

Анотація

Фокіна А. В. Біотехнологія мікроклонального розмноження *Origanum vulgare* L. та *Paulownia elongata* S.Y.Hu × *P.fortunei* (Seem.) Hemsl. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» (16 – Хімічна та біоінженерія). – Державний вищий навчальний заклад «Український державний хіміко-технологічний університет», Дніпро, 2020.

В дисертаційному дослідженні представлено результати розробки біотехнологій мікроклонального розмноження в культурі *in vitro* двох культур – материнки звичайної (*Origanum vulgare* L.) та міжвидового гібрида павловнії (*Paulownia elongata* S.Y.Hu × *P.fortunei* (Seem.) Hemsl.). Для даних технологій розроблено і представлено апаратурно-технологічну схему отримання садивного матеріалу цих культур.

Материнка звичайна (*Origanum vulgare* L., *Lamiaceae*) є цінною ефіроолійною культурою, яка використовується у фармацевтичній та харчовій галузях виробництва як джерело натуральних корисних речовин. В Україні материнка звичайна є малопоширеною культурою. Для розвитку селекції материнки звичайної із високим вмістом ефірної олії певної якості та швидкого розмноження високопродуктивних зразків актуальною є розробка всіх етапів технології мікроклонального розмноження *in vitro*. Павловнія (*Paulownia sp.*, *Paulowniaceae*) – цінна біоенергетична та декоративна деревна культура. Павловнія є новою для України культурою і для широкого розповсюдження потребує значну кількість високоякісного садивного матеріалу. У зв'язку з цим актуальною є розробка комплексної біотехнології мікроклонального розмноження та отримання садивного матеріалу павловнії в умовах України.

Мікроклональне розмноження – це один із способів розмноження рослин в асептичній культурі *in vitro*, який відрізняється високим коефіцієнтом розмноження пропагування та гарантованою генетичною ідентичністю між вихідною материнською рослиною і отриманими рослинами-копіями.

Мікроклональне розмноження дозволяє за короткий період отримати десятки, сотні, тисячі ідентичних рослин-клонів і використовувати їх як садивний матеріал для значних площ. Як показує світовий досвід, для забезпечення ефективності та конкурентоспроможності фітобіотехнологічного виробництва, які спеціалізуються на мікроклональному розмноженні садивного матеріалу *in vitro*, повинні мати повний цикл створення, культивування і вирощування садивного матеріалу, тобто, проводити роботи як на технологічній стадії мікроклонального розмноження рослин в ізольованій асептичній культурі *in vitro*, так і на технологічній стадії мікроклонального розмноження рослин в ґрунті в умовах *ex vitro*.

Об'єктом дослідження була оптимізація процесу мікроклонального розмноження шляхом активації пазушних бруньок і стерильного живцювання у рослин. Предметом дослідження – розробка комплексних біотехнологій мікроклонального розмноження нових і малопоширених культур на прикладі материнки звичайної *O. vulgare* та гібриду павловнії *P. elongata* × *P. fortunei*.

Оптимізацію прийомів і методів мікроклонального розмноження материнки звичайної проводили на прикладі одинадцяти генотипів, перспективних у селекційному відношенні, та одного міжвидового гібрида павловнії.

Проведена оптимізація дозволила збільшити максимальний коефіцієнт розмноження на етапі введення в культуру *in vitro* у материнки звичайної від $5,4 \pm 0,02$ живця/експлант до $7,9 \pm 0,04$ живця/експлант, а у павловнії від $2,2 \pm 0,2$ живця/експлант до $3,7 \pm 0,4$ живця/експлант. У *O. vulgare* в I циклі стерильного живцювання коефіцієнт розмноження збільшився до $11,5 \pm 0,9$ живця/експлант, у III циклі – до $12,9 \pm 0,6$ живця/експлант, а у VII циклі зберігся на рівні $12,7 \pm 0,5$ живця/експлант. У *P. elongata* × *P. fortunei* після оптимізації коефіцієнт розмноження в II циклі стерильного живцювання виріс до $6,9 \pm 0,4$ живця/експлант і до VI циклу лишився на рівні $6,8 \pm 0,2$ живця/експлант.

У материнки звичайної за рахунок оптимізації значення показників досягли: за частотою коренеутворення на етапі ризогенезу *in vitro* – 100%, за виживаністю після перенесення з умов *in vitro* в умови *ex vitro* в ґрунт планшетів

– $66,1 \pm 1,3\%$, з планшетів в горщики – 95% , з горщиків в польові умови на постійне місце вирощування – 90% . У павловнії після оптимізації частота коренеутворення на етапі ризогенезу *in vitro* склала 100% ; виживаність після перенесення з умов *in vitro* в умови *ex vitro* в ґрунт планшетів досягла $92,9 \pm 4,2\%$, з планшетів в горщики – $94,3 \pm 5,6\%$, після перезимівлі в горщиках – 100% , після перенесення з горщиків в польові умови на постійне місце вирощування – 94% .

Розроблено оптимізовані біотехнології мікроклонального розмноження в культурі *in vitro* материнки звичайної та міжвидового гібрида павловнії, представлено блок-схеми та апаратурно-технологічні схеми отримання садивного цих культур.

В ході проведення дослідження поглиблено уявлення про ключові фактори, які визначають ефективність мікроклонального розмноження рослин. Вперше показано роль генотипового фактора та ефекту взаємодії «генотип×середовище» у реалізації здатності материнки звичайної до мікроклонального розмноження.

Вперше досліджено здатність до мікроклонального розмноження шляхом активації пазушних бруньок та стерильного живцювання одинадцяти генотипів материнки звичайної, які використовуються як вихідний селекційний матеріал для створення вітчизняних сортів цієї культури. Вперше досліджено потенціал до мікроклонального розмноження різних генотипів материнки із використанням експлантів різних типів – міжвузлів різної локалізації, пазушних і верхівкових бруньок.

Вперше встановлено характер залежності росту і розвитку живців міжвидового гібрида павловнії в умовах *in vitro* від концентрації 6-бензиламінопурину на ауксиновому і безауксиновому фоні. Вперше вивчено вплив біочару та активованого вугілля на стан живців та ризогенез павловнії.

Оптимізовано склад живильних середовищ для індукції пагоноутворення, стерильного живцювання та ризогенезу *in vitro* материнки звичайної і міжвидового гібрида павловнії за мінеральним, вітамінним, вуглеводним складом та складом фітогормонів.

Вперше складено комплексні біотехнології мікроклонального розмноження *in vitro* материнки звичайної і міжвидового гібрида павловнії та розроблено апаратурно-технологічні схеми для отримання садивного матеріалу цих культур у виробництві.

Розроблено та рекомендовано до використання в технологіях мікроклонального розмноження материнки звичайної (*Origanum vulgare* L.) та міжвидового гібрида павловнії (*Paulownia elongata* S.Y.Hu × *P.fortunei* (Seem.) Hemsl.) умови стерилізації донорного матеріалу, склад живильних середовищ для індукції пагоноутворення під час введення в культуру *in vitro*, стерильного живцювання на ранніх і пізніх циклах, ризогенезу *in vitro*, а також умови адаптації та вирощування рослин-регенерантів в ґрунті та отримання садивного матеріалу. Складено блок-схеми технології мікроклонального розмноження материнки звичайної та міжвидового гібрида павловнії, а також апаратурно-технологічні схеми для забезпечення технологічного процесу виробництва мікроклонованого садивного матеріалу.

Отриманий в процесі виконання дисертаційного дослідження мікроклонований садивний матеріал передано для апробації і впровадження на Дослідну станцію лікарських рослин Інституту агроекології та природокористування НААН (генотипи материнки звичайної) та до ТОВ «Комплексний Агросервіс» (міжвидовий гібрид павловнії).

Матеріали дисертаційної роботи використовуються в навчальному процесі під час викладання змістовного модуля «Біотехнологія рослин» дисципліни «Біотехнологія рослин та тварин» для студентів спеціальності 162 – біотехнології та біоінженерія в ДВНЗ УДХТУ.

Ключові слова: мікроклональне розмноження, *in vitro*, регулятори росту, адаптація, ризогенез, стерилізація, експлант

Summary

Fokina A. V. Biotechnology of microclonal propagation of *Origanum vulgare* L. and *Paulownia elongata* S.Y.Hu × *P.fortunei* (Seem.) Hemsl. – Qualifying scientific work, the manuscript.

Thesis for a PhD degree in specialty 162 "Biotechnologies and bioengineering" (16 Chemical and bioengineering). – State Higher Education Institution "Ukrainian State University of Chemical Technology", Dnipro, 2020.

In the dissertation research the results of the development of biotechnologies of microclonal reproduction in *in vitro* culture of two plants – oregano (*Origanum vulgare* L.) and interspecific hybrid of Paulownia (*Paulownia elongata* S.Y.Hu × *P.fortunei* (Seem.) Hemsl.) are presented. For these technologies the scheme of equipment and technology for planting material production of these cultures is developed and presented.

Oregano (*Origanum vulgare* L., *Lamiaceae*) is a valuable essential oil crop used in the pharmaceutical and food industries as a source of natural nutrients. In Ukraine, oregano is a rare culture. For the development of oregano selection for high content of essential oil of high quality and rapid reproduction of high-yielding samples, it is important to develop all stages of microclonal propagation *in vitro*. Paulownia sp., *Paulowniaceae* is a valuable bioenergetic and ornamental tree crop. Paulownia is a new culture for Ukraine and requires a significant amount of high-quality planting material for widespread distribution. In this regard, it is important to develop a comprehensive biotechnology of microclonal propagation and production of planting material of paulownia in Ukraine.

Microclonal propagation is one of the methods of plant propagation in aseptic culture *in vitro*, which is characterized by a high rate of propagation and guaranteed genetic identity between the original mother plant and the resulting clone plants. Microclonal propagation allows for a short period of time to get tens, hundreds, thousands of identical clone plants and use them as planting material for large areas. As world experience shows, to ensure the efficiency and competitiveness phytobiotechnological production on microclonal propagation of planting material in

in vitro must have a full cycle of creation and cultivation of planting material, and to provide as a technological stage of plant microclonal propagation in isolated aseptic culture *in vitro*, so as in the soil under *ex vitro* conditions.

The object of research is the optimization of the process of microclonal reproduction by activating axillary buds and sterile cutting in plants. The subject of research is the development of complex biotechnologies of microclonal propagation of new and rare cultures of oregano *O. vulgare* and hybrid paulownia *P. elongata* × *P. fortunei*.

Optimization of techniques and methods of microclonal propagation of oregano were performed on the example of eleven, perspective for selection genotypes and one interspecific hybrid of paulownia.

The optimization allowed to increase the reproduction rate at the stage of introduction in *in vitro* culture for oregano from 5.4 ± 0.02 cuttings/explant to 7.9 ± 0.04 cuttings/explant, and in paulownia from $2.2 \pm 0, 2$ cuttings/explant to 3.7 ± 0.4 cuttings/explant. In *O. vulgare* in the first cycle of sterile cutting the reproduction rate increased to 11.5 ± 0.9 cuttings/explant, in the third cycle – to 12.9 ± 0.6 cuttings/explant, and in the seventh cycle remained at 12.7 ± 0.5 cuttings/explant. In *P. elongata* × *P. fortunei* in the second cycle of sterile cutting the reproduction coefficient increased to 6.9 ± 0.4 cuttings/explant and by the VI cycle remained at the level of 6.8 ± 0.2 cuttings/explant.

The maximum values achieved by optimization of oregano are for the frequency of rooting at the stage of rhizogenesis *in vitro* – 100%, survival after the transfer from *in vitro* to *ex vitro* conditions in the soil of the tablets – $66.1 \pm 1.3\%$, from tablets to pots – 95%, from pots into the field to a resident place of cultivation – 90%. The maximum values achieved by optimization of paulownia at the stage of rhizogenesis *in vitro* for the frequency of rooting are – 100%; survival after the transfer from *in vitro* to *ex vitro* conditions in the soil of the tablets is $92.9 \pm 4.2\%$, from tablets to pots – $94.3 \pm 5.6\%$, after overwintering in pots – 100%, after the transfer from pots in the field to a resident place of cultivation – 94%.

Optimized biotechnologies of microclonal propagation in *in vitro* culture of oregano and interspecific hybrid of paulownia have been developed; block diagrams and equipment and technological schemes for production of planting material of these crops have been presented.

The conception of the key factors that determine the effectiveness of microclonal plant propagation are deepened. For the first time, the role of genotypic factor and the effect of "genotype × environment" interaction in the realization of the ability of oregano to microclonal reproduction were shown.

First time the ability to microclonal propagation via activating axillary buds and sterile cutting of eleven oregano genotypes, which are used as a source of breeding material to create national varieties of this culture, was studied. The potential for microclonal reproduction of different genotypes of oregano using explants of different types – internodes of different localization, axillary and apical buds was studied for the first time.

For the first time the dependence of growth and development of cuttings of interspecific hybrid of paulownia *in vitro* on concentration of 6-benzylaminopurine on auxin and without auxin background is characterized. The influence of biochar and activated carbon on the condition of cuttings and rhizogenesis of paulownia was studied for the first time.

The composition of nutrient media for induction of shoot formation, sterile cutting and oregano rhizogenesis *in vitro* and interspecific hybrid of paulownia in mineral, vitamin, carbohydrate and phytohormone composition was optimized.

For the first time, complex biotechnologies of *in vitro* microclonal *in vitro* propagation of oregano and interspecific paulownia hybrid have been compiled, and equipment and technological schemes for production of planting material of these crops have been developed.

Sterilization conditions of donor material, composition of nutrient media for induction of shoot formation introduction in *in vitro* culture, sterile cutting in early and late cycles, *in vitro* rhizogenesis, as well as conditions for adaptation and cultivation of regenerating plants in the soil and obtaining planting material are developed and

recommended in microclonal propagation technologies of oregano (*Origanum vulgare* L.) and interspecific paulownia hybrid (*Paulownia elongata* S. Y. Hu × *P.fortunei* (Seem.) Hemsl.). Block diagrams of the technology of microclonal propagation of oregano and interspecific paulownia hybrid as well as equipment and technological schemes to ensure the process of production of microcloned planting material are composed.

The microcloned planting material obtained in dissertation research was transferred for approbation and implementation to the Experimental Station of Medicinal Plants of the Institute of Agroecology and Nature Management (oregano genotypes) and to Complex Agroservice LLC (interspecific paulownia hybrid).

The materials of the dissertation are used in the educational process during the module "Plant Biotechnology" of the discipline "Plant and Animal Biotechnology" for students of speciality 162 - biotechnologies and bioengineering at State Higher Education Institution "Ukrainian State University of Chemical Technology".

Key words: micropropagation, *in vitro*, growth regulators, adaptation, rhizogenesis, sterilization, explant.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

1. Фокіна А. В., Сатарова Т. М., Сметанін В. Т., Куценко Н. І. Оптимізація мікроклонального розмноження *in vitro* материнки звичайної (*Origanum vulgare*). *Biosyst. Divers.* 2018. Т. 26, № 2. С. 98-102. Doi: 10.15421/011815. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження з виявлення впливу фітогормонів на мікроклональне розмноження *O.vulgare*, вивчено літературні джерела щодо розмноження материнки в умовах *in vitro*)
2. Фокіна А. В., Сатарова Т. М., Деркач К. В. Вплив мінерального та вуглеводного складу живильного середовища на ефективність мікроклонального розмноження *Origanum vulgare* L. *in vitro*. *Innov. Biosyst. Bioeng.* 2019. Т. 3, № 3. С. 176-184. Doi: 10.20535/ibb.2019.3.3.174795. (Здобувачем проведено дослідження впливу мінерального та вуглеводного складу живильного середовища на різні генотипи материнки звичайної в умовах *in vitro*, оцінено отримані результати)
3. Фокіна А. В., Денисюк К. В., Сатарова Т. М. Ризогенез живців *Origanum vulgare* L. при мікроклональному розмноженні *in vitro*. *Innov. Biosyst. Bioeng.* 2020. Т. 4, № 1. С. 51-63. Doi: 10.20535/ibb.2020.4.1.192191. (Здобувачем досліджено вплив фітогормонів на ризогенез різних генотипів *O.vulgare*, вивчено літературні джерела, проведена оцінка отриманих результатів)
4. Fokina A., Satarova T., Denysiuk K., Kharytonov M., Babenko M., Rula I. Biotechnological approaches to *Paulownia in vitro* propagation and *in vivo* adaptation. *Biotechnology: Scientific Bulletin "Biotechnology"* (Bucharest, Romania). 2020. Series F, Vol. XXIV, 10p. (accepted for publication) (Здобувачем проведено експериментальні дослідження та розроблено основи процесу мікроклонального розмноження Павловнії в умовах *in vitro*)
5. Фокіна А. В., Шкопинський Є. О., Таланкова-Середа Т. Є. Мікроклональне розмноження *Origanum vulgare*. *Ботанічні сади та дендропарки – центри формування екологічної культури у сучасному інноваційно-освітньому просторі*: матеріали сесії ради ботанічних садів України міжнародної наукової конференції, присвяченої 60-річчю позашкільного навчального закладу “Дитячий парк «Запорізький міський ботанічний сад»” Запорізької міської ради Запорізької

області (Запоріжжя, 29 трав.-1 черв., 2018 р.). Запоріжжя: [ЗНУ], 2018. С. 138-40. (Здобувачем проведено дослідження та сформовані основи мікроклонального розмноження *O.vulgare*)

6. Фокіна А. В. Вплив складу живильного середовища та типу експланту на стадію розмноження *Origanum vulgare* L. *in vitro*. Перспективні напрямки наукових досліджень лікарських та ефіроолійних культур: матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених (Березоточа, 25 бер. 2020 р.). Лубни: Комунальне видавництво «Лубни», 2020. С. 183-7. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження з метою уточнення впливу живильного складу та типу експланту на стадію розмноження *O.vulgare* в умовах *in vitro*)

7. Фокіна А. В. Ризогенез *Origanum vulgare* L. в умовах *in vitro*. Хімія та сучасні технології: тези доповідей IX Міжнародної науково-технічної конференції (Дніпро, 24-26 трав., 2019 р.), Т. 2. Дніпро. С. 128-9. (Здобувачем проведено дослідження з метою уточнення впливу фітогормонів на ризогенез *O.vulgare* в умовах *in vitro*)

8. Фокіна А. В. Оптимізація на етапі введення павловнії в культуру *in vitro*. Біотехнологія XXI століття: матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченої 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна (для студентів, аспірантів і молодих вчених) (Київ, 20 трав., 2020 р.). Київ: Політехніка, 2020. С. 88. (Здобувачем проведено дослідження з оптимізації умов стерилізації та живильного середовища на етапі введення в культуру *in vitro* Павловнії)

9. Fokina A., Satarova T., Denysiuk K., Kharytonov M., Babenko M., Rula I. Biotechnological approaches to *Paulownia in vitro* propagation and *in vivo* adaptation. Agriculture for Life – Life for Agriculture. Bucharest, 4-6 June, 2020. (Здобувачем проведено дослідження для розробки процесу мікроклонального розмноження та подальшої адаптації Павловнії)

10. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Біотехнології рослин та тварин» за освітнім рівнем «магістр» для студентів

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» (Укл.: О. В. Кузнецова, К. М. Власенко, А. В. Фокіна. – Дніпро: ДВНЗ УДХТУ, 2020. – 66 с.) *(Здобувачем представлені дані для оформлення розділу з мікроклонального розмноження рослин)*