

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет агротехнологій та природокористування
Кафедра біотехнології та хімії

Допущено до захисту

Завідувач кафедриКоваленко В.М.

«»2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ «БАКАЛАВР»

ОСОБЛИВОСТІ ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*
ЧОРНОБРИВЦІВ (*TAGETES*)

за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Виконав Грицина А.В.
Підпис

Група БІО 2001

Науковий керівник Бутенко Є.Ю.
Підпис

Суми – 2024

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет агротехнологій та природокористування

Кафедра біотехнології та хімії

Освітній ступінь – "Бакалавр"

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

“ЗАТВЕРДЖУЮ”:

Завідувач кафедри

_____.
" ____ " _____ 202_ р.

ЗАВДАННЯ
на кваліфікаційну роботу

Грицині Анастасії Віталіївни

ПІБ студента

1. Тема роботи: "Особливості введення в культуру *in vitro* чорнобривців (*Tagetes*)"

Затверджено наказом по університету від " ____ " _____ 202_ р. № _____

2. Термін здачі студентом закінченої роботи на кафедру _____.

3. Вихідні дані до роботи:

- місце проведення досліджень: Навчально-науково-виробничий центр Сумського національного аграрного університету.

- методичне забезпечення: Методичні вказівки для виконання кваліфікаційної роботи, методика проведення лабораторних досліджень, комп'ютерні методи обробки інформації.

- схема досліду: Стерилізацію проводили в наступній послідовності: попередньо насіння упаковали в марлеві мішечки та промивали в мильному розчині та проточній воді; промите насіння занурили на 1 хв. у 70-ти відсотковий етиловий спирт, після чого перенесли в стерилізуючий розчин «Білизни» 1:4 (20 хв.); завершальним етапом стерилізації було триразове промивання насіння в стерильній дистильованій воді.

4. Перелік завдань, які будуть виконуватися в роботі: провести літературний аналіз біологічних особливостей родини *Asteraceae*; відпрацювати процедуру стерилізації насіння *Tagetes*; підібрати прописи живильних середовищ для культивування насіння *Tagetes*; отримати проростки *Tagetes* в умовах асептичної культури.

Керівник кваліфікаційної роботи _____

Завдання прийняв до виконання _____

Дата отримання завдання « ____ » _____ 202_ р.

АНОТАЦІЯ

Види Tagetes, широко відомі як чорнобривці, вирощують як декоративні рослини та процвітають у різноманітних агрокліматах. Біоактивні екстракти різних частин *Tagetes* виявляють нематоцидну, фунгіцидну та інсектицидну дію. Нематоцидну активність коренів приписують тієнілам, тоді як біоцидними компонентами ефірної олії з квітів і листя є терпеноїди. Також каротиноїдні пігменти *Tagetes* корисні в харчових барвниках. У кваліфікаційній роботі розглядаються різні способи використання цієї багатоцільової рослини.

Основою створення живильних середовищ для вирощування культур тканин рослин є суміші мінеральних солей (макро- і мікроелементів) і, оскільки живлення культивованих тканин є гетеротрофним, джерело вуглецю вводять в склад середовища у вигляді сахарози або глюкози.

Для отримання асептичного рослинного матеріалу необхідний правильний і обгрунтований підбір схеми стерилізації та живильного середовища. Тому, виходячи з вище сказаного, первинним матеріалом у наших дослідженнях було насіння *Tagetes*.

Дослідження тканинних і клітинних культур *in vitro* здебільшого зацікавлені в аналізі впливу факторів середовища на індукцію та/або регенерацію калюса. Такого роду дослідження необхідні для роботи над генетичними маніпуляціями, визначення відповідної стадії та типу клітин для регенерації модифікованих рослин.

Для поверхневої стерилізації рослинних тканин використовують значну кількість хімічних речовин, як правило тих, що містять активний хлор (гіпохлорид натрію, хлорне вапно, гіпохлорид кальцію, хлорамін), двохлористу ртуть (сулему), пероксид водню. Рідше використовують бром, сірчану кислоту, в особливих випадках антибіотики.

Метою дослідження було встановити особливості введення та початкові етапи розвитку *Tagetes* в умовах асептичної культури.

Проаналізувавши літературні джерела, ми вивчили морфологічні та біологічні особливості росту та розвитку *Tagetes* в природних умовах, що дало можливість отримати аспетичні рослини. Підбрано схему стерилізації насіння з виходом стерильних експлантів – 85 %.

Встановлено, що ефективним стерилізуючим агентом для насіння *Tagetes* і отримання аспетичних проростків є розчин «Білизни» в концентрації 1:4. Встановлено, що для успішного введення та культивування рослин *Tagetes* в умовах *in vitro* необхідне поживне середовище Мурасіге-Скуга. Виявлено, що ріст і розвиток рослин відбувається рівномірно, про що вказує короткий термін культивування рослин *Tagetes* (14-31 доби).

ABSTRACT

Tagetes species, commonly known as marigolds, are grown as ornamental plants and thrive in a variety of agroclimates. Bioactive extracts of various parts of Tagetes show nematocidal, fungicidal and insecticidal effects. The nematocidal activity of the roots is attributed to thienyls, while the biocidal components of the essential oil from the flowers and leaves are terpenoids. Tagetes carotenoid pigments are also useful in food dyes. This article explores the various uses of this multi-purpose plant.

The basis for creating nutrient media for growing plant tissue cultures is a mixture of mineral salts (macro- and microelements) and, since the nutrition of cultivated tissues is heterotrophic, a source of carbon is introduced into the medium in the form of sucrose or glucose.

To obtain aseptic plant material, a correct and justified selection of the sterilization scheme and nutrient medium is necessary. Therefore, based on the above, the primary material in our research was Tagetes seeds.

In vitro tissue and cell culture studies are mostly interested in analyzing the influence of environmental factors on the induction and/or regeneration of callus. This kind of research is necessary to work on genetic manipulations, to determine the appropriate stage and type of cells for the regeneration of modified plants.

For surface sterilization of plant tissues, a significant amount of chemicals are used, usually those containing active chlorine (sodium hypochlorite, hypochlorite, calcium hypochlorite, chloramine), mercury dichloride (sulem), hydrogen peroxide. Bromine, sulfuric acid, and in special cases antibiotics are used less frequently.

The research method established the peculiarities of the introduction and the initial stages of the development of tagetes in the conditions of aseptic culture.

After analyzing the literary sources, we studied the morphological and biological features of the growth and development of tagetes in natural conditions, which made it possible to obtain aseptic plants. The sterilization scheme was

selected with the yield of sterile explants - 85%.

It has been established that an effective sterilizing agent for tagetes seeds and obtaining aseptic seedlings is a solution of "laundry" in a concentration of 1:4. It has been established that murashige-skoog nutrient medium is necessary for successful introduction and cultivation of tagetes plants in vitro. It was found that the growth and development of plants occurs evenly, which is indicated by the short period of cultivation of tagetes plants (14-31 days).

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1. Загальна характеристика рослин роду <i>Tagetes</i>	10
1.2. Ботанічні та біолого-екологічні особливості <i>Tagetes</i>	11
1.3. Особливості вирощування та зберігання культури <i>Tagetes</i> (чорнобривці розлогі)	20
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	23
2.1. Стерилізація вихідного матеріалу <i>Tagetes</i>	23
2.2. Поживне середовище для введення культуру <i>in vitro Tagetes</i>	25
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO</i> РОСЛИН <i>TAGETES</i> (РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ)	38
ВИСНОВКИ	44
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	45
ДОДАТКИ	51

ВСТУП

Види *Tagetes*, широко відомі як чорнобривці, вирощують як декоративні рослини та процвітають у різноманітних агрокліматах. Біоактивні екстракти різних частин *Tagetes* виявляють нематоцидну, фунгіцидну та інсектицидну дію. Нематоцидну активність коренів приписують тієнілам, тоді як біоцидними компонентами ефірної олії з квітів і листя є терпеноїди. Також каротиноїдні пігменти *Tagetes* корисні в харчових барвниках. У кваліфікаційній роботі розглядаються способи використання цієї багатоцільової рослини.

Чорнобривці (*Tagetes*) є одним із найважливіших комерційні квіти, які вирощують у всьому світі і високо цінуються за їхні вражаючі квіти, блискучі кольори, чудові зовнішній вигляд, аромат і наділений широким спектром комерційних можливостей промислового сектора. *Tagetes patula* L. частіше вирощують для виробництво сипучих квітів і використовується в ландшафтній архітектурі через їхню різну висоту та колір квіток. Це також є важливе джерело каротиноїдів, які використовуються в птахівництві підсилює колір жовтка [1, 2, 3].

Мета дослідження – встановити особливості введення та початкові етапи розвитку *Tagetes* в умовах асептичної культури.

Відповідно до мети, вирішувались наступні завдання:

- провести літературний аналіз біологічних особливостей родини *Asteraceae*;
- відпрацювати процедуру стерилізації насіння *Tagetes*;
- підібрати прописи живильних середовищ для культивування насіння *Tagetes*;
- отримати проростки *Tagetes* в умовах асептичної культури.

Об'єкт дослідження – процес введення в культуру *in vitro* *Tagetes*.

Предмет дослідження – *Tagetes* в культурі *in vitro*.

Структура роботи. Робота складається зі вступу, трьох розділів, загальних висновків, списку використаної літератури, який налічує 50 джерел. Зміст роботи викладено на 44 сторінках основного тексту і містить 7 таблиці, 14 рисунків і 2 схеми.

Особистий внесок дипломника – самостійно проводились студенткою в умовах ННВЦ СНАУ спостереження за ростом та розвитком *Tagetes*, зібрано необхідні дані, опрацьована література з питань технології вирощування культури, складено табличний матеріал, зроблено висновки.

Публікації. Отриманий сертифікат учасника міжнародної конференції та опубліковані тези на тему: «Умови культивування рослин *tagetes*», с. 118-119, в Матеріалах II International Scientific and Theoretical Conference Modern tools and methods of scientific investigations 08.12.2023, Antwerp, Kingdom of Belgium. DOI 10.36074/scientia-08.12.2023 (Додаток А, Б).

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальна характеристика рослин роду *Tagetes*

Рід *Tagetes*, який включає рослини, відомі як «чорнобривці», належить до сімейства Asteraceae і містить понад 50 культивованих і диких видів. Чорнобривці походять з Америки, але деякі види натуралізовані в Африці, Азії та Європі. Рослини роду *Tagetes* є одними з найпоширеніших садових квітів у всьому Світі. Чорнобривці користуються популярністю серед садівників завдяки простоті вирощування, широкій адаптивності, низькій вимогливості до екологічних і технологічних факторів, а також урожайності квітів протягом усього року [3, 4].

Чорнобривці як декоративні рослини мають ряд переваг, завдяки яким вони особливо цінуються та широко культивуються у Світі. До них належать: їх придатність для великого типу культивування, тобто для підстилки, країв і горщиків, а також як зрізані квіти, букети, різні квіткові композиції та інші застосування, визнані в соціальному чи навіть релігійному житті; тривалий період цвітіння, що розтягується на все літо і осінь; легке розмноження насінням; і велике розмаїття різновидів у кількох видах *Tagetes*. Крім того, завдяки своїм різноманітним корисним властивостям, короткому періоду виробництва декоративних і товарних квітів, широкому спектру привабливих колірних палітр, форм і розмірів квіток, а також властивостям рослин, чорнобривці стали одним із бажаних видів багатьох любителів і промислові квітникарі [5, 6, 7].

Чорнобривці як вид культури з коротким терміном вирощування можна вирощувати в багатопосадовій системі, в сівозміні з іншими культурами, або як змішану культуру. В останньому випадку культивування на кордонах з іншими рослинами може забезпечити сприятливий ефект у веденні

органічного сільського господарства, головним чином у виробництві важливих садових видів, наприклад, помідорів [7].

Завдяки бактерицидній, нематоцидній, фунгіцидній та інсектицидній дії види *Tagetes* можна використовувати в органічному сільському господарстві, особливо в культурі овочів. Тіофени, алкалоїди, поліацетилени, жирні кислоти, флавоноїди та терпени, присутні в *Tagetes*. Підкреслюючи роль і значення рослин *Tagetes* відзначають їх широке використання як антиоксидант, ліки, харчовий пігмент, ароматизатор, парфум, смола, декоративний та інсектицид. Біоцидні екстракти з коренів, стебел, листя, суцвіть або з усієї рослини дозволяють широко використовувати в сільському господарстві як нематоцид, ларвіцид, атрактант або інсектицид і як добриво.

Tagetes можна використовувати в сівозміні, а в боротьбі зі шкідниками можна застосовувати як органічне добриво для рослин або у вигляді водних екстрактів і порошків. Різноманітність культиварів *Tagetes*, що належать до різних видів, дозволяє ідентифікувати генотипи зі стійкістю або толерантністю до засолення, посухи та інших несприятливих умов, надає антимікробну та нематоцидну дію, що може представляти інтерес для органічного землеробства. Використання пестицидів природного або біологічного походження має такі переваги, як низька токсичність, ефективний контроль і низька вартість. Крім того, ці продукти не сприяють стійкості сільськогосподарських культур до шкідників і хвороб [4, 8, 9].

1.2 Ботанічні та біолого-екологічні особливості *Tagetes*

Tagetes – рід однорічних або багаторічних, переважно трав'янистих рослин родини айстрових, що налічує 50 видів. Вони належать до кількох груп рослин, відомих англійською як чорнобривці. Рід *Tagetes* був описаний Карлом Ліннеєм у 1753 році [2, 10, 11].

Ці рослини походять з Мексики, природним чином ростуть у долині Мексики на південь і навіть досягають кількох інших латиноамериканських

країн, але деякі види натуралізувалися по всьому світу. Один вид, *T. minuta*, у деяких регіонах вважається шкідливою інвазивною рослиною [5, 12].

Рід *Tagetes*, або чорнобривці – рід сімейства соняшникових або айстрових, який включає 49 видів квіткових трав'янистих рослин кущової форми, які походять із Центральної та Південної Америки та були завезені по всьому світу. Залежно від навколишнього середовища та того, чи вирощують вони як кімнатну чи вуличну рослину, чорнобривці можуть бути однорічними або багаторічними [6, 12, 13].

Рослини видають сильний аромат при подрібненні, а квіти чорнобривців гіркі з пряним трав'яним смаком. Однак сорти «Lemon Gem» і «Tangerine Gem» досить ароматні. Квіти можна зробити більш приємними, якщо видалити гірку білу основу пелюстки. Рослина часто використовується в чаї, для фарбування їжі та як заміник естрагону; однак, це може бути шкідливим, якщо їсти його у великих кількостях. Сік або колючки цих рослин можуть викликати хворобливий висип або подразнення шкіри. Промийте уражену ділянку шкіри водою з милом якомога швидше після контакту [8, 14, 15].

Назва *Tagetes* походить від імені етрусського провидця, який нібито народився під час оранки землі, і вказує на легкість, з якою рослини цього роду щороку виходять через насіння, вироблене в попередньому році, або через стебла, які знову виростають вже на місці [10].

Види *Tagetes* варіюються за розміром від 0,1 до 2,2 м заввишки. Більшість видів мають перисто-зелене листя. Цвіте в природі золотистого, помаранчевого, жовтого та білого кольорів, часто з бордовими відблисками. Квіткові головки зазвичай мають до 4–6 см у діаметрі, як правило, з променевими та дисковими суцвіттями. У садівництві їх, як правило, висаджують як однорічники, хоча набирають популярність багаторічні види. Мають мичкоподібні корені [9].

Залежно від виду, *Tagetes* добре ростуть майже на будь-якому ґрунті. Більшість садових культур найкраще ростуть у ґрунті з хорошим дренажем, а деякі сорти, як відомо, добре переносять посуху.

Знову ж таки, залежно від виду, чорнобривці добре ростуть майже на будь-якому ґрунті з хорошим дренажем, і відомо, що деякі сорти добре переносять посуху. Вони можуть рости на повному або частковому сонці, але повне сонце сприяє цвітінню [11, 16, 17].

Латинське слово *Tagētes* походить від *Tagēs* в етруській міфології, народжене під час оранки землі. Ймовірно, це стосується легкості, з якою рослини цього роду щороку проростають через насіння, вироблене в попередньому році, або через стебла, які відростають із пня, який уже є на місці [18].

Загальна назва англійською мовою, marigold, походить від *Mary's gold*, ім'я, яке вперше було застосовано до подібної рослини, яка походить з Європи, *Calendula officinalis*.

Найбільш часто культивовані різновиди *Tagetes* відомі як африканські чорнобривці (зазвичай це стосується сортів і гібридів *Tagetes erecta*) або французькі чорнобривці (зазвичай це відноситься до гібридів і сортів *Tagetes patula*, багато з яких були виведені у Франції). Так звані чорнобривці з печаткою є гібридами, отриманими переважно з *Tagetes tenuifolia* [15, 17, 19].

Залежно від виду, листя чорнобривців має різкий мускусний запах, хоча деякі сорти були виведені без запаху. Через антибактеріальну дію тіофенів, що виділяються корінням, *Tagetes* не слід висаджувати поблизу бобових культур. Деякі з багаторічних видів є стійкими до оленів, кроликів, гризунів [20].

Квітки *Tagetes erecta* багаті оранжево-жовтим каротиноїдом лютеїном і використовуються як харчовий барвник в Європейському Союзі для таких харчових продуктів, як макарони, рослинна олія, маргарин, майонез, заправки для салатів, випічка, кондитерські вироби, молочні продукти, морозиво, йогурт, цитрусовий сік і гірчиця. Однак у Сполучених Штатах

порошки та екстракти дозволені лише як барвники в кормах для птиці [18, 21, 22].

Чорнобривці вважаються харчовою рослиною для деяких гусениць лускокрилих, у тому числі молі-крапки, і джерелом нектару для інших метеликів і джмелів. Вони часто є частиною садових насаджень метеликів. У дикій природі багато видів запилюються жуками [4, 19].

Tagetes lucida. Вид *Tagetes lucida*, відомий як *pericón*, використовується для приготування солодкого лікарського чаю з анісовим смаком у Мексиці. Його також використовують як кулінарну траву в багатьох країнах з теплим кліматом, як замітник естрагону, і пропонують у розпліднику як «техаський естрагон» або «мексиканську м'яту чорнобривців».



Рис. 1.1. *Tagetes lucida*

Tagetes minuta. *Tagetes minuta* походить з південної частини Південної Америки, є високою прямою рослиною чорнобривців з маленькими квітками, яка використовується як кулінарна трава в Перу, Еквадорі та деяких частинах Чилі та Болівії, де її називають інкським терміном «huacatay». Паста використовується для приготування популярної страви з картоплі під назвою окопа.



Рис. 1.2. *Tagetes minuta*

Маючи як «зелені», так і «жовто-помаранчеві» нотки, смак і запах свіжої *T. Minuta* схожий на суміш солодкого базиліка, естрагону, м'яти та цитрусових. Він також використовується як лікарський чай при шлунково-кишкових захворюваннях і, зокрема, проти нематод.

Tagetes erecta. широко використовується під час святкування Дня мертвих у Мексиці. У Бангладеш, Індії та інших країнах Південної Азії чорнобривці використовуються як прикраса під час таких заходів, як церемонія з куркумою, весілля, Похела Фалгун та інші заходи. У колоніальний період місцеві сорти цих квітів були замінені американськими видами, такими як *T. erecta*, *T. Patula* та *T. tenuifolia*. Чорнобривці також широко культивуються в Індії та Таїланді, зокрема види *T. erecta*, *Tagetes patula* та *T. tenuifolia*. Його завжди продають на ринках для щоденного поклоніння та ритуалів. Величезна кількість чорнобривців використовується в гірляндах і прикрасах для весіль, фестивалів і релігійних заходів. Вирощування чорнобривців широко поширене в штатах Індії Телангана, Андхра-Прадеш, Таміл Наду, Західна Бенгалія, Карнатака та Уттар-Прадеш (для ринків Віджаядашамі та Дівалі).



Рис. 1.3. *Tagetes erecta*

В Україні чорнобривці (*T. erecta*, *T. Patula*) та чорнобривці тонколистні вважаються одним із національних символів і часто згадуються в піснях, віршах, казках.

Чорнобривці широко використовуються в промислових і медичних цілях, а також як природні барвники та інсектициди або гербіциди. Завдяки їх важливості як лікарських рослин для охорони здоров'я та трав'яних препаратів, чорнобривці культивуються та виробляються в промислових масштабах, особливо в країнах, що розвиваються, на Далекому Сході. Крім того, чорнобривцям приділяється все більша увага в наукових дослідженнях через їх багаторазове використання та їхню фітохімічну та біоактивну важливість.

Проте, чорнобривці надзвичайно цінуються як однорічні декоративні рослини, *Tagetes patula* L., *T. erecta* L. і *T. tenuifolia* Cav. будучи одним з найвідоміших і найпоширеніших. На додаток до їх цінності як декоративних

рослин, ці три види мають різноманітні та надзвичайно численні використання та властивості, що робить їх дуже цікавими видами для використання в селекційних роботах з чорнобривцями.

Вид *T. Patula* походить із високогір'я Мексики та Аргентини, але зараз широко поширений у всьому світі, відомий як чорнобривці французькі. Дата його введення в Європу невідома, але вперше про нього було повідомлено у Франції близько 1880 року. Вид також добре акліматизований у Румунії, де він широко культивується в садах і зелених насадженнях. Рослини цього виду невеликі, близько 40 см, мають сильні гілки та подовжені листя (темно-зелені), з перистими композиціями. Їх квіткові головки невеликі, з товстими квітконосами, а квіти зазвичай гермафродитні, жовті, помаранчеві або поєднані з різними кольорами. Цвітіння відбувається поступово, починаючи з липня і до вересня.



Рис. 1.4. *Tagetes patula*

Tagetes erecta походить з Мексики і вперше був завезений до Європи в Іспанії в 16 столітті. Він відомий як африканські чорнобривці, ацтекські чорнобривці, американські чорнобривці або великі чорнобривці. Вид добре

відомий в Румунії. У Мексиці вид може досягати 1,5 м і більше, але середня довжина найбільш часто використовуваних різновидів становить 60-80 см. Надмірне зростання часто ускладнює його зростання в горщиках. З цієї причини нові комерційні сорти мають висоту лише близько 25–38 см. Стебла голі або опушені з зеленими гілками і численними довгими ребрами. Листки перисто-складні. Цвіте з липня по жовтень. Квіткові головки великі, діаметром 4–7 см, складаються з багатьох окремих квіток, зазвичай помаранчевого кольору. *Tagetes erecta* має багаторазове застосування як декоративна рослина для оформлення зелених насаджень та різноманітних квіткових композицій та гірлянд; його висаджують у сільськогосподарських культурах як засіб від комах і використовують у фармації та медицині, промисловості тощо. Борошно та екстракти чорнобривців використовуються в кормах для птиці для фарбування шкіри, м'яса (жиру) та яєчних жовтків, а також як барвники в різноманітних харчових продуктах. Жовто-помаранчеві квіти є джерелом великого інтересу для видобутку натуральних олій і пігментів. Лютеїн видобувається з квітів, основний пігмент, який використовується для отримання помаранчевого кольору, *T. erecta* є основним джерелом цього пігменту для комерційного використання. Види можуть використовуватися як природні повітряні фільтри або поглиначі для зменшення забруднення повітря; він також має потужний інвазійний потенціалі, з культивованих садів, може легко мігрувати в спонтанну флору та вільно поширюватися, Румунію було зареєстровано як заселену чужорідною флорою [8, 12, 14, 23, 24].

Походження *T. tenuifolia* знаходиться в Америці, і воно зустрічається від Мексики по всій Центральній Америці до центральної Колумбії; порівняно з двома попередніми видами зустрічається рідше. Він відомий як чорнобривці, чорнобривці золоті або чорнобривці лимонні. Він має менші складні темно-зелені листя та менші жовті, помаранчеві, золотисті або різнокольорові квіткові головки. Цвіте поступово з червня по жовтень.

Насіння чорнобривців зазвичай висівають безпосередньо в поле. Оптимальний період сівби залежить від географічної зони. У Румунії цей період відповідає середині квітня.



Рис. 1.5. *Tagetes tenuifolia*

На проростання насіння впливають різноманітні фактори навколишнього середовища, особливо температура та вологість ґрунту, а також частота поливу та якість використовуваної води. Якість насіння має першочергове значення для чорнобривців, щоб досягти швидкого та рівномірного сходу сходів, уникнути прогалин у полі та забезпечити однорідну польову культуру [15, 25, 26].



Тільки трубчасті
(у пижма)

Тільки язичкові
(у кульбаби)

Трубчасті і
несправжньо-язичкові
(у ромашки лікарської)

Трубчасті і пійчасті
(у волошки)

Рис. 1.6. Варіантів поєднання квіток у суцвітті рослин *Tagetes*

1.3. Особливості вирощування та зберігання культури *Tagetes* (чорнобривці розлогі)

Ефірну олію викорисовують в харчовій промисловості для приготування виробів кондитерського напрямку, у лікєро-горільчаному виробництві. Особливо широко використовують ефірну олію в парфумерній та косметичній промисловості [13, 27].

Як фітонцидний метод захисту рослин застосовують проти шкідливих комах, готуючи настої та обприскуючи. Настоем також обробляють бульби гладіолусів від різних грибкових захворювань та насіння айстр і левкою - від чорної ніжки, опускаючи в розчин на 8-10 год. Репелентні й токсичні властивості чорнобривців використовують, висіваючи їх на грядках, де розвиваються нематоди та вовчок, а також обсіваючи овочеві грядки з метою відлякування та дезорієнтації ряду шкідливих комах, зокрема мух [22].

В медицині чорнобривці використовують при холангітах у зборах трав (корінь тирлича жовтого - 60 г, трава тирлича хрещатого - 60, трава чорнобривців прямостоячих - 20, коренів терена колючого - 20, трава подорожника великого - 20, трава хвоща польового - 20 г). Дві столові ложки збору заливають 500 мл окропу, кип'ятять 5 хв, п'ють по 100 мл 4 рази в день перед вживанням їжі [14, 28, 29].

Однорічна трав'яниста теплолюбива рослина, розмножується насінням. Має тривалий період вегетації та цвітіння, навіть, до заморозків. Насіння дозріває восени.

Чорнобривці (*Tagetes*), синоніми: бархатці. Родина: Айстрові. Батьківщина чорнобривців - Мексика, де вони ростуть у природних умовах. На території України введені в культуру дуже давно [30].

Відомі в Україні найбільше однорічні види - чорнобривці дрібні та позначені. Зустрічаються багаторічні форми. Чорнобривці вирощують спеціалізовані господарства та практично все населення України, в першу чергу як декоративну рослину. Усі надземні частини містять ефірну олію, якої найбільше у фазі цвітіння (листки - 0,5-0,7 %, суцвіття - 0,1-0,2 %, стебла - 0,05 %). Основний компонент - оцимен, значно менше ліналоолу, цитропю, сабінену тощо [3, 17, 31].

В спеціалізованих господарствах чорнобривці розміщують після будь-якого попередника, на удобрених ділянках [8].

Таблиця 1.1

Районовані сорти

Рослина: [Чорнобривці розлогі](#)

Культура: [Чорнобривці розлогі](#)

Назва сорту	Заява №	Організації	Рік	Напрямок	Реком. зона
Аврора Гольд	97244001	З: 342 (?)	1999	озл, зріз	Л, П
Ефрикан Хавайн	93244005	З: 1010 (?)	1989	дкр, озл	Л, П
Лимонний 1	95244002	З: 365 (?)	1999	х	С
Оранжевий 1	95244001	З: 365 (?)	1999	х	С
Паскаль	93244001	З: 1010 (?)	1988	дкр, озл	Л, П
Прімо Йеллоу	93244002	З: 1010 (?)	1988	дкр, озл	С
Прімо Ориндж	93244003	З: 1010 (?)	1988	дкр, озл	С
Сільва	93244004	З: 1010 (?)	1988	дкр, озл	Л, П

Строки посіву - весняні, з таким розрахунком, щоб тепло-любиві сходи не попали під заморозки. Спосіб посіву - широкорядний з шириною міжрядь 45 см, відстань у рядку між рослинами 20 см. Норма висіву насіння - 2-3 кг/га. Глибина загортання насіння - 1,0- 1,5 см. Період проростання насіння - 10-20 днів [22, 25, 33].

Догляд за посівами починається з моменту означення рядків. Сходи на початковому етапі розвиваються повільно, а тому треба проводити регулярні міжрядні культивації для аерації ґрунту й знищення бур'янів. В рядках одночасно зі знищенням бур'янів формують густоту травостою з розрахунку 5 рослин на 1 пог. м [23, 26, 33].

Заготовлювана сировина для одержання ефірної олії та медичних потреб - надземна маса рослин. Строки збирання - надземну масу скошують у фазі масового цвітіння рослин. Насіння збирають на початку масового досягання, бо запізнення призводить до його осипання. Спосіб збирання - скошування рослин косилками або вручну. Урожайність зеленої маси становить 150-200 ц/га, що забезпечує вихід олії в межах 50-80 кг/га. Середня урожайність насіння - 1,5-2 ц/га [11, 34].

Переробка. Сушіння сировини, якщо потрібно отримати олію, не проводять, а відвозять її на стаціонарні пункти первинної переробки сировини. Для медичних потреб чорнобривці сушать у затінених, добре провітрюваних місцях, регулярно перевертаючи масу. Зберігають сировину в сухих, добре провітрюваних приміщеннях [9, 25, 35].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Стерилізація вихідного матеріалу *Tagetes*

Для поверхневої стерилізації рослинних тканин використовують значну кількість хімічних речовин, як правило тих, що містять активний хлор (гіпохлорид натрію, хлорне вапно, гіпохлорид кальцію, хлорамін), двохлористу ртуть (сулему), пероксид водню. Рідше використовують бром, сірчану кислоту, в особливих випадках антибіотики.

Гіпохлоридом натрію (NaClO) стерилізують насіння та інші рослинні тканини (0,5-5,0% розчином протягом) 1-20 хв. Річні стебла деяких хвойних дерев стерилізують 5% розчином 30-60 с.

Стерилізацію ніжних тканин (листки та стебла сукулентів, поверхневі меристеми) проводять слабким розчином (0,5%) протягом 5 хв. Пиляки після полоскання у 95% етанолі стерилізують в 10% (за об'ємом) розчині NaClO протягом 10-15 хв.

Гіпохлорид кальцію [Ca(ClO)₂] менш токсичний для тканин, ніж NaClO. У концентрації 90 г/л застосовують для стерилізації бульбо- і коренеплодів (протягом 20-25 хв), пагонів деревних (15-30 хв), пагонів та стебел трав'янистих культур - (10-15 хв).

Хлорамін діє на рослинні тканини слабше, ніж NaClO та Ca(ClO)₂.

Всі розчини з активним хлором використовують один раз і готують безпосередньо перед вживанням. Об'єкти після стерилізації промивають 2-3 рази стерильною дистильованою водою.

Двохлориста ртуть (сулема) HgCl₂ надзвичайно токсична, яку використовують в низьких концентраціях та в оптимально вентильованому приміщенні. В основному застосовують 0,1% розчин HgCl₂, а також інші її сполуки, зокрема мертіолят, діацид та фамосепт.

Після стерилізації у розчинах ртуті тканини промивають 4-5 разів дистильованою H_2O у кожній порції впродовж 10-15 хв. Розчин сулеми можна використовувати кілька разів.

Етиловий спирт (C_2H_5OH) застосовують у концентрації 70-95% для стерилізації і покращення дії інших стерилізуючих розчинів. Рослинні об'єкти занурюють на кілька секунд у спирт, обпалюють у полум'ї спиртівки (даний прийом застосовують кілька разів залежно від щільності покривних тканин) і поміщають у стерильну чашку Петрі.

Бром (Br) у вигляді 1% розчину застосовують для стерилізації лише сухого насіння, оскільки бром токсичний і пошкоджує зародки, якщо вони мало захищені (наприклад, у злакових). Після стерилізації бромною водою промивають дистильованою.

Фенолом (C_6H_5OH) стерилізують плоди і кісточки плодкових порід дерев (персика, сливи, вишні) у вигляді 5% розчину протягом 5 хв.

Антибіотики порівняно нетоксичні для рослин, проте їх мало використовують внаслідок обмеженої бактеріологічної активності. Додавання розчинів антибіотиків у живильне середовище ефективно у випадках, коли тканини неможливо простерилізувати звичайними засобами внаслідок інфікування їх внутрішніх областей спорами бактерій або грибів. З цією метою частіше використовують пеніцилін, стрептоміцин, біоміцин, тетрациклін, окситетрациклін, тераміцин, бацитрацин, ауреоміцин та ін. Оскільки антибіотики є термолабільними речовинами, їх стерилізують лише методом фільтрування і додають до охолодженого середовища. При використанні антибіотиків для стерилізації необхідно ретельно підібрати концентрацію, яка б достатньо згубно діяла на мікроорганізми, але не була токсичною для тканин (антибіотики в різних концентраціях можуть стимулювати або пригнічувати ріст ізольованих культур) [20, 36, 37].

Рослинні тканини після стерилізації тричі промивають у стерильній дистильованій воді 10-20 хв у кожній порції і поміщають на живильне

середовище для рослин (насіння) або калюсогенезу (фрагменти стебла, листків, бульб, коренеплодів).

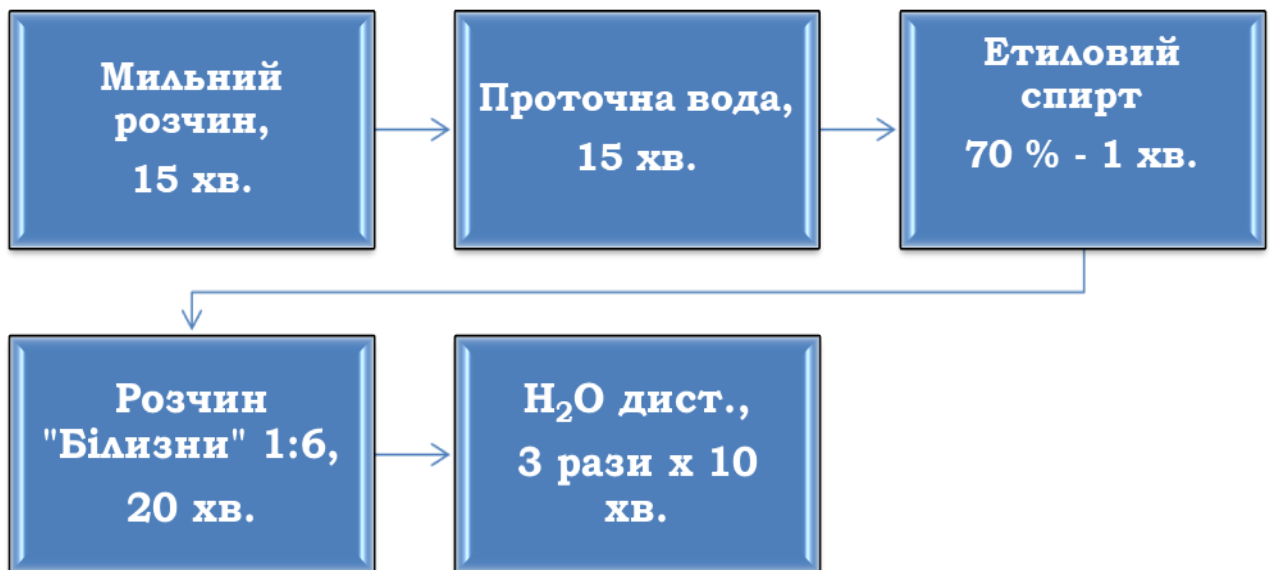


Рис. 2.1. Стерилізації насіння *Tagetes*

У деяких випадках, особливо при роботі з деревними культурами, рекомендують попередню перевірку експлантата на інфікування сапрофітною мікрофлорою. Для цього після стерилізації експлантанти поміщають на безгормональне живильне середовище, яке містить лише мінеральні складові, вітаміни, сахарозу і агар. Через 8-10 діб оцінюють стан тканини, відбирають неінфіковані експлантанти і переносять їх на середовище з регуляторами росту. Цей захід дозволяє культивувати лише стерильний матеріал і економити дефіцитні складові середовища [38, 39].

2.2. Поживне середовище для введення культуру *in vitro* *Tagetes*

Основою створення живильних середовищ для вирощування культур тканин рослин є суміші мінеральних солей (макро- і мікроелементів) і,

оскільки живлення культивованих тканин є гетеротрофним, джерело вуглецю вводять в склад середовища у вигляді сахарози або глюкози [40, 41].

Крім вуглецю, кисню і водню, для росту тканин необхідний азот у вигляді нітратної або амонійної солі, фосфор - фосфату, сірка - сульфату та іони K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Загальна концентрація мінеральних елементів найбільш висока у середовищах Мурасіге і Скуга, Ніча, Гамборга та Шенка.

Мінеральне живлення

Азот. У складі більшості живильних середовищ азот представлений у вигляді нітрату і лише в деяких середовищах (Мурасіге і Скуга, Гамборга), крім нітратів, додають солі амонію. Нітрати, як основне джерело азоту, вводять в середовище в концентрації від 2 до 25 мМ. У деяких випадках для інтенсивного росту калюсних та суспензійних культур сумарну концентрацію нітрату і аміаку збільшують до 60 мМ.

Існує чітка кореляція між збільшенням сирої маси суспензії клітин рослин і використанням нітратів із середовища, що свідчить про значне перетворення нітратів в органічні сполуки. Заміна 10-20% нітратів на солі амонію сприяє оптимальнішому росту тканини [12, 42, 43, 44].

Фосфор. Для росту калюсних тканин та ізолюваних органів необхідним компонентом є фосфор, який використовують у вигляді ортофосфату. Крім цього, джерелом фосфорного живлення можуть бути фосфати цукрів. Іони Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} потрібні для культивування тканин у невеликих кількостях і важливі для регулювання рН середовища.

Сірка. Цей елемент вносять до складу середовища у вигляді сульфату, сульфіту, цистеїну, глутатіону або метіоніну.

Іони заліза вводять у вигляді неорганічних солей ($FeCl_2$, $Fe(SO_4)_3$) і солей органічних кислот (цитрат заліза). Доцільно вводити хелатуючі реагенти, такі як етилендіамінтетраоцтову кислоту, наявність якої в середовищі покращує доступ заліза в широкому діапазоні рН.

Крім основних макроелементів, до складу більшості середовищ входять мікроелементи.

Вуглеводне живлення

У більшості середовищ для культур рослинних тканин джерелом вуглецю і енергії є сахароза або глюкоза в концентрації 20-40 г/л.

Регулятори росту

Для росту і диференціації рослинних клітин необхідні ауксини та цитокініни. Гібереліни використовують надзвичайно рідко (табл. 2.1). Оскільки різні клітини і тканини в культурі значно відрізняються за здатністю до автономного синтезу та метаболізму окремих фітогормонів, їх ріст, значною мірою, залежить від екзогенних регуляторів росту. Відмінності у екзогенних ауксинах та цитокінінах дозволяють виділити декілька груп тканин:

- тканини, які ростуть на середовищі з ауксинами (експлантанти топінамбура, корені цикорію);
- тканини, для росту яких потрібні тільки цитокініни (культура кінчика корінця білого турнепса);
- тканини, для росту яких необхідні ауксини і цитокініни (культивовані первинні експлантанти тютюну, тканини кореня моркви);
- тканини, які ростуть на складних за вмістом компонентів середовищах;
- культури тканин пухлин, що здатні рости на середовищах без регуляторів росту.

Для отримання і підтримання культур тканин використовують ауксини: β -індолілоцтову кислоту (ІОК) (1-30 мг/л), α -нафтилоцтову кислоту (НОК) (0,1-0,2 мг/л) та 2,4-дихлорфеноксоцтову кислоту (2,4-Д) в концентрації меншій, ніж 1 мг/л.

Роль фітогормонів в процесах росту і розвитку рослин

Ауксини	Цитокініни	Гібереліни
Ріст стебла		
Сприяють збільшенню розмірів клітин нижче точки росту та поділу клітин камбію	Стимулюють поділ клітин в апікальній меристемі і камбію. Іноді пригнічують фазу розтягу клітин	Сприяють збільшенню клітин у присутності ауксинів, поділу клітин апікальної меристеми і камбію. У деяких розеткових рослин індукують “вихід в стрілку”
Ріст кореня		
За надзвичайно низьких концентрацій стимулюють. За більш високих концентрацій пригнічують (геотропізм)	Неактивні або сповільнюють ріст первинних коренів	Неактивні
Ініціація росту коренів		
Сприяють формуванню коренів на живцях і калюсах	Неактивні чи сприяють росту бічних коренів	Пригнічують
Ініціація утворення бруньок (пагонів)		
Використовують як антагоністи цитокінінів, однак іноді при знятті апікального домінування стимулюють ріст пагонів	Стимулюють (протонема мохів)	При знятті апікального домінування, стимулюють ріст пагонів

Продовження таблиці 2.1

Ріст листків		
Неактивні	Стимулюють	Стимулюють
Ріст плодів		
Стимулюють, іноді викликають партенокарпію	Стимулюють, іноді викликають партенокарпію	Стимулюють, іноді викликають партенокарпію
Домінування верхівки		
Посилюють і тим самим пригнічують ріст бруньок	Антагоністи ауксинів, стимулюють ріст бічних бруньок	Посилюють дію ауксинів
Стан спокою в бруньках		
Неактивні	Порушують	Порушують
Стан спокою в насінні		
Неактивні	Порушують	Порушують
Цвітіння		
Як правило, неактивні	Як правило, неактивні	У рослин довгого дня стимулюють. У рослин короткого дня сповільнюють
Старіння листків		
У деяких рослин сповільнюють	Сповільнюють	У деяких рослин сповільнюють
Опадання плодів		
Сповільнюють (в окремих випадках стимулюють)	Неактивні	Неактивні
Вплив на продиhi		
Неактивні	Сприяють відкриттю	Неактивні

Для індукції утворення калюсу застосовують більші концентрації ауксинів, а при субкультивуваннях тканина може рости за зменшеного у 10 разів вмісту ауксинів.

Для росту клітин і органів рослин в культурі *in vitro* як цитокініни використовують кінетин (Кін), 6-бензиламінопурин (6-БАП), зеатин тощо.

Таблиця 2.2

**Регулятори росту, які використовують при культивуванні клітин
рослин**

Клас	Назва	Скорочення	Мол. маса	Прийняті концентрації, М	Приготування вихідного розчину	Примітка
Ауксини	2,4-дихлорфеноксипоцтова кислота	2,4-Д	221,0	10^{-7} - 10^{-5}	Ауксини звичайно титрують в розчині за допомогою NaOH	ІОК здатна легко окиснюватись клітинами рослин; її рідко додають в середовище для культивування в якості єдиного ауксину
	Індоліл-3-поцтова кислота	ІОК	175,2	10^{-7} - 10^{-5}		
	β -індолілмасляна кислота	ІМК	203,2	10^{-7} - 10^{-5}		
	α -нафтилопоцтова кислота	НОК	186,2	10^{-7} - 10^{-5}		
Цитокініни	6-бензиламінопурин	БАП	225,2	10^{-7} - 10^{-5}	Цитокініни звичайно розчиняють у розведеному водою етиловому спирті	Зеатин термолабільний, тому його неможна автоклавувати
	N-ізопентеніл-амінопурин	2-іП	203,3	10^{-7} - 10^{-5}		
	6-фурфурол-амінопурин (кінетин)	К	215,2	10^{-7} - 10^{-5}		
Гібереліни	Гіберелова кислота	ГК	346,4	10^{-7} - $5 \cdot 10^{-6}$	Легко розчиняються у воді	Термолабільні; які неможна автоклавувати

Вітаміни

Як відомо, більшість вітамінів, що входять до складу живильних середовищ, є коферментами, які каталізують важливі реакції. Зокрема, тіамін (вітамін В₁) входить до складу піруватдекарбоксілази і відіграє важливу роль у перетворенні вуглеводів, а також в окиснювальному декарбоксілюванні кетокислот. До складу середовищ тіамін вводять в кількості 0,1-10 мг/л. До складу багатьох середовищ входить піридоксин (вітамін В₆), який бере участь у процесах декарбоксілювання та переамінування амінокислот. Нікотинова кислота у вигляді амідів входить до складу окиснювально-відновних ферментів - дегідрогеназ. У живильні середовища нікотинову кислоту вводять в концентрації 0,5-1 мг/л [24, 45, 46].

Агар-агар. Для приготування живильних середовищ як ущільнюючу речовину використовують агар-агар. Це полісахарид, який отримують із морських водоростей і виготовляють у вигляді пластин, зерен або жовтувато-білого порошку. Агар-агар утворює з водою гель, який плавиться за температури +100°C і твердне – +45°C.

pH середовища. В нативних умовах рослинна клітина функціонує у вузьких межах коливань концентрації водневих іонів. Відносна стабільність величини pH всередині клітини та середовищі, яке її оточує, підтримується буферними системами, в яких важливу роль відіграють білкові молекули як амфоліти. Відносно стабільне значення pH у середовищі підтримується за рахунок хелатуючих реагентів або відповідних сполук. Більшість стаціонарних культур ізольованих тканин росте на середовищах з pH 5,6-5,8.

Таким чином, успіх в культивуванні культур клітин, тканин та органів рослин визначається складом живильних середовищ. На даний час розроблено значну кількість варіантів живильних середовищ серед яких найбільше використовують живильні середовища Мурасіге і Скуга - МС, Гамборга та ін. - В₅, Ф. Уайта, Р. Шенка, Хільдебранта - ШХ.

Таблиця 2.3

Основні компоненти найвживаніших живильних середовищ

Компоненти, мг/л	MS	B ₅	WPM	WH	SH
Макроелементи					
NH ₄ NO ₃	1650	–	400	–	–
KNO ₃	1900	2500	–	80	2500
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440	150	96	–	200
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370	250	370	737	400
KH ₂ PO ₄	170	–	170	–	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	–	134	–	–	–
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	–	1150	–	19	–
(CaNO ₃) ₂ x 4H ₂ O	–	–	556	288	–
KCl	–	–	–	65	–
Na ₂ SO ₄	–	–	–	200	–
NH ₄ H ₂ PO ₄	–	–	–	–	300
K ₂ SO ₄	–	–	990	–	–
Мікроелементи					
KJ	0,83	0,75	–	0,75	1
H ₃ BO ₃	6,3	3,0	6,2	1,5	5
MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,3	13,2	22,3	6,65	13,2
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6	2,0	8,6	2,67	1
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	–	0,1
MoO ₃	–	–	–	0,0001	–
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025	0,025	0,25	0,0001	0,2
CoSO ₄ x 6H ₂ O	0,025	0,025	–	–	–
Fe ₂ (SO ₄) ₃	–	–	–	2,5	–
CoCl ₂ x 6H ₂ O	–	–	–	–	0,1
Fe-хелат					
Na ₂ EDTA	37,3	37,3	37,3	–	20
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	–	15

Приготування маточних розчинів та живильних середовищ

Для економного використання часу та зусиль готують концентровані розчини макро-, мікросолей, вітамінів, гормонів (маточні розчини), які зберігають в холодильнику при температурі +4°C не більше місяця. Розчини вітамінів можна заморожувати і зберігати у невеликих кількостях протягом 2 тижнів.

Маточний розчин макросолей за МС, де їх концентрація збільшена у 10 разів.

Солі, г/500 мл маточного розчину:

NH_4NO_3	8,25
KNO_3	9,5
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	2,2
NaH_2PO_4	0,85
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,85

На 1 л середовища відбирають 100 мл маточного розчину.

Маточний розчин Fe-хелату за МС:

солі, г/200мл маточного розчину:

$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,492
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,112

На 1 л середовища відбирають 5 мл маточного розчину.

Вихідний розчин Fe-хелату (200 мл) готують, розчиняють послідовно 1,492 г $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ і 1,112 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, після чого доводять його до кипіння.

Маточний розчин мікросолей за MS, де їх концентрація збільшена у 100 разів.

Солі, мг/100мл маточного розчину:

H ₃ BO ₃	62
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	2,5
KJ	8,3
MnSO ₄ x 4H ₂ O	223
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	86
CuSO ₄ x 5H ₂ O CoCl ₂ x 6H ₂ O	зважити по 10 мг кожної солі і розчинити в 40 мл води

На 1 л середовища відбирають 1 мл маточного розчину.

Маточний розчин вітамінів.

Вітаміни, мг/100 мл маточного розчину:

B ₁ (тіамін HCl)	10
B ₆ (піридоксин HCl)	50
PP(нікотинова кислота)	50

На 1 л середовища відбирають 1 мл маточного розчину. Розчини вітамінів (1,0 і 0,1 мг/мл) готують і безпосередньо розчиняють в бідистильованій воді.

Розчини ауксинів 2,4-Д, НОК, ІОК, ІМК і їх аналогів (наприклад, концентрацію 1мг/мл) готують шляхом розчинення 100мг речовини в 0,5 – 2 мл спирту, підігрівають та додають води до 100 мл. Кін, Зеа, 6-БАП розчиняють попередньо у невеликій кількості 0,5н HCl і при нагріванні додають потрібну кількість води.

Якщо у середовище необхідно внести абсцизову кислоту (АБК), то її розчиняють в 70% етанолі і доводять до потрібного об'єму. Гіберелову кислоту розчиняють безпосередньо у воді і додають у живильні середовища і простерилізують через мембранні фільтри. Кокосове молоко добавляють у живильні середовища і попередньо підігрівають протягом 30 хв. при +60°C й

простерилізують фільтруванням (діаметр мембранного фільтра 0,2 – 0,45 мкм).

Антибіотики, гербіциди та інші речовини, які повністю або частково розкладаються при автоклавуванні, додають до живильних середовищ (40 - +50°C) у вигляді профільтрованого (стерильного) розчину, попередньо довівши рН до 5,6-5,8.

Після приготування маточних розчинів готують живильні середовища, приготування яких потребує особливої ретельності, для запобігання помилок необхідно дотримуватись певної послідовності в роботі.

1. В мірну колбу (циліндр) наливають 250-300 мл дистильованої води і додають точно відмірену кількість кожного розчину макро- й мікроелементів, вітамінів, регуляторів росту.

2. Зважують необхідну кількість вуглеводів, гідролізату казеїну, пептона і т. п.

3. Наважку агару поміщають в термостійку склянку і заливають холодною дистильованою водою для набухання, через 15-20 хв нагрівають й помішують до повного розчинення агару (90-100°C).

4. Зливають обидва розчини, профільтровують через два шари марлі і доводять до необхідного об'єму.

5. рН середовища встановлюють на рН-метрі, доводять його до потрібного значення і додають (краплями) 0,1н КОН, 0,1н NaOH, або 0,1н HCl.

6. Розливають тепле середовище в простерилізовані сухим жаром колби чи пробірки, закривають ватними пробками або фольгою і ретельно обгортають навколо горловини склянки.

7. Стерилізують середовище в автоклаві під тиском 0,08-0,1 МПа (t = 115-120°C) протягом 20-25 хв. Отримані таким шляхом живильні середовища бажано використати протягом 7-12 діб.

8. У робочих зошитах записують склад і приготування живильного середовища, роблять висновок щодо впливу живильного середовища на ростові процеси *in vitro*.

Таблиця 2.4

Маточні розчини для приготування живильних середовищ

Вихідний компонент	Наважка		Необхідний об'єм розчину для приготування 1 л середовища
	за Мурасіге-Скугом	за Уайтом	
Макроелементи, г/л			
NH ₄ NO ₃	16,5	–	100мл
KNO ₃	19,0	0,8	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	–	2,0	
CaCl ₂ б/в	3,3	–	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,7	3,6	
KH ₂ PO ₄	1,7	–	
Na ₂ ЕДТО	0,37	0,37	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,28	0,28	
KCl	–	0,65	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	–	0,165	
Na ₂ SO б/в	–	2,00	
Мікроелементи, мг/100мл			
H ₃ BO ₃	620	150	1 мл
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2230	–	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	–	150	
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	860	–	
KJ	83	–	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25	25	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,5	4	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,5	–	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	–	530	
Вітаміни, мг/л			
Тіамін НСl (В ₁)	10	10	1 мл
Нікотинова к-та (РР)	50	50	
Піридоксин НСl (В ₆)	50	10	

Тому для введення в асептичну культуру *Tagetes* ми використали поживне середовище Мурасіге-Скуга, за прописом (Рис. 2.2).

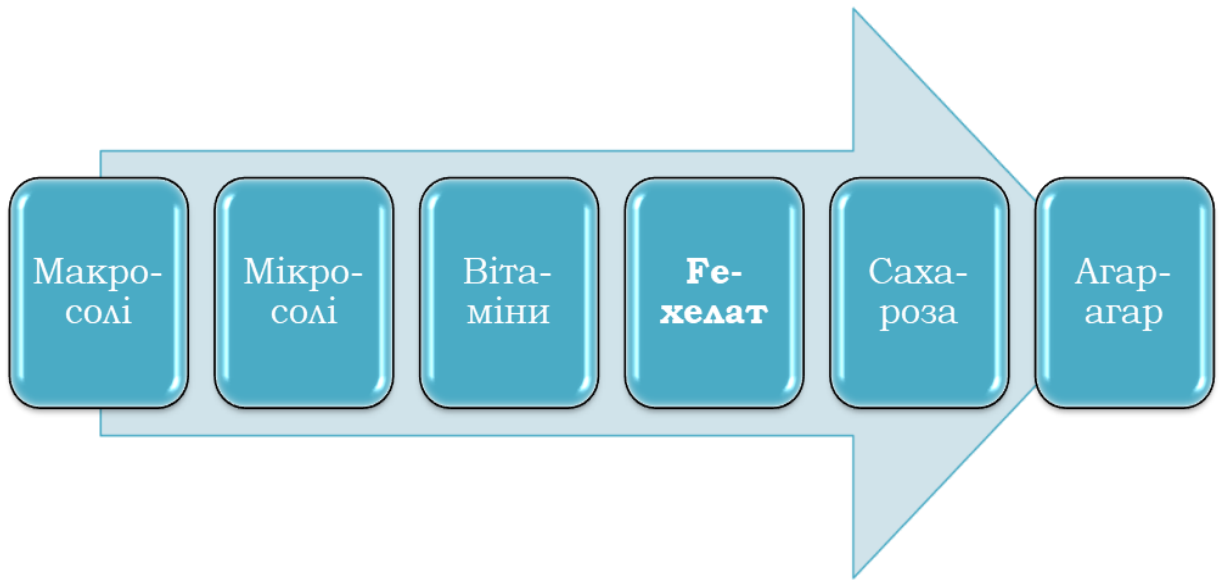


Рис. 2.2. Поживне середовище Мурасіге-Скуга

РОЗДІЛ 3

ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* РОСЛИН *TAGETES* (РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ)

Як свідчать літературні джерела, для отримання асептичного рослинного матеріалу необхідний правильний і обґрунтований підбір схеми стерилізації та живильного середовища. Тому, виходячи з вище сказаного, первинним матеріалом у наших дослідженнях було насіння *Tagetes*.

Дослідження тканинних і клітинних культур *in vitro* здебільшого зацікавлені в аналізі впливу факторів середовища на індукцію та/або регенерацію калюса. Такого роду дослідження необхідні для роботи над генетичними маніпуляціями, визначення відповідної стадії та типу клітин для регенерації модифікованих рослин [48, 49].

Культура рослинної тканини включає набір *in vitro* техніки, методи та стратегії, які входять до складу групи технологій, які називають рослинними біотехнології. Проведено посів тканин використовують для створення генетичної мінливості які культурні рослини можна поліпшити, поліпшити здоров'я посадженого матеріалу та збільшити кількість бажаних зародків плазми, доступної селекціонеру.

Тканина прийому культури в поєднанні з молекулярні методи були успішними використовується для включення специфічних ознак через ген передача. Техніка *in vitro* для культури протопласти, пиляки, мікроспори, яйцеклітини та ембріони були використані для створення нових генетичних варіації в лініях розведення, часто через виробництво гаплоїдів.

Клітинна культура також виробляється сома клональна і гамето клональна варіації з потенціалом покращення врожаю. Культура окремих клітин і меристем може ефективно використовувати для знищення патогенів посадкового матеріалу і тим самим різко покращити врожайність усталених сортів [36, 40].

Рослини використовували як ліки впродовж історії. Лікарські рослини є широко й успішно використовується на кожному континент. В Азії практикують трав медицина надзвичайно добре налагоджена і задокументовано. У результаті більшість лікарських рослини отримали міжнародне визнання цей регіон. Застосування фітотерапії є швидко зростає, особливо для корекції дисбаланси, спричинені сучасними дієтами та способи життя [34, 42, 50]. Будь який насіннєвий матеріал заражений бактеріальним та грибковим матеріалом, тому як діячу речовину для стерилізації насіннєвого матеріалу використали розчин «Білизни» в концентрації 1:4 (20 хв.).

Стерилізацію проводили в наступній послідовності: попередньо насіння упаковали в марлеві мішечки та промивали в мильному розчині та проточній воді; промите насіння занурили на 1 хв. у 70-ти відсотковий етиловий спирт, після чого перенесли в стерилізуючий розчин «Білизни» 1:4 (20 хв.); завершальним етапом стерилізації було триразове промивання насіння в стерильній дистильованій воді.

Стерильне насіння переносили на поверхню стерильного живильного середовища Мурасіге-Скуга, склад якого наведений на схемі 2, розділу 2 (рис. 3.1).



Рис. 3.1. Простерелізоване насіння *Tagetes* на поверхні живильного середовища МС

Слід відмітити, що насіння *Tagetes* не великого розміру, тому в культуральний посуд поміщали на декілька насінин (рис. 3.1).

Як свідчать результати наших досліджень, на 7 добу після введення посадкового матеріалу в умови *in vitro* в деяке насіння виявилось інфіковане патогенною мікрофлорою (рис. 3.2).

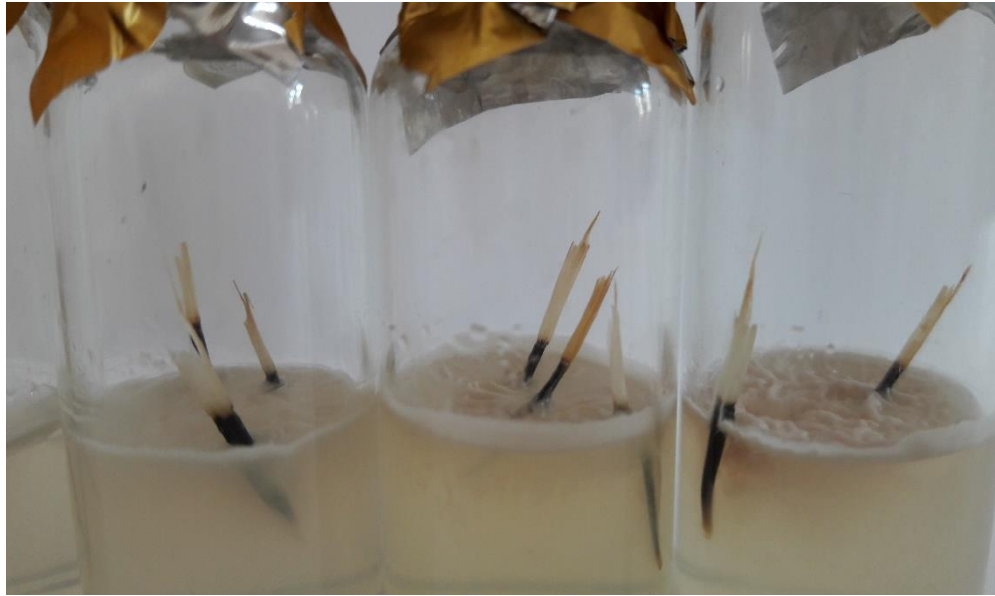
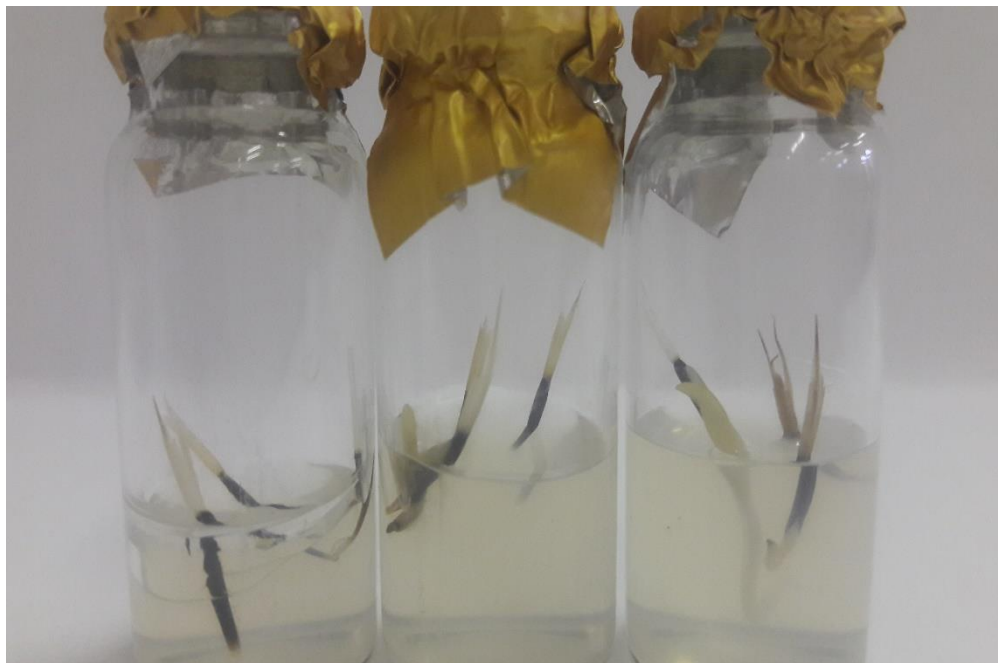
**A****Б**

Рис. 3.2. Ефективність стерилізації *Tagetes* на 7 добу культивування: А - інфіковане насіння; Б - стерильне насіння

Ефективність використаної схеми стерилізації становить - 85%.

Слід зазначити, що на 7 добу культивування насіння проростає. Цікавим є той факт, що більшість насіння проростає надземною частиною, тоді як в даного матеріалу дещо навпаки.

На 14 добу від введення в культуру *in vitro* *Tagetes* ми спостерігали інтенсивний розвиток рослин (в деяких відбувається видовження пагона та з'являються перші листочки) та відбувається ріст головного кореня (рис. 3.3).



Рис. 3.3. Проростки *Tagetes* на 14 добу

Також можна констатувати той факт, що насіння володіє високою схожістю (всі не інфіковані насінини проросли).

Отримавши проростки рослин *Tagetes* подальше культивування ми проводили на середовищі Мурасіге-Скуга. Як видно з рисунку 4 рослини протягом 21–30 доби культивування інтенсивно ростуть і розвиваються. Коренева система набуває стрижневої форми (чітко видно розвиток головного кореня рослини), розмір головного кореня становить до 6 см (рис. 3.4).



Рис. 3.4. Культивування рослин *Tagetes* на середовищі МС, 21-30 доби культивування

Як видно з рисунку 3.4, через 30 діб культивування ми отримали добре зростаючу розвинену рослину, яку можна при необхідності адаптувати або скористатися даною біомасою для отримання калусної маси.

Слід зазначити, що рослини ростуть і розвиваються та безгормональному середовищі Мурасіге-Скуга, тобто не потребують регуляторів росту рослин та склад даного середовища в достатній мірі забезпечує їх необхідними елементами живлення.

ВИСНОВКИ

1. Проаналізувавши літературні джерела, ми вивчили морфологічні та біологічні особливості росту та розвитку *Tagetes* в природних умовах, що дало можливість отримати аспетичні рослини.
2. Підібрано схему стерилізації насіння з виходом стерильних експлантів - 85 %.
3. Встановлено, що ефективним стерилізуючим агентом для насіння *Tagetes* і отримання асептичних проростків є розчин «Білизни» в концентрації 1:4.
4. Встановлено, що для успішного введення та культивування рослин *Tagetes* в умовах *in vitro* необхідне поживне середовище Мурасіге-Скуга.
5. Виявлено, що ріст і розвиток рослин відбувається рівномірно, про що вказує короткий термін культивування рослин *Tagetes* (14-31 доби).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Олейнікова О.М. Чорнобривці. Садові декоративні рослини. Харків: «Веста», 2010. С. 59.
2. Герасименко В.Г., Герасименко М.О., Цвіліховський М.І. Біотехнологія: підруч. К.: Фірма «ІНКОС», 2006. 647 с.
3. Гаркава К.Г. Біотехнологія. Вступ до фаху: навч. посіб. К.: НАУ, 2012. 296 с.
4. Головей О.П. Нові технології виробництва антибіотиків та лікарських препаратів: конспект лекцій. Кам'янське ДДТУ, 2016. 188 с.
5. Нечитайло В.А., Липа О.Л. Систематика вищих рослин. К.: Вища школа, 1993. С. 236-244.
6. Іншина Н.М. Біотехнологія: навч. посіб. Суми: Видавництво СумДПУ ім. А. С. Макаренка, 2009. 172 с.
7. Кузнецова О.В. Методичні вказівки до виконання практичних робіт з курсу Вступ до фаху для студентів спеціальності «Промислова біотехнологія» усіх форм навчання. Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2008. 45 с.
8. Soule J.A. Інфрагенеративна систематика *Tagetes*. Pgs. 435-443 in *Compositae: Systematics, Proceedings of the International Compositae Conference*, Kew 1994.
9. Cicevan R., Al Hassan M., Sestras A.F., Prohens J., Vicente O., Sestras R.E., Boscaiu M. 2016. Скринінг на посухостійкість у сортів декоративного роду *Tagetes* (*Asteraceae*) PeerJ 4: e2133. [doi.org / 10.7717](https://doi.org/10.7717)
10. Гродзинський А.М. Лікарські рослини: енциклопедичний довідник. К.: Вид. «Українська Радянська Енциклопедія» ім. М. П. Бажана, Український виробничо-комерційний центр «Олімп», 1992. 544 с.
11. Григора І.М., Соломаха В.А. Основи фітоценології. Київ: Фітосоціоцентр, 2000. 240 с.

12. Стеблянко М.І., Гончарова К.Д., Закорко Н.Г. Ботаніка: Анатомія і морфологія рослин. Навч. посібник. К: Вища школа, 2009. 384 с.
13. Wang TT, Li HX, Zhang J, Ouyang B, Lu Y, Ye Z (2009). *Sci Horti (Amsterdam)* 121 : 419–424
14. Бичкова О.В., Хлебова Л.П., Бровко Є.С., Борсукова А.І. (2018). Ефективна індукція волосистих коренів у *Tagetes patula* L. Український екологічний журнал, 8(4), 450-453.
15. Чхіквішвілі, І., Санікідзе, Т., Гогія Н. та ін., (2016). Компоненти квітів чорнобривців (*Tagetespatula* L.) захищають Т-клітини юрката від окислювального стресу. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, ID статті 4216285.
16. Діман, Н., Патіал, В., і Бхатгачарія, А. (2018). Сучасний стан та майбутнє застосування культур волосистих коренів. В: Кумар Н. (ред.) Біотехнологічні підходи для лікарських і ароматичних рослин. Спрінгер, Сінгапур.
17. Krzyzaniak, LM, Antonelli-Ushirobira, TM, Panizzon, G., Sereia, AL, de-Souza, JRP, Zequi, JAC, Novello, CR, Lopes, GC, de Medeiros, DC, Silva, DB, Leite-Mello, EVD, & De-Mello, JCP (2017) Ларвоцидна активність проти *Aedes aegypti* та хімічна характеристика суцвіть *Tagetes patula*. Доказова комплементарна та альтернативна медицина, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2017/9602368>
18. Mares, D., Tosi, V., Poli, F., Andreotti, E., & Romagnoli, C. (2004) Протигрибкова активність екстрактів *Tagetes patula* на деякі фітопатогенні гриби: ультраструктурні докази на *Pythium ultimum*. *Microbiol Res*, 159, 295-304.
19. Marotti, M., Piccaglia, R., Biavati, V., & Marotti, I. (2004) Характеристика та оцінка врожаю ефірних олій з різних видів *Tagetes*. *Journal of Essential Oil Research*, 16, 440-444.

20. Мір Р.А. 2019. Чорнобривці: від мандапу до ліків і від прикраси до відновлення. Американський журнал рослинництва, 10, 309-338. <https://doi.org/10.4236/ajps.2019.102024>
21. Mulabagal V., & Tsay H. 2004. Культури рослинних клітин як джерело для виробництва біологічно важливих вторинних метаболітів. *Int J Appl Sci Engin*, 2, 29-48.
22. Патра Н., Сривастава А.К. 2016. Виробництво артемізиніну культурами коренів волосистих рослин у газо- та рідкофазних біореакторах. *Plant Cell Rep*, 35 (1), 143-153. doi: 10.1007/s00299-015-1875-9.
23. Rajasekaran T., Ravishankar G.A, & Obul Reddy B. 2004. In vitro зростання волохатих коренів *Tagetes patula* L., виробництво тіофенів та його ларвіцидна активність проти комарів. Індійський журнал біотехнології, 3, 92-96.
24. Сіддікі М.А., Алам М.М. 1987. Утилізація рослинних відходів чорнобривців для боротьби з рослинними паразитичними нематодами. *Біологічні відходи*, 21, 221-229.
25. Del Villar-Martínez A.A, Vanegas-Espinoza P.E, Paredes-López O. 2009) Календула як важливе джерело каротиноїдів. В: Palazon J, Cusidó RM (eds) *Вторинні терпеноїди рослин*. Research Signpost, Керала, Індія, стор. 131–138.
26. Freire-Seijo M. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecn Veg* 3, 195–209.
27. Michelangeli de Clavijo C.C, Artioli P.I, Medina A.M.M. 2003. Anatomía y ultra estructura de la embriogenesis somática en onoto. *Agron Trop* 52, 523–541.
28. Місра П., Датта С. К. 2001. Пряма диференціація бруньок пагонів у сегментах листя чорнобривців білих (*Tagetes erecta* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 37, 366–470.
29. Soule J. Infrageneric systematics of tagetes. У матеріалах Міжнародної конференції Compositae, Compositae: Systematics, Кью, Великобританія, 24 липня–5 серпня 1994 р. С. 435–443.

30. Салехі Б.; Валуссі М. Morais-Braga MF. *Tagetes* spp. Ефірні олії та інші екстракти: хімічна характеристика та біологічна активність. *Молекули* 2018, 23, 28-47.
31. Пріянка Д., Шаліні Т., Верма Н.К. Коротке дослідження чорнобривців (види *Tagetes*): огляд. *Міжн. рез. J. Pharm.* 2013, 4, 43–48.
32. Васудеван П., Каш'яп С., Sharma S. *Tagetes*: багатоцільова рослина. *Біоресурс. технол.* 1997, 62, 29–35.
33. Сінгх П., Крішна А., Кумар В., Крішна С. Хімія та біологія видів *Tagetes* технічних культур: огляд. *Дж. Ессент. Oil Res.* 2016, 28, 1–14.
34. Сантос П.К, Сантос V.H.M, Мецина Г.Ф. Фітотоксичність *Tagetes erecta* L. і *Tagetes patula* L. на проростання та ріст рослин. *S. Afr. Дж. Бот.* 2015, 100, 114–121.
35. Тапіа-Васкес І., Монтойя-Мартінес А.С. Нематоди кореневих вузлів (*Meloidogyne spp.*) загроза для сільського господарства в Мексиці: біологія, поточні стратегії контролю та перспективи. *Світ Дж. Мікроб. Біотехнологія.* 2022, 38, 26.
36. Серрато-Крус М.А.; Діас-Седілло Ф.; Barajas-Pérez J.S. Composición del aceite esencial en germoplasma de *Tagetes filifolia* Lag. de la región centro-sur de México. *Agrociencia* 2008, 42, 277–285.
37. Січеван Р. Порівняльний аналіз впливу осмотичного та іонного стресу на проростання насіння сортів *Tagetes (Asteraceae)*. *Пропаг. Орнам. Рослини* 2015, 15, 63–72.
38. Січеван Р. Аль Хасан М., Сестрас А.Ф., Прохенс Дж.О. Скринінг стійкості до посухи у сортів декоративного роду *Tagetes (Asteraceae)*. *PeerJ* 2016, 4, e2133.
39. Бурлець А.Ф., Ресіо Ł., Козачок С., Мірча К., Сорсіовă А., Верестюк Л. Фітохімічний профіль, антиоксидантна активність та оцінка цитотоксичності квітів *Tagetes erecta* L.. *Молекули* 2021, 26, 1201.

40. Перес Гутьєррес Р., Ернандес Луна Х., Hernández Garrido S. Антиоксидантна активність ефірної олії *Tagetes erecta*. Дж. Чил. Chem. Соц. 2006, 51, 883–886.
41. Laosinwattana С., Вічиттракарн П., Teerarak М. Хімічний склад і гербіцидна дія ефірної олії з листя *Tagetes erecta* L.. Інд. Культури Виробн. 2018, 126, 129–134.
42. Сінг Ю., Гупта А., Kannoja Р. *Tagetes erecta* (Календула) - Огляд її фітохімічних і лікувальних властивостей. Curr. Мед. Drugs Res. 2020, 4, 1–6.
43. Чжан Х., Сінь Х., Конг Р., Лі З. Аналіз перехресної сумісності для виявлення відповідних батьків *Tagetes erecta* та *T. patula* для розведення гетерозичних гібридів. ні Бот. Хорті Агробот. Клуж-Напока 2019, 47, 676–682.
44. Альварадо-Сансінієня J.J., Санчес-Санчес Л., Лопес-Муньос Х., Ескобар М.L., Флорес-Гусман Ф.М. Кверцетагетин і патулетин: антипроліферативна, некротична та апоптотична активність у клітинних лініях пухлин. Cancer Res. 2018, 23, 2579.
45. Sachin T.M, Homraj S. Огляд корисних аспектів чорнобривців. Фарма Іннов. J. 2021, 10, 422–427.
46. Heuze V., Тран Г., Хассун П., Lebas F. Чорнобривці мексиканські (*Tagetes erecta*); Feedipedia, програма INRAE, CIRAD, AFZ та FAO: Рим, Італія, 2017.
47. Gilman F.E. *Tagetes patula* French Marigold; Environmental Horticulture, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida: Gainesville, FL, USA, 2011; Том FPS-571.
48. Босма Т.Л., Конвей К.Е., Доул Дж.М., Манесс Н.О. Терміни позиву та обґрунтування впливають на появу сходів африканських чорнобривців. HortTechnology 2003, 13, 487–493.
49. Ільбі Х., Пауелл А.А., Алан О. Підрахунок з'являється одного корінця для прогнозування потужності партій окислення чорнобривців (*Tagetes* spp.). Seed Sci. технол. 2020, 48, 381–389.

50. Batish D.R, Arora K., Singh H.P., & Kohli R.K. 2007. Потенційне використання висушеного порошку *Tagetes minuta* як природного гербіциду для боротьби з рисовими бур'янами. *Crop Protect*, 26, 566-571.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

SCIENTIA
COLLECTION OF SCIENTIFIC PAPERS

CERTIFICATE OF PARTICIPATION



IST № 23/1208-153

Certificate provides at least a 0,1 ECTS credits to awarded participants for being involved

Anastasia Hrytsyna

participated in the II International Scientific and Theoretical Conference

Modern tools and methods of scientific investigations

08.12.2023 | Antwerp, Kingdom of Belgium

The conference is included in the Academic Resource Index, ResearchBib catalog and UKRISTEI catalog (Certificate № 301 dated June 16, 2023).



President of the International
Center of Scientific Research
MARIIA HOLDENBLAT



ДОДАТОК Б



PROCEEDINGS OF THE
II INTERNATIONAL SCIENTIFIC
AND THEORETICAL CONFERENCE

MODERN TOOLS AND
METHODS OF SCIENTIFIC
INVESTIGATIONS

08.12.2023

ANTWERP
KINGDOM OF BELGIUM

SCIENTIA
COLLECTION OF SCIENTIFIC PAPERS

Бутенко Євгенія Юрїївна

доктор філософії, старший викладач кафедри біотехнології та хімії
Сумський національний аграрний університет, Україна

Грицина Анастасія Віталіївна

здобувач I рівня вищої освіти (бакалавр),
спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
Сумський національний аграрний університет, Україна

Гришак Карина Олегівна

здобувач I рівня вищої освіти (бакалавр),
спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
Сумський національний аграрний університет, Україна

УМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ РОСЛИН *TAGETES*

Останніми роками інтенсивно вивчають хімічний склад і біологічну активність рослин роду *Tagetes* L. Чорнобривці містять більше ніж 100 біологічно активних вторинних метаболітів: фенольних похідних, фенілпропаноїдів, по-хідних тіофену та бензофурану, тритерпеноїдів, стероїдів, алкалоїдів, флавоноїдів, каротиноїдів тощо [1, 2].

Біологічно активні каротиноїди, флавоноїди, ефірна олія, гідроксикоричні кислоти, вітаміни та полісахариди, що наявні у суцвіттях і траві видів, форм і сортів роду *Tagetes* L., виявляють виражену антиоксидантну, протизапальну, ранозагоювальну, протимікробну, цукрознижувальну, сечогінну дії [2, 3].

Рослини роду чорнобривці відомі застосуванням у медицині та народному господарстві, зокрема як лікарські з високою ранозагоювальною, гепатозахисною, холеретичною та адаптогенною діями; як джерело ефірної олії, що має інсектицидні властивості та використовується у парфумерній та інших галузях промисловості; як джерело каротиноїдів [1, 4, 5].

У науковій медицині застосування рослин пов'язано з наявністю біологічно активних каротиноїдів, флавоноїдів та ефірної олії. Препарати Лютеїн, Лютеїн Форте, Лютеїн Комплекс, Лютеїн для очей і Окювайт лютеїн широко використовують в офтальмології для підвищення гостроти зору, нормалізації функції ока, покращення здатності розрізняти кольори [6].

У традиційній медицині чорнобривці також використовуються для лікування захворювань шлунково-кишкового тракту, шкірних захворювань і порушень роботи печінки, а також деяких інших хвороб [3, 5, 7, 8].

Мета дослідження – встановити особливості введення та початкові етапи розвитку *Tagetes* в умовах асептичної культури.

Як свідчать літературні джерела, для отримання асептичного рослинного матеріалу необхідний правильний і обгрунтований підбір схеми стерилізації та живильного середовища [5, 7, 8]. Тому, виходячи з вище сказаного, первинним матеріалом у наших дослідженнях було насіння *Tagetes*.

Для поверхневої стерилізації рослинних тканин використовують значну кількість хімічних речовин, як правило тих, що містять активний хлор (гіпохлорид натрію, хлорне вапно, гіпохлорид кальцію, хлорамін), двохлористу ртуть (сулему), пероксид водню. Рідше використовують бром, сірчану кислоту, в особливих випадках антибіотики.

Будь який насінневий матеріал заражений бактеріальним та грибковим матеріалом, тому як діячу речовину для стерилізації насінневого матеріалу використали розчин «Білизни» в концентрації 1:4 (20 хв.).

Стерилізацію проводили в наступній послідовності: попередньо насіння упаковували в марлеві мішечки та промивали в мильному розчині та проточній воді; промите насіння занурили на 1 хв. у 70-ти відсотковий етиловий спирт, після чого перенесли в стерилізуючий розчин «Білизни» 1:4 (20 хв.); завершальним етапом стерилізації було триразове промивання насіння в стерильній дистильованій воді. Стерильне насіння переносили на поверхню стерильного живильного середовища Мурасіге-Скуга. Слід відмітити, що насіння *Tagetes* не великого розміру, тому в культуральний посуд поміщали на декілька насінин.

Як свідчать результати наших досліджень, на 7 добу після введення посадкового матеріалу в умови *in vitro* в деяке насіння виявилось інфіковане патогенною мікрофлорою. Ефективність використаної схеми стерилізації становить - 85%.

Слід зазначити, що на 7 добу культивування насіння проростає. Цікавим є той факт, що більшість насіння проростає надземною частиною, тоді як в даного матеріалу дещо навпаки.

На 14 добу від введення в культуру *in vitro* *Tagetes* ми спостерігали інтенсивний розвиток рослин (в деяких відбувається видовження пагона та з'являються перші листочки) та відбувається ріст головного кореня. Також можна констатувати той факт, що насіння володіє високою схожістю (всі не інфіковані насінини проросли).

Отримавши проростки рослин *Tagetes* подальше культивування ми проводили на середовищі Мурасіге-Скуга. Як видно з рисунку 4 рослини протягом 21–30 доби культивування інтенсивно ростуть і розвиваються. Коренева система набуває стрижневої форми (чітко видно розвиток головного кореня рослини), розмір головного кореня становить до 6 см.

Через 30 діб культивування ми отримали добре зростаючу розвинену рослину, яку можна при необхідності адаптувати або скористатися даною біомасою для отримання калусної маси.

Слід зазначити, що рослини ростуть і розвиваються та безгормональному середовищі Мурасіге-Скуга, тобто не потребують регуляторів росту рослин та склад даного середовища в достатній мірі забезпечує їх необхідними елементами живлення.

Таким чином, провівши аналіз літературних джерел, ми вивчили морфологічні та біологічні особливості росту та розвитку *Tagetes* в природних умовах, що дало можливість отримати аспетичні рослини.

Підібрано схему стерилізації насіння з виходом стерильних експлантів - 85 %. Встановлено, що ефективним стерилізуючим агентом для насіння *Tagetes* і отримання аспетичних проростків є розчин «Білизни» в концентрації 1:4.

Визначили, що для успішного введення та культивування рослин *Tagetes* в умовах *in vitro* необхідне поживне середовище Мурасіге-Скуга.

Виявлено, що ріст і розвиток рослин відбувається рівномірно, про що вказує короткий термін культивування рослин *Tagetes* (14-31 доби).

Список використаних джерел:

1. Олейнікова О.М. (2010). Чорнобривці. Садові декоративні рослини. Харків, *Весна*, 59.
2. Герасименко В.Г., Герасименко М.О., Цвіліховський М.І. (2006). Біотехнологія. *ІНКОС*», 647.
3. Гаркава К.Г. (2012). Біотехнологія. Вступ до фаху: навч. посіб. Київ, *НАУ*, 296.
4. Головей О.П. (2016). Нові технології виробництва антибіотиків та лікарських препаратів: конспект лекцій. *Кам'янське ДДТУ*, 188.
5. Нечитайло В.А., Липа О.Л. (1993). Систематика вищих рослин. Київ, *Вища школа*, 236-244.
6. Іншина Н.М. (2009). Біотехнологія: навч. посіб. Суми. *СумДПУ ім. А.С.Макаренка*, 172.
7. Cicevan R., Al Hassan M., Sestras A.F., Prohens J., Vicente O., Sestras R.E., Boscaiu M. (2016). Скринінг на посухостійкість у сортів декоративного роду *Tagetes* (*Asteraceae*) *PeerJ* 4: e2133. doi.org / 10.7717
8. Юлевич О.І. (2012). Біотехнологія: навчальний посібник. Миколаїв, *МДАУ*, 476.