

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**  
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

**ПОГОДЖЕНО**  
Декан факультету захисту рослин,  
біотехнологій та екології  
\_\_\_\_\_ **Юлія КОЛОМІЄЦЬ**  
“ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2025 р.

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**  
Завідувач кафедри  
екобіотехнології та біорізноманіття  
\_\_\_\_\_ **Олена КВАСКО**  
“ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2025 р.

**МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

на тему Вплив стимуляторів росту на мікроклональне розмноження *Thuja occidentalis* в умовах *in vitro*

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Екологічна біотехнологія та біоенергетика

Орієнтація освітньої програми Освітньо-професійна

**Гарант освітньої програми**

д.с.-г.н., професор

\_\_\_\_\_

(підпис)

**Микола ЛІСОВИЙ**

**Керівник магістерської кваліфікаційної роботи**

д.с.-г.н., професор

\_\_\_\_\_

(підпис)

**Юлія КОЛОМІЄЦЬ**

**Виконала**

\_\_\_\_\_

(підпис)

**Юлія ПАВЛЕНКО**

**КИЇВ – 2025**

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри  
екобіотехнології та біорізноманіття  
к.б.н., доцент \_\_\_\_\_ Олена КВАСКО  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2025 р.

## ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ ЗДОБУВАЧУ

Павленко Юлії Сергіївни

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

Орієнтація освітньої програми Освітньо професійна

Тема магістерської кваліфікаційної роботи: «Вплив стимуляторів росту на мікроклональне розмноження *Thuja occidentalis* в умовах *in vitro*»

затверджена наказом від 7 листопада 2024 р. №2005 –Є”.

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 листопада 2025 року.

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи: пагони *T. Occidentalis* –Smaragd”, протоколи введення в культуру *in vitro*, методу мікроклонального розмноження рослин.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Проаналізувати наукову літературу щодо біологічних особливостей *T. occidentalis*, сучасних методів її розмноження та застосування технології *in vitro* для хвойних рослин.
2. Обрати оптимальний режим стерилізації експлантів для введення в культуру *in vitro*.
3. Дослідити вплив різних типів та концентрацій цитокінінів на коефіцієнт розмноження та стан мікропагонів.
4. Визначити вплив ауксинів на укорінення мікропагонів.

Дата видачі завдання 8 листопада 2024 року

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи \_\_\_\_\_ **Юлія КОЛОМІЄЦЬ**  
(підпис)

Завдання прийняв до виконання \_\_\_\_\_ **Юлія ПАВЛЕНКО**  
(підпис)

## РЕФЕРАТ

Магістерська робота на тему «Вплив стимуляторів росту на мікроклональне розмноження *Thuja occidentalis* в умовах *in vitro*» представлена на 67 сторінках формату А4, містить 9 таблиць, 9 рисунків, 1 додаток. Список використано літератури включає 44 використаних джерел. Складається з таких основних розділів: Вступ; Огляд літератури; Об'єкти та методи дослідження; Результати дослідження; Висновки; Список використаних джерел; Додатки.

**Актуальність роботи:** Туя західна є однією з найпопулярніших декоративних порід завдяки високій декоративності, тіньовитривалості та газостійкості, а також наразі активно вивчаються фармакологічні властивості цієї рослини та їх застосування у промисловості. Технології *in vitro* дають можливість швидко отримувати генетично однорідні, оздоровлені рослини протягом усього року, незалежно від сезону. Зокрема ефективність мікроклонального розмноження істотно залежить від складу поживного середовища та режимів застосування регуляторів росту. Тому їх вивчення є доцільним для розроблення більш ефективних протоколів цього методу саме для туї західної.

**Мета:** теоретично обґрунтувати та експериментально дослідити вплив різних типів та концентрацій стимуляторів росту на ефективність окремих етапів мікроклонального розмноження *Thuja occidentalis in vitro*.

Згідно з метою, було поставлено такі **завдання дослідження:**

1. Проаналізувати наукову літературу щодо біологічних особливостей *Thuja occidentalis*, сучасних методів її розмноження та застосування технології *in vitro* для хвойних рослин.
2. Обрати оптимальний режим стерилізації експлантів для введення в культуру *in vitro*.
3. Встановити оптимальний склад живильного середовища та дослідити вплив різних типів та концентрацій цитокінінів на коефіцієнт

розмноження та стан мікропагонів.Визначити оптимальні умови для етапу укорінення мікропагонів, зокрема вплив різних ауксинів.

4. Проаналізувати результати дослідів та зробити висновки.

**Об'єкт дослідження:** процес мікроклонального розмноження рослин *Thuja occidentalis*.

**Предмет дослідження:** вплив регуляторів росту на морфологічні процеси при вирощуванні туї західної в умовах *in vitro*.

**Ключові слова:** мікроклональне розмноження, туя західна, *Thuja occidentalis*, *in vitro*, культура тканин, пагоноутворення, ризогенез.

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	7
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	10
1.1. Біологічні особливості та поширення <i>Thuja occidentalis</i> .....	10
1.2. Практичне використання та значення туї західної в господарстві.....	13
1.3. Традиційні та сучасні методи розмноження хвойних рослин.....	16
1.4. Основи та етапи мікроклонального розмноження .....	22
1.5. Стимулятори росту рослин у культурі <i>in vitro</i> .....	26
1.5.1. Цитокініни.....	27
1.5.2. Ауксини .....	29
1.5.1. Гібереліни.....	32
<b>РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ</b> .....	33
2.1. Підготовка експлантів та їх поверхнева стерилізація.....	33
2.2. Приготування живильного середовища .....	36
2.3. Вибір стимуляторів росту та концентрацій .....	39
2.4. Дослідження на різних етапах розмноження.....	40
2.5. Умови культивування .....	41
2.6. Методики обліку та обробки даних .....	43
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ</b> .....	45
3.1. Відбір експлантів та введення їх в асептичні умови.....	45
3.2. Визначення оптимального складу живильних середовищ для проліферації та укорінення мікропагонів.....	47
3.3. Вплив регуляторів росту на пагоноутворення рослин.....	51
3.4. Вплив стимуляторів росту на ризогенез рослин .....	54
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	58
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	60
<b>ДОДАТКИ</b> .....	65

## ВСТУП

Останні десятиліття характеризуються стрімким розвитком біотехнологічних методів у рослинництві, які відкривають нові можливості для відтворення та збереження цінних видів і сортів рослин. Одним із найбільш перспективних напрямів у цій сфері є мікроклональне розмноження – метод вегетативного відтворення рослин в умовах *in vitro*, що базується на здатності рослинних клітин і тканин до тотипотентності, тобто відновлення цілого організму з окремої клітини або групи клітин. Такий підхід дозволяє отримувати велику кількість генетично однорідного та оздоровленого посадкового матеріалу незалежно від сезону, що є особливо важливим для цінних декоративних і лісових культур.

Мікроклональне розмноження включає кілька послідовних етапів: ініціацію експлантатів, індукцію і проліферацію пагонів, укорінення та адаптацію отриманих мікророслин до умов зовнішнього середовища. Кожен із етапів потребує ретельного підбору компонентів живильного середовища, особливо співвідношення фітогормонів, які регулюють процеси морфогенезу. Найчастіше для цього застосовують цитокініни (для стимуляції ділення клітин і формування пагонів) та ауксини (які сприяють утворенню коренів).

Туя західна належить до вічнозелених голонасінних видів, які важко піддаються традиційним методам розмноження, тому використання технології *in vitro* є ефективним інструментом для швидкого отримання якісного садивного матеріалу. Оптимізація складу живильних середовищ і режимів культивування є необхідною умовою для успішного застосування цього методу, оскільки навіть незначні відхилення у концентраціях стимуляторів росту можуть істотно впливати на частоту утворення пагонів, їх укорінення та подальший розвиток. Тож дослідження особливостей впливу стимуляторів росту на процеси мікроклонального розмноження туї західної має важливе значення для вдосконалення технології отримання високоякісного посадкового матеріалу, забезпечення збереження

декоративних форм і підвищення ефективності біотехнологічного відтворення деревних видів.

**Актуальність** теми зумовлена зростаючим попитом на якісний посадковий матеріал вічнозелених декоративних культур для озеленення міських територій, приватних садів і захисних насаджень за умов кліматичних змін та урбанізації. Туя західна (*Thuja occidentalis*) є однією з найпопулярніших порід для формування живоплотів і ландшафтних композицій завдяки високій декоративності, тіньовитривалості та газостійкості. Традиційні розсадницькі методи розмноження не завжди забезпечують стабільну якість і достатній обсяг садивного матеріалу, а також мають ризики поширення інфекцій. Технології *in vitro* дають можливість швидко отримувати генетично однорідні, оздоровлені рослини протягом усього року, незалежно від сезону. Однак ефективність мікроклонального розмноження істотно залежить від складу поживного середовища та режимів застосування регуляторів росту.

Оптимізація комбінацій і концентрацій фітогормонів (передусім цитокинінів та ауксинів) на етапах ініціації, проліферації пагонів і вкорінення є ключем до підвищення коефіцієнта розмноження, біометричних показників і виживаності рослин після акліматизації. Для туї західної ці параметри залишаються варіабельними та специфічними до певного генотипу, що зумовлює потребу у відпрацюванні стандартизованих протоколів саме для цільових сортів чи клонів. Наукове обґрунтування впливу стимуляторів росту на морфогенез туї в культурі *in vitro* дозволить встановити оптимальні режими культивування, скоротити цикл виробництва мікророслин і зменшити собівартість продукції..

Практичне значення дослідження полягає у розробленні науково обґрунтованих підходів до мікроклонального розмноження туї західної з використанням регуляторів росту, що забезпечують високу частоту утворення пагонів, їх укорінення та подальшу адаптацію до нестерильних умов.

Отримані результати можуть бути використані для вдосконалення лабораторних технологій масового розмноження туї, створення колекцій оздоровлених клонів та підвищення ефективності виробництва посадкового матеріалу. Це може сприяти розвитку декоративного садівництва, зменшенню залежності від імпортного садивного матеріалу та розширенню можливостей відновлення і озеленення урбанізованих територій.

**Мета:** теоретично обґрунтувати та експериментально дослідити вплив різних типів та концентрацій стимуляторів росту на ефективність окремих етапів мікроклонального розмноження *Thuja occidentalis in vitro*.

Згідно з метою, було поставлено такі **завдання** дослідження:

5. Проаналізувати наукову літературу щодо біологічних особливостей *Thuja occidentalis*, сучасних методів її розмноження та застосування технології *in vitro* для хвойних рослин.

6. Обрати оптимальний режим стерилізації експлантів для введення в культуру *in vitro*.

7. Встановити оптимальний склад живильного середовища та дослідити вплив різних типів та концентрацій цитокінінів на коефіцієнт розмноження та стан мікропагонів.

8. Визначити оптимальні умови для етапу укорінення мікропагонів, зокрема вплив різних ауксинів.

9. Проаналізувати результати дослідів та зробити висновки.

**Об'єкт дослідження:** процес мікроклонального розмноження рослин *Thuja occidentalis*.

**Предмет дослідження:** вплив регуляторів росту на морфологічні процеси при вирощуванні туї західної в умовах *in vitro*.

**Методи дослідження:** лабораторні, статистичні, морфометричні.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Біологічні особливості та поширення *Thuja occidentalis*

Туя західна (*Thuja occidentalis*) – вічнозелена хвойна рослина роду кипарисових (*Cupressaceae*). Рід складається всього із 5 видів, поширених у Східній Азії та Північній Америці, зокрема: *Thuja koraiensis*, *Thuja occidentalis*, *Thuja plicata*, *Thuja standishii*, *Thuja sutchuenensis*.

Найпопулярнішою в Україні є *Thuja occidentalis*, або туя західна. Цей вид налічує понад 120 садових форм, які відрізняються формою крони та кольором листя. Культивують їх у ботанічних садах та парках практично на всій території України. Також відома як східний білий кедр, болотний кедр, «американське дерево життя» [1,2].

Родина кипарисових – найдавніша група голонасінних рослин. Важливим моментом тут є те, що своїми біохімічними та морфологічними ознаками ця родина відрізняється від інших хвойних, наприклад соснових, що може впливати на їх реакцію до поживних середовищ та регуляторів росту в культурі *in vitro* [3].

За своєю морфологією туя є деревом, рідше – великим чагарником, з характерними для кипарисових особливостями будови. У природних умовах дерево заввишки 15-20 м, може сягати іноді до 40 м, діаметр стовбура до 2 м. у культурі часто зустрічаються низькорослі декоративні форми рослини. Крона молодих рослин пірамідальної або яйцеподібної форми, зі зростанням стає більш округлою та нерівномірною. Стовбур зазвичай один, але може згинатися та роздвоюватися [4].

У молодих рослин кора гладка, червонувато-коричневого кольору. З віком вона стає сіро-коричневою, поздовжньо-волокнистою, що розшаровується на довгі вузькі смужки, товщиною до 0,5-1,0 см.

Ключова ознака туї західної – її листя (хвоя) лускоподібного типу, що відрізняє її від сосни чи ялиці з голкоподібною хвоєю. Має плоску

клиноподібну форму в верхній і нижній частинах гілки. Бічна хвоя є продовгуватою, більш загостреною, із серпоподібно увігнутим внутрішнім і овальним зовнішнім краєм. Хвоїнки щільно притиснуті до пагона та розташовані парами супротивно. Розмір дрібний, 1,5-3,5 мм завдовжки. Зверху забарвлення хвої яскраво-зелене, знизу – світліше, з непомітними залозами. Взимку набуває бурого або оливково-зеленого відтінку, що є абсолютно нормальним. Опадання хвої відбувається не щорічно, як у листяних рослин, а раз на 2-3 роки разом із гілочками, так званий «гілочкопад».

Це однодомна роздільностатева рослина, має чоловічі та жіночі шишки на одному дереві. Чоловічі шишки (мікростробіли) дуже дрібні та майже непомітні, розміром до 2 мм, розташовані на кінцях пагонів, виробляють пилок навесні (рис. 1.1.).

Жіночі шишки (мегастробіли), дрібні, яйцеподібні, спочатку жовто-зелені, але потім стають світло-коричневими. Завдовжки 8-12 мм, складаються з 4-6 (рідше 8-10) насінневих лусок, розташованих навхрест і супротивно. Насіння дрібне та плоске, зазвичай 1-3 на кожній лусці, має 2 бічні, вузькі крила для поширення вітром. Дозріває восени в перший рік, але часто шишки залишаються на дереві до наступної весни. Утворюється велика кількість насіння, часто несхожого один на одного [5].

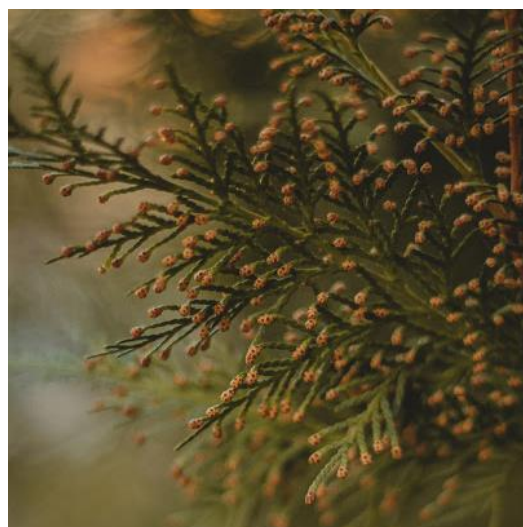


Рис. 1.1. Листя туї західної з чоловічими шишками

Також для туї характерне таке біологічне явище, як «цвітіння», чи точніше, пиління. Процес пилоутворення відбувається навесні, зазвичай у квітні-травні, одночасно з початком вегетації, але часто ці терміни залежать від кліматичної зони та погодних умов місця зростання дерева. Період активного висипання пилку супроводжується появою на пагонах жовтого помітного нальоту, який може сприйматися людьми як симптом хвороби, хоча насправді це є абсолютно нормальним явищем [2].

Коренева система поверхнева, але сильно розгалужена, з великою кількістю тонких коренів, що дозволяє приживатися виду на різних типах ґрунтів, але при цьому може робити корені вразливішими до механічних ушкоджень.

Туя західна є аборигенним видом для Північної Америки, тобто таким, що є природним для даної місцевості, автохтонним. Її природний ареал охоплює східні райони Північної Америки: від східної Канади до північних і центральних штатів США (рис.1.2.).

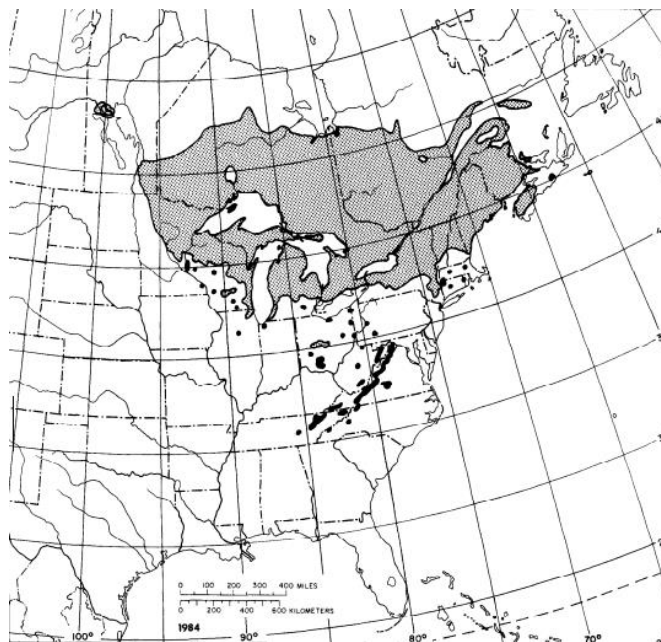


Рис. 1.2 Природний ареал існування туї західної

Вид був інтродукований в Європу ще в XVI столітті (близько 1536 року), з того часу широко розповсюджений по всій території континенту, включно з Україною. Тут рослина культивується повсюдно як непримхлива, морозостійка декоративна рослина в парках, садах, живоплотах тощо. Добре

зимує у всіх регіонах. Наразі виведено понад 120 декоративних сортів, що різняться формою крони, забарвленням хвої та розмірами рослини. Широка поширеність туї свідчить про екологічну пластичність виду, що зокрема є доброю передумовою для адаптації регенерантів *ex vitro*.

Біотопами, тобто місцями зростання туї західної є вологі ґрунти, такі як болотисті території, береги річок, озер і струмків. Часто утворює так звані «тамаракові болота» (часто верхові чи перехідні) разом з модриною американською. Росте в лісах, як хвойних, так і змішаних разом із ялиною, сосною, кедром, дубом чи явором. Також може рости на вапнякових скелях та урвищах, де проникає корінням у тріщини [4].

## **1.2. Практичне використання та значення туї західної в господарстві**

Туя західна має багатоаспектне значення та використання, що поширюється від декоративного садівництва до медицини та промисловості, що ґрунтується на її унікальних зовнішніх якостях, стійкості та здатності до утворення різних садових форм. Ця універсальність зумовлює її широке поширення та економічну цінність [12].

Кедри цінуються як декоративні рослини, так і за свою деревину. Існує кілька садівничих різновидів *T. occidentalis* та *T. orientalis*, які широко використовуються як декоративні рослини по всій Північній Америці, Європі та Азії. Крім того, східний білий кедр використовується для виготовлення стовпів, жердин, черепиці, каное тощо. Західний червоний кедр є однією з найцінніших лісових порід Британської Колумбії та щорічно складає від 10,6 до 11,3% обсягу деревини, що заготовлюється в цій провінції. Це важливий лісовий заповідник як за обсягом, так і за вартістю. У 1954 році була створена Асоціація лісопилів західного червоного кедр для просування продукції з кедр, і сьогодні кедрова деревина забезпечує багато унікальних продуктів та підтримує значну промислову інфраструктуру. Наявність туяпліцинів та

лігнінів у серцевині робить цю деревину міцною та стійкою до гниття, а старі дерева (понад 200 років) наразі використовуються для виготовлення деревини та виробів з неї [10].

Найбільш масштабна сфера використання туї на сьогодні – декоративне озеленення та ландшафтний дизайн.

- Живоплоти, зелені екрани, бордюри – ця рослина ідеально підходить для створення щільних, вічнозелених живих огорож, які захищають від шуму та пилу, забезпечують приватність та слугують цілорічним елементом структурування саду;

- алейні, солітерні (поодинокі) та групові посадки – виведені колоноподібні, пірамідальні та конічні сорти використовують для створення алей, акцентних ділянок (контрастних композицій, центральних елементів садових ділянок) чи оформлення входів;

- озеленення міст – завдяки високій газостійкості, гарному перенесенню стрижки та формування вона є ідеальним вибором та одним з основних хвойних видів для озеленення парків, скверів, територій навколо громадських будівель, вздовж доріг та промислових зон [11].

На даний момент існує понад 120 виведених декоративних сортів, що різняться формою крони (колоноподібна, куляста, пірамідальна, плакуча), забарвленням хвої (від яскраво-зеленого до золотистого та блакитно-сірого) та розмірами, що дозволяє вдало вписати її в будь-який ландшафт [13].

Популярними сортами туї західної є: Смарагд (має вузьку конусоподібну крону та насичений смарагдово-зелений колір хвої, один із найпопулярніших сортів для живоплотів), Брабант (швидкорослий сорт з колоновидною кроною, добре підходить для створення високих живоплотів), Колумна (сорт із вузькою, колоноподібною формою крони), Даніка (карликовий, повільнорослий сорт із кулястою кроною), Хосері (ще один кулястий сорт, хвоя якого набуває бронзового відтінку восени) [29].

Також туя західна має лікарське та фітотерапевтичне використання, зокрема вона містить ряд діючих біологічно активних сполук, таких як ефірні

олії (туйон, фенхон, сабінен), флавоноїди, таніни, смоли, які мають антисептичні, протигрибкові та протизапальні властивості. Традиційно знаходить застосування в народній медицині (сечогінний, відхаркувальний, кровоспинний та протиревматичний засіб), ароматерапії (проти шкірних інфекцій, для зняття стресу та очищення повітря) та гомеопатії (лікування захворювань шкіри та слизових оболонок, ревматичних болів). Але при цьому внутрішнє застосування вимагає великої обережності через токсичність туйону у високих дозах, який може спричинити опіки [8].

Сучасна наука переоцінює терапевтичний потенціал туї західної, зосереджуючись на ізоляції та стандартизації її біологічно активних сполук. На відміну від гомеопатії та традиційного застосування, сучасні дослідження спрямовані на створення доказових фармакологічних препаратів [6].

Перспективним напрямком є вивчення протипухлинної активності. Екстракти туї, зокрема компоненти її ефірної олії (туйопліцен, полісахариди), демонструють здатність індукувати апоптоз пухлинних клітин та пригнічувати ангиогенез *in vitro* та на моделях тварин. Досліджується синергічна дія з традиційними цитостатиками [9].

Значну увагу приділяють антиоксидантним та протизапальним властивостям. Флавоноїди та фенольні сполуки туї ефективно нейтралізують вільні радикали та пригнічують медіатори запалення. Це відкриває перспективи для розробки препаратів проти хронічних захворювань. Актуальним залишається антимікробний потенціал ефірних олій рослини, що проявляють активність проти антибіотикорезистентних штамів бактерій і грибків. Дослідження зосереджені на створенні на її основі нових дезінфікуючих та протигрибкових засобів [14].

Основним обмеженням є нейротоксичність  $\beta$ -туйону. Сучасні дослідження спрямовані на визначення безпечних концентрацій, виділення нетоксичних фракцій та розробку синтетичних аналогів. Для стандартизації сировини перспективним є використання біотехнологічних методів, зокрема клітинних культур *in vitro* [15].

Завдяки своїй м'якій, легкій та дуже стійкій до гниття (через наявність природних антисептиків) деревині, туя часто використовується і в промисловості. З неї виготовляють стовпи, шпали, будують човни, бондарні вироби, зовнішню обшивку будівель. Також виробляють меблі, внутрішні оздоблювальні матеріали, розкладають садові доріжки. Кора часто раніше використовувалась більше як дубильна речовина та джерело отримання червоного барвника [7].

Також, звісно ж, цей вид має і своє екологічне значення: виконується ґрунтозміцнююча роль завдяки розгалуженій кореневій системі, що дозволяє запобігти ерозію ґрунтів, особливо на схилах та берегах водойм; відбувається очищення повітря від пилу та шкідливих мікроорганізмів, завдяки виділенню в повітря фітонцидів (так звана фітомеліорація); створення середовища існування птахів чи дрібних тварин (наприклад, синиць чи щиглів) та їх годування насінням [43].

### **1.3. Традиційні та сучасні методи розмноження хвойних рослин**

Наразі розмноження хвойних рослин є одним із ключових завдань для лісового господарства, декоративного садівництва та збереження біорізноманіття. Усі хвойні рослини можна розмножувати двома шляхами – статевим і нестатевим, або інакше кажучи, генеративним (насінневим) і вегетативним [11].

Статеве розмноження, при якому новий організм формується внаслідок злиття батьківських гамет із подальшим утворенням насіння, забезпечує генетичне розмаїття утворених проростків. На противагу цьому, нестатевий (вегетативний спосіб) передбачає точне копіювання спадкової інформації материнської особини, що призводить до виникнення генетично однакових клонів. Обидва механізми, будучи результатом еволюційного відбору, знайшли своє застосування в селекційній практиці, де вибір на користь того чи іншого методу визначається поставленими цілями.

Генеративне розмноження – це основний метод відтворення природних популяцій та створення лісових культур у лісовому господарстві. Він забезпечує генетичне різноманіття популяцій, що є необхідним для її стійкості до навколишніх змін, таких як клімат чи стійкість до хвороб. Також дозволяє отримати велику кількість саджанців із мінімальними витратами, які при цьому зазвичай мають потужну стійку будову і кореневу систему [15].

Фаза запилення (полінація) туї західної співпадає з початком вегетації пагонів, припадаючи, залежно від метеорологічних умов, на квітень-травень. Тривалість цього фенологічного етапу становить 6–12 діб. Після завершення цього етапу відбувається формування овальних шишок, які досягають фізіологічної зрілості протягом 160–180 днів. Хоча плодоношення є щорічним, рясне насінношення спостерігається з періодичністю 2–3 роки. Активний ріст пагонів ініціюється через 1–1,5 тижні після завершення процесу запилення; щорічний приріст становить 10–15 см. Дозрівання та розкриття шишок відбувається у жовтні-грудні. Насінневий матеріал зберігає схожість (життєздатність) протягом 2 років. При генеративному розмноженні насіння потребує стратифікації, для чого застосовують підзимовий посів у ґрунт. Посів здійснюють у контейнери, заповнені зволоженим субстратом (суміш ґрунту, торфу та піску). Насіння загортають у борозенки на глибину 1 см, після чого субстрат ущільнюють та зволожують методом обприскування. Контейнери розміщують у затіненому місці, забезпечуючи захист від пошкодження фауною, при цьому покривний матеріал не повинен контактувати з поверхнею субстрату. Проростання насіння відбувається навесні при температурному режимі 10–15 °С. Ювенільні сіянці характеризуються наявністю голчастої (ацикулярної) хвої. Протягом вегетаційного періоду сходи підживлюють розчинами мінеральних добрив з періодичністю двічі на місяць. При досягненні високої щільності посівів, сіянці пікірують на затінені грядки. У ґрунт попередньо вносять органічні (перегній) та мінеральні (деревна зола, Нітроамофоска) добрива. Подальший догляд включає регулярне зволоження, мульчування органічними

матеріалами та розпушування ґрунту. Вирощування сіянців на грядках триває протягом трьох років, після чого рослини пересаджують на постійне місце вирощування [42].

При цьому, такий метод не підходить для розмноження декоративних сортів, адже при насінневому розмноженні такі сортові ознаки, як форма крони чи колір хвої, не успадковуються. Також насіння багатьох хвойних перебуває у стані спокою та потребує спеціальної підготовки матеріалу, зокрема стратифікації чи скарифікації. Багато хвойних мають тривалий період дозрівання до першого плодоношення та періодичність у врожаї насіння. Вирощування саджанців із насіння може займати до 3-5 років, а подібність насіння більшості декоративних форм низька, менше десяти відсотків [38].

На відміну від статевого розмноження, вегетативні методи дозволяють зберегти всі ознаки материнських рослин, що є особливо важливим для декоративних сортів і клонів. Виділяють традиційні методи та сучасні (біотехнологічні). До перших відносять живцювання та прищеплювання, що є відносно простими та дешевими способами розмноження [20].

Вегетативне розмноження хвойних рослин, зокрема *Thuja occidentalis*, методом стеблового живцювання найефективніше проводити у зимовий період. В якості експлантів використовують лігніфіковані (2-3-річні, 25-40 см) або напівлігніфіковані (прирости поточного року, 10-20 см) пагони, які заготовляють із "п'яткою" — фрагментом деревини старшої гілки. Базальну частину живців звільняють від хвої та піддають обробці стимуляторами ризогенезу, зокрема екзогенними ауксинами (ІОК, ІМК, НОК), експозицією у водному чи спиртовому розчині до однієї доби. Для дезінфекції зрізів до розчину доцільно додавати деревне вугілля. Підготовлені живці висаджують у тепличних умовах на глибину 1.5–2.5 см під кутом 60° у субстрат, що складається з річкового піску, торфу та дернової землі. При посадці слід уникати контакту хвої з поверхнею субстрату. Оптимальними умовами для укорінення є стабільна температура (близько 23°C) та висока відносна

вологість повітря (не менше 70%), яку підтримують шляхом регулярного обприскування, що замінює прямий полив [13].

Процес ризогенезу зазвичай ініціюється через 3 місяці. Укорінені рослини потребують поступової акліматизації (провітрювання, загартовування) та підживлення. Через півроку їх пересаджують в окремі контейнери для дорощування. На постійне місце рослини висаджують через рік. У зимовий період живці потребують утеплення тирсою чи листям) та додаткового плівкового укриття при критичних від'ємних температурах (від -5 до -7°C). Але для хвойних рослин цей процес є доволі трудомісткими, з низьким відсотком приживлювання та вкорінення у багатьох видів, особливо у дорослих рослин, наявна доволі сильна залежність від сезону, можлива несумісність та обмеженість кількості посадкового матеріалу [12].

Північний білий кедр, як іще називають тую західну, може пускати коріння з будь-якої частини гілки або стебла, якщо умови вологості сприятливі. Таким чином, в природних регіонах існування туя часто розмножується вегетативно на болотах, особливо на бідних ділянках із рясним мохом сфагнумом. Якщо не враховувати молоді саджанці, то набагато більше стебел, ймовірно, походить вегетативно, ніж з насіння, у більшості боліт, оскільки вегетативне розмноження більш стійке до тіні та ніколи не буває без адекватної стійкої кореневої системи. Відводки зазвичай становлять більше половини стебел розмноження білого кедр на болотах північного Мічигану та Мену. Це найчастіше трапляється в молодих насадженнях та тих, де дерева нахилені, де нижні гілки покриваються мохом. Сіянці можуть утворювати відводки до 5 років або раніше. Нові дерева також розвиваються вегетативно з викорінених дерев, вертикальні гілки яких утворюють коріння. Паростки від коренів або пнів зазвичай трапляються рідко. Живці зазвичай використовуються для розмноження сортів північного білого кедр; в лісових умовах їх можна вкорінювати, висаджуючи у глибокий сфагновий мох [28].

Саме вегетативне розмноження лежить в основі культивування багатьох сільськогосподарських і декоративних як дерев'яних, так і трав'янистих

культур. Історично складені традиційні методи «макророзмноження», що базуються на вкоріненні значних за розміром частин рослини, були суттєво вдосконалені завдяки сучасним науковим дослідженням у галузі садівництва [23].

Серед біотехнологічних методів виділяють мікроклональне розмноження *in vitro* та культуру соматичних ембріонів.

Біотехнологічні методи розмноження, зокрема мікроклональне розмноження (культура *in vitro*), базуються на фундаментальній властивості рослинних клітин — тотипотентності. Суть методу полягає у культивуванні ізольованих тканин, органів або окремих клітин (експлантів) на спеціально розроблених штучних поживних середовищах. Процес відбувається в асептичних (стерильних) умовах, що виключають контамінацію мікроорганізмами. Шляхом варіювання гормонального складу середовища, зокрема співвідношення фітогормонів ауксинового та цитокінінового типів, індукується органогенез (формування пагонів або коренів) або соматичний ембріогенез, що призводить до регенерації цілісних, генетично ідентичних вихідній формі рослин (клонів) [30].

Ключові переваги методів *in vitro* включають надзвичайно високий коефіцієнт розмноження, що дозволяє отримати мільйони рослин з одного експланту за короткий період, та незалежність від сезонних циклів, забезпечуючи цілорічне виробництво. Метод дозволяє проводити оздоровлення садивного матеріалу, зокрема, отримувати безвірусні рослини шляхом культури апікальних меристем. Це єдиний ефективний спосіб масової реплікації генотипів, які важко розмножуються традиційними вегетативними методами (наприклад, живцюванням), гарантуючи при цьому збереження генетичної однорідності та сортових ознак [25].

До істотних недоліків біотехнологічного розмноження належать висока собівартість процесу, обумовлена необхідністю спеціалізованих лабораторій (ламінарих боксів, автоклавів, кліматичних кімнат) та кваліфікованого персоналу. Існує постійний високий ризик втрати культури через мікробну

контамінацію на етапах введення та культивування. При тривалому культивуванні, особливо через фазу недиференційованого калусу, може виникати соматональна мінливість, що призводить до генетичної гетерогенності та втрати сортових ознак. Окрім того, рослини-регенеранти потребують складного та тривалого етапу адаптації до умов *ex vitro* (нестерильного середовища) через недостатньо розвинені продишовий апарат та кутикулу [37].

Соматичний ембріогенез – це біотехнологічний процес, при якому соматичні клітини (будь-які клітини, окрім статевих) *in vitro* репрограмується та розвиваються, формуючи структури, морфологічно ідентичні зиготичним зародкам (соматичні зародки). На відміну від органогенезу, ці зародки є біполярними, тобто одночасно формують пагонову та кореневу апікальні меристеми. Процес може бути прямим (зародок формується безпосередньо з експланта) або непрямим (через утворення проміжної недиференційованої калусної маси), що є поширенішим шляхом для хвойних [40].

Ключовою перевагою СЕ є надзвичайно високий потенціал для масового розмноження, оскільки процес можна автоматизувати, культивуючи ембріогенні клітини у рідких середовищах (біореакторах) у промислових масштабах. Це дозволяє отримати мільйони генетично ідентичних рослин. Крім того, соматичні зародки можна інкапсулювати, створюючи "штучне насіння", що полегшує їх транспортування, зберігання та висадку, а також є ефективною системою для генетичної трансформації рослин [33].

Незважаючи на переваги, метод має суттєві недоліки, що обмежують його комерційне застосування. Головними проблемами є висока генотипозалежність (протоколи не є універсальними і потребують складної оптимізації для кожного сорту) та високий ризик соматональної мінливості (генетичних мутацій), особливо при непрямому СЕ через калус. Також спостерігається низька ефективність "конверсії" – нездатність багатьох сформованих зародків прорости у повноцінну, життєздатну рослину [18].

Для туй західної, як цінної декоративної культури, найбільш перспективним сучасним методом є мікроклональне розмноження *in vitro*, адже це дозволяє подолати ключові недоліки традиційних методів, зокрема отримати значно вищу ефективність та швидкість отримання саджанців, а також збереження всіх сортових ознак, порівняно із живцюванням та насіннєвим розмноженням [35].

#### **1.4. Основи та етапи мікроклонального розмноження**

Мікроклональне розмноження є біотехнологічним методом, що базується на тотипотентності рослинних клітин – тобто здатності окремої соматичної клітини реалізувати всю генетичну програму відтворити цілий організм. Метод передбачає отримання *in vitro* рослин-регенерантів із ізольованих меристематичних тканин або органів, що забезпечують збереження генетичної стабільності та отримання клонів материнської рослини. Фізіологічною основою процесу є індукція органогенезу – формування пагонів та коренів із експлантів на спеціальних живильних середовищах при контрольованих умовах освітлення, температури та вологості [28].

Процес мікроклонального розмноження включає в себе три послідовні етапи:

1. Ініціація культури – передбачає відбір, поверхневу стерилізацію та введення в культуру *in vitro* вихідного експланта. Оптимальними експлантами для хвойних рослин є апікальні та пазушні меристеми, ізольовані бруньки, сегменти пагонів;

2. Проліферація – суть у багаторазовому пагоноутворенні на середовищах із високою концентрацією цитокинінів (6-БАП, кінетин);

3. Ризогенез – індукується укорінення мікропагонів на середовищах із ауксинами (ІМК, НОК);

4. Адаптація (акліматизація) – пристосування рослин-регенерантів до умов *ex vitro*, що передбачає поступове зниження вологості повітря, привчання рослини до природного освітлення тощо (рис. 1.3.) [16].

Метод є одним із найефективніших для отримання садивного матеріалу, залишається пріоритетним напрямком досліджень у галузі лісової біотехнології, а також має низку переваг, порівняно із традиційними методами, зокрема:

- незалежність від періодичності врожайності, якості насіння, чинників довкілля, а отже розмноження рослин протягом усього року, адже їх ріст і розвиток *in vitro* практично не залежать від сезону;
- добір рослинного матеріалу *in vitro* із заданими ознаками;
- отримання як генетично однорідного матеріалу, так і соматоклональних культиварів залежно від мети;
- продукування садивного матеріалу, генетично ідентичного материнській рослині;
- розмноження цінних клонів рослин на невеликих площах, з меншими затратами енергії та праці;
- прискорення терміну розмноження цінних клонів завдяки можливості розмноження саджанців без виведення їх із ювенільної фази, що важливо для багаторічних деревних рослин, а отже й збільшення коефіцієнту розмноження (понад 100 клонів на рік);
- отримання вегетативних генерацій рослин, які важко розмножуються у звичайних умовах;
- тривале зберігання рослин *in vitro* за низьких температур шляхом створення кріобанку цінних рослин;
- продукування матеріалу рослин, позбавлених епіфітної мікрофлори;
- можливість дослідження експериментального мутагенезу і розхимерювання, індивідуальної генетики культиварів, що розмножуються насінням, і створення нових сортів;

- використання клітинних культур як джерело біологічно активних сполук, а також як модельні системи для вивчення диференціації експресії генів тощо [25].

Сьогодні все більше виникає необхідність у встановленні можливості відтворення цінних лісових насаджень шляхом отримання садивного матеріалу зі стійких дерев *in vitro* та його адаптації в *in vivo*. Широке запровадження мікроклонального методу розмноження деревних рослин, що важко розмножуються, дозволить значно збільшити обсяги виробництва якісного, безвірусного садивного матеріалу для задоволення власних потреб. У цьому контексті особливо актуальним є проведення досліджень, спрямованих на вивчення видових особливостей мікроклонального розмноження, адаптування рослин-регенерантів і вирощування саджанців для подальшого створення лісових культур [22].

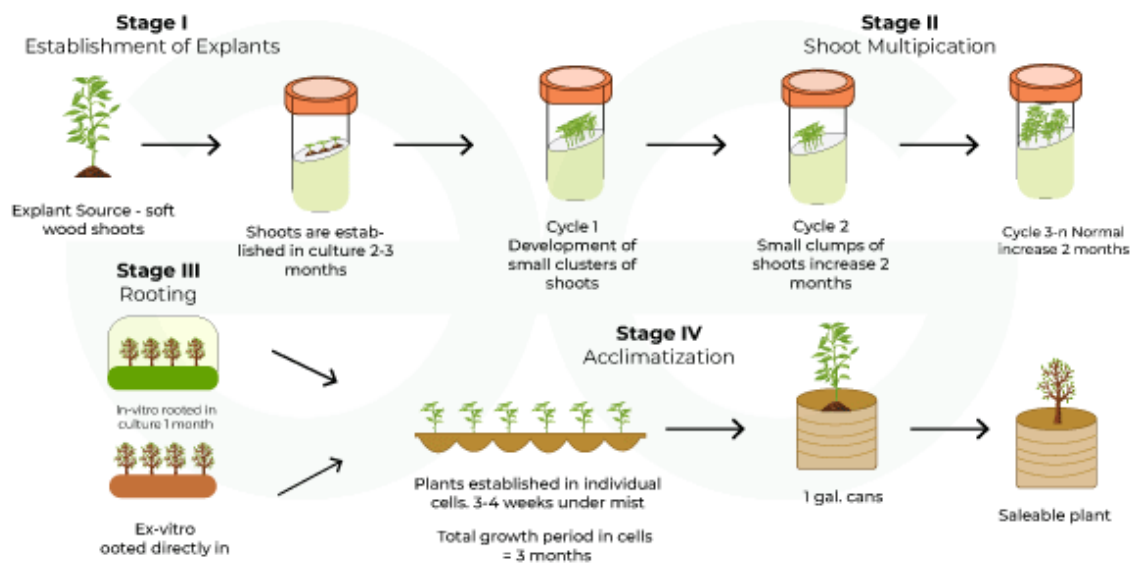


Рис. 1.3. Загальна схема мікроклонального розмноження деревних рослин: 1 – відбір експлантів і введення в культуру *in vitro*, ініціація росту рослини; 2 – розмноження пагонів; 3 – укорінення; 4 – адаптація.

Ще в 1965 році було зроблено кілька спроб розробити методи *in vitro* для цього важливого роду, зокрема спроби мікророзмноження *T. orientalis*; пізніше робота була проведена з *T. plicata* та *T. occidentalis*. Використовувався

як ювенільний, так і зрілий матеріал, а також отримувалися як додаткові, так і пазушні бруньки [44].

Мікроклональне розмноження в біотехнології ґрунтується на чотирьох фундаментальних принципах:

- стимуляція розвитку меристематичних тканин (апексу пагона, пазушних та сплячих бруньок);
- ініціація утворення адвентивних бруньок із соматичних тканин експлантата;
- застосування процесу соматичного ембріогенезу;
- диференціація адвентивних бруньок у первинній калюсній тканині [37].

Серед цих підходів ключову роль відіграє метод активації пазушних меристем, який вважається найбільш надійним для багатьох плодових і ягідних видів. В основі цього методу, вперше розробленого для суниці у 1970-х роках, лежить механізм усунення апікального домінування, що забезпечує масове проростання пазушних бруньок.

Основними факторами, що впливають на морфогенез при вирощуванні рослини в асептичних умовах, є склад живильного середовища, світловий та температурний режими, тип і стан експланта. Важливий баланс мікро- та макроелементів, джерела вуглецю, вітаміни та амінокислоти, що безпосередньо впливають на метаболічні процеси. Фотоперіодичні умови, зокрема тривалість фотоперіоду та спектральний склад світла, визначають ефективність органогенезу. Для багатьох рослин також необхідний період темної культивації. Більшість видів оптимально розвивається при температурі 23-25°C, крім того, термоперіодичні цикли можуть імітувати сезонні зміни та стимулювати перехід до репродуктивної фази. Також високий потенціал до морфогенезу часто визначається вибором експланту, зокрема апікальні та пазушні меристеми. Важливими є фізіологічний стан рослини, її вік, сезон відбору тощо. Для певних видів застосування стресових

факторів (осмотичний, окислювальний стрес) може активувати латентні механізми морфогенезу [31].

### 1.5. Стимулятори росту рослин у культурі *in vitro*

Ключовими компонентами живильних середовищ для культивування рослин *in vitro* є стимулятори росту, або фітогормони. Вони регулюють процеси проліферації, диференціації та дедиференціації клітин та тканин, ініціюють гістогенез та органогенез, визначаючи напрямок розвитку рослинних експлантів, беруть участь у процесах старіння і дозрівання, стимулюють чи інгібують ріст і розвиток клітинних культур. Фітогормони впливають на експресію генів, що контролюють синтез тих чи інших ферментів. Навіть серед експлантів різних сортів одного і того ж виду може спостерігатися неоднаковий прояв реакції на додавання в середовище регуляторів росту, що обумовлене ознакою сорту [39].

Виділяють такі основні групи регуляторів росту для використання в біотехнологічних дослідженнях у культурі *in vitro*, як цитокініни, ауксини, а також менш поширені гібереліни, абсцизинова кислота та етилен. Кожна з цих груп виконує специфічні функції у морфологічних процесах в рослині. Саме відкриття цитокінінів розпочало еру культивування рослинних клітин *in vitro* для утворенні калюсу [32].

Від синергізму та оптимального співвідношення регуляторів росту залежить ефективність їх застосування. Баланс між ауксинами та цитокінінами визначає тип морфогенезу в рослині, таким чином високі концентрації перших стимулюють ризогенез, якщо ж переважають цитокініни – утворюються меристеми пагонів та ініціюється органогенез. Для різних видів рослин на різних етапах культивування необхідно підбирати індивідуальні гормональні композиції. Зміни у співвідношенні ауксин/цитокінін спричиняють суттєві відмінності в розвитку клітин та тканин *in vitro*. Сучасні підходи мікророзмноження передбачають поетапну

зміну гормонального складу середовища на різних стадіях процесу. Крім того перспективним є використання альтернативних регуляторів росту (брасиностероїди, поліаміни) та сигнальних молекул (саліцилова, жасмонова кислоти) для підвищення активності морфогенезу *in vitro*. Але багато з нещодавно відкритих фітогормонів ще не досліджувалися щодо застосування в асептичній культурі. Нові, природні речовини цих категорій все ще відкриваються. Водночас постійно синтезуються нові структурно споріднені сполуки з гормоноподібною активністю [39].

Для хвойних рослин, зокрема туї західної, характерна вища чутливість до регуляторів росту, порівняно з трав'янистими рослинами. Оптимальними цитокинінами для проліферації є 6-БАП та кінетин, тоді як для ризогенезу ефективнішими виявляються ІМК та НОК. Також необхідним є додавання адсорбентів (активоване вугілля) для нейтралізації вторинних метаболітів, таких як фенольні сполуки, що виділяються експлантами хвойних [30].

### 1.5.1. Цитокиніни

Цитокиніни являють собою похідні пурину (аденіну), що стимулюють клітинний поділ та їх диференціювання, уповільнюють старіння рослин. До найвідоміших представників цієї групи належать кінетин (6-фурфуриламінопурин), зеатин та 6-БАП (6-бензиламінопурин). Вони містяться в різних тканинах рослин, зокрема найвищі їх концентрації містяться в апікальних меристемах коренів, ксилемному соку, насінні під час проростання та пухлинних утвореннях. Подібно до ауксинів, вони виявляють атрагуючу дію, сприяючи транспорту поживних речовин до тканин із високим їх вмістом. На молекулярному рівні цитокиніни, зв'язуючись зі специфічними білковими рецепторами, активують РНК-полімеразу та підвищують матричну активність хроматину, що призводить до збільшення кількості полірибосом та інтенсифікації синтезу білків, змінюючи експресію генів на транскрипційному рівні [41].

- кінетин ( $C_{10}H_9N_5O$ ) – тип цитокінінів, що сприяє поділу клітин. Є історично першим описаним цитокініном, ізольований із автоклавованих зразків ДНК оселедця. Хоча кінетин і не є природним цитокініном, він структурно подібний до сполук цієї групи, що існують у рослинах у вільній формі та як глікозиди. Досить часто використовується в культурах рослинних тканин для індукування утворення калюсу в поєднанні з ауксином для регенерації тканин пагонів з калюсу з меншою концентрацією ауксину. Проявляє класичні цитокінінові властивості, як стимуляція поділу клітин, затримку старіння листя, підтримку розвитку пагонів, індукція органогенезу. Порівняно з іншими цитокінінами, має низку переваг, зокрема стабільний при автоклавуванні, повільно деградує в живильних середовищах, ефективний для широкого спектру рослин. Проте може поступатися за активністю деяким синтетичним цитокінінам (наприклад, 6-БАП) у випадку застосування щодо деревних рослин. Для мікроклонального розмноження хвойних порід часто використовується у поєднанні з іншими регуляторами росту при проліферації пагонів [36].

- 6-БАП (6-бензиламінопурин, бензиладенін,  $C_{12}H_{11}N_5$ ) – це синтетичний цитокінін першого покоління, що стимулює ріст і розвиток рослини, викликає цвітіння та розвиток плодів шляхом індукування поділу клітин. На вигляд це порошок білого кольору, добре розчинний у розведених кислотах, лугах, полярних органічних розчинниках, обмежено розчинний у воді, стабільний при автоклавуванні. Є стандартним компонентом живильних середовищ. Порівняно з іншими цитокінінами, має вищу стабільність до ферментативного розщеплення, ефективний для важкорозмножуваних видів, потужно стимулює проліферацію та універсальний у застосуванні. Однак при підвищених концентраціях може спричинити аномальний ріст пагонів із пригніченим ризогенезом. У мікроклональному розмноженні туї західної демонструє гарну ефективність у концентраціях 1,0-1,5 мг/л у комбінації з низькими дозами ауксинів.

- зеатин ( $C_{10}H_{13}N_5O$ ) – природний цитокінін пуринової природи, вперше був виділений із квасолі та незрілого насіння кукурудзи. Існує у двох ізомерних формах: транс-зеатин (більш активний) та цис-зеатин. Найбільш активний серед природних цитокінінів, стимулює поділ клітин та органогенез, індукує розвиток пазушних бруньок, модулює імунітет рослини. Але при цьому має більшу чутливість до автоклавування та меншу стабільність у живильних середовищах. У розмноженні рослин може використовуватися на етапі ініціації культури [32].

### 1.5.2. Ауксини

Ауксини – це клас фітогормонів на основі індольних сполук. Спочатку були виявлені під час дослідження тропізмів та росту рослин, проте їхня фізіологічна роль виявилася значно ширшою. Ці гормони беруть участь безпосередньо у координації морфогенезу, рухових реакцій та функціональної активності рослинних організмів. Ауксин є обов'язковим фактором ініціації поділу клітин, що особливо проявляється у його здатності стимулювати реплікацію ДНК. Хоча й перехід клітин до мітозу зазвичай вимагає присутності цитокініну, високі концентрації ауксину можуть індукувати мітотичну активність навіть за відсутності перших. ІОК та її синтетичні аналоги значно впливають на мітотичну активність різних тканин. Навесні ауксини забезпечують функціональну активність камбію в апікальних меристемах. Критичною є роль цих гормонів у розвитку плодів, починаючи з виділення пилком на початкових етапах і до подальшого синтезу в насінні, що формується [28].

Важливим аспектом дії ауксинів є їхня участь у коренеутворенні. Ці процеси регулюються балансом між ауксинами та цитокінінами. Виділяється видоспецифічність у реакції на різні типи ауксинів, що зокрема обумовлена відмінностями у поглинанні сполук, особливостями метаболічних шляхів та

різницею в будові ауксинових рецепторів. Важливість підбору точного гормонального балансу демонструється тим, що надмірна кількість ауксинів може спричиняти гальмування росту коренів [23].

В поєднанні з цитокінінами, ауксини застосовуються в середовищах на стадії мультиплікації, а вже при укоріненні додають лише ауксини. Раніше для цього використовували в основному ІОК, а потім перевагу стали надавати таким синтетичним сполукам, як НОК і 2,4-Д у концентраціях  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  М.

- Індоліл-3-оцтова кислота ( $C_{10}H_9NO_2$ ) – основний природний ауксин. Це біла кристалічна речовина з молекулярною масою 175,19 г/моль, що плавиться при  $168^{\circ}C$ . Речовина проявляє фоточутливість, тому на світлі швидко темніє. Спектр поглинання ІОК має максимум 279 нм. Добре розчинна в спиртах (етиловому, метиловому), етилацетаті та диетиловому ефірі. Водна розчинність є обмеженою – погана у холодній і значно краща у гарячій. Також погано розчинна у хлороформі та бензолі. Швидко розкладається у кислому середовищі та за наявності окисників (наприклад,  $H_2O_2$ ), тоді як у лужному середовищі її стійкість значно вища. Як основний природний ауксин, ІОК швидко метаболізується в рослинах за участі ферменту індолілацетатоксидази, активність якого специфічно гальмує деякі ортодифеноли, що пояснює їхню стимулюючу дію на ріст. Спочатку вважалося, що самі ортодифеноли і є ауксинами, проте подальші дослідження показали, що їхній ефект зумовлений саме інгібуванням розщеплення ендогенної ІОК, що призводить до її накопичення в рослинних тканинах [17].

-  $\beta$ -індолілмасляна кислота (ІМК,  $C_{12}H_{13}NO_2$ ) – один із ключових представників природних ауксинів, за молекулярною структурою є похідним індолу з масляною кислотою у положенні  $\beta$ . Сполуку отримують як синтетичними методами, так і виділяючи з листя чи насіння кукурудзи чи інших видів. При цьому попередником ІМК в рослин є ІОК ( $\beta$ -індолілоцтова кислота). Являє собою білі або світло-жовті кристали, молекулярною масою 203,24 г/моль, температура плавлення становить  $125^{\circ}C$ . Добре розчинна в етанолі, метанолі, ацетоні, обмежено розчинна у воді, що обумовлює

використання допоміжних розчинників для приготування робочих розчинів. Проявляє високу активність, зазвичай менш токсична для рослин порівняно із синтетичними аналогами типу 2,4-Д. основним біологічним ефектом є стимуляція ризогенезу на живцях та мікропагонах *in vitro*. Оптимальними концентраціями для індукції коренеутворення є 0,5-3,0 мг/л. порівняно з іншими ауксинами, має ряд переваг, зокрема це вища стабільність та стійкість у живильних середовищах, менша фітотоксичність при тривалому застосуванні, поступове вивільнення активних компонентів тощо [15].

-  $\alpha$ -нафтилоцтова кислота (НОК,  $C_{12}H_{10}O_2$ ) – синтетичний ауксин, але завдяки схожій структурі імітує біологічну активність природних ауксинів. Це безбарвні або білі кристали, молекулярною масою 186,21 г/моль. Температура плавлення становить 135°C. Добре розчинний в етанолі, ацетоні, діоксані, і погано розчинний у воді, що вимагає використання емульгаторів і розчинників для приготування розчинів. Проявляє виражену ауксинову активність, але не метаболізується до ІОК і діє безпосередньо через ауксинові рецептори. Основними біологічними ефектами НОК є стимуляція ризогенезу, індукція партенокарпії, запобігання передчасному опаданню плодів, стимуляція калюсоутворення *in vitro*. Порівняно із природними ауксинами, має такі переваги, як вища стабільність до ферментативного розщеплення, повільніша деградація та тривала персистентність у рослинних тканинах, менша чутливість до дії індолілацетатоксидази. Однак може проявляти фітотоксичність при підвищених концентраціях або тривалому експонуванні, що вимагає ретельного підбору дозування. У мікроклональному розмноженні хвойних порід, зокрема і для туї західної, НОК часто використовують у комбінації з ІМК для синергетичного ефекту при ризогенезі [41].

### 1.5.1. Гібереліни

Гібереліни представляють собою важливий клас фітогормонів, наразі ідентифіковано понад 100 різних сполук цієї групи, серед яких найбільш поширеною та біологічно активною є гіберелінова кислота (ГК<sub>3</sub>). Фізіологічна роль цих гормонів полягає в регуляції росту рослин шляхом стимуляції подовження клітин, контролю процесів проростання насіння та індукції переходу до репродуктивної фази розвитку.

На молекулярному рівні гібереліни реалізують свої функції через активацію синтезу специфічних ферментів, що розщеплюють компоненти клітинної стінки. Вони також індують експресію генів, пов'язаних з ростовими процесами, регулюють метаболізм крохмалю та цукрів, і стимулюють клітинний поділ у меристематичних тканинах. Ці комплексні механізми забезпечують координацію росту та розвитку рослин.

Поєднання гіберелінів з цитокінінами у культурі тканин демонструє виражений синергетичний ефект у регуляції морфогенетичних процесів. Цитокініни переважно стимулюють клітинний поділ та ініціюють органогенез, тоді як гібереліни сприяють подовженню та подальшій диференціації клітин. Така комбінація забезпечує збалансований ріст і розвиток рослинних експлантів *in vitro* [34]. У мікроклональному розмноженні деревних порід, зокрема туї західної, рекомендовано використання ГК<sub>3</sub> у концентрації 0,5-1,0 мг/л у поєднанні з 6-БАП (1,0-2,0 мг/л). Така комбінація сприяє покращенню якості пагонів та підвищує їх приживлюваність. Крім того, гібереліни виявляються особливо ефективними для подолання ювенільної фази та активації пазушних бруньок. До основних переваг комбінованого застосування належать: збалансований ріст і розвиток експлантів, запобігання аномаліям морфогенезу, підвищення коефіцієнта розмноження та поліпшення адаптації до умов *ex vitro*. Однак необхідно враховувати потенційні обмеження, такі як чутливість гіберелінів до фотодеградації, що вимагає захисту культур від прямого світла, а також необхідність індивідуального підбору концентрацій [32, 43].

## РОЗДІЛ 2

### ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Підготовка експлантів та їх поверхнева стерилізація

Правильний вибір та підготовка експлантів є вирішальним етапом, що визначає подальший успіх мікроклонального розмноження туї західної та забезпечує отримання стабільних морфогенетичних реакцій.

Культура *in vitro* характеризується універсальністю у виборі вихідного матеріалу, оскільки для розмноження можуть бути використані різноманітні частини рослини. До них належать апікальні та пазушні меристеми, вегетативні бруньки, зародки, а також диференційовані тканини – молоді листки, черешки, суцвіття тощо. Ефективність подальшого використання отриманого матеріалу значною мірою залежить від правильності відбору вихідних експлантів [27].

Важливим є відбір матеріалу, вільного від патогенних інфекцій, особливо вірусного походження. Дослідження демонструють, що навіть візуально здорові рослини можуть бути носіями латентної вірусної інфекції, яка поширюється при вегетативному розмноженні *in vivo*. Хоча бактеріальну та грибкову контамінацію можна ефективно усунути, вірусна інфекція залишається найбільш проблематичною через внутрішньоклітинну локалізацію збудників. Також потенціал вихідного матеріалу визначається фізіолого-біохімічними характеристиками, що впливають на продуктивність. Експланти слід відбирати від рослин, що пройшли діагностику на наявність інфекцій та демонструють високі показники за комплексом агрономічних ознак [31].

Оптимальний час відбору експлантів – ранкові години за високого тургору рослин. Зібраний матеріал необхідно розмістити у зволоженому фільтрувальному папері з подальшим поміщенням у поліетиленові пакети для збереження тургору. Важливим є швидке введення матеріалу в культуру *in*

*in vitro*, а саме не пізніше ніж через 2-4 години після відбору, оскільки інакше зростає ризик інфікування та погіршується приживлюваність експлантів [24].

При вегетативному розмноженні обов'язковою вимогою є збереження генетичної ідентичності отриманого матеріалу вихідним рослинам. Будь-які спадкові відхилення або соматональні варіації вважаються неприйнятними, оскільки порушують принцип клонального розмноження [27].

Також ефективність введення рослин в асептичну культуру та подальші регенераційні процеси значною мірою детермінуються видом вихідного експланта. У результаті вивчення досліджень МКР туї західної було виявлено, що проводилась порівняльна оцінка різних типів експлантів за ефективністю деконтамінації. Досліджувалися такі види вихідного матеріалу: апікальні меристеми пагона розміром 0,2-0,3 мм, живці з однорічного приросту, насіння, а також пагони проростків з двома хвоїнками, отримані з насіння на перлітному субстраті. Результати дослідження демонструють суттєві відмінності в ефективності стерилізації та подальшого розвитку для різних типів експлантів (табл. 2.1.).

Таблиця 2.1.

Вплив виду експланта на ефективність введення в асептичні умови

Тип експланта	Контаміновано, %
меристема	9,3
стебловий живець	82,3
насіння	67,8
пагін проростка	7,2

Зовнішні поверхні рослинних органів зазвичай колонізовані мікроорганізмами, які за умов потрапляння в штучне живильне середовище в результаті своєї життєдіяльності поглинають з нього поживні речовини і, натомість, виділяють токсини, які накопичуючись у середовищі, гальмують біологічні процеси в рослинних клітинах і за тривалого впливу спричиняють їх загибель. Тоді як внутрішні тканини лишаються стерильними, зокрема стерильними вважаються апікальні меристеми. Ключовою вимогою для

успішного культивування калюсних та суспензійних культур є повна елімінація мікроорганізмів із зовнішніх покривів без ушкодження життєздатності тканин. Вибір стерилізуючого агента базується на його здатності ефективно усувати контамінацію при мінімальній токсичності для рослинних клітин. Критеріями вибору є здатність до нейтралізації промиванням або розкладання на нетоксичні компоненти, відсутність кумулятивного ефекту та селективна дія щодо мікроорганізмів. Ускладнити цей процес може виділення смолистих речовин у туї західної, вимагаючи індивідуального підбору стерилізуючих агентів [21].

Перед стерилізацією проводиться механічна очистка матеріалу від ґрунтових частинок, решток рослинних тканин та покривних лусок. Етап включає ретельне промивання з використанням миючих засобів у проточній воді з подальшим ополіскуванням дистильованою водою.

Стандартна процедура стерилізації передбачає первинну обробку 70% етанолом: для листків та бруньок – 10-20 секунд, для насіння та підземних органів – 1-5 хвилин. Етанол виконує подвійну функцію – руйнує восковий наліт і посилює проникнення основних стерилізуючих агентів. Як детергенти застосовують поверхнево-активні речовини (Твін-80, Твін-20).

Найпоширеніші групи стерилізуючих речовин включають хлорвмісні сполуки (гіпохлорит натрію 0,5-5%, гіпохлорит кальцію, хлорамін 0,2-10%), ртутні препарати (сулема), окисники (перекис водню, перманганат калію), концентровану сірчану кислоту для насіння з щільною оболонкою тощо [23].

Для матеріалів з внутрішньою інфекцією, а також її запобіганню, застосовують антибіотики, хоча вони можуть пригнічувати ріст калюсу. Перекис водню є переважним для насіння через низьку токсичність та швидке розкладання [28].

Процедуру виконують в асептичних умовах з використанням стерильного лабораторного посуду. Після обробки стерилізуючими агентами обов'язковим є багаторазове промивання стерильною дистильованою водою для повного видалення залишків хімічних речовин. Кінцевим етапом є

моніторинг ефективності стерилізації шляхом інкубації на поживних середовищах [25].

## 2.2. Приготування живильного середовища

Приготування живильних середовищ є фундаментальним етапом у мікроклональному розмноженні, від якого безпосередньо залежить успіх всієї процедури. Цей процес починається з підготовки компонентів. Живильне середовище – головний фактор, що обумовлює успіх МКРР. Основою усіх середовищ є мінеральні солі. Наприклад, за різного вмісту макросолей в середовищі регенеранти мають неоднаковий морфогенез. Кількісний та якісний склад макросолей детермінує онтогенез з різними особливостями; тобто MS стимулює утворення бічних пагонів і його доцільно використовувати для прискореного нарощування кількості матеріалу *in vitro*. Стандартні середовища адаптують під конкретний вид рослини та стадію культивування. Внесення компонентів проводиться в строгій послідовності: спочатку розчиняють макроелементи, потім мікроелементи, вітаміни, цукор, і лише в останню чергу – регулятори росту. Це допомагає уникнути хімічних реакцій та випадіння осаду [19].

Воду спочатку дистиллюють чи деіонізують, зазвичай підігрівають до 40-50°C для кращого розчинення компонентів.

Для оптимізації роботи рекомендується заздалегідь готувати концентровані (маточні) розчини основних компонентів – макро- та мікросолей, вітамінів та регуляторів росту. Такі розчини зручно зберігати в холодильнику при температурі 2-4°C у посуді з темного скла, але не довше 4-6 тижнів.

Макросолі готують у вигляді 10-кратного концентрату. Їх зберігають у стерильних ємностях або заморожують. Мікроелементи готують у 100-кратній концентрації, розраховуючи так, щоб 1 мл розчину містив кількість

солі, необхідну для 1 літра середовища. Їх об'єм зазвичай становить 0,1 л. Кожну сіль спочатку розчиняють окремо в невеликому об'ємі бідистильованої води. Особливу увагу приділяють хелатній формі заліза (Fe-EDTA), яка забезпечує його доступність для рослин.

Вітаміни розчиняють у бідистильованій воді до концентрації 1 мг/мл.

Фітогормони потребують особливого підходу:

- цитокініни (кінетин, зеатин, БАП) спочатку розчиняють в 1N розчині лугу або кислоти;
- ауксини (ІОК, НОК, 2,4-Д) – в невеликій кількості етанолу з подальшим додаванням води;
- гібереліни можна розчинити безпосередньо в бідистильованій воді.

Робочі розчини гормонів також мають концентрацію 1 мг/мл. Розчини вітамінів та деяких гормонів (ІОК, зеатин, гіберелін) доцільно розливати по 3-5 мл і зберігати у замороженому вигляді для підвищення стабільності.

В іншому стакані розчиняють агар-агар у дистильованій воді, нагріваючи та перемішують до повного розчинення. Гарячий агар-агар обережно змішують з розчином солей, вітамінів та сахарози. Вуглеводи (сахарозу) та органічні добавки додають безпосередньо під час приготування, зважуючи їх навішування. Після внесення всіх компонентів об'єм середовища доводять до мітки дистильованою водою та регулюють рН (зазвичай за допомогою 1N КОН чи HCl до потрібного значення). Розливають середовище у пробірки або інші ємності приблизно на 1/3 об'єму і закривають кришками (або ватними пробками чи фольгою).

Завершальним етапом є стерилізація, яку проводять методом автоклавування або фільтрування. Живильні середовища, стійкі до високих температур, стерилізують в автоклаві. Стандартний режим – тиск 0,75-1 атм та температура 115-120°C. Час обробки залежить від об'єму: для порцій по 25-50 мл достатньо 15-20 хвилин, тоді як для великих ємностей об'ємом 2-4 літри потрібно 30-40 хвилин (табл. 2.2.) [25, 30, 31].

Таблиця 2.2.

## Час стерилізації живильного середовища

Об'єм на посудину, мл	Час стерилізації, при 121°C (1атм), хв.
20-50	15
75	20
250-500	25
1000	30
2000	40

Для речовин, що руйнуються від нагрівання (наприклад, деякі гормони, вітаміни, антибіотики та білки), застосовують методи холодної стерилізації. Один із способів – обробка етиловим ефіром з подальшим його випарюванням при  $-30^{\circ}\text{C}$ . Отриманий стерильний залишок розчиняють та додають до охолодженого середовища [33].

Поширеним методом є фільтрування через спеціальні стерильні фільтри, які затримують бактерії та віруси. Для цього використовують фільтри Беркефельда, Зейтца або сучасні мембранні фільтри (наприклад, "Міліпор"). Останні виготовляють з целюлози та полімерів, а розмір їх пор може варіюватися від 25 до 14 000 нанометрів, що забезпечує високу ступінь очищення.

Також існує метод стерилізації за допомогою мікрохвильової печі, де мікрохвилі нагрівають воду всередині клітин мікроорганізмів, що призводить до їх загибелі вже за температури  $100^{\circ}\text{C}$ . Усі простерилізовані термолабільні компоненти з'єднують з основною частиною середовища виключно в стерильних умовах, використовуючи ламінарний бокс [26].

Усі маніпуляції з готовим середовищем (зокрема, висаджування експлантатів) проводять в стерильних умовах ламінарного боксу. Перед використанням партію середовища залишають на кілька днів для контролю

на стерильність. Якщо з'являються ознаки мікробного забруднення (каламутність, пліснява), середовище бракують. Готові стерильні середовища можна зберігати в холодильнику при 4-6°C протягом 2-4 тижнів [25].

### **2.3. Вибір стимуляторів росту та концентрацій**

У рамках дослідження було застосовано чотири основних регулятори росту, що представляють два ключові класи фітогормонів: ауксини та цитокініни. До ауксинів відносяться індол-3-масляна кислота (ІМК) та  $\alpha$ -нафтилоцтова кислота (НОК), тоді як до цитокінінів – 6-бензиламінопурин (6-БАП) та кінетин. Вибір цих речовин обумовлений їх доведеною ефективністю у регуляції морфогенетичних процесів у хвойних рослин, зокрема туї західної.

Дослідження передбачало вивчення впливу різних концентрацій регуляторів росту на етапах проліферації та ризогенезу. Для ІМК досліджували концентрації 0,1; 0,5; 1,0 та 1,5 мг/л, що дозволило оцінити її ефективність у індукції ризогенезу. НОК застосовували у концентраціях 0,5 та 1,0 мг/л для вивчення її впливу на ризогенез. З боку цитокінінів, 6-БАП використовували у концентраціях 0,5 та 1,0 мг/л для стимуляції проліферації пагонів, а кінетин – у концентраціях 0,5 та 1,0 мг/л для індукції органогенезу.

Способи внесення регуляторів росту включали кілька послідовних етапів. Регулятори росту додавали до поживного середовища у вигляді стерильних водних розчинів, приготовлених на дистильованій воді з подвійною фільтрацією. Процес приготування середовищ починався з приготування базового середовища з макро- та мікроелементами, з подальшим додаванням вітамінів та сахарози. Після цього вносили розраховані об'єми розчинів регуляторів росту, проводили коригування рН до оптимальних значень 5,7-5,8, і додавали агар-агар.

Стерилізація середовищ з регуляторами росту проводилася шляхом автоклавування при температурі 121°C протягом 15-20 хвилин. Після стерилізації середовище розливали в стерильні культуральні посудини в умовах ламинарного боксу. Для різних етапів мікроклонального розмноження використовували специфічні комбінації регуляторів росту. На етапі проліферації застосовували комбінацію 6-БАП (0,5-1,0 мг/л) з кінетином (0,5-1,0 мг/л), а також однаковою кількістю ІМК (0,1 мг/л) для індукції росту пагона вгору, тоді як для етапу ризогенезу використовували поєднання ІМК (1,0-1,5 мг/л) з НОК (0,5-1,0 мг/л). Контрольний варіант являв собою безгормональне середовище MS.

Вибір досліджуваних концентрацій ґрунтувався на аналізі літературних даних щодо мікроклонального розмноження хвойних рослин з урахуванням специфіки туї західної.

#### **2.4. Дослідження на різних етапах розмноження**

Експериментальна частина роботи була спрямована на вивчення впливу регуляторів росту на конкретні етапи мікроклонального розмноження туї західної, для фази ініціації та проліферації та для етапу ризогенезу. Для кожного етапу було розроблено схеми дослідження, що дозволили комплексно оцінити ефективність застосування різних типів та концентрацій фітогормонів.

На етапі ініціації та проліферації досліджували вплив цитокінінів на проліфераційну активність експлантів туї західної. Було застосовано двофакторну схему дослідження, де першим фактором виступав тип цитокініну (6-БАП та кінетин), а другим фактором – його концентрація. Контрольну групу становили експланти, культивовані на середовищі без додавання цитокінінів.

Кожен варіант дослідження включав по 15 експлантів, з яких формували три повторності по 5 експлантів у кожній. Культивування проводили на модифікованому середовищі Мурасіге-Скуга з додаванням 30 г/л сахарози та 0,7% агар-агару. Основними критеріями оцінки ефективності були: відсоток експлантів, що утворили пагони, кількість пагонів на один експлант, довжина пагонів та морфологічні характеристики отриманих мікророслин.

Для дослідження ризогенезу було розроблено схему з використанням ауксинів різного типу та концентрацій. Досліджували вплив ІМК та НОК у різних концентраціях. Експланти для дослідження відбирали з пагонів, отриманих на етапі проліферації, довжиною 2-3 см з добре розвиненими бічними пагонами.

Культивування проводили на середовищі зі зменшеним удвічі вмістом мінеральних солей та зменшеною концентрацією сахарози до 20 г/л. Оцінку результатів проводили через 6 тижнів культивування, враховуючи такі показники: відсоток експлантів, що утворили корені, кількість коренів на один експлант, довжину коренів та загальний стан кореневої системи.

## **2.5. Умови культивування**

Умови для мікроклонального розмноження рослин включають підтримку асептичних (стерильних) умов, створення відповідного поживного середовища (з необхідними солями, цукром, вітамінами, гормонами та регулюванням рН) та контрольовані фізичні параметри (температуру, освітленість). Також, як вже зазначалось, важливим є правильний відбір експланта (рослинної тканини) та оптимізація всіх умов для забезпечення росту та розвитку клонів.

Після висадження на поживні середовища рослинний матеріал розміщують у культиваційних приміщеннях із спеціально підібраними

фізичними параметрами. Стандартні умови передбачають температурний режим у діапазоні 22-27°C, відносну вологість повітря 70-85% та освітленість 3-5 кілолюкс при 16-годинному фотоперіоді. Нічне зниження температури на 2-3°C сприяє нормальному розвитку рослин-регенератів. Температурний режим підтримується за допомогою кліматичних камер з автоматичною регулюванням. Джерелом світла слугують флуоресцентні лампи холодного денного світла або спеціалізовані фітолампи. Для запобігання конденсації вологості на поверхні середовища та рослинах використовують газообмінні мембрани або перфоровані плівкові покриття. Для запобігання виділенню фенольних сполук при пересаджуванні використовують антиоксиданти (аскорбінову кислоту, цистеїн, аденін тощо). На етапі ініціації застосовують знижену інтенсивність освітлення (800-1000 лк). Під час проліферації тривалість освітлення збільшують до 18 годин. На етапі ризогенезу температуру знижують до 20-21°C для стимуляції укорінення [28].

Період адаптації характеризується інтенсивним ростом експлантів та ініціацією морфогенетичних процесів. Протягом 20-30 діб відбувається активне пагоноутворення, після чого сформовані мікропагони відокремлюють від вихідних тканин і пересаджують на свіжі поживні середовища для подальшого розмноження. Інтенсифікація розмноження досягається шляхом мікророзмноження отриманих пагонів. Під дією цитокинінів активізується процес брунькоутворення, що дозволяє з однієї материнської рослини отримати від 15 до 35 клонів. Культивування проводиться в контрольованих умовах культиваційних приміщень з періодичним пересаджуванням на нові поживні середовища для досягнення необхідних обсягів рослинного матеріалу.

Характерною особливістю методу є потенційно необмежена тривалість культивування, однак на практиці період безперервного розмноження зазвичай обмежують 1-2 роками. Таке обмеження дозволяє запобігти накопиченню соматоклональних варіацій та втраті регенераційного потенціалу культури [21].

Для туї західної оптимальним виявилось використання базового середовища Мурасіге-Скуга без додавання регуляторів росту. Найбільш ефективні параметри культивування включають температуру 21-23°C, освітленість 1800 люкс та 16-годинний фотоперіод. Для тривалого субкультивування відбирають експланти з ювенільними морфологічними ознаками, при чому вторинні експланти повинні мати розвинені мікропагони висотою 3-4 см із 2-3 міжвузлями [16].

## **2.6. Методики обліку та обробки даних**

Вибір конкретних методів обліку залежить від мети мікроклонального розмноження. Для загальної оцінки ефективності достатньо кількісних показників, тоді як для розмноження цінних сортів рослин необхідні також якісні методи контролю, що забезпечують генетичну стабільність та високу життєздатність отриманого матеріалу. Методи обліку результатів мікроклонального розмноження включають кількісну та якісну оцінку. Кількісна оцінка визначає ефективність процесу розмноження, тоді як якісна оцінка гарантує відповідність рослин вимогам.

Кількісні методи обліку включають в себе такі показники, як підрахунок рослин, отриманих із однієї вихідної клітини чи тканини; зважування біомаси (сухої або вологої) рослин для визначення темпів росту та розвитку; підрахунок пагонів, що утворилися з одного експлантату, для визначення коефіцієнта розмноження. До якісних методів обліку можна віднести оцінку життєздатності, візуальний огляд рослин на наявність зовнішніх аномалій (зміни в морфології, кольорі, формі листя), фізіологічні тести тощо.

Для кількісної оцінки ефективності мікроклонального розмноження туї західної було вивчено кожен з морфометричних показників на відповідних етапах культивування з дотриманням стандартних процедур обліку.

Облік життєздатних експлантів проводили через 14 діб після введення в культуру *in vitro*. До життєздатних відносили експланти, що зберегли тургор, мали інтактну меристематичну зону та демонстрували ознаки росту. Відсоток життєздатних експлантів розраховували за формулою (Ф1.1):

$$\frac{\text{кількість життєздатних експлантів}}{\text{загальна кількість висаджених експлантів}} \times 100\%, \#(1.1)$$

Облік проводили окремо для кожної дослідної групи з подальшим усередненням результатів.

Коефіцієнт розмноження визначали як середню кількість пагонів, що утворилися з одного вихідного експланта за один пасажний цикл. Підрахунок проводили через 30 діб культивування на середовищі з цитокінінами. Для розрахунку використовували формулу (Ф1.2):

$$КР = \frac{\sum ni}{N}, \#(1.2)$$

де  $ni$  – кількість пагонів у  $i$ -го експланта,  $N$  – загальна кількість експлантів у групі. Облік вели окремо для кожного варіанту дослідження.

Морфологічну та фізіологічну оцінку пагонів проводили за такими показниками, як вимірювання довжини пагонів та підрахунок їх кількості. Довжину пагонів вимірювали лінійкою з точністю до 1 мм. Оцінку проводили через 30 діб культивування.

Відсоток укорінення визначали також через 30 діб культивування на середовищі з ауксинами за формулою (Ф1.3):

$$\frac{\text{кількість експлантів із коренями}}{\text{загальна кількість експлантів}} \times 100\%, \# \quad (1.3)$$

Кількість коренів підраховували візуально для кожного експланта. Якість коренів оцінювали за 3-бальною шкалою: 1 бал – слабкі, тонкі корені; 2 бали – корені середньої товщини; 3 бали – потужні, добре розвинені корені.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 3.1. Відбір експлантів та введення їх в асептичні умови

Вибір експланта має суттєве значення для успішної регенерації рослини в асептичних умовах. Важливу роль відіграють такі фактори, як вік рослини-донора, положення експлантату на рослині, його розмір тощо. Найчастіше для мікроклонального розмноження використовується метод активації розвитку рослинних меристем, який ми і було взято для цієї роботи. Тому було використано невеликі сегменти верхівок пагонів ювенільних рослин віком 2 роки довжиною  $5 \pm 1$  мм без виражених зовнішніх ознак ураження хворобами. Відбір проводився у фазі активного весняного приросту.

Перед стерилізацією експланти піддавались попередній обробці. Зокрема частини рослини промивали в стерильній мильній воді шляхом постійного перемішування, а також обробляли розчином фунгіциду, по 20 хв на кожний процес. Далі експланти занурювали в 70% етиловий спирт на 45 секунд, обробляли 20 % розчином гіпохлориту натрію з подальшим перенесенням в 0,1% розчин сулеми ( $\text{HgCl}_2$ ) на 5 хв, після чого сегменти промивали 5 разів у стерильній дистильованій воді (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Схема стерилізації експлантів

№	Стерилізаційний агент	Концентрація	Експозиція
1	$\text{H}_2\text{O}$ + детергент	10 г/л	20 хв
2	Фунгіцид	-	20 хв
3	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	70%	45 с
4	$\text{NaClO}$	20%	10 хв
5	$\text{HgCl}_2$	0,1%	5 хв

Запропонована схема стерилізації дозволила мінімізувати рівень контамінації та забезпечити високу життєздатність експлантів, а саме 83 %.

Для забезпечення асептичних умов культивування проводилась ретельна підготовка лабораторного посуду. Баночки для розливу поживного

середовища піддавались попередній обробці, що включав миття з використанням мийних засобів, багаторазове промивання теплою проточною водою та фінальне ополіскування дистильованою водою. Після механічного очищення посуд висушувався та стерилізувався в сухожаровій шафі протягом 2 годин при температурі 160°C, що гарантувало повну елімінацію мікроорганізмів.

В якості базового поживного середовища використовувалося середовище Мурасіге-Скуга (MS), яке готувалося за стандартною методикою. Стерилізація середовища проводилась шляхом автоклавування в герметично закритих баночках протягом 15 хвилин за температури 121°C та тиску 1 атм. Такий режим стерилізації забезпечував повну дезінфекцію середовища при збереженні його хімічного складу та біологічної активності.

Висаджування експлантів проводилося в строго асептичних умовах ламінарного боксу. Перед початком роботи робоча поверхня боксу ретельно оброблялася 96% етиловим спиртом. Проводилась періодична дезінфекція рук етиловим спиртом під час процесу. Металевий інструментарій (пінцети, скальпелі) піддавався попередній стерилізації в сушильній шафі протягом 2 годин при 160°C з подальшою обробкою спиртом та обпалюванням над полум'ям спиртівки (рис. 3.1).

Перед кожним висаджуванням інструменти охолоджували на спеціальній підставці для запобігання термічного ушкодження рослинних тканин. Процедура стерилізації інструментів повторювалася перед кожною новою маніпуляцією з експлантами. Висаджування проводилось швидко та точно для мінімізації часу перебування експлантів поза асептичними умовами, що значно знижувало ризик вторинної контамінації та забезпечувало високу приживлюваність культивованих зразків. Ефективність стерилізації спостерігали через 10 днів.



Рис. 3.1. Висаджування стерильних експлантів на живильне середовище

### **3.2. Визначення оптимального складу живильних середовищ для проліферації та укорінення мікропагонів**

Після завершення стерилізації проводилось висадження підготовлених експлантів на поживне середовище. Для введення експлантів у стерильні умови використовувалося середовище Мурасіге-Скуга у стандартній модифікації без додавання регуляторів росту. Вибір даного середовища обумовлений його універсальністю та доведеною ефективністю для культивування рослин *in vitro*. Концентрації всіх компонентів підтримувалися на рівнях, визначених оригінальною методикою. Сахарозу використовували як джерело вуглеводів у концентрації 30 г/л, що забезпечує оптимальний осмотичний тиск та енергетичні потреби культивованих експлантів.

Для стабілізації структури середовища додавався агар-агар. Кислотність середовища коригували до рН 5,7-5,8, що є оптимальним для більшості рослинних культур. Стерилізацію проводили автоклавуванням за стандартним режимом. Висадження експлантів виконували в асептичних умовах ламінарного боксу з використанням стерильного інструментарію.

Процес приготування базового живильного середовища Мурасіге-Скуга розпочинався з послідовного додавання компонентів у дистильовану воду об'ємом 200 мл. На етапі розчинення макросолей використовувалася магнітна мішалка для забезпечення рівномірного розподілу речовин. Додавання мікроелементів, включаючи хелатні форми заліза, проводилося згідно зі стандартними прописами середовища Мурасіге-Скуга (табл. 3.2.). Вітамінні добавки вносилися після повного розчинення мінеральних компонентів.

Після введення сахарози та доведення об'єму до 500 мл проводився контроль кислотності середовища. Значення рН підтримувалося в діапазоні 5,6-5,8 шляхом додавання 0,1N розчинів КОН або НСІ. Агар-агар у концентрації 7-8 г/л попередньо замочувався у холодній воді протягом 20 хвилин з подальшим нагріванням до повного розчинення. Отриманий розчин з'єднувався з поживною основою та доводився дистильованою водою до кінцевого об'єму 1 літр. Тепле середовище розливалось у культуральну посудину приблизно на  $\frac{1}{4}$  їх об'єму та стерилізувалося в автоклаві за режимом 1,2 атм при температурі 105-110°C. Після розливу посудини герметизувалися стерильними кришками та піддавалися автоклавуванню. Стерилізація проводилася за стандартним режимом, що гарантувало повну дезінфекцію середовища та посудин.

Робочі розчини ауксинів (НОК, ІМК) готувалися шляхом початкового розчинення 100 мг речовини в 0,5-2 мл етилового спирту з подальшим додаванням дистильованої води до об'єму 100 мл. Цитокініни (кінетин, 6-БАП) розчиняли у 0,5N розчині НСІ з наступним розведенням дистильованою водою до необхідних концентрацій.

Таблиця 3.2.

Склад безгормонального живильного середовища Мурасіге-Скуга

№	Компонент	Концентрація, г/л
1	Макросолі	100
2	Мікросолі	1

3	Вітаміни	1
4	Fe-хелат	5
5	Ca Cl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	100
6	Інозитол	0,1
7	Сахароза	30
8	Агар	6,8

Висадження підготовлених експлантів проводилося в умовах ламінарного боксу з дотриманням всіх правил асептики. Попередньо стерильні експланти піддавалися механічній обробці – за допомогою скальпеля та ножиць їх розділяли на сегменти оптимального розміру для культивування. Кожен експлант розміщували на поверхні поживного середовища. Загалом було підготовлено 10 баночок по 5-6 експлантів у кожній.

Через приблизно місяць після введення туї західної в стерильні умови, експланти пересаджувалися на свіжоприготовані живильні середовища з різним вмістом стимуляторів росту для постановки задуманих досліджень (3.2).



Рис. 3.2. Утворення пагонів туї західної

Для вивчення впливу стимуляторів росту на індукції утворення мікропагонів було обрано наступні концентрації цитокинінів (табл.3.3.):

Таблиця 3.3.

Вміст цитокінінів у живильному середовищі для пагоноутворення

Варіант	6-БАП (мг/л)	Кінетин (мг/л)	ІМК (мг/л)	Опис
В1	1,0	0	0,1	6-БАП + ІМК
В2	0	1,0	0,1	Кінетин + ІМК
В3	0,5	0,5	0,1	Обидва цитокініни + ІМК
В4	1,0	0,5	0,1	Підвищений БАП + Кін + ІМК
В5	0,5	1,0	0,1	Підвищений Кін + БАП + ІМК

Для індукції проліферації необхідна помірна концентрація ауксину (ІМК – 0,1 мг/л) у поєднанні з вищими концентраціями цитокінінів. Ауксин додається для підтримки життєздатності експлантів та забезпечення біполярності росту. Концентрації для варіантів 1 та 4 (1,0 мг/л) обрані для тестування проліферативного потенціалу. Однак, відомо, що високий рівень 6-БАП може призводити до гіпергідратації (водянистості) мікропагонів та інтенсивного калюсоутворення у базальній частині, що є негативним фактором. Варіанти 2 та 5 (1,0 мг/л Кін) використовується для порівняння ефективності з 6-БАП та для перевірки, чи сприяє він подовженню пагонів перед наступним етапом укорінення. Варіант 3 із однаковими концентраціями тестує синергічний ефект двох цитокінінів при їх помірних дозах. Часто збалансована суміш забезпечує максимальний відсоток індукції без виражених негативних морфологічних змін. Незбалансовані комбінації варіантів 4 та 5 (1,0 + 0,5 мг/л) обрані для визначення оптимального співвідношення між стимуляторами і виявлення можливого інгібування при надлишку одного з гормонів.

Після одержання потрібної кількості клонів, їх переносять на середовище для укорінення та отримання повноцінних рослин. На цьому

етапі цитокініни, що використовувалися для проліферації, виключаються або мінімізуються, оскільки ауксин-цитокініновий баланс зміщується на користь ауксину. Для індукування росту адвентивних коренів здійснювали пересадку мікропагонів туї, культивованих в умовах *in vitro*, на поживне середовище  $\frac{1}{2}$  MS, тобто таке, яке має удвічі меншу концентрацію макроелементів і мікроелементів, порівняно із середовищем за базовим прописом.

Для дослідження впливу гормонів росту на коренеутворення обиралися такі концентрації (табл. 3.4.):

Таблиця 3.4.

Вміст ауксинів у живильному середовищі для ризогенезу

Варіант	ІМК (мг/л)	НОК (мг/л)	Опис
У1	1,0	0,5	Стандартна комбінація
У2	1,5	0,5	Підвищена ІМК, стандартна НОК
У3	1,0	1,0	Рівні концентрації
У4	0,5	1,0	Зниження ІМК, підвищення НОК

Варіанти 1 та 2 обрані для тестування оптимальної дози ІМК та як підтримуюча концентрація НОК. Варіант 3 тестує ефект рівних, високих доз двох сильних ауксинів. Це може призвести до максимальної кількості коренів, але також має ризик інгібування або надмірного калюсоутворення. У варіанті 4 досліджується вплив низької концентрації ІМК та високої НОК, що дозволяє визначити, чи здатна вища доза НОК компенсувати зниження ІМК і чи не призведе це до формування коротших коренів, що є типовим ефектом НОК.

### 3.3. Вплив регуляторів росту на пагоноутворення рослин

Дослідження показало значний вплив гормонального складу середовища на інтенсивність та морфологію утворення мікропагонів (таблиця 3.5.):

Таблиця 3.5.

## Вплив цитокінінів на ефективність індукції та проліферації пагонів

Варіант	% пагоноутворення	Середня кількість пагонів на експлант (шт)	Довжина пагонів (см)
<b>К</b>	15,0 ± 3,5	1,1 ± 0,2	1,5 ± 0,3
<b>В1</b>	75,0 ± 4,8	<b>4,5 ± 0,6</b>	1,8 ± 0,4
<b>В2</b>	60,0 ± 5,1	3,2 ± 0,4	2,2 ± 0,3
<b>В3</b>	<b>85,0 ± 3,0</b>	4,0 ± 0,5	2,0 ± 0,4
<b>В4</b>	80,0 ± 4,2	3,9 ± 0,5	1,3 ± 0,3
<b>В5</b>	70,0 ± 4,9	3,5 ± 0,4	<b>2,5 ± 0,5</b>

Кількість експлантів на один варіант становила 15 шт.

Контрольний варіант (К) – експланти без додавання стимуляторів росту продемонстрували мінімальну регенеративну здатність, забезпечивши лише 15,0 ± 3,5% пагоноутворення із середньою кількістю 1,1 ± 0,2 пагона на експлант. Ці результати підтверджують необхідність екзогенних цитокінінів для ефективною індукції проліферації.

Варіант 1 (1,0 мг/л 6-БАП) забезпечив найвищий показник середньої кількості пагонів (4,5 ± 0,6 шт.), підтверджуючи високу проліферативну активність 6-БАП. Однак, відсоток індукції був середнім (75,0 ± 4,8%), а пагони були відносно короткими (1,8 см).

Варіант 2 (1,0 мг/л кінетину) виявився менш ефективним для індукції та множення (60,0 ± 5,1% та 3,2 ± 0,4 шт.), але сприяв кращому витягуванню пагонів (2,2 ± 0,3 см) порівняно з В1.

Оптимальний варіант 3 (0,5 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л кінетину) співвідношення цитокінінів виявилось найкращим для ініціації процесу з максимальним відсотком пагоноутворення (85,0 ± 3,0%). Це свідчить про синергічний ефект помірних доз гормонів, що дозволяє досягти високої частоти регенерації при добрій якості пагонів (2,0 ± 0,4 см).

У варіанті 4 (1,0 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л кінетину) висока доза 6-БАП призвела до істотного інгібування подовження пагонів, які досягли лише 1,3 ± 0,3 см. Це підтверджує, що надлишок 6-БАП пригнічує елонгацію.

B5 (0,5 мг/л 6-БАП + 1,0 мг/л кінетину) незважаючи на менший % пагоноутворення ( $70,0 \pm 4,9\%$ ), цей варіант дав найбільшу середню довжину пагонів ( $2,5 \pm 0,5$  см), що є наслідком домінування кінетину, який сприяє витягуванню, роблячи ці пагони ідеальними для наступного етапу укорінення.

Тож у висновок можна сказати, що для масового розмноження найбільш перспективним є варіант 3, який забезпечує максимальний відсоток індукції. Для етапу подовження та підготовки до ризогенезу рекомендовано використовувати середовище 5.

З метою наочної демонстрації впливу гормонального складу поживного середовища на ключові показники цього етапу, було побудовано графічні залежності (рис.3.3):

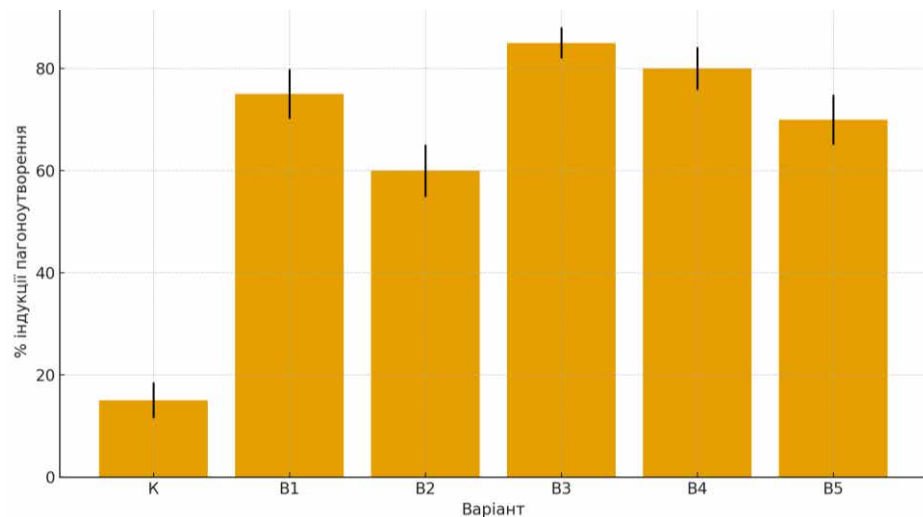


Рис. 3.3. Відсоток індукції утворення пагонів (простежується домінування варіанта 3)

А також наочне графічне зображення кількості утворених пагонів та їх довжини (рис.3.4):

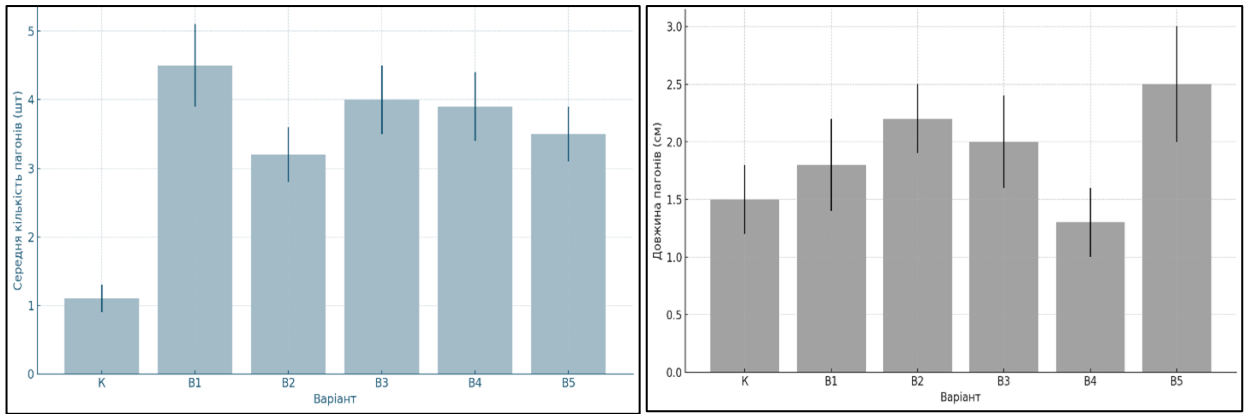


Рис. 3.4. Середня кількість утворених пагонів туї західної (ліворуч) та їх середня довжина (праворуч)

Аналіз показує, що хоч варіант 3 і забезпечив максимальну частоту індукції (85,0%), найвищий коефіцієнт розмноження за кількістю пагонів (4,5 шт.) отримано у варіанті 1, а найбільшу довжину (2,5 см) – у варіанті 5, що вказує на зміщення фізіологічної активності цитокінінів. Введення цитокінінів є ключовим фактором для запуску морфогенезу *in vitro*, а найбільш ефективними є комбінації регуляторів із середніми концентраціями.

### 3.4. Вплив стимуляторів росту на ризогенез рослин

Результати експерименту продемонстрували, що співвідношення та концентрація ауксинів ІМК та НОК суттєво впливають як на відсоток укорінення, так і на морфометричні показники кореневої системи (табл. 3.6.).

Таблиця 3.6.

#### Вплив ауксинів на ефективність укорінення мікропагонів

Варіант	% укорінення	Середня кількість коренів (шт)	Середня довжина коренів (см)
К	5,0 ± 1,5	1,0 ± 0,3	0,5 ± 0,1
У1	70,0 ± 5,0	3,1 ± 0,5	1,8 ± 0,4
У2	90,0 ± 3,5	5,5 ± 0,7	2,5 ± 0,5
У3	75,0 ± 4,5	4,0 ± 0,6	2,0 ± 0,4
У4	65,0 ± 5,2	3,5 ± 0,5	2,3 ± 0,4

Експланти, культивовані без додавання ауксинів, показали вкрай низьку здатність до спонтанного коренеутворення ( $5,0 \pm 1,5\%$  укорінення), що підкреслює необхідність екзогенних стимуляторів для успішної індукції ризогенезу *Thuja occidentalis*.

Варіант 2 (1,5 мг/л ІМК + 0,5 мг/л НОК) виявився найефективнішим, забезпечивши максимальний % укорінення ( $90,0 \pm 3,5\%$ ) та найбільшу середню кількість коренів ( $5,5 \pm 0,7$  шт.). Це свідчить про те, що для ініціації ризогенезу цього генотипу необхідна підвищена концентрація ІМК, яка виступає як основний індуктор корневих примордіїв, тоді як низька концентрація НОК виконує підтримуючу функцію.

Варіант 1 (1,0 мг/л ІМК + 0,5 мг/л НОК) хоч і продемонстрував високий рівень укорінення ( $70,0 \pm 5,0\%$ ), він був менш ефективним, ніж другий, що підтверджує недостатність 1,0 мг/л ІМК для досягнення максимального ефекту.

Варіант 3 (1,0 мг/л ІМК + 1,0 мг/л НОК) показує, що підвищення концентрації НОК до 1,0 мг/л призвело до помірного зниження відсотка укорінення ( $75,0 \pm 4,5\%$ ) порівняно з варіантом 2. Це може бути ознакою початку фітотоксичної дії або надмірного гормонального навантаження, що частково пригнічує повну реалізацію процесу.

Варіант 4, з акцентом на НОК (0,5 мг/л ІМК + 1,0 мг/л НОК), мав найнижчий відсоток укорінення серед усіх дослідних груп ( $65,0 \pm 5,2\%$ ). Проте, він забезпечив найбільшу середню довжину коренів ( $2,3 \pm 0,4$  см). Це підтверджує, що висока частка НОК у співвідношенні сприяє витягуванню коренів, що є важливим для подальшої адаптації рослин *ex vitro*.

Отже, в даному випадку оптимальним середовищем для індукції ризогенезу *Thuja occidentalis* є варіант У2, оскільки він забезпечує максимальний вихід укорінених мікророслин. Проте, для досягнення якісної, довшої кореневої системи, варіант У4 може бути розглянутий як середовище для подальшої елонгації коренів.

Вплив ауксинів на відсоток укорінення та середню кількість коренів *Thuja occidentalis* також зображено на гістограмах (рис. 3.5., рис. 3.6.):

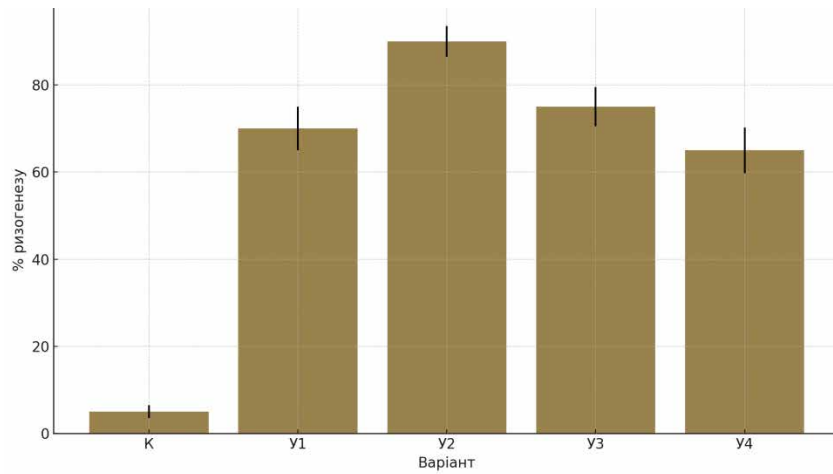


Рис. 3.5. Відсоток укорінення пагонів туї західної

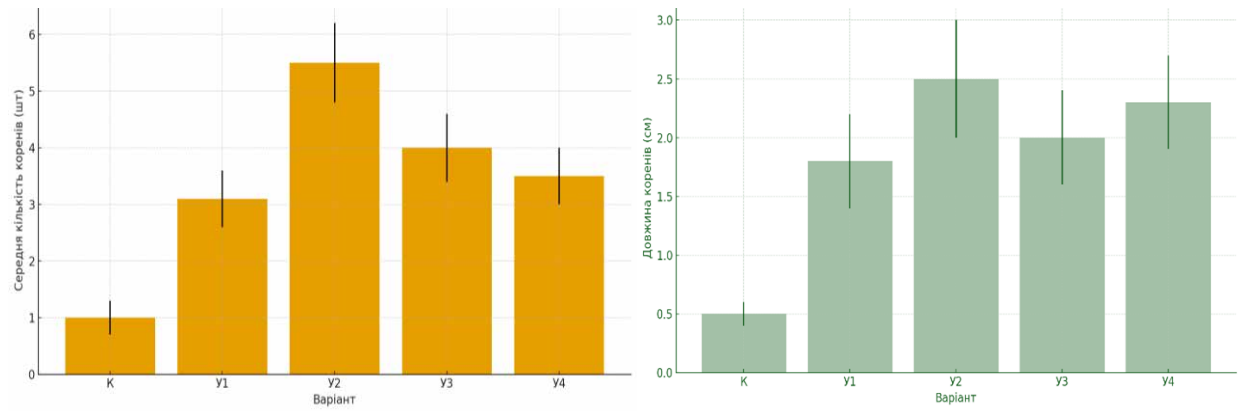


Рис. 3.6. Середня кількість (ліворуч) та довжина утворених коренів (праворуч)

Таким чином, результати демонструють, що для ефективного ризогенезу *Thuja occidentalis* оптимальним є застосування підвищених концентрацій ІМК у поєднанні з низькими дозами НОК.

Також на основі отриманих даних було виконано оцінку утворених коренів у кожному варіанті за 3-бальною шкалою (табл. 3.7):

Таблиця 3.7

Оцінка якості утворених коренів *Thuja occidentalis*

Варіант	Оцінка (1–3 бали)	Пояснення
К	1	Слабкі, тонкі, поодинокі корені, низький рівень розвитку.
У1	2	Корені середньої товщини, помірно розвинені, сформована базова коренева система.
У2	3	Потужні, добре розвинені, численні корені — найвищий рівень ризогенезу.
У3	2	Коренева система середньої сили, достатньо добре розвинена, але поступається У2.
У4	2	Добре сформовані корені, однак менша інтенсивність порівняно з оптимальними умовами.

## ВИСНОВКИ

1. Аналіз наукової літератури підтвердив перспективність застосування технології *in vitro* для розмноження *Thuja occidentalis*. Встановлено, що існуючі методи вегетативного розмноження мають низьку ефективність через повільне зростання та складність укорінення. Мікроклональне розмноження дозволяє подолати ці обмеження шляхом отримання генетично однорідного матеріалу з високим коефіцієнтом розмноження.

2. Оптимальний режим стерилізації експлантів включає послідовну обробку мильним розчином води (20 хв), фунгіцидом (20 хв), 70% етанолом (45 с), 20% розчином гіпохлориту натрію (10 хв) та 0,1% розчином хлориду ртуті (5 хв). Дана схема забезпечила виживаність експлантів 83%. Використовувалися апікальні меристеми, які дали найшвидшу ініціацію росту.

3. Дослідження впливу цитокінінів показало, що оптимальним для проліферації пагонів є середовище Мурасіге-Скуга з додаванням комбінації 0,5 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л кінетину + 0,1 мг/л ІМК. Цей варіант забезпечив індукцію пагонів 85% та середню кількість  $4,0 \pm 0,5$  пагонів на експлант. Комбіноване застосування цитокінінів показало вищу ефективність порівняно з їх окремим використанням.

4. Для етапу ризогенезу найбільш ефективною виявилася комбінація 1,5 мг/л ІМК + 0,5 мг/л НОК, що забезпечила 90% укорінення з середньою кількістю  $5,5 \pm 0,7$  коренів на пагін. Підвищення концентрації ІМК сприяло інтенсифікації коренеутворення, тоді як зниження її концентрації призводило до погіршення результатів.

5. Аналіз результатів дослідження довів ефективність розробленого протоколу мікроклонального розмноження *Thuja occidentalis*. Запропонована методика дозволяє отримати високий коефіцієнт розмноження та ефективно укорінення. Оптимізовані гормональні композиції та режими культивування

забезпечують стабільне отримання якісного посадкового матеріалу, що має значний потенціал для комерційного застосування декоративних культур.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Олейнікова О.М. Садові декоративні рослини / Харків : Веста, 2010. С. 128. ISBN 978-966-08-4940-2.
2. Туя (Thuja) сімейство кипарисових (Cupressaceae) : вебсайт. URL: <https://landshaft.org.ua/khvoyni-dereva-ta-kushchi/tuy-vydy-i-sorty>
3. Thuja Occidentalis – Eastern White Cedar Cupressaceae (Cypress Family) : вебсайт. URL: <https://www.borealforest.org/thuja-occidentalis-eastern-white-cedar/>
4. The Gymnosperm Database : вебсайт. URL: <https://www.conifers.org/cu/Thuja.php>
5. Туя західна : вебсайт. URL: <https://www.ieenas.org/p/tuia-zakhidna/>
6. Лікарські рослини : енциклопедичний довідник / за ред. А. М. Гродзінського. Київ : Видавництво «Українська Енциклопедія» ім. М. П. Бажана, Український виробничо-комерційний центр «Олімп», 1992., С. 437. ISBN 5-88500-055-7.
7. The IUCN Red List of Threatened Species. : вебсайт. URL: [https://web.archive.org/web/20060220013925/http://www.redlist.org/info/categories\\_criteria2001](https://web.archive.org/web/20060220013925/http://www.redlist.org/info/categories_criteria2001)
8. Caruntu S, Ciceu A, Olah NK, Don I, Hermenean A, Cotoraci C. Thuja occidentalis L. (Cupressaceae): Ethnobotany, Phytochemistry and Biological Activity. *Molecules*. 2020 Nov 19;25(22):5416. doi: 10.3390/molecules25225416
9. Altman, A., Loberant, B. Micropropagation: clonal plant propagation in vitro. *Agricultural biotechnology*, 1998. 19-42 с.
10. George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G.-J. D. (n.d.). Micropropagation: Uses and Methods. *Plant Propagation by Tissue Culture*, 29–64. doi:10.1007/978-1-4020-5005-3\_2
11. Котелевець А.І., Булат А.Г. Особливості вегетативного розмноження декоративних форм туї західної. Стан і майбутнє лісового господарства та землевпорядкування : матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. Здобувачів вищої освіти та молодих вчених 15-16 лист. 2022 р. Харків : ДБТУ, 2022. С. 72

12. Маурер В. М. Декоративне розсадництво з основами насінництва. К. Арістей, 2006. 273 с
13. Лісовий М.М. Особливості автовегетативного розмноження декоративних форм *Thuja occidentalis* L. Науковий вісник НЛТУ України. 2015, Т. 25, № 9. С. 57-62
14. Gupta, N., Jain, V., Joseph, M., & Devi, S. (2020). A Review on Micropropagation Culture Method. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 8(1), 86-93. doi: <http://dx.doi.org/10.22270/ajprd.v8i1.653>
15. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи: Моногр. / В. А. Кунах; НАН України. Ін-т молекуляр. біології і генетики. К. : Логос, 2005. 724 с.
16. Подгаєцький А.А. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин : монографія / А.А. Подгаєцький, В. В. Мацкевич, А.Ан. Подгаєцький. Біла Церква : БНАУ, 2018. 209 с.
17. Лісовий М. М. Вплив стимуляторів росту на ініціацію експлантів *Thuja Occidentalis* L. в умовах *in vitro*. Науковий вісник НЛТУ України. 2019, т. 29, № 5. С. 47–50. <https://doi.org/10.15421/40290509>
18. Tokman V. Optimization of elements of cultivation technology of ornamentals in the North-eastery part of of forest Steppe of Ukraine. *SciensRice Biological Science*. 2017. Vol. 3(6). P. 27-33
19. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plantarum*.–1962.– Vol. 15. – P. 473-497.
20. Мікроклональне розмноження рослинного матеріалу : Методичні вказівки. Умань: УНУС, 2019. 16 с
21. Мацкевич В.В. Ефективність тривалого клонального мікророзмноження *Thuja occidentalis* ‘Smaragd’ залежно від компонентів живильного середовища та стану експлантів / В. В. Мацкевич, М. Ю. Власенко, Л. М. Філіпова // Збірник праць уманського національного університету садівництва «Агрономія». 2010. Вип. 74. С. 324-329

22. Галузі сучасної біотехнології : підручник для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Дігтяр С. В., Єлізаров М. О., Мазницька О. В., Никифорова О. О., Новохатько О. В., Пасенко А. В., Сакун О. А. Загальна редакція професора Никифорова В. В. Кременчук: ПП Щербатих О.В., 2021 – 126 с. ISBN 978-617-639-311-5

23. Мікроклональне розмноження в культурі *in vitro*: можливості та переваги використання. Рибальченко А.М., Криворучко Л.М., № 10 (2024): Український журнал природничих наук, 2024, <https://doi.org/10.32782/naturaljournal.10.2024.14>

24. Лісовий М. М. Особливості отримання асептичної культури *Thuja occidentalis* L. в умовах *in vitro* / М. М. Лісовий // Науковий вісник НЛТУ України. 2017. Вип. 27(9). С. 27-29.

25. Кушнір Г. П. Мікроклональне розмноження рослин / Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька. К.: Наукова думка, 2005. 271 с.

26. Григорюк І. П. Біоенергетичні основи стійкості озимої пшениці до посухи: Моногр. / І. П. Григорюк, В. І. Ткачов, М. Ф. Михальський, О. І. Серга; НАН України. Ін-т фізіології рослин і генетики, Київ. нац. ун-т ім. Т.Шевченка. К. : Наук. світ, 2004. 202 с.

27. Нижник Т.П. Фізіологічні основи та способи підвищення стійкості картоплі до посухи 2001 року: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: 03.00.12 «Фізіологія рослин» / Т. П. Нижник. К., 2001. 21 с.

28. Мацкевич В.В., Подгаєцький А.А., Філіпова Л.М. Мікроклональне розмноження окремих видів рослин (протоколи технологій): науково-практичний посібник. Біла Церква: БНАУ, 2019. 85 с.

29. Туя західна: вирощування в саду, опис сортів : вебсайт. URL: <https://floristics.info/ua/statti/sadivnitstvo/3909-tuya-zakhidna-posadka-i-doglyad-opis-sortiv.html#s9>

30. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л. Біотехнологія в агросфері. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. Київ, 2014, 247 с.

31. Лабораторний практикум з біотехнології. Методичні рекомендації до лабораторних робіт з циклу "Розмноження рослин *in vitro*" для студентів біологічного факультету денної та заочної форми навчання. Колесник А.В., Сікура А.О., Гедзур Т.І., Ужгород, 2023, 30с.

32. Gaspar T., Kevers C., Penel C. et al. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 32, 272–289 (1996). <https://doi.org/10.1007/BF02822700>

33. Kabir M., Roy P., & Ahmed G. (2008). *In vitro* Propagation of *Thuja occidentalis* Through Apical Shoot Culture. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 16(1), 5–9. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v16i1.1099>

34. Kentelky, E., Szekely-Varga, Z. (2022). Effect of the cutting length and propagation on three *Thuja occidentalis* varieties. *Current Trends in Natural Sciences*, 11(21), 440-447. <https://doi.org/10.47068/ctns.2022.v11i21.048>

35. Методичні рекомендації для мікроклонального розмноження деревних та трав'янистих рослин. – К.: НАУ, 2003. – 40 с.

36. Мусієнко М.М., Панюта О.О. Біотехнологія рослин. Навчальний посібник. – К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. – 114 с.

37. Ewald D., Naujoks G., Schneck V. Micropropagation of fast growing tree species as possible alternatives for agriculture *Poznan/ Polen*, 07. – 08.09.2005.

38. Сільськогосподарська біотехнологія Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 6.051401 «Екобіотехнологія»/Укладачі: Лобова О.В., Пилипчук О.О. – Київ, 2014. –20 с

39. Chen L., Wang Y. Effects of plant growth regulators on *in vitro* propagation of coniferous species // *Trees*. – 2019. – Vol. 33. – P. 345-357.

40. Thorpe T.A. History of plant tissue culture // *Molecular Biotechnology*. – 2007. – Vol. 37. – P. 169-180.

41. Фітогормони : вебсайт. URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/401/fitogormoni>

42. Розмноження та вирощування туй: що потрібно знати : вебсайт.  
URL: <https://plants-club.ua/rozmnozhennia-tuj-shco-potribno-znaty?srsId=AfmBOop9IBB55n9m33DLOoItZa4avhBgZqpnVseDjdBesRp-huJdxyXF>

43. Younes K., Abouzied A., Alqarni S., Elakashlan A., Hussein W., Alhathal R., Albsher R., Alshammari S., Huwaimel B. Biological Activities and Phytochemical Screening of *Thuja occidentalis* Extracts with In Silico Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 2025, 26, 939. <https://doi.org/10.3390/ijms26030939>

44. I.S. Harry, T.A. Thorpe. Micropropagation of Cedar (*Thuja* spp.). *High-Tech and Micropropagation II*, Springer Science & Business Media, 2012, P. 82-95 ISBN 3642764223, 9783642764226

**ДОДАТКИ**

Додаток А

*XVI Міжнародна науково-практична конференція «Практичні та теоретичні питання розвитку науки та освіти»*

---

**ЛЬВІВСЬКИЙ НАУКОВИЙ ФОРУМ**

МАТЕРІАЛИ

XVI МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ  
КОНФЕРЕНЦІЇ

**ПРАКТИЧНІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ  
РОЗВИТКУ НАУКИ ТА ОСВІТИ**

22-23 листопада 2025 року

**ЛЬВІВ  
2025**

## ЗМІСТ

<b>БІОЛОГІЧНІ НАУКИ.....</b>	<b>8</b>
<i>Майданович Н.Р.</i> НОВІ ПІДХОДИ ДО ВИВЧЕННЯ ОТРИМАННЯ БЕЗВІРУСНОГО ПОСАДКОВОГО МАТЕРІАЛУ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН НА ПРИКЛАДІ SALVIA OFFICINALIS L.....8	
<i>Павленко Ю.С., Коломієць Ю.В.</i> ВПЛИВ СТИМУЛЯТОРІВ РОСТУ НА МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ THUJA OCCIDENTALIS В УМОВАХ IN VITRO.....10	
<b>ДЕРЖАВНЕ УПРАВЛІННЯ .....</b>	<b>14</b>
<i>Мельничук Н.Б.</i> РІВЕНЬ ПРОТИДІЇ КОРУПЦІЇ В РЕГІОНАХ СВІТУ. ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ .....	
	14
<b>ЕКОНОМІЧНІ НАУКИ .....</b>	<b>18</b>
<i>Михайлова С.С.</i> ПОРІВНЯННЯ ЕКОНОМІЧНИХ МОДЕЛЕЙ ВЕЛИКОЇ БРИТАНІЇ ТА УКРАЇНИ: СУЧАСНИЙ СТАН І ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ .....	
	18
<i>Пінчук В.В.</i> FINANCIAL PERFORMANCE AND MARKET POSITION OF ASML HOLDING: A STRATEGIC ANALYSIS .....	
	22
<b>ІСТОРИЧНІ НАУКИ.....</b>	<b>26</b>
<i>Березовська Т.І.</i> МОЛОДЬ ЯК РУШІЙ ПЕРЕОСМИСЛЕННЯ ІСТОРИЧНОЇ ПРАВДИ.....	
	26
<i>Гончаренко С.В., Соколова Н.Д.</i> ВІЙСЬКОВІ ТРАДИЦІЇ УКРАЇНСЬКОГО КОЗАЦТВА.....	
	29
<i>Осітін К.О.</i> РОЛЬ ОРГАНІЗАЦІЇ ОБ'ЄДНАНИХ НАЦІЙ У СТАНОВЛЕННІ СИСТЕМИ МІЖНАРОДНОГО ЗАХИСТУ ПРАВ ЛЮДИНИ.....	
	34
<i>Пруденко Г.М., Запорожченко Ю.В.</i> «САМОСТІЙНА УКРАЇНА» М.МІХНОВСЬКОГО: ГОЛОВНІ ІДЕЇ ТА ЇХ ВПЛИВ НА РОЗВИТОК УКРАЇНСЬКОГО НАЦІОНАЛІЗМУ».....	
	37
<b>МЕДИЧНІ НАУКИ .....</b>	<b>39</b>
<i>Вояківський А., Тяпченко О.М.</i> ЦИФРОВА ВЗАЄМОДІЯ МЕДИЧНОГО ОБЛАДНАННЯ: СТАНДАРТИ ПЕРЕДАЧІ ДАНИХ У СУЧАСНІЙ МЕДИЦИНІ .....	
	39
<i>Кузюра К.В., Тяпченко О.М.</i> ЕЛЕКТРОННА МЕДИЧНА КАРТА: ПЕРЕВАГИ, ПРОБЛЕМИ ВПРОВАДЖЕННЯ ТА ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ В УКРАЇНІ.....	
	41

*Павленко Юлія Сергіївна*  
*здобувачка вищої освіти ступеня магістра*  
*Коломієць Юлія Василівна*  
*доктор сільськогосподарських наук, професор*  
*Національний університет*  
*біоресурсів і природокористування України*  
*м. Київ*

## **ВПЛИВ СТИМУЛЯТОРІВ РОСТУ НА МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ THUJA OCCIDENTALIS В УМОВАХ IN VITRO**

Туя західна (*Thuja occidentalis*) – цінна декоративна культура, що широко використовується в декоративному садівництві для створення живоплотів, групових посадок тощо. Відомо понад 120 декоративних сортів, що відрізняються формою крони, забарвленням хвої та розмірами. Ефірна олія туї містить туйон, фенхон, сабінен та інші біологічно активні речовини, що зумовлює її застосування в народній медицині як антисептичний та протизапальний засіб. Деревина туї легка, м'яка, стійка до гниття, тож використовується також і в промисловості. Традиційні розсадницькі методи розмноження не завжди забезпечують стабільну якість і достатній обсяг садивного матеріалу, а також мають ризики поширення інфекцій. При насінневому розмноженні спостерігається значне розщеплення ознак, що обумовлює необхідність вегетативного розмноження для збереження сортових характеристик [1, 4].

Стрімкий розвиток біотехнології останніх десятиліть відкриває нові можливості для відтворення цінних видів рослин. Перспективним напрямом є мікроклональне розмноження в умовах *in vitro*, що ґрунтується на тотипотентності рослинних клітин, тобто здатності рослини відновлювати цілий організм із однієї клітини. Цей метод дозволяє отримувати генетично однорідний оздоровлений матеріал незалежно від сезону, що особливо важливо для декоративних культур. Процес мікроклонального розмноження включає чотири етапи: ініціацію, проліферацію пагонів, укорінення та адаптацію. Критичним фактором є підбір компонентів живильного середовища, особливо співвідношення цитокінінів (для стимуляції пагоноутворення) та ауксинів (для індукції ризогенезу). Технологія *in vitro* дозволяє отримувати якісний садивний матеріал, проте її ефективність залежить від оптимізації складу середовищ та режимів культивування. Навіть незначні відхилення у концентраціях регуляторів росту можуть суттєво впливати на морфогенез [2].

Актуальність дослідження зумовлена зростаючим попитом на якісний посадковий матеріал для озеленення. Мікроклональне розмноження дозволяє отримувати генетично однорідні оздоровлені рослини протягом року, незалежно від сезону. Враховуючи високі декоративні якості та адаптаційні властивості, туя західна залишається однією з найпопулярніших хвойних культур в Україні, а впровадження сучасних