

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології**

**УДК 582.929:615.322:579.61**

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

**БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**на тему «Введення ялини голубої (*Picea pungens* L.) в культуру *in vitro*»**

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**Гарант освітньої програми**

Кандидат біологічних наук, доцент,  
завідувач кафедри екобіотехнології  
та біорізноманіття

\_\_\_\_\_ Олена КВАСКО  
(підпис)

**Керівник бакалаврської роботи**

Доктор сільсько-господарських наук, професор

\_\_\_\_\_ Оксана КЛЯЧЕНКО  
(підпис)

Виконав

\_\_\_\_\_ Назарій Плаксюк  
(підпис)

**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.

**З А В Д А Н Н Я**

**на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студенту**  
**Плаксюку Назарію Валерійовичу**

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи: «Введення ялини голубої (*Picea pungens* L.) в культуру *in vitro*»

затверджена наказом ректора НУБіП України від «22» жовтня 2024 р. № 1880 «С».

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 травня 2025 року.

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи: живці ялини голубої, живильні середовища, стерилізація насіння та живців, власні спостереження та дослідження. Перелік питань, які потрібно розробити:

1. Провести аналіз наукових джерел, включаючи підручники, наукові статті, монографії та інтернет-ресурси, щодо досліджуваного питання. Підготувати розділ "Огляд літературних джерел".
2. Провести стерилізацію насіння ялини голубої
3. Отримати асептичні мікроживці ялини голубої
4. Вивчити процес морфогенезу у ялини голубої *in vitro*.
5. Провести укорінення рослин-регенерантів ялини голубої *in vitro*.
6. Сформулювати висновки на основі проведених досліджень.

Дата видачі завдання 23 жовтня 2024 року

**Керівник бакалаврської  
кваліфікаційної роботи**

\_\_\_\_\_  
(підпис) **Оксана КЛЯЧЕНКО**

**Завдання прийняв до виконання**

\_\_\_\_\_  
(підпис) **Назарій ПЛАКСЮК**

## ЗМІСТ

<b>РЕФЕРАТ</b>	6
<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ</b>	7
<b>ВСТУП</b>	8
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b>	
1.1 Ботанічна характеристика та біологічні особливості ялини голубої	11
1.2 Теоретичні основи мікроклонального розмноження та його практичне застосування	13
1.2.1 Фактори, що впливають на процес регенерації рослин	
1.3 Мікроклональне розмноження хвойних порід рослин та ялини голубої	16
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	
2.1 Місце проведення досліджень та обладнання лабораторії	17
2.2 Вихідний матеріал	23
2.3 Методика досліджень	24
2.3.1 Введення в культуру <i>in vitro</i> насіння та живців з верхівковими бруньками ялини голубої	24
2.3.2 Підбір живильних середовищ для культивування насіння та живців ялини голубої	25
2.3.3 Статистична обробка отриманих результатів	27
<b>РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА</b>	28
3.1 Введення в культуру <i>in vitro</i> та отримання асептичного насіння ялини голубої	28
3.2 Введення в культуру <i>in vitro</i> та отримання асептичних живців ялини голубої	
3.3 Індукція калюсогенезу у ялини голубої.	

3.4	Підбір оптимального живильного середовища для культивування живців ялини голубої <i>in vitro</i>	39
3.5	Різогенез рослин-регенерантів ялини голубої <i>in vitro</i>	46

## **ВИСНОВКИ**

## **СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

## **ДОДАТКИ (копії публікацій)**

## РЕФЕРАТ

Дипломна робота на тему «Введення ялини голубої (*Picea pungens* L.) в культуру *in vitro*» виконана на 55 сторінках друкованого тексту, містить 9 інформаційних таблиць, 13 рисунків та 34 джерела літератури, із них 30 латиницею.

Складається із наступних розділів: огляд літературних джерел; матеріали та методика досліджень; результати досліджень; висновки та список використаних джерел.

Дослідження проводилися в лабораторії біотехнології рослин кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України у 2024-2025 рр.

**Метою роботи** було отримання асептичних рослин ялини голубої із верхівкових меристем та насіння і їх укорінення в умовах *in vitro*.

В результаті наших досліджень було проведено підбір експлантатів ялини голубої та введено в культуру *in vitro* насіння та верхівкові меристеми, підібрано оптимальні живильні середовища для культивування верхівкових меристем ялини голубої. Досліджували процес різогенезу отриманих пагонів, застосовуючи живильне середовище Мурасіге-Скуга з додаванням різних концентрацій кінетину, НОК та ІОК. В результаті проведених досліджень було зроблено наступні висновки: найкращим стерилізуючим розчином є гіпохлорид натрію в концентрації 0,9% з експозицією 15 хв. При цьому ефективність стерилізації становила 96%. Найкращі результати коренеутворення спостерігалися на модифікованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга з додаванням регуляторів росту у концентрації ІОК – 0,1 мг/л та НОК – 0,1 мг/л.

В результаті наших досліджень отримано посадковий матеріал, підібрано оптимальні концентрації регуляторів росту для розмноження і одержання рослин-регенерантів в умовах *in vitro*.

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

БАП – 6-бензиламінопурин;

ЖС – живильне середовище

2,4Д – 2,4 дихлорфеноксіоцтова кислота;

ІМК – індолілмасляна кислота;

ІОК – індолілоцтова кислота;

НОК – нафтилоцтова кислота;

клк – кілолюкс;

МС – середовище Мурасіге і Скуга

МКР – мікроклональне розмноження

ПВ – повна вологоємкість;

## ВСТУП

Лісові насадження є одними із найважливіших природніх середовищ існування прикарпатського та карпатського регіону України. Більша частина біорізноманіття України пов'язана з лісовими екосистемами, при цьому 16,6% вкриті лісами із яких заповідні становлять 6,6%. Генетичні ресурси рослин можуть скорочуватися та зникати, їх використання та втрата залежать від антропогенного фактору; фактично – це збільшення популяції, індустріалізація та розширення сільськогосподарських меж, зміни клімату, які сприяють модифікації або знищенню центрів генетичного різноманіття [4]. Для уникнення цих втрат генетичні ресурси рослин необхідно зберігати та використовувати таким чином, щоб прийнята стратегія збереження застосовувалася з урахуванням цільових видів.

В умовах інтенсифікації лісівництва та лісорозведення значна роль відводиться розробці і освоєнню ефективних методів біотехнології і організації вирощування лісових культур на безвірусній основі та збереження біорізноманіття голкових культур [1, 3]. Відомо, що велика кількість лісових культур уражується низкою вірусних, грибних та бактеріальних патогенів, які суттєво знижують їх виживання. Доведено, що тільки при організації біотехнологічних шляхів розмноження лісових культур можна реалізувати їх швидке розмноження і підвищити рентабельність галузі [1].

Великою проблемою лісівництва в Україні є зосередження вирощення лісових культур на збіднених ґрунтах [3]. Нині в Україні використовується низка дієвих способів розмноження, але при цьому постає необхідність в об'єктивному аналізі з урахуванням агрокліматичних і економічних особливостей регіону [5]. Обов'язковою умовою відтворення високоякісного насіннєвого матеріалу є

використання здорових вихідних рослин. Ними можуть бути здорові польові чи тепличні рослини, та матеріали *in vitro*, оздоровлений методами термотерапії у поєднанні з культурою апікальних меристем.

Протягом останніх 20 років зростає попит на висадження ялини голубої. При чому посадковий матеріал отримують шляхом розмноження насінням. Для цього було започатковано програму генетичної селекції та створено райони виробництва насіння на заході України [4, 5]. Проте розмноження насінням має очевидні труднощі стосовно збереження бажаних характеристик батьківських форм, зокрема кольору хвої [7, 8], що перешкоджає подальшому поширенню виду.

Найкращим методом розмноження ялини голубої є розробка біотехнологічних методів розмноження *in vitro*, а саме мікроклонального розмноження (включаючи прямий на непрямий морфогенез і розвиток рослини-регенеранту із верхівкових бруньок та їх різогенез), що уможлиблює швидко отримувати саджанці у великих масштабах, зберігаючи при цьому генетичну ідентичність батьківським формам.

Враховуючи недосконалість методики мікроклонального розмноження та отримання генетично ідентичного посадкового матеріалу ялини голубої виконана нами робота набуває актуальності і нині.

**Метою роботи** було отримання асептичних рослин ялини голубої із верхівкових меристем та насіння і їх укорінення в умовах *in vitro*.

Для виконання поставленої мети нами були виконані наступні завдання:

- встановити найоптимальніші умови стерилізації насіння ялини голубої;
- провести стерилізацію мікроживців ялини голубої;
- підібрати живильні середовища для культивування живців ялини голубої;
- вивчення процесів морфогенезу у ялини голубої *in vitro*;
- провести укорінення рослин-регенерантів ялини голубої *in vitro*.

**Об'єкт досліджень** - оптимальні умови стерилізації вихідного матеріалу ялини голубої та процеси її морфогенезу в культурі *in vitro*.

**Предмет досліджень** – живці та насіння ялини голубої.

**Методи досліджень** – біотехнологічні (культура ізольованих клітин та тканин рослин, мікроклональне розмноження).

В результаті досліджень отримано асептичний посадковий матеріал ялини голубої із мікроживців з верхівковою брунькою та проведене його мікроклональне розмноження та одержані

#### **Публікації.**

Плаксюк Н., Кляченко О.Л. Особливості введення в культуру *in vitro* ялини блакитної (*Picea pungens* L.). Матеріали XI Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Екологія – філософія існування людства». Київ, 23-24 квітня 2025 року. С.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Ботанічна характеристика та біологічні особливості ялини голубої

Ялина блакитна – це хвойне вічнозелене дерево, яке має конічну, пірамідальну крону і досягає 10м у висоту та 2,5-3 м в ширину. Це однодомне дерево родини Голонасінних. При цьому чоловічі та жіночі органи розмноження розміщуються на одній особині. Бруньки загострені, не смолисті, пагони ялини голубої продовгуваті, борозенчасті. Хвоя її сріблясто-блакитна, жорстка, густа, колюча, чотиригранна, трохи серповидна, не повністю радіальна, довжиною 10-12 мм. У нижній частині крони хвоя плоска і має назву тіньова та змінюється один раз на 5-7 років. Щорічний приріст становить 8-10 см. Гілки рослини жорсткі і відростають під прямим кутом від стовбура. Дерево не страждає від пізніх заморозків і є морозостійким.

Ялина голуба є одним із найголовніших символів Різдва та Нового року, а також дуже популярна у садівництві та міському озелененні. У ялини дуже цінна деревина, білого кольору, легка та м'яка. Її широко використовують у будівництві, деревообробній та целюлозно-паперовій промисловості, для виготовлення ящиків, розводять як декоративне дерево у парках і лісосмугах та у складі садових композицій. Ялина блакитна має прекрасний вигляд на сонці, однак в тіні може втрачати блакитне забарвлення [2, 3].

Деревина ялини не має стійкості до комах-шкідників та до гниття після вирубки і зазвичай використовується тільки для будівельних робіт в середині приміщення. Деревина її має довгі деревні волокна і тому її широко застосовують для виробництва деревної маси та виготовлення паперу найвищого гатунку.

Свіжі пагони ялини блакитної не дивлячись на колір хвої є природним джерелом вітаміну С. Джеймс Кук виготовляв алкогольне ялинове пиво на основі цукру і використовував під час своїх подорожей для запобігання серед членів екіпажу захворювання цингою.

Цвіте ялина блакитна у квітні-травні, шишки дозрівають у рік цвітіння, проте насіння висипається із шишок переважно в кінці наступної зими. Залежно від умов вирощування ялина блакитна починає плодоносити у віці 10-60 років. Зазвичай тривалість їх життя в середньому 250-300 років, однак можна зустріти особини, вік яких понад 500 років. Проте найдоступнішим способом розмноження ялини блакитної є насінневий і живцювання. Насіння ялини не втрачає здатності до проростання протягом 8-10 років, дозріває в жовтні, висипається із шишок, які відкриваються і розносяться вітром. На рис. 1 представлено саджанці ялини голубої.



Рис.1 Саджанець ялини голубої

Чоловічі шишки, що мають назву мікростробіли, складаються з тичинок, які розташовані спіралью. Жіночі шишки, на відміну від чоловічих, мають назву

мегастробіли і на початку розвитку є яйцеподібними, з часом веретеноподібними. У пазухах їхніх покривних лусочок знаходиться насіння, яке називають крилаті горішки. Пилок починає утворюватися з 25-30 років, а у самоточащих дерев та розріджених деревостоях з 10-15 років [5, 9].

Ялина голуба має поверхневу кореневу систему і тому дуже сильні вітри можуть вивернути дерево з коренями і не дуже вибаглива до ґрунтів. Вона тіньовитривала і тому нижні гілки дерева живуть довго. Розмножується насінням, яке дозріває пізно восени, шишки великі за розміром. Квіти запилюються за допомогою вітру. Розмноження деревних рослин насінням є основною ознакою, яка відрізняє голонасінні від покритонасінних рослин. Причому у голонасінних рослин плоди не утворюються. Збір насіння проводять зі здорових рослин, що нормально розвиваються та ростуть у сприятливих умовах з метою отримання розвинених молодих рослин. Для швидкого вивільнення насіння шишки просушують за оптимальних температур. При цьому отримуємо безкрилене насіння.

## **1.2. Теоретичні основи мікроклонального розмноження та його практичне застосування**

Мікроклональне розмноження рослин - це нестатеве вегетативне розмноження в культурі *in vitro*, за якого отримують рослини генетично ідентичні вихідній батьківській формі, що сприяє збереженню генетично однорідного садивного матеріалу [2].

Наразі розроблено низку різних способів мікроклонального розмноження. За їх основу взято три принципові підходи, а саме:

- 1) індукція до поділу клітин апікальних меристем;
- 2) утворення із тканини експлантату пагонів та ембріодів або прямиї морфогенез;

- 3) отримання калюсної тканини з наступною індукцією органогенезу чи соматичного ембріогенезу або непрямий морфогенез.

Досить широко використовується технологія, основана на активації пазушних меристем, яка базується на знятті апікального домінування [14]. Непрямий морфогенез включає повторну диференціацію адвентивних бруньок із калюсних тканин. Калюс - це недиференційована маса клітин, що утворюються в результаті проліферації. В культурі *in vitro* калюсна тканина картоплі утворюється на ізольованих експлантатах. Для індукції калюсогенезу необхідними є відповідні концентрації ауксинів і цитокінінів в живильному середовищі, які становлять 10 : 1. Спочатку на ізольованих експлантатах утворюється первинний калюс, який згодом перепасировують на свіже живильне середовище. При цьому слід зазначити, що повторна диференціація адвентивних бруньок і ембріодів хвойних потребує великих затрат як праці, так і часу тому, що не всі тканини і органи рослин здатні утворювати морфогенний калюс. Можливо це пов'язано з утворенням поліплоїдних і анеуплоїдних клітин, які мають генетично перебудовані хромосоми та ДНК. Молоді ембріональні клітини є найкращими експлантатами для вторинного утворення адвентивних паростків.

Прямий соматичний ембріогенез - це утворення соматичних ембріодів безпосередньо з тканин експлантату в умовах *in vitro*. Ця система є дуже перспективною для деяких видів рослин завдяки високому коефіцієнту розмноження. Таке диференціювання соматичних зародків може бути використане як найбільш ефективний біотехнологічний метод клонування деяких видів як сільськогосподарських рослин, так і хвойних порід рослин. Результати досліджень отриманні низкою авторів за останні роки, свідчать про універсальність процесу та можливість його застосування для багатьох видів рослин зокрема і для ялини голубої [22, 29, 34].

Органогенез - це поява в диференційованій калюсній тканині морфологічних структур, бруньок або коренів, що проходить шляхом організованого поділу однієї або декількох клітин. Основною метою органогенезу є диференціація бруньок, укорінення яких відбувається в результаті перенесення їх на безгормональне живильне середовище або на середовище з низькою концентрацією ауксинів. Диференціація включає утворення біполярних структур з чітко визначеними стебловими і корневими меристемами, які фізично не прикріплені до тканини із якої походять [25]. Калюсні тканини хвойних порід рослин, зазвичай, культивують за умов темряви, оскільки культура клітин на середовищі, що містить сахарозу, не потребує фотосинтезу.

Соматичний ембріогенез в культурі калюсних тканин відбувається після перенесення їх в умови розсіяного світла. Для вкорінення проростків чи пагонів перед висадженням їх в субстрат можна збільшити освітлення до 10клк, що сприяє кращому приживанню рослин-регенерантів [23, 20].

Для укорінення рослин-регенерантів застосовують живильні середовища з розбавлянням мінеральної основи в два рази і без застосування регуляторів росту або до живильного середовища додають активоване вугілля. При адаптації рослин-регенерантів хвойних порід, їх переносять в ґрунт, який для кращого продовжування росту і укорінення повинен бути досить вологим і легким за механічним складом. Дуже часто використовують наступні субстрати торф : пісок : перліт (1: 1: 1), торф : перліт, дерновий ґрунт : торф : перліт [14].

Висадження рослин-регенерантів у субстрат є відповідальним етапом, який завершує процес мікроклонального розмноження. Найсприятливим періодом для висадження пробіркових рослин-регенерантів є весна чи початок літа. Більш пізні строки висадження рослин негативно впливають на процеси приживання та подальший ріст рослин. Рослини-регенеранти з двома-трьома голочками і

добре розвиненою кореневою системою обережно виймають з колб пінцетом або спеціальним крючком. Відмивають коріння від залишків агару, занурюють у слабкий розчин перманганату калію і залишають на дві години. Висаджують рослини-регенеранти в субстрат, що має велику вологість і повітропроникність та склад якого - торф, пісок, перліт (1:1:1). Культивують рослини-регенеранти в теплиці з регульованою температурою  $+22-25^{\circ}\text{C}$  і вологістю повітря 65-80%.

На 20-30 добу після висадження, добре вкорінені рослини ялини голубої підживлюють мінеральним розчином солей за Мурасіге-Скуга. По мірі росту рослин їх розсаджують на свіжі субстрати у великі ємкості. Подальше вирощування регенерантів відповідає прийнятій для кожного виду технології [14, 24, 28, 34].

Переведення рослин *in vitro* в ґрунтову культуру здійснюють за схемою пробірка – касета - теплиця. Для цього пробіркові рослини на початку квітня місяця висаджують в касети, наповнені перлітом з живильною рідиною розчину Кнопа. Подальший розвиток живців відбувається у кліматичній камері з температурою  $+20-24^{\circ}\text{C}$ , освітленням 400-500 люкс та вологістю повітря – 80-90%. Через 4 тижні сформовані рослини з добре розвиненою листковою та кореневою системою пересаджують у ґрунт теплиці, де вони вегетують до збирання врожаю. Контроль – оздоровлені пробіркові рослини вихідних сортів.

### **1.2.1. Фактори, що впливають на регенерацію рослин**

На реалізацію морфогенетичного потенціалу висаджених експлантатів рослин як деревних, так і трав'янистих культур суттєво впливають хімічні та фізичні умови культивування. До хімічних умов відносять склад живильного середовища, особливо наявність в ньому регуляторів росту ауксинової та цитокінінової природи. До фізичних умов культивування відносять осмотичний

тиск живильного середовища, аерація живильного середовища, газовий склад в колбах, температура культивування, інтенсивність освітлення, фотоперіод, відносна вологість повітря. Крім того, на процеси морфогенезу особливий вплив мають тип експлантату, фізіологічний стан рослини-донора [2, 29].

Тип експлантату має велике значення для реалізації його регенераційного потенціалу. Необхідно враховувати, що для мікроклонального розмноження використовують меристематичні тканини, які мають високу метаболічну активність. Ці тканини характеризуються високою приживлюваністю та зберігають всі ознаки клону. До таких тканин відносять апікальні меристеми, верхівкові бруньки, латеральні бруньки, черешки листків, квітконоси.

Крім того велике значення має розмір експлантату. При цьому слід зазначити, що великі за розміром експлантати, які містять паренхіму, провідні тканини та камбій дуже часто індукують стеблові бруньки незалежно від наявності в живильному середовищі регуляторів росту. Однак велике значення має вік материнської рослини. Спостерігається така задежність, чим менший її вік, тим вища морфогенетична та регенераційна здатність. У деревних культур найкращий результат дають експлантати, що були ізольовані із пагонів останнього року приросту та сіянці [29].

Морфогенетичний потенціал ізольованих тканин залежить від тривалості їх культивування. Зазвичай перепасирування рослинних тканин та рослин-регенерантів перед довготривалим зберіганням на свіже живильне середовище проводять через кожні 30 діб. У середовище на якому довготривало зберігають обов'язково додають вітамін Е, який запобігає старінню рослинного організму, оскільки це антиоксидант.

Температура впливає на ріст і регенерацію ізольованих тканин рослин, сприяє активації метаболічних процесів. Зазвичай у культуральних кімнатах, де

культивують рослинні тканини та рослини-регенеранти температурний режим підтримують в межах +25-27°C.

Стосовно інтенсивності освітлення та тривалості фотоперіоду, експлантати культивують при освітленні люмінесцентними лампами з червоним та голубим спектром світла. Зазвичай рекомендують інтенсивність освітлення 1000-5000 лк та 14-16 годинний фотоперіод, що сприяє ініціації пагонів та коренів у більшості рослин. Необхідно враховувати, що пряме сонячне світло пригнічує ріст і розвиток рослин-регенерантів [19].

### **1.3. Мікроклональне розмноження хвойних порід рослин та ялини голубої.**

У результаті багаторічних досліджень розроблено методи клонального мікророзмноження для хвойних рослин. Вихідним матеріалом для ізолювання експлантатів верхівки пагонів першого року приросту, насіння, вегетативні бруньки. Низкою вчених досліджувалися можливості індукції органогенезу на експлантатах вегетативних бруньок і верхівок пагонів дорослих рослин різної вікової категорії. Використовували верхівки пагонів довжиною 0,8 - 1, см, верхівкові бруньки довжиною 4 - 8 мм та вегетативні бруньки – 5 - 7 мм. Встановлено, що найвищу морфогенетичну активність мають вегетативні бруньки, які були ізолювані у в березні, трохи нижчу – за умов ізолювання у травні і найнижчу - у вересні [2, 3].

При цьому на ізолюваних бруньках ялини голубої починають формуватися пазушні бруньки, пагони та меристемоїдні тканини у вигляді глобул, які здатні до морфогенезу рослин. Експлантати культивують на середовищі Мурасіге-Скуга з додаванням регуляторів росту у різних концентраціях, а саме: БАП (0,05 - 3,0 мг/л), кінетин (0,5 - 4,0 мг/л), 2,4 Д (0,01 - 1,5 мг/л), ІОК (0,01 - 10,0 мг/л), ІМК (0,01 - 10, 0 мг/л), НОК (0,01 - 10,0 мг/л). За культивування проростків і експлантатів

сім'ядольних листків на живильних середовищах Мурасіге-Скуга, що містили, доповнених 2,4Д у концентрації 0,05 мг/л та БАП у концентрації 2 мг/л спостерігали формування пагонів і пазушних бруньок, які в подальшому культивували на середовищі з додаванням БАП у концентрації 0,5 - 1,0 мг/л для отримання багаточисельних додаткових пагонів. Отримані пагони поміщали на середовище МС з додаванням 5 - 10 мг/л ІМК та НОК. При цьому спостерігалися значні труднощі при укоріненні [ 2, 4, 22].

Експлантати ялини голубої, білої та чорної мають вищий морфогенетичний потенціал порівняно з експлантатами ялини європейської. Високу здатність до органогенезу мають експлантати сосни піцундської, що були ізольовані з дерев у віковій категорії 10 - 50 років. Необхідно зазначити, що інтенсивність процесу органогенезу у неї не залежав від віку материнської рослини-донору. Регенерація рослин у сосни піцундської від початку культивування до пересадження в умови відкритого ґрунту тривала близько року [18].

Найбільшу морфогенетичну здатність із досліджуваних хвойних порід рослин мала секвойя вічнозелена. Експлантати верхівок молодих пагонів на середовищах з 1 мг/л БАП протягом 6 - 7 тижнів сформували по декілька пазушних бруньок та пагонів, які можна розділити на фрагменти, перепасирувати на свіжі живильні середовища і субкультивувати для отримання необхідної кількості рослин. Зазвичай укорінення проводять на середовищі Мурасіге-Скуга з додаванням 5 - 10 мг/л НОК чи 5,5 - 10, мг/л ІМК [21].

Розроблені та модифіковані методи мікроклонального розмноження хвойних порід рослин уможливають отримання із одного експлантату, в середньому, 600 - 700 рослин-регенерантів за рік [2, 28]. Через 40 - 50 діб утворені пагони розділяють на невеликі живці розміром 3-5 мм та культивують на живильному середовищі з 2% сахарозою. При цьому кожен

експлантат регенерує групу пагонів, які в подальшому розділяють і перепасирують на свіже живильне середовище для культивування. Один пасаж триває 10-12 тижнів, що уможлиблює збільшення кількості регенерованих пагонів. При цьому можна використовувати довготривале культивування пагонів за температури 2-4°C зі збереженням життєздатності протягом 17 місяців. Для покращення приживання рослин-регенерантів рекомендовано культивувати рослини на середовищі доповненому ІМК та НОК у концентрації 1 мг/л та 0,5 мг/л відповідно. Використовують подвійний субстрат для адаптації рослин, а саме: осоковий торф та пемза у співвідношенні 1 : 2, а потім через 5 діб розсаджують у торф'яні горшечки [3, 5].

При введенні в культуру *in vitro* сплячих та верхівкових бруньок із них знімають покрівні чешуйки, занурюють їх у 70% етиловий спирт з три разовим відмиванням стерильною дистильованою водою протягом 30 - 40 хв та в подальшому поміщають у 5-7% гіпохлорит натрію. Експлантати бруньок висаджують на середовище Мурасіге-Скуга, Ліндсмаєра-Скуга з додаванням цитокінінів, витримують за температури +14 - 15°C протягом семи діб, а потім температуру культивування підвищують до +20°C. Проведені експерименти із культивування на живильних середовищах Мурасіге-Скуга та Ліндсмаєра-Скуга, доповнених різними концентраціями БАП, частин гіпокотилу та хвої котиледону. При цьому із меристемоїдів, що з'являються на експлантатах хвої починають формуватися адвентивні бруньки із яких в подальшому формуються рослини-регенеранти [11,16].

Укорінення пагонів може проходити як в стерильних умовах, так і після пересадження їх у нестерильний субстрат. У деяких випадках значно підвищується різогенез хвойних порід рослин завдяки попередній обробці пагонів низькими концентраціями ауксинів, а саме 0,0005 - 0,005 мг/л протягом 14-20 діб чи високими концентраціями, такими як 0,5 - 1,5 мг/л протягом 12 - 24

годин. При цьому у рослин-регенерантів не спостерігаються хромосомні аберації чи мутації.

Показана можливість мікроклонального розмноження ялини, сосни, секвойї та можжевельнику [5-10]. Подальше розроблення, вдосконалення та впровадження нових технологій мікроклонального розмноження нових порід хвойних рослин рослин уможливить значне прискорення селекційного процесу, отримання цінного високопродуктивного посадкового матеріали за короткі терміни.

## **РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ**

### **2.1. Місце проведення досліджень та обладнання біотехнологічної лабораторії**

Дослідження проводились в лабораторії біотехнології рослин кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного Університету біоресурсів і природокористування України в 2024 – 2025 рр. Біотехнологічна лабораторія укомплектована спеціальними приміщеннями та обладнанням.

1. Кімната для миття посуду була оснащена раковинами із кислотостійкого матеріалу, дистиллятором, мийними машинами, стелажми для сушіння посуду та шафами.

2. Кімната для приготування живильних середовищ забезпечена технічними, аналітичними, торзійними вагами, рН - метром, бідистиллятором, холодильними камерами з температурним режимом в діапазоні +1-4<sup>0</sup>С, лабораторними столами, шафами для зберігання чистого посуду, автоматичними піпетками.

3. Приміщення для стерилізації живильних середовищ, інструментів, посуду, яке оснащено горизонтальними або вертикальними автоклавами, сушильною шафою з режимом роботи 160-180°C.

4. Операційна (асептична) кімната забезпечена ламінар-боксами і використовується для ізолювання та пересадження ізолюваних, клітин, тканин і рослин - регенерантів.

5. Світлова культуральна кімната з кондиційованим повітрям, температурою 25-26°C, відносною вологістю 70-80%, 14-16-годинним фотоперіодом, оснащена стелажми і використовується для вирощування рослин-регенерантів та отримання морфологічних структур шляхом непрямого морфогенезу.

6. Центрифужна кімната використовується для біохімічних досліджень і оснащена міні- та ультрацентрифугами.

7. Темнова культуральна кімната з кондиційованим повітрям, температурою +25-26°C, відносною вологістю 70-80%, оснащена установками ротаційного та шейкерного типу і використовується для вирощування калюсних культур та клітинних суспензій.

Робота по отриманню безвірусного посадкового матеріалу потребує стерильності живильних середовищ, посуду, матеріалів та інструментів, а також приміщення і тканин, які вводять в культуру *in vitro*.

В лабораторії біотехнології рослин виконували наступні операції:

- приготування, стерилізація та зберігання живильних середовищ;
- миття та стерилізація посуду, після його використання;
- робота з об'єктами досліджень в асептичних умовах;
- вирощування ізолюваних тканин та культур в термостатованих умовах.

При проведенні досліджень, нами використовувалося наступне обладнання, а саме:

- ламінар-бокси – ПК-1 для створення стерильних умов проведення досліджень;
- автоклав АР-100 (рис. 2.1);
- бідистилятор;
- термостат;
- сушильна шафа (рис. 2.1);
- рН-метр;
- бінокляр;
- культуральна кімната (рис. 2.2)
- посуд (колби мірні (0,5-5л), стакани хімічні (0,05-1л), циліндри мірні (0,1-2л), автоматичні піпетки (0,01-5мл), лійки, скляні палички різних розмірів, чашки Петрі, пробірки біологічні, стакани).
- інструменти (пінцети анатомічні різних розмірів (20, 25, і 30 см), скальпелі анатомічні, спиртівки).
- матеріали (фільтрувальний папір, вата, марля, ватні пробки, алюмінієва фольга для виготовлення ковпачків на колби, флакони, пробірки).



Рис. 2.1. Сушильна шафа та автоклав AP-100



Рис. 2.2. Світлова культуральна кімната

### **Проведення досліджень**

Роботи з стерилізації насіння та верхівкових меристем, індукції морфогенезу, різогенезу рослин-регенерантів проводили в асептичних умовах, використовуючи ламінар-бокси, які стерилізували протягом 30 хв ультрафіолетовим опроміненням з попереднім протиранням робочої поверхні 96<sup>0</sup> С етиловим спиртом. Стерилізацію рук проводили 96 °С етиловим спиртом безпосередньо перед роботою в ламінар-боксі. Найчастіше для стерилізації ламінар-боксу і достатньо протирання його спиртом та 20 хв продування стерильним повітрям за допомогою бактерицидного фільтру.

Живильні середовища стерилізували у автоклаві за робочого тиску 1-2 ат протягом 20-25 хвилин. Посуд стерилізували у сушильній шафі сухим жаром при температурі 160-180 °С протягом 2 год.

У ламінар-боксі безпосередньо перед роботою стерилізували інструменти, поміщаючи їх спочатку в фарфоровий стакан із 96 % етиловим спиртом, а потім прожарюючи їх в полум'ї спиртівки. Інструменти для охолодження розміщали на металеву підставку, яку протирали спиртом. Їх використовували тільки для однієї

маніпуляції. Для повторного використання інструменту проводили його повторну стерилізацію.

## **2.2. Вихідний матеріал**

Первинний матеріал для введення в культуру *in vitro* ялини голубої використовували у вигляді насіння та верхівкових бруньок, ізольованих із пагонів поточного приросту ялини голубої. При цьому насіння піддавали обов'язковій стратифікації поміщаючи його на зволожений фільтрувальний папір та витримуючи в холодильній камері за температури +4°С протягом 14 -18 діб.

## **2.3. Методи досліджень**

В роботі застосовували загальноприйняті в біотехнології методи досліджень [4]. Дослідження проводилися в декількох напрямках: введення в культуру *in vitro* насіння ялини голубої минулорічного врожаю та живців з верхівковою брунькою, прямого морфогенезу та укорінення рослин-регенерантів. Для вирощування маточних рослин використовували живці з верхівковими меристемами довжиною 1,3-1,5 см.

### **2.3.2. Введення в культуру *in vitro* насіння та живців з верхівковими бруньками ялини голубої**

Як стерилізатори нами використано 70% етиловий спирт, водний розчин гіпохлориду натрію, який містить активний хлор у співвідношенні 3:1 та сулему в концентрації 1,5%. У гіпохлориті натрію насіння витримували 15 хв, після чого розчин зливали, а в сулемі експозиція тривала 10 хв.

Простерилізовані насіння та проростки промивали три рази по 10 хв. у стерильній дистильованій воді. Відмиті від розчинів стериліантів живці та насіння

поміщали в чашки Петрі на стерильний фільтрувальний папір для обсихання. В подальшому пінцетом експлантати переносили у пробірки на безгормональне живильне середовище МС1, склад якого наведено у табл.2.1.

Таблиця 2.1

Склад безгормонального ЖС для пророщування насіння льону

Компоненти	Кількість
Макро МС	50мл
Мікро МС	0,5мл
Fe – хелат	5мл
Вітаміни по МС	1мл
Сахароза	20г
Агар	0,7%
рН середовища 5,6 – 5,8	

Пробірки з експлантатами протягом 7 діб культивували у термостаті без освітлення за регульованої температури  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Через 7 діб перевіряли пробірки з насінням та живцями на зараженість мікроорганізмами. При цьому заражені рослини видаляли з термостата, щоб уникнути джерела інфекції.

Ефективність стерилізації ( $E_c$ ), у відсотках обчислювали за формулою:

$$E_c = \frac{K_e - K_{вр.е.}}{K_e} \cdot 100\%$$

де,  $K_e$  – загальна кількість експлантів, шт.

$K_{вр.е.}$  – кількість вражених експлантів [26].

### 2.3.3. Підбір живильних середовищ для культивування насіння та живців ялини голубої

Компоненти живильного середовища, які необхідні для росту і розвитку експлантатів підрозділяють на шість груп, а саме: основні неорганічні живильні речовини (макроелементи); мікроелементи; джерело заліза; вітаміни; вуглеводи;

регулятори росту. Середовище Мурасіге-Скуга [39] є одним із найбільш розповсюджених, яке використовується як основа при роботі з культурою тканин рослин. Потім підбирають різні концентрації і співвідношення рід активуючих речовин. Склад живильного середовища представлено в табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Склад поживного середовища (концентрація речовин в мг/л)

Склад	Мурасіге-Скуга
<b>Макросолі</b>	
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	16500
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
Продовження табл. 2.2	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{KNO}_3$	1900
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	170
<b>Мікросолі</b>	
$\text{H}_2\text{BO}_3$	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{Na}_2\text{M}_6\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
KJ	0,83
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28
$\text{Na}_2\text{EDTO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
<b>Вітаміни</b>	
$\text{B}_1$	10
$\text{B}_6$	1,0

PP	1,0
Сахароза	30000
Агар	8
рН 5,6-5,8	

Французькі дослідники в основу живильного середовища, для отримання проростків включали макро- і мікроелементи середовища [39]. Були досліджені декілька комбінацій середовищ з різними концентраціями і співвідношеннями ауксинів і цитокінів, такими як 0,5мг/л індолілоцтової кислоти, 0,2мг/л 6 – бензиламінопурина, або 0,5мг/л НУК і 0,2мг/л кінетину. Тому працюючи з живильним середовищем такого складу не завжди отримуємо позитивний результат.

Для проведення досліджень використовували наступні варіанти живильних середовищ:

№1 Мурасіге-Скуга + гіберелін 0,02мг/л + кінетин 0,25мг/л.

№2 Мурасіге-Скуга + гіберелін 0,02мг/л + кінетин 0,25мг/л + НОК 0,1мг/л.

№3 Мурасіге-Скуга + гіберелін 0,02мг/л + НОК 0,1мг/л.

Для укорінення стерильних рослин-регенерантів ялини голубої використовували регулятори росту ауксинової природи, які у невисоких концентраціях викликали процеси різогенезу. До таких ауксинів відносили індолілоцтову кислоту та індолілмасляну кислоту, які у концентрації 0,01-2 мг/л викликають активне коренеутворення на експлантатах ялини голубої.

### 2.3.3. Статистична обробка отриманих результатів

Статистичну обробку результатів одержаних експериментальних даних здійснювали з використанням пакету програм «Аналіз електронних таблиць Microsoft Excel», Statistica 6,0. Результати досліджень представлені у вигляді  $m \pm s$ ,

де  $m$  – середнє арифметичне результатів, одержаних із декількох повторень;  $s$  – стандартна похибка.

### РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

#### 3.1. Введення в культуру *in vitro* та отримання асептичного насіння ялини голубої

Основною умовою успішного отримання стерильного рослинного матеріалу є стерилізація рослинних об'єктів, що полягає у дезактивації грибних та бактеріальних спор на зовнішній поверхні без пошкодження внутрішніх тканин.

Внутрішні тканини здорових рослин вважають стерильними, хоча і в них можуть міститися непатогенні бактерії. Особливо внутрішню інфекцію містять тропічні та субтропічні рослини.

Для цього використовують різні стерилізуючі речовини, які не проникають у тканину і легко змиваються водою, щоб запобігти отруєнню рослинної тканини. Вид стерилізуючої речовини, її концентрація і тривалість застосування залежить від густини і чутливості тканини, що буде піддаватися стерилізації. Правильний вибір стериліанта полягає в тому, що він повинен знешкоджувати всі мікроорганізми і мінімально пошкоджувати тканини. Зазвичай режим стерилізації встановлюють експериментально для кожного об'єкта.

Враховуючи те, що в природних умовах на поверхні рослин знаходиться велика кількість грибів, їх спор, бактерій, рослинний матеріал занурюють в 70% етиловий спирт: насіння на 2-3 хвилини, меристеми листя на 0,5-1 хвилину. Обробка тканин етанолом руйнує твосковий наліт на листках, посилює проникнення стерилізуючих речовин.

Щоб видалити із тканин стерилізуючу речовину, промивання експлантату проводять три-чотири рази з періодом експозиції 15 хвилин. За порушенні режиму відбувається отруєння культури, що призводить до заторможення ростових процесів або повної загибелі рослин.

В наших дослідженнях при отриманні асептичного насіння ялини голубої для швидкого проростання в умовах *in vitro* його піддавали стратифікації. Для

цього насіння замочували в стерильній дистильованій воді і поміщали в холодильну камеру за температури  $+4^{\circ}\text{C}$  на 14 діб (рис.3.1).



Рис. 3.1. Стратифіковане насіння ялини голубої.

Після стратифікації насіння, проводили його стерилізацію застосовуючи такі розчини стериліантів як 0,5% сулема та 0,9% гіпохлорит натрію. Причому використовували різний час експозиції, який із сулемою становив 5 , 6, 7 хвилин, а з гіпохлоритом натрію 10, 12, 15 хвилин відповідно. Після стерилізації насіння три рази по 10 хв відмивали від розчинів стериліантів стерильною дистильованою водою і висаджували на безгормональне живильне середовище, склад якого представлено в табл. 2.1. Культивували простерилізоване насіння у термостаті за регульованої температури  $+25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , без доступу світла та відносній вологості повітря 80%. Результати стерилізації насіння ялини голубої представлено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1.

### **Отримання асептичного насіння ялини голубої**

Розчин стерилізатору	Тривалість стерилізації	Кількість насіння, шт.	Кількість інфікованого насіння		Ефективність стерилізації %
			штук	%	
0,5% сулема	5	20	13	65	30
	6	20	12	60	40
	7	20	11	55	45
0,9% гіпохлорит натрію	10	20	13	65	35
	12	20	9	45	55
	15	20	8	40	60
НІР <sub>05</sub>	-	-	0,15	0,63	0,22

З представлених даних можна бачити, що ефективність стерилізації насіння ялини голубої становила 30 - 45% при застосуванні 0,5% сулеми та 35 - 60% за використання 0,9% гіпохлориту натрію.

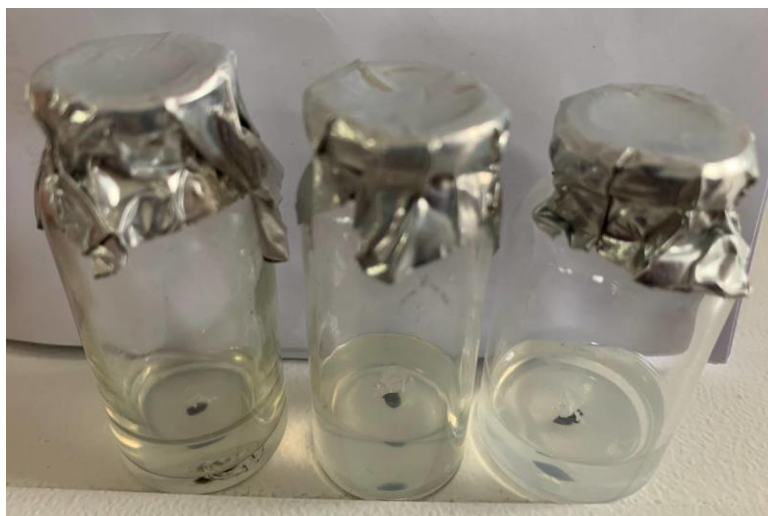


Рис. 3.2. Насіння ялини голубої в культурі *in vitro*.

Така низька ефективність стерилізації насіння пояснюється внутрішньою контамінацією насіння. Тому для ефективного введення ялини голубої в культуру *in vitro* нами використано живці з верхівковими бруньками.

### **3.2. Введення в культуру *in vitro* та отримання асептичних живців ялини голубої**

При отриманні стерильного рослинного матеріалу необхідно зробити правильний вибір розчинів стериліантів для того щоб нейтралізувати епіфітну мікрофлору і не пошкодити тканини рослин. Крім того основною із умов є непроникнення стериліанту в тканини і вони повинні легко змиватися водою. Зазвичай режим стерилізації розробляють індивідуально для кожного виду і сорту як голонасінних, так і покритонасінних рослин.

Перед початком стерилізації молоді пагони з верхівковими бруньками ялини голубої ретельно промивали теплим мильним розчином від пилу (враховуючи те, що дерево росте на вулиці) і бруду, використовуючи шейкерну установку для відмивання зразків, надалі промивали водопровідною водою від залишків мила і бруду та споліскували дистильованою водою. Така попередня підготовка рослинного матеріалу знижує контамінацію поверхневих тканин.

Подальшу роботу зі стерилізації експлантатів проводили в ламінар-боксі. Для знищення воскового наліту і смолистих речовин на голках ялини блакитної та посилення дії стерилізуючих розчинів, експлантати поміщали в 96° етиловий спирт на одну хвилину (60 сек).

Для стерилізації експлантатів використовують різні стерилізуючі розчини. Найпоширенішими є хлорвмісні препарати, які містять активний хлор, а саме: гіпохлорит натрію і кальцію, хлорамін та ртутні препарати – діацид і сулема. Крім того використовують розчини окиснювачів, таких як пероксид водню та перманганат калію. В літературі для стерилізації голонасінних порід рослин рекомендують використовувати 5-25% розчин гіпохлориту натрію, що містить

сліди перманганату калію [3]. Розчини використовують однократно зразу після їх приготування.

В наших дослідженнях ми використовували 0,9% гіпохлорит натрію та 1,5% розчин сулеми. Враховуючи те, що гіпохлорит натрію є клітинним ядом, необхідно застосовувати чотири разове відмивання залишків хлору стерильною дистильованою водою [3, 4]. Нами використано три разове по 15 хвилин відмивання стерильною дистильованою водою. При використанні 0,9% гіпохлориту натрію час експозиції становив 10, 12, 15 хвилин.

При застосуванні ртуть вмісних розчинів, таких як сулема, діюцид, фамосепт, не дивлячись на їх токсичність для рослинних тканин, зазвичай, отримують дуже позитивні результати. Нами використано 0,5% розчин сулеми з експозицією 5, 10, 15 хвилин. Рослинні тканини після стерилізації в сулемі п'ять разів по 10 хв промивали в кожній порції стерильної дистильованої води.

Після стерилізації експлантати поміщали в стерильну чашку Петрі з фільтрувальним папером для обсушування і висаджували на безгормональне живильне середовище Мурасіге-Скуга, яке містить тільки мінеральні компоненти, сахарозу у концентрації 20 г/л та агар. Культивували експлантати за регульованої температури +25-26 °С, освітленості 1 клк, 16-годинному фотоперіоді та відносній вологості повітря 80%. На восьму-десяту добу оцінювали стан тканин, відбирали неінфіковані екземпляри та пересаджували на середовище з різним вмістом регуляторів росту. Цей прийом уможливорює культивування тільки стерильних експлантатів. Результати досліджень представлені в таблиці 3.2.

З представлених даних можна бачити, що за умов застосування поєднання 96°C етиловий спирт та 0,9% розчин гіпохлориду натрію з експозицією 15хв ефективність стерилізації становила 50%.

Таблиця 3.2.

## Отримання асептичного матеріалу ялини голубої

Експлантат	Розчин стерилізатору	Тривалість стерилізації	Кількість експлантів шт.	Кількість інфікованих експлантів		Ефективність стерилізації %	
				штук	%		
Живці	96°C етиловий спирт +0,5% сулема	5	20	12	60	40	
		10	20	13	65	35	
		15	20	4	20	80	
	96°C етиловий спирт + 0,9% гіпохлорит натрію	10	20	10	50	50	
		12	20	9	45	55	
		15	20	9	45	55	
	НІР <sub>05</sub>		-	-	0,5	1,8	2,6

За умов застосування 96°C етиловий спирт +0,5% сулема з експозицією 15 хв. Ефективність стерилізації становила 80%.

В умовах ламінар-боксу висаджені на баезгормональне живильне середовище експлантати ялини голубої з бічними та верхівковими бруньками представлено на рис.3.3. Культивували експлантати за регульованої температури +25 – 26° С, відносній вологості повітря 80% та інтенсивності освітлення 2000 лк і 16-годинному фотоперіоді.

Таким чином в результаті проведених досліджень було розроблена наступна схема стерилізації живців з бічними і верхівковими бруньками:

Живці → 96°C етиловий спирт (експозиція 60 сек) → 0,5% сулема (експозиція 15 хв).



Рис. 3.3. Верхівкові та бічні бруньки ялини голубої в культурі *in vitro*.

При цьому ефективність стерилізації живців ялини голубої становила 80%, що узгоджується з літературними джерелами. Отриманий асептичний матеріал в подальшому використовували для індукції калюсогенезу та органогенезу ялини голубої.

### 3.2. Індукція калюсогенезу у ялини голубої *in vitro*

Основною умовою успішного отримання великої кількості посадкового матеріалу ялини голубої є правильний підбір компонентів живильного середовища, їх концентрації та співвідношення. Змінюючи вміст живильного середовища, можна цілеспрямовано впливати на прискорення процесу

мікроклонального розмноження та підвищення коефіцієнта розмноження [16, 29, 37].

Для індукції калюсогенезу ялини голубої використовували живильне середовище, що містить всі необхідні для рослин макроелементи, а саме: азот, фосфор, калій, кальцій, сірка, магній, залізо та мікроелементи, такі як: бор, цинк, мідь, кобальт, марганець, йод, молібден та вітаміни (водо- і жиророзчинні), вуглеводи, фітогормони. До складу живильних середовищ входять вітаміни, які подовжують час життя експлантів, нормалізують певні ростові процеси. Готували розчини макроелементів, мікроелементів та вітамінів у вигляді маточних розчинів і зберігають в холодильній камері за температури +4°C. Крім того до складу середовищ входить етилендіамін - тетраоцтова кислота (ЕДТО) або її натрієва сіль, що покращує доступність заліза для рослинних клітин в широких межах рН [26].

Зазвичай використовують регулятори росту групи ауксинів та цитокінів. До них відносяться речовини, що синтезуються у верхівках, стеблах і коренях рослин. В біотехнологічній практиці широко використовують їх синтетичні аналоги, наприклад, індолілоцтову кислоту. Ауксини проявляють свою активність у низьких концентраціях, тому до живильного середовища додають їх у межах 0,005-100 мг/л [1].

В результаті травми, отриманої експлантатом при ізолюванні, активізуються ферменти фенолази, що окислюють феноли рослин [26]. Продукти окиснення фенолів інгібують поділ і ріст клітин експлантату. Тому в живильні середовища рекомендують додавати антиоксиданти, а саме, аскорбінову кислоту. Враховуючи те, що живлення рослинних тканин в культурі *in vitro* гетеротрофне, до поживних середовищ додають вуглеводи, а саме сахарозу.

При підборі живильного середовища наші дослідження мали за мету простежити можливість отримання калюсних тканин на голках ялини голубої. До живильного середовища Мурасіге-Скуга додавали ауксини та цитокініни в співвідношенні 10 : 1. Стерильні голочки ялини в умовах ламінар-боксу ізолювали із експлантату і висаджували на живильне середовище, склад якого представлено в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

**Склад живильного середовища для індукції калюсогенезу ялини голубої**

<b>Склад середовища</b>	<b>Кількість речовини в 1 л ЖС</b>
Макро МС	100 мл
Мікро МС	1 мл
Fe-хелат	5 мл
Вітаміни МС	1 мл
Мезоінозит	100 мг
2,4-Д	2 мг
Кінетин	0,2 мг
Сахароза	20 г
Агар	7 г
pH 5,6-5,8 до автоклавування	

Після висадження експлантатів на живильні середовища їх культивували в термостаті за регульованої температури  $+25 \pm 1$  °C, без доступу світла та відносній вологості повітря 80%. При цьому на чотирнадцяту добу культивування спостерігали знебарвлення експлантатів і збільшення їх в розмірі, втрату форми, а в місцях механічного пошкодження початок утворення калюсної маси (рис.3.3).

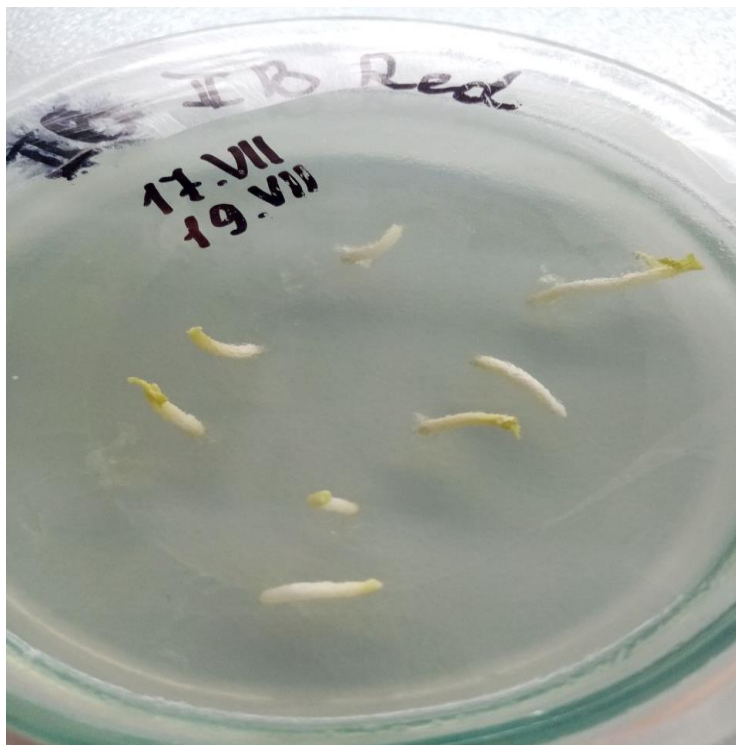


Рис. 3.3. Індукція калюсної маси на експлантатах ялини блакитної.

На 21 добу культивування експлантати перепасировували на свіже модифіковане живильне середовище МС доповнене БАП в концентрації 0,5 мг/л в окремі флакончики для запобігання повторного інфікування і кращого розвитку калюсних тканин. Перепасировані калюсні тканини представлено на рис. 3.4. Можна бачити, що тканини повністю втратили зелене забарвлення, калюсна тканина інтенсивно розвивається тільки в місці механічного пошкодження, наростання калюсу проходить у вигляді шапочки, калюс має світло-жовте забарвлення і середню за щільністю консистенцію. Слід зазначити, що середня за щільністю калюсна тканина має морфогенетичні осередки, які при культивуванні в умовах розсіяного світла дають початок росту морфологічним структурам. Зазвичай у ялини голубої виникають соматичні ембріоїди.

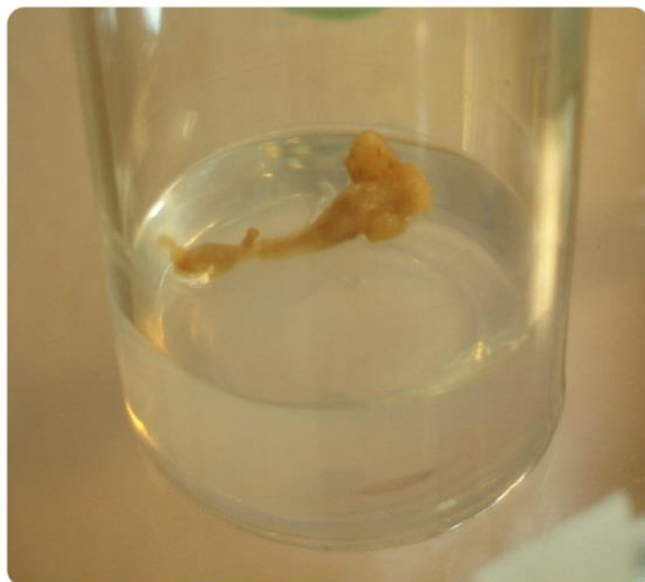


Рис. 3.4. Перепасирована калюсна тканина ялини голубої

Таким чином, в процесі культивування ізолюваних тканин ялини блакитної на живильному середовищі Мурасіге-Скуга з додаванням 2 мг/л 2,4-Д та 0,2 мг/л кінетину нами отримано первинну калюсну тканину. За подальшого перепасирування її на свіже живильне середовище, доповнене БАП в концентрації 0,5 мг/л отримано морфогенетичну калюсну тканину.

#### **3.4. Підбір оптимального живильного середовища для культивування живців ялини голубої *in vitro***

Нами вивчено оптимальний склад живильного середовища для вирощування живців рослин отриманих із апікальних меристем. Спостереження проводили за інтенсивністю росту пагонів з метою визначення найоптимальнішого для ростових процесів живильного середовища, на яке висаджували живці рослин. До живильного середовища додавали регулятори

росту у різних концентраціях та досліджували їх вплив на інтенсивність росту пагонів.

Вченими [34] для культивування пагонів ялини голубої використовували середовища з мінеральною основою Мурасіге-Скуга та Уайта в модифікації З. Г. Бутенко. Виявлено, що недоліком цих середовищ є те, що вони розроблені були для рослин тютюну, гаглопапусу та інших культур і не зовсім відповідали біологічним особливостям ялини. Тому в живильних середовищах співвідношення основних елементів живлення N : P : K було віддалене від оптимального для ялини. Середовище Мурасіге-Скуга містить основних елементів живлення в співвідношенні 1,0 : 0,1 : 1,1, тоді як середовище Уайта відповідно 1,0 : 0,2 : 1,7. Крім того, для нормального росту рослин ялини необхідним є 20-30% азотного живлення, що знаходиться в амонійній формі. Середовище Уайта не містить амонійного азоту на відміну від середовища Мурасіге-Скуга, де спостерігається його надлишок. Це негативно впливає на ріст рослин у перший період їх розвитку.

В обох варіантах живильного середовища міститься надмірна кількість токсичного для картоплі хлору. Однак середовище Мурасіге - Скуга є найбільш сприятливим для культивування ялини (табл.3.4).

Таблиця 3.4.

**Склад макросолей у живильних середовищах для культивування *in vitro* ялини блакитної**

Мінеральна основа	Вміст у середовищі, мг/л		
	Мурасіге-Скуга	Уайта	Мурасіге-Скуга, модифіковане
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-	1250
KNO <sub>3</sub>	1900	80	1100

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	-	-
Продовження таблиці 3.4			
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	737	770
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	-	970
$\text{Na}_2\text{EDTO}$	32.8	37.8	37.8
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	27.8	271
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	287.8	440
$\text{KCl}$	-	65	-
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	-	200	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	-	16.5	-

Проводили спостереження за рослинами-регенерантами на вищеназваних середовищах через 14 діб, з оглядом рослин через кожні 7 діб (рис.3.5 - 3.7). Необхідно зазначити, що у рослин, які вирощували на середовищі Мурасіге-Скуга, спостерігали відмирання верхівок і початок росту пазушних бруньок верхніх листків. При цьому бокові пагони розвивалися слабо і рослина ставала букетоподібною, не росла у висоту та мала вкорочене нерозвинуте коріння. За культивування живців на середовищі Уайта спостерігали погіршення формування кореневої системи, а пазушні бруньки, інколи довше не починають рости.

Модифіковане живильне середовище Мурасіге-Скуга має переваги порівняно із стандартними середовищами Уайта і Мурасіге-Скуга. На ньому розвиваються високостеблові рослини з бічними бруньками, із яких потім при подальшому ізолюванні можна отримати рослини-регенеранти (рис. 3.5) і таким чином підвищити коефіцієнт розмноження ялини голубої.



Рис. 3.5. Пагін ялини голубої з розвиненими бічними бруньками

Одним із недоліків культивування рослин ялини голубої є специфічна реакція рослин на склад живильного середовища, особливо на наявність в ньому регуляторів росту, що може призводити до то чи іншого морфогенетичного процесу. Дуже часто це може призводити до суттєвого погіршення росту і розвитку, при цьому також може спостерігатися відмирання верхівкових бруньок, верхівок пагонів, утворення калюсних тканин, інгібування кореневої системи та розгалуження рослин [46]. В табл. 3.5 та на рис. 3.6 представлено

усереднені дані виміру висоти утворених пагонів. При цьому слід враховувати, що для досягнення певної висоти пагонів, через кожні 28 днів пагони необхідно перепасировувати на свіже живильне середовище, оскільки за тривалого культивування проходить його збіднення, особливо на азот, фосфор і калій.

Таблиця 3.5.

### Середні дані висоти пагонів ялини голубої

Варі- ант	Висота живців на день висад- жування, мм.	Середня висота пагонів на 14 добу, мм	Середня висота пагонів на 21 добу , мм	Середня висота пагонів на 28 добу, мм
1	15	65	78	92
2	15	57	71	89
3	15	69	85	114

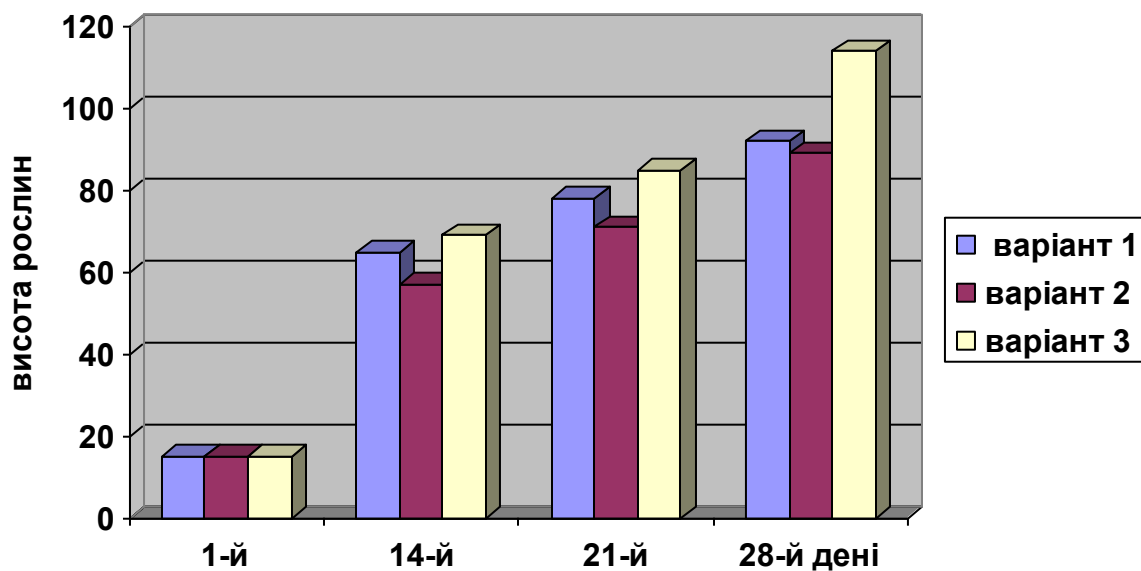


Рис. 3.6. Інтенсивність росту пагонів ялини голубої за середніми даними спостережень.

В результаті проведених досліджень встановлено, що більш інтенсивний ріст пагонів спостерігався за вирощування живців ялини голубої на модифікованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга варіант 3 (див. табл. 3.4). Таким чином, можна стверджувати, що мінеральний склад даного живильного середовища найбільш повно задовільняє потребу живців ялини голубої у мінеральному живленні. Добре розвинений пагін ялини голубої представлено на рис. 3.7.



Рис. 3.7. Добре розвинений пагін ялини голубої на модифікованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга (варіант 3)

Порівняно з органогенезом *de novo* розмноження пагонів завдяки пазушним меристемам має низку переваг, а саме: швидкість розмноження, економія часу та площі, а саме головне це виключення ризику генетичної нестабільності [18]. Крім того, індукція пазушних бруньок та пагонів є перспективним методом розмноження для відновлення ареалу поширення ялини голубої, для підвищення стійкості ялинових насаджень.

Метою цього дослідження була розробка вдосконаленої системи розмноження пагонів цього цінного для садівництва та потенційно прибуткового виду сосни через пазушні меристеми зі зрілих зиготичних ембріонів за допомогою короткочасного рідкого імпульсу цитокініну. Для вивчення морфогенетичного потенціалу ялини голубої експлантати культивували на модифікованому середовищі Мурасіге-Скуга з додаванням кінетину та аскорбінової кислоти у концентраціях 0,5 мг/л і 0,6 мг/л відповідно за регульованої температури  $25 \pm 1^{\circ} \text{C}$ , відносній вологості повітря 60-70% та інтенсивності освітлення 3 тис.лк. з 16-годинним фотоперіодом. Спостерігали формування бокових пагонів та їх високий коефіцієнт розмноження, інтенсивний ріст пагонів (до 80-10 мм у висоту) з великою кількістю бічних бруньок. На мікророслинах ялини голубої спостерігали інтенсивне формування бічних бруньок від 3 до 5 шт (рис. 3.8).



Рис. 3.8. Брунькоутворення у ялини голубої в культурі *in vitro*.

Слід зазначити, що активне брунькоутворення починається за умови призупинення або повного зупинення росту пагонів. Найоптимальнішим виявилось середовище МС доповнене 1,5 мг/л кінетину, 1 мг аскорбінової кислоти та 20 г сахарози.

Таким чином, в результаті проведених досліджень отримані рослини-регенеранти ялини голубої та велику кількість бічних бруньок із яких в подальшому можна отримати елітний посадковий матеріал.

### 3.5. Різогенез рослин-регенерантів ялини голубої *in vitro*

Заключним і одним із найскладних етапів за мікроклонального розмноження є укорінення рослин-регенерантів. Як правило, індукувати коренеутворення можна завдяки наступним прийомам:

- до живильного середовища додавати ауксини : ІОК, НОК, ІМК;
- поєднуючи проведення обробки базальних ділянок мікропагонів ауксинами з послідуєчим культивуванням на безгормональних живильних середовищах;

- добавляючи до живильного середовища активоване вугілля чи обгортаючи нижню частину пробірок фольгою для створення умов затемнення з урахуванням того, що висока інтенсивність світла пригнічує утворення коренів.

Живцювання рослин в культурі *in vitro* та їх укорінення є кращим методом для швидкого розмноження ялини голубої. Даний метод дозволяє повністю унеможливити повторне зараження рослин при їх розмноженні, а також отримати за 2-3 місяці до 3-5 тисяч рослин. Розмноження пазушних бруньок у хвойних порід рослин є більш складним процесом порівняно із листяними породами, враховуючи те, що хвойні дерева не стійко розмножуються при мікроклональному розмноженні. При цьому основним механізмом, який забезпечує ріст і утворення пазушних бруньок є наявність в живильноу середовищі ауксинів та цитокінінів та їх співвідношення.

Необхідною умовою живцювання рослин є стерильність, тому всі операції проводять в ламінар-боксі, а інструменти, якими користуються стерилізують в сушильній шафі. В ламінар-боксі відкривали пробірку з рослинами, прожарювали верхню її частину в полум'ї спиртівки, виймали пінцетом рослину і поміщали в чашку Петрі. Розрізали рослину-регенерант на живці, кожен з яких має сегмент стебла з пазушною брунькою. Висаджували в пробірку на живильне середовище таким чином, щоб частина стебла нижче бруньки була поміщена в агар, а бічна брунька знаходилась на його поверхні. Із однієї рослини отримували 5-8 живців.

Культивування живців ялини голубої проводили в світловій культуральній кімнаті за регульованої температури +20-23 °С, відносній вологості повітря 70-80%, 16-годинному фотоперіоді та інтенсивності освітлення 3000 - 4000 лк, враховуючи, що вона відноситься до рослин довгого світлового дня. За умов

недостатнього освітлення голки ялини голубої втрачають своє блакитне забарвлення, хвоя набуває світло-зеленого кольору.

Для пагоноутворення нами використовувалося модифіковане живильне середовище Мурасіге-Скуга, доповнене регуляторами росту в концентрації 0,12 мг/л кінетину, 0,12 мг/л аденіну та 0,25 мг/л гібереліну. Спостереження за інтенсивністю росту пагонів проводили через кожні 14 діб з послідуємим інтервалом в 7 діб. Результати досліджень представлені в таблиці 3.6.

Із пагонів з бруньками, що утворилися (див. рис.3.8) можна отримати необмежену кількість садивного матеріалу, розділяючи їх і отримуючи пагони, що утворилися і висаджуючи на живильні середовища. Проводили підрахунок коефіцієнту розмноження ялини голубої, який становив 1:144.

Таблиця 3.6.

**Інтенсивність росту пагонів ялини голубої на модифікованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга**

Довжина пагонів, мм	Кількість бруньок	
	21 доба	28 доба
60 – 70 мм	4±5	4±5
80 – 100 мм	6±7	7±8

За умов мікроклонального розмноження формування кореневої системи, як додаткових так і основного кореня є головним завданням для ведення клонального лісівництва. Даний процес залежить від факторів навколишнього середовища та ендогенних факторів і є складним для хвойних порід рослин. Найчастіше для укорінення використовують ауксини, а саме нафтилоцтову кислоту та індолілмасляну кислоту.

У своїх дослідженнях нами вивчено дію НОК у наступному діапазоні концентрацій від 0,5 до 2 мг/л в агаризованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга, до складу якого входила половинна концентрація мінеральних солей на процес коренеутворення у ялини голубої та укорінення на живильному середовищі без регуляторів росту.

Для укорінення відбирали пагони одного розміру і висаджували на модифіковане живильне середовище Мурасіге-Скуга різних варіантів : МСК1 – половинна концентрація мінеральних солей без додавання регуляторів росту; МСК 2 - половинна концентрація мінеральних солей з додаванням 0,5 мг/л НОК; МСК 3 - половинна концентрація мінеральних солей з додаванням 2 мг/л НОК.

Результати досліджень представлені у табл. 3.7.

Таблиця 3.7.

**Вплив складу живильного середовища на укорінення пагонів ялини голубої**

Варіант	Склад середовища	Кількість пагонів, шт	Кількість укорінених пагонів	
			шт	%
1	½ МС	20	8	20
2	½ МС + 0,5 мг/л НОК	20	16	90
3	½ МС + 2,0 мг/л НОК	20	10	50
НІР <sub>05</sub>			0,02	10,80

Коренеутворення зазвичай проходить у основи пагонів. З даних наведених у табл. 3.8 можна бачити, що оптимально ефективним виявилось живильне середовище МСК2 яке доповнене 0,5 мг/л НОК. При цьому кількість укорінених пагонів на цьому середовищі становила 90%. Укорінені пагони ялини голубої представлено на рис. 3.9.



Рис. 3.9. Укорінені пагони ялини голубої.

Таким чином, в результаті проведених досліджень можна зробити висновок, що найкращим для укорінення ялини голубої виявилось середовище МС з половинною концентрацією макро- і мікросолей та доповнене 0,5 мг/л НОК, що ми і рекомендуємо для укорінення пагонів.

Одним із проблемних та заключних етапів розмноження хвойних порід рослин методом культивування ізольованих тканин є процес адаптації, який у рослин, отриманих в умовах *in vitro*, більш ускладнений порівняно із рослинами за умов *in vivo*.

Слід зазначити, що рослини, отримані *in vitro* відрізняються також анатомічними ознаками, а саме – це тонка кутикула, яка містить мало воску та воскоподібних речовин; мала кількість механічних тканин; слабо розвинені провідні пучки; обмежене функціонування органів, які необхідні для фотосинтезу (продихи) [9].

Пересадження інтактних рослин *in vitro* в умови *in vivo* призводить до виникнення стресу, оскільки їх органи, сформовані за високої вологості повітря та низької інтенсивності освітлення, не можуть функціонувати адекватно у нових умовах. Підчас поступового зниження вологості повітря, за адаптації у рослин-регенерантів утворюються кутикули.

## ВИСНОВКИ

1. При введенні в культуру *in vitro* насіння ялини голубої встановлено, що найкращим стерилізуючим розчином 0,9% гіпохлориту натрію з експозицією 15 хвилин. Ефективність стерилізації становила 60%.

2. Розроблено схему стерилізації живців ялини голубої, яка полягала в їх поетапній обробці 96°C етиловий спирт +0,5% сулема, експозиція 7 хв. Живці → 96°C етиловий спирт (експозиція 60 сек) → 0,5% сулема (експозиція 15 хв). Ефективність стерилізації становила 80%.

3. В процесі культивування ізольованих тканин ялини блакитної на живильному середовищі Мурасіге-Скуга з додаванням 2 мг/л 2,4-Д та 0,2 мг/л кінетину нами отримано первинну калюсну тканину. За подальшого перепасирування її на свіже живильне середовище, доповнене БАП в концентрації 0,5 мг/л отримано морфогенетичну калюсну тканину.

4. Встановлено, що більш інтенсивний ріст пагонів спостерігався за вирощування живців ялини голубої на модифікованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга варіант 3.

5. Згідно проведених досліджень найкращим для укорінення виявилось середовище МС з половинною концентрацією макро- і мікросолей та доповнене 0,5 мг/л НОК, яке рекомендовано нами для укорінення пагонів ялини голубої.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Калінін Ф.Л., Сарнацька В. В., Поліщук В. Е. Технологія мікроклонального розмноження рослин. К.: Наукова думка, 1992. – 250 с.
2. Кічура А.В., Кічура В.П. (2023). Можливості формування різновікових насаджень у лісовому фонді закарпатської області. ЛІСІВНИЦТВО І АГРОЛІСОМЕЛІОРАЦІЯ. 143.: 19-29.
3. Кляченко О. Л., Коломієць Ю.В., Субін О.В. Біотехнологія рослин. Навчальний посібник. К.: НУБІП України, 2023. – 320 с.
4. Харачко Т.І. (2009) Особливості штучних лісових насаджень ялини європейської в Ікво-Вілійському лісокультурному районі. Науковий вісник НЛТУ України. 19.12.: 45-51
5. Gaidamashvili M., Benelli C. (2021). Threatened Woody Plants of Georgia and Micropropagation as a Tool for In Vitro Conservation. *Agronomy* 11, 1082. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061082>.
6. Liu U., Cossu T.A., Davies R.M., Forest F., Dickie J.B., Breman E. (2020). Conserving orthodox seeds of globally threatened plants Ex Situ in the Millennium Seed Bank, Royal Botanic Gardens, Kew, UK: The Status of Seed Collections. *Biodivers. Conserv.*, 29, 2901–2949.
7. Cao X., Gao F., Qin C., Chen S., Cai J., Sun C., Weng Y., Tao J. (2022) Optimizing Somatic Embryogenesis Initiation, Maturation and Preculturing for Cryopreservation in *Picea pungens*. *Forests*. 13, 2097-2116. <https://doi.org/10.3390/f13122097>.
8. Conservation International. Biodiversity Hotspots. Available online: <https://www.conservation.org/priorities/biodiversityhotspots> (accessed on 6 May 2021).
9. Tao J., Chen S.G., Qin C.Y., Li Q.M., Cai J.F., Sun C.B., Wang W.M., Weng Y.H. (2021). Somatic embryogenesis in mature zygotic embryos of *Picea pungens*. *Sci. Rep.*, 11, 19072 - 19086.

10. Rathore J.S., Rathore V., Shekhawat N.S., Singh R.P., Liler G., Phulwaria M., Dagla H.R. (2004). Micropropagation of Woody Plants. In Plant Biotechnology and Molecular Markers; Srivastava, P.S., Narula, A., Srivastava, S., Eds.; Anamaya Publishers: New Delhi, India. pp. 195–205.

11. Wajs-Bonikowska A., Maciejczyk E., Szoka Ł., Kwiatkowski P., Meena S.N., Banaszczak P. (2025). Biological Potential of *Tsuga canadensis*: A Study on Seed, Cone Essential Oils, and Seed Lipophilic Extract. *Appl. Sci.* 15, 1713. <https://doi.org/10.3390/app15041713>.

12. Hofmann T., Albert L., Nemeth L., VrSanska M., Schlossova N., Voběrkova S., Visi-Rajczi E. (2021). Antioxidant and Antibacterial Properties of Norway Spruce (*Picea abies* H. Karst.) and Eastern Hemlock (*Tsuga canadensis* (L.) Carrière) Cone Extracts. *Forests*, 12, 1189-1200.

13. Wolff R.L., Lavalie O., Frederique P., Aitzetmuller K. (2002) Abietoid Seed Fatty Acid Compositions—A Review of the Genera *Abies*, *Cedrus*, *Hesperoepuce*, *Keteleeria*, *Pseudolarix*, and *Tsuga* and Preliminary Inferences on the Taxonomy of Pinaceae. *Lipids*, 36.1–8.

14. Terezia Salaj, Katarina Klubicová, Bart Panis, Rony Swennen and Jan Salaj. (2020). Physiological and Structural Aspects of In Vitro Somatic Embryogenesis in *Abies alba* Mill. *Forests*. 11. 1210 – 1220. doi:10.3390/f11111210

15. Egertsdotter U. (2019). Plant physiological and genetical aspects of the somatic embryogenesis process in conifers. *Scand. J. Res.* 34, 360–369.

16. Vooková B., Kormut'ák A. (2003). Plantlet regeneration in *Abies cilicica* Carr. and *Abies cilicica* \_ *Abies nordmanniana* hybrid via somatic embryogenesis. *Turk. J. Bot.* 27, 71–76.

17. Pullman G.S., Olson K., Fischer T., Egertsdotter U., Frampton J., Bucalo K. (2016) Fraser fir somatic embryogenesis: High frequency initiation, maintenance, embryo development, germination and cryopreservation. *New For.* 47.: 453–480.

18. Vondráková Z., Eliášová K., Fischerová L., Vágner M. (2011). The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Central Europ. J. Biol.* 6. 587–596.

19. Abrahamsson M., Valladares S., Larsson E., Clapham D., von Arnold S. (2012). Patterning during somatic embryogenesis in Scots pine in relation to polar auxin transport and programmed cell death. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 109, 391–400.
20. Klimaszewska K., Noceda C., Pelletier G., Label P., Rodriguez R., Lelu-Walter M.-A. (2009). Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 45, 20–33.
21. Hazubska-Przybył T., Wawrzyniak M.K., Kijowska-Oberc J., Staszak A.M., Ratajczak E. (2022). Somatic Embryogenesis of Norway Spruce and Scots Pine: Possibility of Application in Modern Forestry. *Forests.* 13, 155. <https://doi.org/10.3390/f13020155>.
22. Hazubska-Przybył T., Ratajczak E., Obarska A., Pers-Kamczyc E. (2020). Different Roles of Auxins in Somatic Embryogenesis Efficiency in Two *Picea* Species. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3394.
23. Aronen T., Virta S., Varis S. (2021). Telomere Length in Norway Spruce during Somatic Embryogenesis and Cryopreservation. *Plants.* 10, 416.
24. Peng C., Gao F., Wang H., Shen H., Yang L. (2021). Optimization of Maturation Process for Somatic Embryo Production and Cryopreservation of Embryogenic Tissue in *Pinus koraiensis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 144, 185–194.
25. Dahrendorf J., Clapham D., Egertsdotter U. (2018). Analysis of Nitrogen Utilization Capability during the Proliferation and Maturation Phases of Norway Spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.) Somatic Embryogenesis. *Forests.* 9, 288.
26. Cao X., Gao F., Qin C., Chen S., Cai J., Sun C., Weng Y., Tao J. (2022) Optimizing Somatic Embryogenesis Initiation, Maturation and Preculturing for Cryopreservation in *Picea pungens*. *Forests* 13, 2097. <https://doi.org/10.3390/f13122097>.
27. Salaj, T.; Matusova, R.; Salaj, J. (2015). Conifer somatic embryogenesis an efficient plant regeneration system for theoretical studies and mass propagation. *Dendrobiology.* 74, 69–76.

28. Välimäki S, Hazubska-Przybył T, Ratajczak E, Tikkinen M, Varis S and Aronen T. (2021) Somatic Embryo Yield and Quality From Norway Spruce Embryogenic Tissue Proliferated in Suspension Culture. *Front. Plant Sci.* 12:791549. doi: 10.3389/fpls.2021.791549
29. Egertsdotter, U., Ahmad, I., and Clapham, D. (2019). Automation and scale up of somatic embryogenesis for commercial plant production, with emphasis on conifers. *Front. Plant Sci.* 10:109. doi: 10.3389/fpls.2019.00109.
30. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-97.
31. Murashige T. (1990) Plant propagation through tissue culture. Paractice with unrealized potential. In: *Handbook of Plant Cell Culture, Ornamental Species* (Eds. P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp and Y.P.S. Bajaj). McGraw Hill Publishing Company, New York. 5 : 3-9.
32. Liu, H., Wang, J., Liu, J., Liu, T., and Xue, S. (2021). Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) signaling in plant development and stress responses. *BIOTECH 2*, 32–63. doi: 10.1007/s42994-021-00035-4.
33. Mamun, N. H., Aidun, C. K., and Egertsdotter, U. (2018). Improved and synchronized maturation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.) somatic embryos in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell. Dev.-Pl.* 54, 612–620. doi: 10.1007/s11627-018-9911-4.
34. Stojić, D.; Budimir, S.; Čokeša, V.; Uzelac, B. (2024). Optimization of In Vitro Regeneration of *Pinus peuce* (Gris.). *Horticulturae*, 10, 97. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10010097>.

## ДОДАТКИ



НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ  
І ЕКОЛОГІЇ

## ЗБІРНИК

матеріалів доповідей

ХІ МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ  
КОНФЕРЕНЦІЇ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ

І МОЛОДИХ ВЧЕНИХ



«ЕКОЛОГІЯ – ФІЛОСОФІЯ ІСНУВАННЯ  
ЛЮДСТВА»

23-24 квітня 2025 р.

Київ – 2025

УДК 581.143.6:633.88:581.9

ОСОБЛИВОСТІ ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ЯЛИНИ БЛАКИТНОЇ

*Плаксюк Н.*, студент 4 курсу спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»,  
факультету захисту рослин, біотехнології та екології

*Кляченко О.Л.*, доктор с.-г. наук, професор кафедри екобіотехнології та біорізноманіття  
Національний університет біоресурсів і природокористування України

Блакитна ялина є морозостійкою рослиною, яка не страждає від пізніх заморозків, виносить посуху набагато краще порівняно з іншими видами ялин, переносить певний рівень загазованості повітря, стійка до міського клімату. Використовується в декоративному садівництві, озелененні, в поодиноких посадках, в групах, на альпінариях. Однак рослини страждають від попеліші [1].

Біотехнологічні методи отримання рослин через культуру *in vitro* є альтернативним традиційному, оскільки уможливає звільнення від екзогенної та ендогенної інфекції тканини рослин та одержати елітний безвірусний рослинний матеріал.

Метою нашої роботи є введення в культуру *in vitro* ялини блакитної та опис її морфогенезу залежно від складу живильного середовища та вмісту регуляторів росту.

Вихідним матеріалом слугували молоді пагони з апікальними бруньками та насіння ялини голубої. В роботі застосовували загальноприйняті в біотехнології методи досліджень та стерилізації посуду, матеріалів, живильних середовищ та рослинного матеріалу [2]. Нами застосовано два методи стерилізації: для насіння застосовували 70% етиловий спирт (2 хв) → 0,1% розчин  $HgCl_2$  з експозицією 8хв і подальшим три кратним промиванням стерильною дистильованою водою, тоді як для мікроживців застосовували розчин гіпохлориту натрію (1:3) з експозицією 15хв з подальшим відмиванням стерильною дистильованою водою три рази по 10 хвилини. Експлантати поміщали на середовище Мураціге-Скуга (МС) [3]. Отримані проростки та розвинуті бічні пагони перепасировували на середовище МС з додаванням 0,25мг/л БАП та кінетину у концентрації 0,5 мг/л та 1 мг/л. Параметри росту фіксували на 30 добу культивування. Насіння перед введенням в культуру *in vitro* піддавали стратифікації, поміщаючи їх на вологий фільтрувальний папір та витримуючи за температури +4°C протягом 14 діб.