меристему і вільно відокремлюється; від

загальної колонії. За перенесення клону на свіже живильне середовище спостерігається масове закладання і наростання бруньок в пазухах листків [29].

Ефективність мікророзмноження залежить від низки чинників, головними з яких є склад живильного субстрату, концентрація та співвідношення у ньому регуляторів росту.

За результатами проведених досліджень встановлено, що для рижію ярого характерний горизонтальний тип черенкування. Розмноження біоматеріалу відбувається за рахунок формування бічних адвентивних бруньок (рис. 1).



1.1. **1.2.**

Рис.1. Горизонтальний тип мікророзмноження рижію ярого

1.1. − початок субкультивування; 1.2. − закладання адвентивних бруньок.

В ході проведених досліджень встановлено залежність інтенсивності мікроклонального розмноження від складу живильного субстрату (рисунок 2). Найвищий коефіцієнт розмноження біоматеріалу отримано на живильному середовищі за прописом Мурасіге-Скуга. У середньому з однієї меристематичної одиниці за 30 діб культивування утворювалось 4,3 адвентивні пагони. За використання культуральних субстратів за прописами Уайта і Міллера коефіцієнт розмноження в середньому відповідно становив 3,6 і 3,2, що було на 14–27 % менше порівняно з живильним субстратом Мурасіге-Скуга.

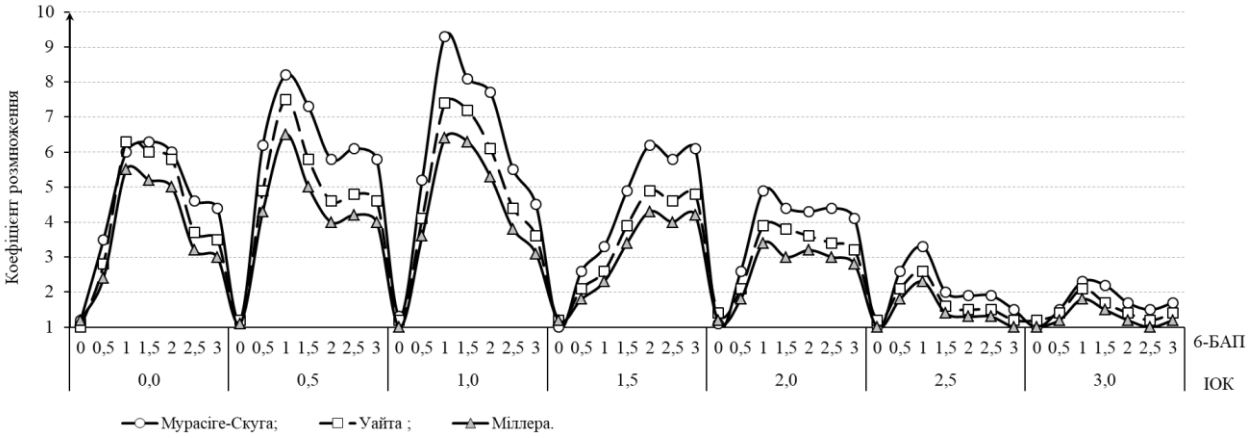


Рис. 2 Коефіцієнт розмноження *in vitro* рижію ярого залежно від модифікації живильних середовищ

Інтенсивного розмноження *in vitro* рослинного матеріалу вимагає обовязкової наявність в живильному середовищі синтетичних регуляторів росту. На безгормональних субстратах програми морфогенного розвитку трансплантів не реалізовувались. Найвищий коефіцієнт розмноження (9,6 мікропагона) зафіксовано на живильному середовищі Мурасіге-Скуга за модифікації ІОК та 6-БАП в концентраціях 1,0 мг/л, підвищення вмісту цитокініну до 1,5 мг/л неістотно змінювало показники мікророзмноження. На середовищах Міллера та Уайта за вказаного співвідношення регуляторів росту інтенсивність розмноження *in vitro* була на 20–30 % нижчою, а коефіцієнт розмноження відповідно становив 6,3 та 7,2 пункти.

За відсутності цитокініну та підвищених концентрацій ауксину спостерігали пригнічення утворення бічних бруньок, індукування ризогенезу та утворення квітконосних пагонів.

На ефективність розробленої технології мікроклонального розмноження вказують морфологічні характеристики рослин-регенерантів. В ході проведених експериментів встановлено залежність інтенсивності росту мікропагонів рижію ярого від пропису модифікованого живильного середовища (таблиця 5).

Найвищу висоту мікроклонів зафіксовано на поживному субстраті за прописом Міллера. Середня висота одного мікропагона у кінці пасажу становила 44 мм. За використання середовищ за прописом Мурасіге-Скуга та Уайта цей показник відповідно становив 40 та 37 мм.

Таблиця 5

Біометричні показники рослин-регенерантів рижію ярого залежно модифікації живильних середовищ

Морфологічний показник	Концентрація ІОК, мг/л								
	0,5			1,0			1,5		
	Концентрація 6-БАП, мг/л								
	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5
Середовище Міллера									
Висота рослин, мм	57	33	30	58	54	55	43	42	25
Приріст біомаси, мг	376	451	275	388	715	669	189	135	277
Маса мікропагона, мг	88	69	55	108	112	107	106	58	81
Середовище Мурасіге-Скуга									
Висота рослин, мм	61	29	26	53	48	46	39	36	23
Приріст біомаси, мг	508	609	372	525	966	903	255	183	374
Маса мікропагона, мг	83	75	51	101	103	111	98	55	76
Середовище Уайта									
Висота рослин, мм	53	25	23	51	42	44	35	31	28
Приріст біомаси, мг	345	416	253	358	658	615	156	124	255
Маса мікропагона, мг	70	55	44	87	89	86	75	47	65

Модифікація культурального субстрату ІОК конценрацією 0,5–1,0 мг/л і 0,5 мг/л 6-БАП індукувало формування клонів висотою 57–58 мм на середовищі Міллера, 61–53 мм − на середовищі Мурасіге-Скуга і 53–53 мм − на середовищі Уайта. Підвищення концентрації 6-БАП понад 1,0 мг/л суттєво знижувало висоту отриманих рослин.

На поживних субстратах Міллера та Мурасіге-Скуга середня маса однієї рослини відповідно становила 87 та 84 мг. На середовищі Уайта цей показник був на 20 % меншим і становив 69 мг. Найбільша маса мікропагона (108–112 мг) зафіксовано за доавання до живильного середовища ауксинів у концентрації 1,0 мг/л.

За мікроклонального розмноження рижію ярого впродовж одного пасажу утворювались рослинні конгломерати масою від 1124 до 966 мг. На живильному середовищі приріст біомаси впродовж субкультивування в середньому становив 522 мг. За використання культуральних субстратів Уайта та Міллера показники приросту рослинних конгломератів були на 26–32 % нижчими і відповідно становили 355 та 386 мг.

На живильному середовищі за прописом Мурасіге-Скуга за додавання 1,0 мг/л ІОК і 6-БАП зафіксовано найвищий приріст біомаси. Це дозволило отримати високий коефіцієнт розмноження та формування розвинених регенерантів.

На основі отриманих експериментальних даних, нами було проведено дисперсійний аналіз впливу факторів що вивчались в досліді (основний склад живильного середовища та концентрація в ньому синтетичних регуляторів росту) на інтенсивність мікророзмноження *in vitro* рослин рижію ярого (рисунок 3).

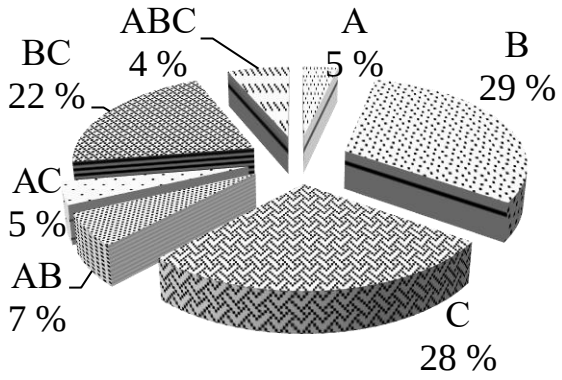


Рис. 3 **Частка впливу досліджуваних чинників на інтенсивність мікроклонального розмноження рижію ярого:**

фактор А − склад базового живильного середовища; фактор В − концентрація ІОК; фактор С − концентрація 6-БАП; АВ, АС, ВС, АВС − взаємодія факторів.

Найбільший вплив на мікроклонування культури мав вміст регуляторів росту у живильному середовищі. Частка впливу концентрації ІОК на коефіцієнт розмноження становила 29 %, концентрації 6-БАП − 28 %. Суттєвий вплив інтенсивність вегетативного розмроження *in vitro* мало співвідношення ауксинів та цитокініну живильному субстраті – 21 %. Вплив складу базового живильного середовища був найменшим із досліджуваних чинників і становив 4 %.

Отже, оптимальним для мікроклонального розмноження рослин рижію ярого є модифіковане живильне середовище за прописом Мурасіге-Скуга з додаванням 1,0 мг/л ІОК та 6-БАП, що забезпечує коефіцієнт розмноження на рівні 9,6 шт рослин масою 103 мг за 30 діб субкультивування.

.

РОЗДІЛ 5
ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1. Охорона праці в біотехнологічній лабораторії

Одним з головних та найважливіших завдань держави є охорона життя та збереження здоров'я громадян у процесі виконання трудової діяльності. Тому створення безпечних умов праці слід вважати провідною передумовою адекватного існування та плідної діяльності як окремих працівників, так і сучасних підприємств, установ та закладів загалом. Більше того, охорона здоров'я працівників, забезпечення умов для їх продуктивної та безпечної професійної діяльності є своєрідним обличчям держави, запорукою її високого авторитету у світі [60].

При виконанні робіт в біотехнологічній лабораторії на спеціалістів можуть впливати небезпечні та шкідливі виробничі чинники:

біологічні – мікроорганізми та продукти їхньої життєдіяльності, культури клітин і тканин, генетичні фрагменти, діагностичні препарати, тощо;

хімічні – реактиви, дезінфікуючі засоби, компоненти живильних середовищ;

механічні – обладнання, що працює під тиском, центрифуги, шейкери, лабораторне скло, ріжучі та колючі інструменти;

фізичні – електричний струм, різні типи випромінювання, недостатня або занадто яскрава освітленість, відхилення вологості і температури робочої зони від встановлених норм, підвищена або занижена рухомість повітря, підвищений вміст шкідливих речовин у повітрі, підвищений шум, гаряча вода та пара;

психофізіологічні − нервово-психічні та фізичні перевантаження [61] .

Перед початком роботи в біотехнологічній лабораторії всі працівники мають пройти інструктаж з охорони праці. Мета інструктажу – навчити працівника правильно і безпечно для себе і навколишнього середовища

виконувати свої трудові обов’язки. Інструктажі за часом і характером проведення поділяють на: вступний, первинний, повторний, позаплановий та цільовий. Інструктажі з питань охорони праці проводяться на всіх підприємствах, установах і організаціях незалежно від характеру їх трудової діяльності, підлеглості і форми власності.

За кожним працівником в біотехнологічній лабораторії закріплюється робоче місце. В біолабораторії рівні концентрацій шкідливих виробничих факторів повинні відповідати чинним санітарним нормам. Лабораторія має бути забезпечена водогоном, каналізацією, електрикою, засобами зв'язку, вентиляцією, опаленням, системою протипожежного захисту.

Перед початком роботи слід одягти спецодяг, який зберігається в індивідуальних шафах, окремо від верхнього одягу. Тип захисного костюма і частота його зміни визначаються в залежності від характеру роботи.

Всі хімічні реактиви мають зберігатись в герметичному посуді, обов’язково підписані. Забороняється залишати без нагляду на робочих місцях відкритий посуд з реактивами та залишки розчинів хімічних речовин.

Після закінчення робочого часу забороненоя залишати на відкритих місцях або в неопечатаних сховищах незафіксовані біооб’єкти з посівами та інші культури, які вміщують біологічно небезпечний матеріал.

Біотехнологічній лабораторії обладнані великим різноманіттям електроприладів, які використовують безпосередньо в дослідженнях та як допоміжні прилади: автоклави, дистилятори, шейкери, кондиціонери, ламінар-бокси, термостати тощо. Для створення безпечних умов користування електроприладами необхідно проводити: ізоляцію струмопровідних елементів устаткування, обмеження доступу до струмоведучих елементів за допомогою встановлення огорож, використання наклейок, інформаційних дошок, маркувань або запобіжних табличок. забезпечення захисного заземлення, встановлення ручних, автоматичних або електромагнітних блокаторів безпеки, проведення захисного розмежування електричних зон, застосування розділових трансформаторів.

5.2. Охорона навколишнього природного середовища

Сільськогосподарьке виробництво — найбільш активна галузь, де взаємодіє суспільство і природа. В умовах сучасної системи сільського господарства можна виокремити два напрямки природоохоронної діяльності: охорона навколишнього природного середовища і всіх його елементів від негативного впливу сільськогосподарського виробництва та охорона сільського господарства від шкідливого впливу антропогенного навколишнього середовища.

Основні правові норми, які закріплюють порядок використання та охорони земель, інших природних об'єктів у сільському господарстві, містяться в Земельному, Водному, Лісовому кодексах України, в кодексі України про надра, а також у Законах України «Про охорону земель», «Про тваринний світ» та «Про охорону атмосферного повітря». Вказані правові норми становлять правову основу екологізації аграрного законодавства [62].

До основних заходів по збереженню, відновленню, поліпшенню ґрунту належать дії по боротьбі з вітровою та водною ерозією ґрунту, з безгосподарним ставленням до земель, меліорацією та рекультивацією земель, а також боротьба з забрудненням ґрунту.

Особливої уваги заслуговує питання рекультивації порушених земель. Рекультивація порушених земель – це комплекс організаційних, технічних і біотехнологічних заходів, спрямованих на відновлення ґрунтового покрову, поліпшення стану та продуктивності порушених земель. Повернення рекультивованих земель у сільськогосподарське виробництво є обов’язковою умовою для отримання нової земельної ділянки для видобутку корисних копалин відкритим способом і торфу та проведення інших робіт, пов’язаних з порушенням ґрунтового покриву.

Забруднення земель можливе також і в процесі сільськогосподарського виробництва безпосередньо власниками землі або землекористувачами. Для підвищення врожайності сільськогосподарських культур господарства

використовують різні агрохімікати, пестициди, мінеральні добрива, які призначені для боротьби з бур'янами, хворобами та шкідниками рослин. Однак при їх застосуванні виникають різні негативні наслідки — забруднення навколишнього середовища та спричинення шкоди здоров'ю населенню, водним об'єктам, лісовій рослинності, тваринному світу.

При використанні в сільському господарстві засобів захисту рослин, стимуляторів їх росту, мінеральних добрив та інших препаратів повинні враховуватися вимоги щодо охорони тваринного світу. Всі сільськогосподарські підприємства зобов'язані вживати заходів щодо запобігання захворюванню та загибелі тварин під час зберігання, транспортування та застосування вказаних препаратів.

Отже, можна виділити наступні варіанти охорони навколишнього середовища і здоров’я громадян від негативного впливу сільськогосподарського виробництва: охорона навколишнього середовища при експлуатації об'єктів сільськогосподарського призначення; охорона навколишнього середовища при проведенні меліорації земель і використанні меліоративних систем і гідротехнічних споруд; охорона навколишнього середовища в області хімізації сільського господарства; охорона навколишнього середовища в процесі здійснення генно-інженерної діяльності та використання її результатів.

ВИСНОВКИ

1. Для експлантів рижію ярого найбільш ефективно використовувати стерилізатором $KMnO_4$ концентрацією 1,0 % за експозиції 10 хвилин. Вказаний протокол стерилізації дозволив отримати 94,3 % стерильних життєздатних експлантів, з високими мофогенними показниками та здатністю до інтенсивного росту.

2. Оптимальним для мікроклонального розмноження рослин рижію ярого є живильне середовище за прописом Мурасіге-Скуга за модифікації 1,0 мг/л ІОК та 6-БАП, що забезпечує коефіцієнт розмноження на рівні 9,6 шт рослин масою 103 мг.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Левенко Б. О. Основи біотехнології рослин. Київ: Поліграфконсалт, 2000. 248 с.
2. Мусієнко М. М., Панюта С. В. Біотехнологія рослин. Київ: ВПЦ «Київський університет», 2005. 114 с.
3. Ricroch A., Chopra S., Kuntz M. Plant biotechnology experience and future prospects. Springerlink, 2021. ISBN: 978-3-030-68345-0
4. Дубровна О. В., Моргун В. В. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів. Київ: Логос, 2012. 425 с.
5. Кунах В.А. Біотехнологія рослин для поліпшення біотехнологія рослин для поліпшення умов життя людини умов життя людини. *Біотехнологія*. 2008. 29–30 с.
6. Das H. K. Textbook of biotechnology. Hoboken: Wiley-Interscience, 2017. 1052 p.
7. Сатарова Т. М., Абраімова О. Є., Вінніков А. І., Черенков А. В. Біотехнологія рослин: навчальний посібник. Дніпропетровськ: Адверта, 2016. 136 с.
8. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин: Підручник. Київ: Поліграфконсалт, 2003. 520 с.
9. Любченко І. О., Рябовол Л. О., Любченко А. І. Використання культури *in vitro* в адаптивній селекції рослин. *Збірник наукових праць УНУС*. 2016. Вип. № 88. С. 126–139.
10. Sinha B. K. Abiotic and biotic stress management in plants. Delhi: NIPA, 2021. 640 p.
11. Abdin M., Kiran U., Kamaluddin A.A. Plant biotechnology: principles and applications. Springerlink, 2017. ISBN: 978-981-10-2961-5
12. Кунах В. А. Біотехнологія рослин для поліпшення умов життя людини умов життя людини. *Біотехнологія*. Т. 1, № 1, 2008. С. 28–39.

13. Любченко А. І., Любченко І. О. Аналіз продуктивності рослин сомаклональних ліній рижію ярого. *Збірник наукових праць УНУС*. 2020. Вип. № 96. С. 303–319.
14. Рябовол Л. О., Любченко А. І. Морфогенез стійких до засолення калюсних ліній цикорію коренеплідного та збереження ознаки солестійкості регенерантами. *Збірник наукових праць УНУС*. 2011. Вип. № 75. С. 110–115.
15. Моргун В. В., Дубровна О. В., Моргун Б. В. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*. 2016. С. 196–214.
16. Чугункова Т. В. Використання клітинної селекції для створення стійких форм буряків. *Фізіологія і біохімія культурних рослин*. 2011. С. 509–519.
17. Івченко Т. В., Баштан Н. О., Віценя Т. І., Мірошніченко Т. М., Мозговська Г. В., Гарт О. Ю. Клітинна селекція овочевих культур на стійкість до біотичних і абіотичних чинників навколишнього середовища. *Вісник аграрної науки*. 2014. № 12. С. 34–38.
18. Захарчук Н. А. Можливості клітинної селекції та сомаклональної варіабельності генотипів картоплі для створення сортів стійких до фузаріозу *Вісник Житомирського НАЕУ*. 2014. № 2 (42). С. 125–130.
19. Blakeslee A. P., Belling G., Earnham M. E., Bergner A. D. A haploid mutant in the Jimson weed. *Science*. 2019. Vol. 55. P. 645–647.
20. Паламарчук Д. П. Перспективи використання подвоєних гаплоїдів в селекції рису та методи їх отримання. *Збірник наукових праць Інституту зрошуваного землеробства*. 2012. Вип. 58 С. 130–133.
21. Гребенюк І. В. Умови культивування пиляків *in vitro* тритикале. *Вісник ХНУ ім. В. Н. Каразіна*. 2008. Вип. 7. № 814. С. 187–198.
22. Antonyuk M. Z., Bodylyova M.V., Ternovskaya T.K. Genome structure of introgressive lines *Triticum aestivum*/*Aegilops sharonensis*. *Cytology and Genetics*. 2009. № 43(6). P. 58–67.
23. Маньковська О. С., Антонюк М. З. Гаметоцидні гени представників *Aegilops* L. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*; 2010.№ 8(1). С. 140–153.

24. Farooq S., Iqbal N, Shah T.M. Promotion of homoeologous chromosome pairing in hybrids of *Triticum aestivum* × *Aegilops variabilis*. *Genome*. 1990. № 33. P. 825–828.
25. Flagel L., Udall J., Nettleton D., Wendel J. Duplicate gene expression in allopolyploid *Gossypium reveals* two temporally distinct phases of expression evolution. *BMC Biology*. 2008. № 6. doi: 10.1186/1741-7007-6-16.
26. Блюм Я., Сиволап Ю., Рудий Р., Созінов О. Нова хвиля «зеленої революції» (Перспективи застосування в Україні досягнень молекулярної біотехнології та геноміки). *Вісник НАН України*. 2006. № 3. С. 21–31.
27. Cheng M., Lowe B. A., Spenser T. M. Factors influencing Agrobacterium-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 2004. № 1. P. 31–35.
28. Hamilton A., Baulcombe D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 1999. № 286. P. 950–952.
29. Подгаєцький А. А., Мацкевич В. В,. Подгаєцький А. Ан. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин: монографія. Біла Церква: БНАУ, 2018. 209 с.
30. Зеленіна Г. А. Мікроклональне розмноження та особливості водного обміну регенерантів *Arnica foliosa*. *Вісник Одеського національного університету*. 2005. Т. 9. Вип. 5. С. 7–11.
31. Денчиля-Сакаль Г. М., Ніколайчук В. І., Терек В. О. Мікроклональне розмноження рослин *Trifolium pratense* L. *Науковий вісник Ужгородського університету.* 2010. 1–4 с.
32. Сергієнко О. Ф. Оптимізація методики мікроклонування моркви. *Фізіологія і біохімія культурних рослин*. 2000. 232–235 с.
33. Карзіна Н., Митрофанова І. Розвиток експлантів ломиносу (*Clematis* L.) на етапі введення за умов *in vitro*. *Вісник Львівського університету*. 2014. 67–74 с.
34. Худолєєва Л. В., Куцоконь Н. К. Введення в культуру *in vitro* клонів тополь та верб перспективних для відновлюваної енергетики. *Біологічні системи*. Т. 9. Вип.1. 2017. С. 18–22.

35. Любченко А. І., Рябовол Л. О., Сержук О. П. Умови мікророзмноженя *in vitro* солестійких сомаклонів цикорію коренеплідного при їх повторному ретестуванні. *Збірник наукових праць ІБКіЦК*. 2011. № 12. С. 161–165.
36. Любченко А. І, Рябовол Л. О., Любченко І. О. Вплив модифікованого живильного середовища на мікроклонування рослин *in vitro* рижію ярого. *Збірник наукових праць УНУС*. 2018. Вип. № 92. С. 133–141.
37. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження рослин. Київ: Наукова думка, 2005. 271 с.
38. Мацкевич В. В., Власенко М. Ю., Філіпова Л. М. Ефективність тривалого клонального мікророзмноження *Thuja occidentalis «Smaragd»* залежно від компонентів живильного середовища та стану експлантів. *Збірник праць Уманського НУС*. 2010. Вип. 74. С. 324-329
39. Benson E. E. *In vitro* plant recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 2000. № .6. P. 141–148.
40. Yancheva S., Golubowicz S,. Fisher E. Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during *in vitro* organogenesis in apple. *Plant Science*. 2003.P. 299–309.
41. Опалко А. І., Сержук О. П., Небиков М. В., Рябовол Л. О.,Любченко А. І. Розмноження глоду в культурі in vitro. Збірник наукових праць УНУС «Основи біологічного рослинництва в сучасному землеробстві». 2011. С. 194–198.
42. Черненко А. Д., Небиков М. В. Стерилізація експлантів ріпаку озимого для введення в культуру *in vitro*. Автохтонні та інтродуковані рослини. 2010. 117–120 с.
43. Н.В. Титаренко, Н.І. Теслюк УДОСКОНАЛЕННЯ ПРОЦЕСІВ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ОЖИНИ ЗВИЧАЙНОЇ RUBUS CAESIUS L. СОРТУ ТОРНФРІ Мікробіологія і біотехнологія. 2020. № 2. С 72–84
44. О.О. Олійник1, А.А. Клюваденко2, М.Д. Мельничук3 ПОКРАЩЕННЯ СКЛАДУ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ПРИШВИДШЕННЯ РОСТУ І

РОЗВИТКУ ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ В КУЛЬТУРІ IN VITRO Збірник науково-технічних праць. Національний лісотехнічний університет України.2016.№11

45. Лук'янець О.Д. ЕФЕКТИВНІСТЬ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ЦИКОРІЮ САЛАТНОГО ЕНДИВІЙ ТА ЕСКАРІОЛ. Таврійський науковий вісник. 2018. № 107 С. 109–116.
46. Білінська Оксана, Голод Руслана, Шубала Галина ВПЛИВ РЕГУЛЯТОРА РОСТУ НА ФОРМУВАННЯ ПРОДУКТИВНОСТІ РОСЛИН IN VITRO В УМОВАХ ЗАКРИТОГО ГРУНТУ. доповіді IV міжнародної науково-практичної конференції "Інтеграційна система освіти, науки і виробництва в сучасному інформаційному просторі" (Тернопіль, 31 травня 2018 року) С.9–11є
47. 1Циганкова В. А., 1Блюм Я. Б Скринінг та особливості біологічної дії синтетичних регуляторів росту рослин. Биополимеры и клетка. 1997. Т. 13. № 6. С.484–492.
48. Becher T., Haberland G., Koop H. Callus formation and plant regeneration in standard and microexplants from seedlings of barley (Hordeum vulgare L.)// Plant Cell Rep. — 1992. — 11. — P. 39—43.
49. Maksimov I.V, Yarullina L.G., Surina O.B. The effect of exogenous phytohormones on resistance of wheat calluses to Tilletia caries (D.C.) Tul. & C. Tul// Amer. J. of Plant Sci. — 2014. — 5. — P. 1745—1754.
50. Ying-Hua Su, Yu-Bo Liu, Xian-Sheng Zhang. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development// Mol. Plant. — 2011. — 4, N 4. — P. 616—625.
51. Rashid U. et al. Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in Pakistani wheat (Triticum aestivum) cultivars// Electronic J. of Biotechnol. — 2009. — 12.— P. 4—5.
52. Andersone U. Medium pH aff ects regeneration capacity and oxidative enzyme activity of Pinus sylvestris in tissue culture / U. Andersone. [Electronic resource]. – Mode of access http://eeb.lu.lv/EEB/2008/Andersone.pdf
53. Лісовий М. М. ОСОБЛИВОСТІ РОЗМНОЖЕННЯ PINUS SYLVESTRIS L. В

УМОВАХ IN VITROНауковий вісник НЛТУ України. – 2016. – Вип. 26.8. С.123–128

54. Н. Іванова. РОЗРОБКА ПРОТОКОЛУ КЛОНАЛЬНОГО МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ IN VITRO BEGONIA RIGER ELATIOR ДЛЯ МАСОВОГО ВИРОБНИЦТВА САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2011. Випуск 57. С. 24–29.
55. D.S. Karuna [a], Prasanta Dey [b], Shibu Das [c], Amit Kundu [d], Tejendra Bhakta *In vitr o* antioxidant activities of root extract of *Asparagus racemosus* Linn. Journal of Traditional and Complementary MedicineVolume 8, Issue 1, January 2018, Pages 60-65.
56. Шумик М. І. Теоретичне обґрунтування перспектив розмноження декоративних деревних рослин на сучасному етапі. *Інтродукція рослин*. 2004. № 4. С. 58-62.
57. Державний реєстр сортів рослин придатних для поширення в Україні у 2023 році. https://sops.gov.ua/ua/derzavnij-reestr.
58. [c]**Мусієнко** М.М., Панюта О.О. **Біотехнологія** рослин: Навчальний посібник. – К.: ВПЦ «Київський університет», 2005. – 114 .
59. Єщенко В. О., Копитко П. Г., Опришко В. П., Костогриз П. В. Основи наукових досліджень в агрономії. К.: Дія. 2005. 288 с.
60. охорона праці
61. ох пракекиапріаі
62. Екологічні аспекти сільськогосподарського виробництва / Р.Б. Гевко, Ю.В. Дзядикевич, Н.Ю. Малевич. Сталий розвиток економіки. 2017. № 2 (35). С. 156–162.
63. Екологічне право України : [підруч. для студ. юрид. спец. вищ. навч. закл.] / за ред. А. П. Гетьмана та М. В. Шульги. — Х. : Право, 2009. – 328 с.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

ДОДАТОК А

ДОДАТОК А

ДОДАТОК А

ДОДАТОК А