

**СТЕРИЛЬНА КУЛЬТУРА РИЖІЮ СІЙНОГО (CAMELINA SATIVA (L.) CRANTZ) СОРТУ «КЛОНДАЙК»: ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ТА МУЛЬТИПЛІКАЦІЇ IN VITRO**

<sup>1</sup>Іванніков Р., д.б.н., провідний науковий співробітник,

ORCID [0000-0001-5917-2980](https://orcid.org/0000-0001-5917-2980),

E-mail: [namor.iv22@gmail.com](mailto:namor.iv22@gmail.com)

<sup>2</sup>Аніщенко В., к.х.н., науковий співробітник,

ORCID [0000-0001-5076-3549](https://orcid.org/0000-0001-5076-3549)

<sup>2</sup>Лагута І., к.х.н., завідувач лабораторії,

ORCID [0000-0001-5654-7185](https://orcid.org/0000-0001-5654-7185)

E-mail: [icvmtt34@gmail.com](mailto:icvmtt34@gmail.com)

<sup>3</sup>Кузема П., к.х.н., ст. н. співробітник,

ORCID [0000-0003-4028-4784](https://orcid.org/0000-0003-4028-4784),

E-mail: [coralchance@gmail.com](mailto:coralchance@gmail.com)

<sup>3</sup>Смирнова Н., к.х.н., завідувач лабораторії,

ORCID [0000-0002-6782-7761](https://orcid.org/0000-0002-6782-7761),

E-mail: [smirnatali@gmail.com](mailto:smirnatali@gmail.com)

<sup>3</sup>Ставинская О., к.х.н., ст. н. співробітник,

ORCID [0000-0001-9715-5292](https://orcid.org/0000-0001-9715-5292),

E-mail: [okstavinskaya@yahoo.com](mailto:okstavinskaya@yahoo.com)

<sup>3</sup>Ліннік О., д.х.н., ст. н. співробітник,

ORCID [0000-0003-0499-8157](https://orcid.org/0000-0003-0499-8157),

E-mail: [oksana.linnik@isc.gov.ua](mailto:oksana.linnik@isc.gov.ua)

<sup>4</sup>Крамар А., магістр I р. н., хімічного факультету,

ORCID [0000-0001-5076-3549](https://orcid.org/0000-0001-5076-3549),

E-mail: [nkramar45@gmail.com](mailto:nkramar45@gmail.com)

<sup>1</sup>Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України

<sup>2</sup>Інститут фізико-органічної хімії та вуглехімії ім. Л.М.

Литвиненка НАН України

<sup>3</sup>Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України

<sup>4</sup>Київський національний університет ім. Т. Шевченка

**Анотація.** Переважна частина енергетичних потреб людства задовольняється викопним паливом. У найближчій перспективі, використання невідновлюваних видів ресурсів не зможе сприяти стійкому розвитку світової економіки через виснаження їхніх запасів, зростанню цін на нафту та значну шкоду довкіллю. Зазначені екологічні та економічні ризики є підґрунтям для розвитку відновлюваної біоенергетики. Олійні

культури розглядають як перспективне джерело для виробництва біопалива. Одним із напрямків робіт у колі окресленої проблематики є відбір, селекція та розробка біотехнологій перспективних олійних культур, зокрема, і рижію сійного *Camelina sativa* (L.) Crantz.

У тексті статті висвітлено методичні питання щодо отримання стерильної культури сорту рижію сійного української селекції «Клондайк» та розробці процедур її подальшої мультиплікації *in vitro*. При опрацюванні завдань дослідження використовували класичні морфологічні та біотехнологічні методи отримання та ведення стерильних рослинних культур.

Асептичну культуру рижію отримано із зиготичних зародків насіння. Ми оптимізували процедуру стерилізації рослинного матеріалу та вперше показали позитивний вплив на хід знезараження стериліантів типу Thimerosal (0,01 %, Мерск, експозиція 15-20 хв) та біглюконат хлоргексидину (0,05 %, експозиція 30-35 хв).

Встановлено, що для дослідного сорту рижію на початкових етапах введення та надалі у разі клонального мікророзмноження, оптимальним прописом базового середовища є Мурасіге-Скуга (МС). Найкращі показники приросту біомаси нами були зафіксовані на середовищі МС із вмістом цукрози в межах 20 г/л.

Отже, нами була опрацьована процедура знезараження та отримана стерильна культура рижію, підібрані середовища для введення та подальшої мультиплікації для нарощування рослинної біомаси *in vitro*.

Результати отримані в ході робіт є складовою комплексного дослідження й будуть використані при розробці еколого-інноваційних підходів ефективного використання відновлюваних рослинних ресурсів шляхом фотокаталітичної конверсії біомаси.

**Ключові слова:** рижій сійний, *Camelina sativa* (L.) Crantz, *in vitro*

---

**Вступ.** Одним із перспективних напрямів досліджень у межах нової ініціативи Європейського Союзу «Європейський зелений курс», що сприяють збереженню стану довкілля та підвищенню біобезпеки людини, є пошук відновлюваної рослинної сировини, яку можна використовувати для одержання біоактивних речовин і для виробництва біологічного пального, зокрема, біодизелю. Особливу цінність мають рослини та біовідходи (біомаса), які містять поліфенольні сполуки, що володіють антиоксидантними відновлювальними властивостями, і можуть застосовуватися, наприклад, в енергетиці (як стабілізатори біодизелю для запо-

бігання його деградації за зберігання), у медицині (як фармакологічні агенти з антиоксидантними та антимікробними властивостями), у «зеленому» синтезі наночастинок металів (як відновники), у харчовій промисловості (як добавки до полімерів для одержання активних полімерних пакувальних плівок). Біологічно активні речовини можуть бути вилучені внаслідок екстракції, піролізу, а також за допомогою фотокаталітичних процесів. Фотокаталітична конверсія біомаси є перспективним напрямом «зелених технологій», одним з інноваційних методів переробки відходів завдяки перебігу каталітичних перетворень за нормального

тиску й температури із застосуванням УФ та / або видимого світла, джерелом якого є сонячне випромінювання (Granone et al., 2018; [Xiaoqing](#) et al., 2019). У результаті фотокаталітичної конверсії речовин можуть бути отримані біометанол, біоводень, антиоксиданти й цінні хімічні сполуки. Титанати заліза, які є складовими природних мінералів і не загрожують довікілью, видаються найбільш придатними каталізаторами для фотокаталітичної конверсії біомаси та її похідних. Плівкова форма таких каталізаторів зумовить їхнє багаторазове використання та легке вилучення з рідкої фази.

Стабільність біодизелю до окиснення – важливе технологічне питання. Підвищити стійкість біодизелю до окислювальної деградації можна через додавання антиоксидантів ([Varatharajan](#) et al., 2018). У виробництві біодизелю не існує єдиного інгібітора, який підходить для всіх видів біопалива, тому розширення асортименту антиоксидантів та пошук ефективних природних відновників є одним з основних сучасних напрямів досліджень. Джерелом природних антиоксидантів можуть бути рослини, багаті на антиоксиданти, рослинні відходи виробництва біодизелю, продукти фотокаталітичної конверсії біомаси, а також стерильні рослинні культури. Метод асептичної культури клітин і тканин рослин дає можливість діставати високоякісну стандартизовану сировину в необхідній кількості, що є також актуальним у зв'язку з глобальними змінами клімату та їхнім впливом на сталість рослинної сировини під час її виробництві *in situ*.

Рижій сійний (*Camelina sativa* (L.) Crantz) – рослина класу Dicotyledoneae, родини

Brassicaceae – давня сільськогосподарська культура, яка традиційно використовувалась у різних сільськогосподарських районах землеробства. Завдяки біологічній пластичності, унікальному біохімічному складу рослинної сировини й низки корисних властивостей, рижій привертає до себе увагу селекціонерів. Рижій розглядають як потенційну альтернативу деяким олійним культурам (Мельничук, 2012). Вміст олії в його насінні становить приблизно 38-43 %, а переважна частина жирних кислот (> 90 %) представлена ненасиченими кислотами, включаючи значну кількість С 20:0 ейкозадієнової кислоти, яка відносно не часто міститься в рослинних оліях, а також ліноленову (36,2-39,4 %), олеїнову (12,8-14,7 %), лінолеву (16,3-17,2 %) й ейкозенову (14-15,5 %) кислоти (Gugel et al., 2006). Між тим, чим північніше посіви рижію, тим більшим ступенем ненасиченості характеризуються кислоти, що входять до складу олії (Шевченко та ін., 2017). У зв'язку з цим, рижій є дуже перспективною культурою для отримання біодизелю (Pilgeram et al., 2007; Мельничук, 2012).

Сьогодні з цією культурою активно ведуться селекційні дослідження та створюються нові сорти. Центрами селекційної роботи з рижієм в Україні є Національний ботанічний сад імені М. М. Гришка НАН України та Інститут олійних культур НААН України. Активні розробки щодо всебічного вивчення корисного потенціалу рижію посівного ведуться в Інституті харчової біотехнології і геноміки НАН України (Yemets et al., 2013; Бойчук, 2019). Ведуться роботи з одержання міжродових гібридів за участі *C. sativa* внаслідок злиття протопластів (Narasimhulu et al., 1994),

розробляються процедури та вдосконалюються протоколи ведення асептичної культури різних сортів рижю (Tattersall, 1998; Zandacka-Dziubak, 2000; Бойчук та ін., 2011, 2012, 2013), вивчається можливість використання різних продуктів переробки рослинної сировини рижю у фармації, косметології, харчовій промисловості (Gugel et al., 2006; Pilgeram et al., 2007; Kumar et al., 2017; Karamać et al., 2020; Pathak et al., 2020).

*C. sativa* – рослина, цінність якої полягає не тільки в олійних властивостях її насіння та високому потенціалі для одержання біопалива. Окрім цього, для представників цього виду є характерний широкий пул вторинних метаболітів, які потенційно можуть бути використані як біоактивні речовини для зменшення темпів природного окислення біопалива.

Відповідно до цього, стратегічною метою наших досліджень було одержання стерильної культури *C. sativa* для подальшого вивчення антиоксидантного пулу вторинних метаболітів за умов стерильної культури.

Згідно з зазначеним перед нами стояли такі завдання:

- визначитися з типом первинного експланту та найбільш сприятливими термінами для введення в стерильну культуру *C. sativa*;
- відпрацювати процедуру стерилізації інтактного матеріалу – підібрати перелік стериліантів, їхню експозицію та умови знезараження;
- підібрати живильні середовища для початкових і подальших етапів культивування стерильного рослинного матеріалу *C. sativa* та нарощування біомаси.

- в стерильній культурі виділити окремі генотипи, наростити їхню біомасу для подальшого порівняльного їхнього скринінгу на предмет якісного / кількісного вмісту БАС з антиоксидантними / відновлювальними властивостями.

### **Матеріали та методи дослідження.**

Як джерело рослинного матеріалу було обрано ярий сорт рижю сійного (*Camelina sativa* (L.) Crantz) «Клондайк» селекції Інституту олійних культур НААН України. Висота рослин цього генотипу – 56-58 см. Стебло округле, завтовшки 2-3 мм із 4-5 гілками першого порядку. Суцвіття – завдовжки 6-10 см. Плід – грушоподібний стручок, у якому розміщується 8-10 насінин світло-жовтого кольору. Маса 1000 насінин – 2-3 г. Сорт відзначається стійкістю до вилягання, розтріскування стручків і осипання насіння. Врожайність – 25,0 ц/га, вміст олії в насінні – 39,4 %. У роботі були використані класичні біотехнологічні та морфологічні методи.

Стерильну культуру *Camelina sativa* культивували в конічних колбах Ерленмеєра (250 мл) та циліндричних скляних ємностях (200 мл). Культуральні ємності з рослинами розміщували у світловій кімнаті на скляних стелажах за штучного освітлення (інтенсивність 2000 лк, фотоперіод 16 год), температура 22-26 °С, вологість 70 %. Штучне досвічування проводили люмінесцентними лампами (ЛБ 40 та ЛД 40). Рослини культивували на агаризованих живильних середовищах, основу яких складали прописи середовищ Мурашиге-Скуга (МС) (Murashige & Skoog, 1962), Кнудсона (К) (Knudson, 1922) та Кнопа (Кн) (Knop, 1865).

Складання живильних середовищ щоразу проводили індивідуально, наважки всіх компонентів проводили за допомогою терез (Kern & Sohn GmbH ABJ 320-4 electronic balance). Процедуру стерилізації середовищ проводили через автоклавування (автоклав ГК-100-3), тиск 1-1,2 атм., температура 100<sup>o</sup>-110<sup>o</sup>С, експозиція 20-22 хв. Допоміжні матеріали: серветки з фільтрувального паперу, вату, шовкові контейнери для стерилізації рослинного матеріалу, конверти зі щільного пакувального паперу типу «Крафт», металевий інструмент, стакани, чашки Петрі, колби з водою, інструментарій для маніпуляцій – стерилізували в автоклаві впродовж 1 год під тиском 2 атм. Для приготування живильних середовищ та розчинів стериліантів використовували стерильний дистиллят.

Перелік речовин обраних для стерилізації та їхню експозицію komponували відповідно до попередньо отриманих результатів та даних літератури (Бычкова, 2004; Емец, 2013; Бойчук, 2019). Серед стериліантів, які було використано в роботі для звільнення від грибною та бактеріальною інфекції зазначимо наступні: 70% етиловий спирт (Медасепт, Україна), 0,01 % розчин Thimerosal (Merck, Німеччина), препарат Domestos (Unilever Magyarorszag Kft., Угорщина), хлоргексидину біглюконат (0,05%) (ТОВ «Ключ здоров'я», Україна), Фундазол (АГРО-КЕМІ КФТ, Угорщина); 10% розчин H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Медасепт, Україна).

Процедуру стерилізації інтактного рослинного матеріалу проводили в ламінарному боксі в спеціальних шовкових контейнерах, які занурювали в стакани зі стерилізаторами. Після кожного типу стерилізатора рослинний матеріал ретельно, 3-4 рази, відмивали в ємностях зі стерильною дистильованою водою. По завершенні процедури контейнери просушували між листками стерильного фільтрувального паперу.

Процес перенесення діаспор *Camelina sativa* в стерильну культуру проводили згідно з протоколом DSC (*dry seed culture*) за класичною методикою (Knudson, 1922). Умови стерилізації рослинного матеріалу підбирали індивідуально. Перелік речовин, обраних для стерилізації, та їх експозицію komponували відповідно до зазначених у літературі даних та власного досвіду.

Спостереження за ходом морфогенезу представників досліджуваних видів проводили за допомогою мікроскопів МБС–9, Carl Zeiss Jena NU. Документальне фіксування етапів росту й розвитку проводили завдяки фотографуванню (фотоапаратами Canon Power Shot G5, Nikon D 90). Під час спостережень за розвитком стерильної культури, визначенні типів морфологічних структур та етапів морфогенезу керувалися методиками Ф. М. Куперман (Куперман, 1977). Об'єкти препарували під бінокулярною лупою та світловим мікроскопом МБІ-15 за допомогою окуляр-мікрометра (x 16; x 18).

**Результати дослідження та їх обговорення.**

На першому етапі роботи було необхідно отримати життєздатні проростки рижю вільні від епіфітних грибів та бактерій. Аналіз літератури виявив, що як первинні експланти для отримання стерильної культури цього виду дослідники ви-

користуються різні частини рослини, переважно ті, яким притаманна меристематична активність. Найчастіше джерелом стерильного рослинного матеріалу обирають різні частини проростків *C. sativa*. Це найбільш технологічно зручний та відносно менш травматичний спосіб отримання стерильного рослинного матеріалу. Крім того, обираючи як джерело первинних експлантів зиготичні зародки, ми порівняно вільні в термінах отримання культури, оскільки, у цьому випадку, не є залежними від її онтогенетичних циклів.

Спроби отримання стерильної культури реалізовувались у вересні-жовтні. Ніяких додаткових процедур щодо стимуляції проростання не застосовували. Контрольні пророщування насіння в септичних умовах показали, що в цей період його здатність до проростання коливалася в межах 95-98 %.

Загальна схема реалізованих нами на цьому етапі робіт представлена на рисунку 1. Роботи було

розпочато з оптимізації власне процедури стерилізації інтактного матеріалу. З огляду на наявний досвід, ми розробили та опрацювали низку нових варіантів стерилізації, у яких було використано нові типи стериліантів та змінено їхні експозиції (Табл. 1).

Проблема, з якою ми зіткнулися під час отримання стерильної культури рижію цього сорту полягала в тому, що контамінація з'являлася не тільки одразу після процедури стерилізації, а й через тривалий час (50 - 90 діб) культивування. За таких умов можна припускати дві можливі причини прояву таких наслідків: не оптимізована процедура стерилізації або прояв (у конкретних умовах субкультивування) ендодітних мікроорганізмів. Власне проблема процедури стерилізації могла полягати в тому, що до складу спермодерми насінини рижію входять специфічні групи сполук (можливо з групи складних вуглеводнів) які відповідають за швидке ослизнення поверхні (Емец и др., 2013).



Рис. 1. Схема отримання стерильної культури та подальшого клонального мікророзмноження *C. sativa* сорту «Клондайк»

Для дрібного насіння рижю, з біологічної точки зору, це дуже зручне та корисне пристосування – слиз утримує депонент вологи навколо насінини, що сприяє його

проростанню, механічному зчепленню із субстратом, може стати в нагоді у разі зоохорії.

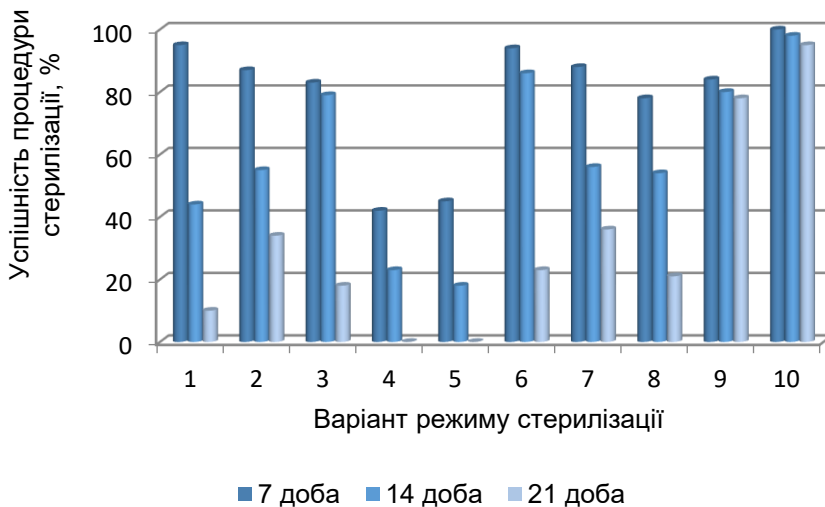
**1. Варіанти та схеми застосованих в експерименті процедур стерилізації інтактного матеріалу рижю посівного сорту «Клондайк»**

№	Назва стерилізуючого розчину	Варіант стерилізації / тривалість експозиції, хв									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Мильний розчин*	---	---	---	---	---	---	---	50	55	60
2	H <sub>2</sub> O (проточна)	---	---	---	---	---	---	---	30	30	30
3	Хлорексидину біглюконат (0,05%) (ТОВ «Ключ здоров'я», Україна)	---	---	---	10	15	20	25	25	30	35
4	70% Етиловий спирт (Медасепт, Україна)	3	2	1	---	---	---	---	---	---	---
5	Дистилат стерильний	5	5	5	10	10	10	10	10	10	10
6	Дистилат стерильний	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
7	Фундазол 2 гр / л (АГРО-КЕМІ КФТ, Угорщина)	---	---	---	15	20	25	25	25	---	---
8	0,01% розчин Thi-merosal (Merck, Німеччина)	20	15	10	---	---	---	---	---	15	20
9	Дистилат стерильний	10	10	10	---	---	---	---	---	---	---
10	Дистилат стерильний	10	10	10	---	---	---	---	---	---	---
11	10% розчин H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Медасепт, Україна)	15	10	5	---	---	---	---	---	---	---
12	Дистилат стерильний	10	10	10	---	---	---	---	---	---	---
13	препарат Domes-tos (Unilever Magyarország Kft., Угорщина)	15	10	5	---	---	---	---	---	---	---
14	Дистилат стерильний	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
15	Дистилат стерильний	10	10	10	10	10	10	10	10	---	10
16	Дистилат стерильний	10	10	10	10	10	10	10	10	---	10

\* - Мило господарське (72%) – 1г/100 мл води;

Однак, швидке формування шару слизу на поверхні насінини у вологому середовищі значно ускладнює та знижує ефективність самої процедури стерилізації – слиз сприяє склеюванню деяких насінин у конгломерати, запобігає рівномірному доступу стериліантів до зовнішнього шару спермодерми насінини, потенційно може створювати «кармани» в яких переживають процедуру стерилізації окремі

спори грибів та бактерій. Саме для максимального видалення слизу нами була застосована тривала, попередня промивка в проточній воді. Крім того, були використані нові типи стериліантів антимікробної (хлоргексидину біглюконат (0,05 %)) та фунгіцидної (фундазол) дії. Результати отримані під час експерименту продемонстровані на рисунку 2.



**Рис. 2. Успішність застосування різних процедур стерилізації інтактного матеріалу рижю посівного сорту «Клондайк»**

Аналізуючи отримані результати можна констатувати факт ефективного пригнічення мікотичних інфекцій на початкових етапах культивування практично для всіх варіантів стерилізації. Це демонструє нам перша контрольна точка зняття результатів (7 діб). Виключенням стали тільки 4 та 5 варіант, які, за підсумками експерименту, виявилися неефективними. У разі потрапляння в умови асептичної культури мікроскопічні гриби демонструють значно швидші темпи розвитку ніж бактерії, тому в разі прогалин у процедурі стерилізації

формування їхніх колоній можна спостерігати вже на 3-7 добу.

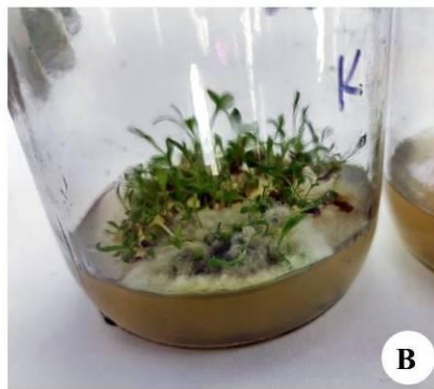
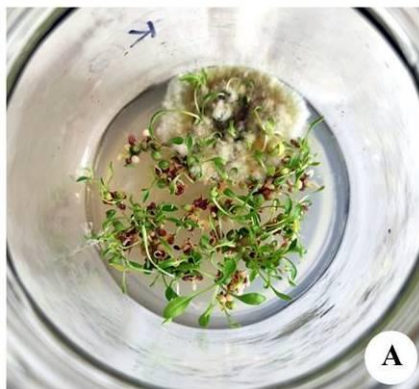
Бактеріальна контамінація, зазвичай, проявляється пізніше (починаючи від 5-7 доби) та колонії бактерій розвиваються значно повільніше. Отже, з рис. 2 можемо бачити, що на момент першого контролю більшість процедур демонструє гарні результати ефективності знезараження (в межах 75 % і вище). Картина змінюється на момент повторного контролю (14 діб), а третя контрольна точка (21 доба) демонструє нам остаточні результати



тати. У підсумку, на 21 добу можемо констатувати різке зниження показників ефективності стерилізації для варіантів 1,2,7,8. У решти також цей показник зменшується, але не так істотно. За своєю природою це в основному була бактеріальна контамінація, хоча ми зазначили деякі випадки формування

колоній грибних мікроорганізмів (рис. 3).

Через 21 добу найкращі результати ми зазначили для 9 та 10 варіантів стерилізації. Решта варіантів і далі демонстрували тенденцію до зменшення кількості стерильних зразків.



**Рис. 3** Контамінація грибною мікрофлорою проростків рижію сійного сорту «Клондайк» (А, В); 25 доба, середовище Кнопа

Отримані результати демонструють вірність нашого припущення щодо негативного впливу слизу поверхні спермодерми діаспор рижію на процедуру стерилізації. Заміна в переліку стериліантів препарату Thimerosal (0,01 %) на фундазол, навіть на фоні тривалої промивки проточною водою, призвела до значного погіршення результатів (варіанти 8/9). Натомість його застосування після замочування у водному розчині господарського мила та подальшої тривалої промивки дало найкращі результати.

Отже, у підсумку остання в ряду процедура стерилізації (мильний розчин – 60 хв; проточна вода – 30 хв; хлоргексидину біглюконат (0,05 %) – 35 хв; стерильний дистилат 2 × 10 хв; Thimerosal (0,01 %) – 20 хв;

стерильний дистилат 3 × 10 хв) інтактного матеріалу рижію посівного сорту «Клондайк» виявилася найефективнішою (рис. 4).



**Рис. 4.** Стерильні проростки *C. sativa* сорту «Клондайк»

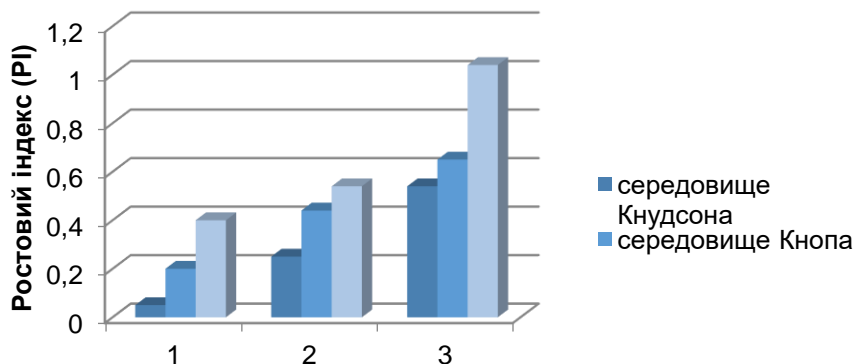
На наступному етапі нашої роботи було необхідно визначитися з базовим прописом живильного середовища для культивування та нарощування біомаси. У літературі є різні дані щодо цього питання (Park et al., 2012; Yemets et al., 2013; Бойчук, 2019; Sitther et al., 2019), тому ми вирішили від початку протестувати три різні базові прописи та визначитися з оптимальним. У роботі за основу були використані прописи середовищ Мурасіге-Скуга, Кнудсона та Кнопа.

Для характеристики особливостей репродукційної біології рижю в асептичних умовах, використовували такий показник як ростовий індекс (PI), який вираховували за формулою:

$$PI = (W1 - W0) / W0$$

де,  $W0$  – початкова маса зразка,  $W1$  – маса зразка в кінці циклу культивування (Бычкова, 2004).

Аналізуючи отримані результати, зазначимо, що цим експериментом ми остаточно підтвердили отримані на попередньому етапі роботи дані про те, що рослини культивовані на середовищі за прописом МС демонструють найкращі параметри PI. Ювенільні особини рижю, які культивували на живильних середовищах за цим прописом за показником приросту біомаси демонстрували випереджаючу динаміку на всіх етапах контролю експерименту (рис. 5, 6). Надалі, як базове нами використовувалося саме це середовище.



Контрольні точки зняття результатів:  
1 - 14 діб; 2 - 21 доба; 3 - 30 діб

Рис. 5 Залежність показників ростового індексу культури рижю сорту «Клондайк» від типу живильного середовища

Метаболізм вуглеводів займає провідне місце в основному обміні покритонасінних. У рослинах синтезуються, містяться й засвоюються в основному D-форми вуглеводів, тоді як L-форми трапляються вкрай рідко. Легкість взаємоперетворень глюкози, фруктози та

сахарози забезпечує включення кожної з цих сполук в основні шляхи деградації – гліколітичний та пентозофосфатний (Медведев, 2004; Мусієнко, 2008). Низка форм вуглеводів може проявляти навіть гормоноподібну активність (Коваленко, 1993).

Культури рослинних тканин, у теперішньому їй вигляді, без включення до складу живильних середовищ різних форм вуглеводів, неможлива. До того ж, сам процес нагромадження біомаси, тісно пов'язаний із наявністю й та кількісним умістом вуглеводів у живильному середовищі. Традиційно, до живильних середовищ, які використовують під час отримання стерильних рослинних культур покритонасінних та на подальших етапах їхнього субкультивування, додають цукрозу (Червченко Т. М. и др., 2008).



**Рис. 6. Стерильна культура рижію, середовище МС.**

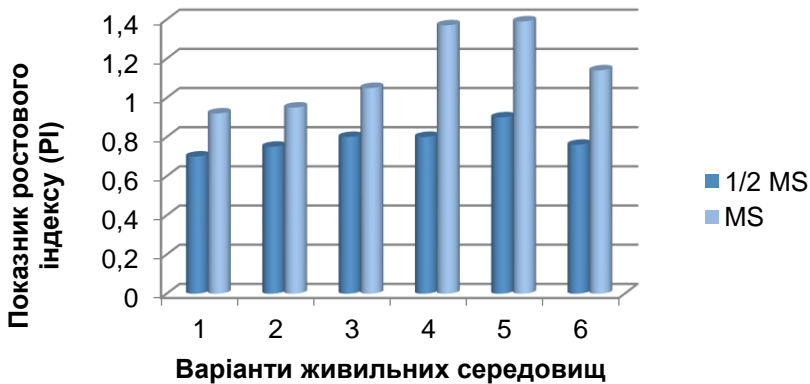
Однак, природа вуглеводу, який вводять до складу середовища залежить, зазвичай, від таксономічної приналежності рослини. Представники деяких видів здатні асимілювати різні типи цукрів, інші, більш вибагливі, що може говорити про пластичність самого процесу гетеротрофного живлення автотрофних організмів.

Однак, зв'язок процесу росту культури з вуглеводним метаболізмом значно глибше і складніше. Найбільш ефективним джерелом вуглецю для культур клітин і тканин найчастіше є цукроза. Легкість

взаємоперетворень глюкози, фруктози й цукрози забезпечує залучення кожного із цих головних компонентів для росту ізольованих культур і включення в основні шляхи деградації – гліколітичний та пентозофосфатний. Загалом використання вуглеводів через гліколіз більше відповідає високим енергетичним витратам, а пентозофосфатний шунт краще відповідає синтетичним запитам.

Остаточо визначившись із типом живильного середовища подальшим етапом роботи ми опрацювали оптимальну концентрацію цукрози для найбільш інтенсивного приросту біомаси рижію. У роботі, для порівняння використовували повний та половинний пропис компонентів за МС. Розкладку по цукрозі зробили в межах від 10 до 24 г/л із кроком 3 г/л. Контроль проводили за показником ростового індексу (PI), експозиція 30 діб (рис. 7).

Коментуючи дані представлені на рис. 7 відмітимо, що загалом, половинна концентрація пропису МС негативно впливала на приріст культури рижію. Причому, це не мало прямої залежності із концентрацією цукрози в середовищі. Ймовірно, для такої швидкоростучої культури як рижій, за названих умов та термінів культивування для приросту біомаси визначальними є концентрації базових компонентів середовища, на фоні яких збалансований уміст вуглеводів може призводити до істотного збільшення показника PI. Отримані результати свідчать, що оптимальна концентрація цукрози для нарощування біомаси донного сорту лежить у межах 19-21 г/л.



**Рис. 7. Залежність показників ростового індексу культури рижію сорту «Клондайк» від умісту макро- та мікросолей по MS та концентрації цукрози в середовищі. Варіанти середовищ за вмістом цукрози: 1 – 10 г/л; 2 – 13 г/л; 3 – 16 г/л; 4 – 19 г/л; 5 – 21 г/л; 6 – 24 г/л**

Надалі на середовищі MS із концентрацією цукрози в межах 20 г/л нами проводилися субкультування ювенільних рослин рижію та подальше їхнє клональне мікророзмноження. Емпіричним шляхом було відібрано ряд особин, які розмножували мікроклонально, а нарощену біомасу було передано на предмет скринінгу якісного вмісту біологічно активних сполук антиоксидантної / відновлювальної дії.

### **Висновки.**

Підсумовуючі дані отримані на даному етапі роботи зі стерильною культурою ярого сорту рижію посівного (*Camelina sativa* (L.) Crantz) «Клондайк» зазначимо що:

- нами було оптимізовано процедуру стерилізації інтактного рослинного матеріалу рижію послідовність стерилізації (мильний розчин – 60 хв; проточна вода – 30 хв; хлоргексидину біглюконат (0,05%) – 35 хв; стерильний дистиллят 2 x 10 хв; Thimerosal (0,01%) – 20 хв; стерильний дистиллят 3 x

10 хв) інтактного матеріалу рижію посівного сорту «Клондайк» виявилася найефективнішою;

- було встановлено, що на початкових етапах введення та в подальшому, при клональному мікророзмноженні, оптимальним прописом базового середовища є середовище Мурасіге-Скуга;

- найкращі показники приросту біомаси *Camelina sativa* (L.) Crantz «Клондайк» нами були зафіксовані на середовищі Мурасіге-Скуга з вмістом цукрози в межах 19-21 г/л.

Роботу виконано за фінансової підтримки Національного фонду досліджень України (проект № 2020.01/0136 «Ефективне використання відновлюваних рослинних ресурсів та фотокаталітична конверсія біомаси як еколого-інноваційні підходи для збереження довілля та біобезпеки людини»).

### References

1. Granone, L.I. (2018). Photocatalytic conversion of biomass into valuable products: a meaningful approach? *Green Chem.*, 20, 1169–1192. <https://doi.org/10.1039/C7GC03522E>
2. [Xiaoqing](#), L. (2019). Photocatalytic conversion of lignocellulosic biomass to valuable products. *Green Chem.*, 21, 4266–4289. <https://doi.org/10.1039/C9GC01728C>
3. [Varatharajan](#), K. (2018). Screening of antioxidant additives for biodiesel fuels. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 82, 2028. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.07.020>
4. Мельничук, М.Д. (2012). Рижій посівний як альтернатива ріпаку ярому для виробництва біодизеля. *Наук. доп. Нац. Ун-ту біоресурсів і природокористування України*, 31 (2), 1–9. [http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2012\\_2/12dgi.pdf](http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2012_2/12dgi.pdf)
5. Gugel, R.K. (2006). Agronomic and seed quality evaluation of *Camelina sativa* in western Canada. *Can. J. Plant Sci.*, 86, 1047–1058. <https://doi.org/10.4141/P04-081>
6. Шевченко, І.А., Поляков, О.І., Ведмедєва, К.В., Комарова, І.Б. (2017). Рижій, сафлор, кунжут. Стратегія виробництва олійної сировини в Україні (малопоширені культури). Інститут олійних культур Національної академії аграрних наук України. — Запоріжжя : СТАТУС, 2017. — 40 с
7. Pilgeram, A.L., Sands, D.C., Boss D. (2007). *Camelina sativa*, a montana omega-3 and fuel crop. In J. Janick & A. Whipkey (Eds.), *Issue in new crops and new uses* (pp. 129–131). Alexandria, ASHS Press.
8. Yemets, A.I., Boychuk, Yu.N., Shysha E.N. (2013). Establishment of in vitro culture, plant regeneration, and genetic transformation of *Camelina sativa*. *Cytology and Genetics*, 47(3), 138–144. <https://doi.org/10.3103/S0095452713030031>
9. Бойчук, Ю.М. (2019). Відбір та введення в культуру високопродуктивних генотипів ярого рижію *Camelina sativa* L. з їх подальшою генетичною трансформацією. Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук. Київ. 2019. 25 с.
10. Narasimhulu, S.B., Kirti, P.B., Bhatt, S.R. (1994). Intergeneric protoplast fusion between *Brassica carinata* and *Camelina sativa*. *Plant Cell Reports*, 13, 657–660. <https://doi.org/10.1007/BF00232940>
11. Tattersall, A., Millam, S. (1998). Establishment and in vitro regeneration studies of the potential oil crop species *Camelina sativa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55, 147–150. <https://doi.org/10.1023/A:1006132407886>
12. Zandecka-Dziubak, J., Luczkiewicz, T. (2000). Efektywnosc embriogenezy somatycznej w kulturze in vitro lnianki siewnej (*Camelina sativa* L.). *Rośliny Oleiste-Oilseed, Crops*. 21(2), 615–629.
13. Бойчук, Ю.Н., Шиша, Е.Н., Емец, А.И., Исаенков, С.В., Блюм, Я.Б. (2011, 5-7 октября). Введение в культуру in vitro и разработка метода генетической трансформации Рыжика посевного (*Camelina sativa*). Мат. первой конференции молодых ученых (с международным участием) «Биология растений и биотехнология», Белая Церковь, Украина. 2011 г., изд-во Институт пищевой биотехнологии и геномики, с. 107
14. Бойчук, Ю.М., Шиша, О.М., Емец, А.І. (2012, 15-16 листопада). Регенерація рослин рижію посівного (*Camelina sativa*) культури in vitro. Мат. XII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та

освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів», Київ, Україна, 2012 р., вид-во Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, 24 с.

15. Бойчук, Ю.М., Шиша, О.М., Ємець, А.І. (2013, 23-24 грудня). Генетична трансформація рижію посівного (*Camelina sativa*). Міжнародна конференція «Геноміка рослин та біотехнологія» та друга конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія», Київ, Україна, 2013 р., вид-во Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, 38 с.

16. Kumar, K., Gupta, S.M., Arya, M.C. (2017). In vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Camelina* Seed Extracts as Potential Source of Bioactive Compounds. Proc. Natl. Acad. Sci., India, 87, 521–526. <https://doi.org/10.1007/s40011-015-0631-9>

17. Karamać, M., Gai, F., Giorgio, P. (2020). Peiretti Effect of the Growth Stage of False Flax (*Camelina sativa* L.) on the Phenolic Compound Content and Antioxidant Potential of the Aerial Part of the Plant. Pol. J. Food Nutr. Sci., 70(2), 189–198. <https://doi.org/10.31883/pjfn/119719>

18. Pathak, R., Kumari, A., Mohsin, M., Bisht, G., Bala, M. (2020). Phytochemical Assessment and In vitro Antioxidant potential of *Camelina sativa* L. seed cake. Asian J. Research Chem., 13(1), 38–43. <https://doi.org/10.5958/0974-4150.2020.00009.7>

19. Murrashige, T. A., Skoog, F. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant, 15, 473–497.

20. Knudson, L. (1922). Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz., 73(1), 1–25.

21. Knop W. (1865). Quantitative untersuchungenüber den ernährungsprozess der pflanze. Landw. Versuchssat., Vol. - 7, P. 93.

22. Куперман, Ф.М. (1977). Морфофизиология растений. М.: Высшая школа.

23. Бычкова, Е.Ю. (2004). Рост, развитие и биосететические способности культур каллусных тканей нерпухи венценосной, серпухи чертополоховой и родиолы розовой, Астана, 2004 р., 24 с.

24. Емец, А.И., Бойчук, Ю.Н., Никишина, Е.Н., Рахметов, Д.Б., Блюм, Я.Б. (2013). Введение в культуру in vitro, регенерация и генетическая трансформация рыжика посевного (*Camelina sativa* (L.) Crantz). Цитология и генетика, 47 (3), 14–20. <https://doi.org/10.3103/S0095452713030031>

25. Бойчук, Ю.М. (2019). Відбір та введення в культуру високопродуктивних генотипів ярого рижію *Camelina sativa* L. з їх подальшою генетичною трансформацією, Київ, вид-во ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», 2019 р., 25 с.

26. Park, J.-I., Ahmed, N.U., Kim, H.-R., Nou, I.-S. (2012). Advances in in vitro culture of the Brassicaceae crop plants. Journal of Plant Biotechnology, 39(1), 13–22. <https://doi.org/10.5010/jpb.2012.39.1.013>

27. Sitther, V., Tabatabai, B., Enitan, O., Fathabad, S., Dhekney, S. (2019). Production of Transgenic *Camelina sativa* Plants via Agrobacterium-Mediated Transformation of Shoot Apical Meristems. American Journal of Plant Sciences, 10, 1–11. <https://doi.org/10.4236/ajps.2019.101001>

28. Медведев, С.С. (2004). Физиология растений. Санкт-Петербург., [Издательство Санкт-Петербургского университета](#), 336 с.
29. Мусієнко, М.М. (2005). Фізіологія рослин. Київ. Вид-во Либідь, 808 с.
30. Коваленко, О.В. (1993). Генетические аспекты морфогенеза растений. Успехи соврем. Биологии, 113 (3), 269–285.
31. Черевченко, Т.М., Лаврентьева, А.Н., Иванников, Р.В. (2008). Биотехнология тропических и субтропических растений in vitro. Киев, вид-во науков думка, 633 с.

**R. Ivannikov, V. Anishchenko, I. Laguta, P. Kuzema, N. Smirnova, O. Stavinskaya, O. Linnik, A. Kramar (2021). STERILE CULTURE OF CAMELINA SATIVA (L.) CRANTZ VAR. "KLONDIKE": FEATURES OF OBTAINING AND multiplication IN VITRO.**

BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 12(4): 19-33.

<http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/editor/submission/15989>

<https://doi.org/10.31548/biologiya2021.04.002>

**Abstract.** The vast majority of human energy needs are met by fossil fuels. In the short term, the use of non-renewable resources will not be able to contribute to the sustainable development of the world economy due to depletion of their reserves, rising oil prices and significant damage to the environment. These environmental and economic risks are the basis for the development of renewable bioenergy. Oilseeds are considered as a promising source for biofuel production. One of the areas of work in the range of outlined issues is the selection, selection and development of biotechnology of promising oilseeds, including red seed *Camelina sativa* (L.) Crantz.

The text of the article highlights the methodological issues of obtaining a sterile culture of ryegrass varieties of Ukrainian selection "Klondike" and the development of procedures for its further multiplication in vitro. Classical morphological and biotechnological methods of obtaining and maintaining sterile crops were used in the study tasks.

Aseptic culture of ryegrass was obtained from zygotic seed germs. We optimized the sterilization procedure of plant material and for the first time showed a positive effect on the disinfection of sterile-type sterilants (0.01%, Merck, exposure 15-20 min) and chlorhexidine bigluconate (0.05%, exposure 30-35 min).

It was established that Murashige-Skug (MS) is the optimal formulation of the basic medium for the experimental variety of red rice at the initial stages of introduction, and later, during clonal micropropagation. The best biomass growth rates were recorded on MS with sucrose content in the range of 20 g/l.

Thus, we developed a decontamination procedure and obtained a sterile culture of red rice, selected media for introduction and subsequent multiplication in order to increase plant biomass in vitro.

The results obtained during the work are part of a comprehensive study and will be used in the development of eco-innovative approaches to the efficient use of renewable plant resources through photocatalytic conversion of biomass.

**Keywords:** camelina, *Camelina sativa* (L.) Crantz, in vitro.