

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07. – МР. 1998 «С». 2023.11.01. 12 ПЗ

ШВЕЦЯ ВЛАДИСЛАВА ВІКТОРОВИЧА

2024

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 606:57.085

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету захисту
рослин, біотехнологій та екології

_____ Коломієць Ю.В.

«___» _____ 2024 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри
Екобіотехнології та біорізноманіття

_____ Кваско О.Ю.

«___» _____ 2024 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Введення *Pulsatilla alba* в культуру *in vitro*»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

Гарант освітньої програми

д. с.-г. наук, професор

(підпис)

Лісовий М.М.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

к. б. наук, доцент

(підпис)

Субін О.В.

Виконав

Швець В.В.

КИЇВ-2024

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи: насіння *Pulsatilla alba*, методичні рекомендації для проведення заходів зі стерилізації вихідного рослинного матеріалу для введення в асептичну культуру.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Провести комплексний аналіз наукових публікацій щодо застосування методів культури *in vitro* для розмноження *Pulsatilla alba*.
2. Здійснити збір необхідних для роботи матеріалів, в тому числі насіння *Pulsatilla alba* та створити необхідні умови для його введення в культуру *in vitro*.
3. Розробити та оптимізувати схему клонального мікророзмноження.
4. Провести оцінку ефективності розроблених методів.

Дата видачі завдання – 1 вересня 2023 року

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи _____
(підпис) (прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання _____
(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Магістерська кваліфікаційна робота була виконана протягом 2023-2024 років у навчально-науковій лабораторії біотехнології та клітинної інженерії на базі кафедри екобіотехнології та біорізноманіття факультету захисту рослин, біотехнологій та екології НУБіП України.

Робота представлена на 44 сторінках комп'ютерного друку, складається із 3 розділів, ілюстрована 2 таблицями, 12 рисунками, містить 42 використаних джерела.

Мета роботи: дослідити та проаналізувати можливість застосування методу культури *in vitro* для розмноження рослин *Pulsatilla alba*.

Згідно із встановленою метою необхідно виконати наступні завдання:

1. Провести комплексний аналіз наукових публікацій щодо застосування методів культури *in vitro* для розмноження *Pulsatilla alba*.
2. Здійснити збір необхідних для роботи матеріалів, в тому числі насіння *Pulsatilla alba* та створити необхідні умови для їхнього введення в культуру *in vitro*.
3. Розробити та оптимізувати схему клонального мікророзмноження з урахуванням впливу різних факторів.
4. Провести оцінку ефективності розроблених методів.

Предмет досліджень: рослини сну альпійського (*Pulsatilla alba*), культивовані в асептичних умовах.

Об'єкт досліджень: процес клонального мікророзмноження *Pulsatilla alba*.

Методи дослідження: біотехнологічні, теоретичні (аналіз, класифікація, систематизація).

Актуальність теми.

Дефіцит сировини цінних лікарських рослин, таких як *Pulsatilla alba*, створює значні обмеження для фармацевтичної промисловості та традиційної медицини. Біотехнологічні методи, зокрема культура тканин *in vitro*, пропонують ефективне рішення цієї проблеми. Використання біотехнологічних

підходів дозволяє отримувати достатню кількість біомаси з високим вмістом цінних біологічно активних сполук, що є особливо актуальним для видів, які мають обмежені ареали поширення.

Ключові слова: культура *in vitro*, *Pulsatilla alba*, асептичні проростки, *Ranunculaceae*.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Загальна характеристика родини Жовтецеві (<i>Ranunculaceae</i>)	8
1.2. Народногосподарське значення родини Жовтецеві	12
1.3. Характеристика представника родини Жовтецеві – сну альпійського (<i>Pulsatilla alba</i>)	14
РОЗДІЛ 2. ПРЕДМЕТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	19
2.1. Основи мікроклонального розмноження рослин.....	19
2.2. Підбір та підготовка вихідного експланта для введення в асептичну культуру	21
2.3. Підготовка та стерилізація рослинного матеріалу та обладнання.....	22
2.4. Живильне середовище для асептичної культури.....	28
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВВЕДЕННЯ <i>PULSATILLA ALBA</i> В АСЕПТИЧНУ КУЛЬТУРУ	32
ВИСНОВКИ.....	38
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	39
ДОДАТОК А.....	44

ВСТУП

На даний час фармацевтична галузь виявляє зростаючий інтерес до використання природних компонентів, отриманих з рослин. У складі багатьох препаратів, що представлені на ринку, містяться рослинні інгредієнти, що свідченням важливості пошуку нових джерел активних біологічних сполук для розробки сучасних дієвих лікарських засобів. Серед рослинних ресурсів особливу увагу слід звернути на представників родини Жовтецевих (*Ranunculaceae*), які містять багато біологічно активних сполук, що можуть бути використані у якості цінної сировини для одержання потрібних речовин. Проте багато видів цієї родини, особливо ті, що ростуть у високогірних зонах, є вразливими та можуть втратити свої ареали поширення. Їхні природні ресурси поступово зменшуються через вплив людської діяльності, що обмежує їхню здатність до природного відновлення.

Одним із видатних представників цієї родини є *Pulsatilla alba*, що має значний потенціал у фармацевтиці. Застосування культивування *Pulsatilla alba in vitro* може створити основу для промислового виробництва високоякісних гомеопатичних засобів, біологічно активних добавок, натуральної косметики та природних барвників. Це сприяє не тільки ефективному використанню цього цінного рослинного ресурсу в медицині та інших галузях, але й підтримці біорізноманіття завдяки збереженню рідкісних видів рослин.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика родини Жовтецеві (*Ranunculaceae*)

Жовтецеві (*Ranunculaceae*) – родина дводольних квіткових рослин, що налічує близько 59 родів з більш ніж 2000 видів, поширених по всьому світу.

Родина характеризується різноманітністю життєвих форм: від багаторічних трав з кореневищами до однорічних трав, напівчагарників та ліан. Переважно представники цієї родини зустрічаються у північних помірних зонах. У тропіках вони рідкісні й обмежені високогірними районами. Жовтецеві поширені як у різних наземних, так і у водних біотопах від низовин до високогір'я. Загалом 44 роди присутні у Східній Азії, 24 – в Європі, з невеликою кількістю родів у Північній Америці та у високогір'ї Південної Америки [12]. Найбільш чисельними родами родини *Ranunculaceae* є *Ranunculus* – 600 видів, *Thalictrum* – 330 видів, *Delphinium* – 365 видів, *Clematis* – 325 видів і *Aconitum* – 300 видів.

Важливими факторами їхньої здатності колонізувати нові осередки існування на більших висотах і широтах можуть бути різноманітні морфологічні адаптації та репродуктивні стратегії, зокрема вегетативне розмноження.

Родина *Ranunculaceae* є однією із найбільш цікавих для вивчення груп квіткових рослин. Її представники відзначаються високим рівнем морфологічної різноманітності, що є результатом тривалої еволюції та пристосування до різних змін екологічних умов. Філогенетичні дослідження дозволяють простежити складну історію розвитку цієї родини та її місце в системі покритонасінних.

Спочатку види Жовтецевих класифікували на основі опису їхніх плодів (наприклад, структури перикарпу та опушення), квіток (наприклад, кількості чашолистків та пелюсток, блиску та кольору пелюсток, форми нектарників), коріння (наприклад, чи були вони однорідними чи диморфними з волокнистим та бульбовим корінням) та анатомії плодів [5].

Для *Ranunculaceae* було запропоновано кілька класифікацій, заснованих на морфологічних ознаках, на молекулярних даних та на комбінованому наборі молекулярних і морфологічних даних. З-поміж традиційних ознак, що

використовуються, тип хромосоми і число основ виявилися найбільш відповідними філогенії родини, як це впливає з молекулярних даних. Нещодавні молекулярні дослідження дали уявлення про філогенетичні зв'язки всередині цієї родини [3]. Родина *Ranunculaceae* у флорі України представлена двома підродинами, десятьма трибами, 22 родами та 102 видами [2]. За чисельністю видів родина посідає сьоме місце у флорі України [11].

М. Тамура, завдяки своїм всебічним філогенетичним дослідженням, створив детальну систему класифікації родини *Ranunculaceae*, яка включає 5 підродин, 10 триб та 14 підтриб, відбиваючи складну еволюційну історію цієї групи рослин [4]. Триба *Ranunculeae* DC. у підродині *Ranunculoideae* Hutch., включає близько 650 видів і поширена на всіх континентах [3].

Пізніше для визначення філогенетичних зв'язків у *Ranunculaceae* були використані ДНК-маркери [6]. Послідовності внутрішньої транскрибованої спейсерної області ядерної рибосомної ДНК переважно використовуються як ДНК-баркод-маркери для філогенетичних досліджень на родовому чи підродовому рівні [7,8]. У поєднанні з даними з хлоропластного геному та іншими зовнішніми даними цей ядерний маркер також дає уявлення про мережеві структури, викликані гібридизацією [9,10].

Родина характеризується значною варіативністю квіткових структур і високою різноманітністю способів запилення. Зазвичай квіткові нектарники присутні, однак у *Anemone*, *Clematis*, *Thalictrum* та багатьох видів *Pulsatilla* нектарники відсутні, і ці види покладаються лише на пилок як джерело їжі для залучення запилювачів. У більшості інших родів квітки містять численні тичинки та нектарники, які з функціональної точки зору є нектаропродукуючими квітками з пилком.

Квітки Жовтецевих, як актиноморфні, так і зигоморфні. Період цвітіння видів охоплює вегетаційний період, починаючи з березня і триваючи до вересня, із піком цвітіння у червні та липні.

Оцвітина може бути як подвійною, так і простою, а кількість чашолистків та пелюсток різняться. Особливо цікавою є будова нектарників у деяких родів

(наприклад, *Aconitum*, *Consolida*, *Delphinium*), а також наявність стамінодій у деяких видів. Тичинки розташовані спіралью або циклічно, а пилок має різноманітну будову. Гінецей, як правило, апокарпний, але може бути і ценокарпним [11].

Квітки рослин роду *Pulsatilla* класифікують як дзвоникоподібні або чашоподібні [26] на основі форми оцвітчини, яка визначає доступність нектару та пилку для запилювачів.

Незважаючи на відносно примітивну будову квітки, рослини родини *Ranunculaceae* демонструють різноманітність стратегій запилення. Більшість видів є ентомофільними, хоча деякі види є анемофільними [26]. Також трапляється самозапилення. Від вітрозапильних видів роду *Thalictrum* до яскраво забарвлених, великих квіток, що приваблюють комах, як у *Clematis* чи *Ranunculus* – Жовтецеві проявляють широкий спектр адаптацій [13]. Забарвлення квіток, від жовтого до фіолетового, забезпечується різними пігментами. Зокрема, квіти світлих кольорів пристосовані до запилення вночі, а блакитні та фіолетові – до денного. У роді *Aquilegia* зустрічаються види, які запилюються колібри, завдяки розвитку глибоких нектарних шпор. Ряд науковців виявили, що деякі види роду *Pulsatilla* здатні підтримувати всередині квіток температуру, значно вищу за температуру навколишнього середовища. Зокрема, Кнутсон зафіксував у *Pulsatilla patens* різницю температур до 10°C, а Лузар і Готтсбергер – до 6,2°C у *P. alpina* [22]. Таке підвищення температури може сприяти швидшому дозріванню маточок і пилкових трубок, а також приваблювати запилювачів теплом і підігрітим нектаром.

Аромати квітів відіграють ключову роль у взаємодії рослин із запилювачами. Різноманітність квіткових запахів між різними видами рослин часто слугує своєрідним сигналом, що приваблює певних запилювачів.

Досліджено летючі речовини 12 видів з шести родів родини *Ranunculaceae* та виявлено 116 сполук (103 вдалося ідентифікувати). Основними класами сполук є похідні жирних кислот, ізопреноїди та бензоїни, тоді як фенілпропаноїди й азотовмісні сполуки зустрічаються рідше. Найбільш

поширеними сполуками, знайденими у кожного виду, є похідні жирних кислот (наприклад, протоанемонін, октанал, нонанал, деканал) і бензоноїди (фенілацетальдегід, 2-метокси-4-вінілфенол). Кількість компонентів коливається від 28 у *A. canadensis* до 70 у *P. rubra*. До найбільш значущих сполук, які досягали щонайменше 20% вмісту, належать: протоанемонін у *Pulsatilla* і *Ranunculus* (48–98%), октанал у *Aquilegia* (28–42%), пентадекан у *P. rubra* (26%), нонанал у *T. europaeus* (22%), (E,E)- α -фарнезен у *T. europaeus* (35%), α -муролен у *C. palustris* (22, 4%), 2-фенілетанол у *A. sylvestris* (39%) і фенілацетальдегід у *A. canadensis* (22,4%) [26].

Різноманітність плодів у родині *Ranunculaceae* є важливою систематичною ознакою. Апокарпні плоди, характерні для більшості представників родини, вважаються примітивною ознакою. Однак наявність монокарпних та соковитих плодів у деяких родів свідчить про паралельну еволюцію та ускладнення будови плодів у межах родини.

У багатьох однорічних і дворічних рослин первинний корінь зазвичай перетворюється на стрижневий. У таких родів, як *Ceratocephala* та *Myosurus*, гіпокотиль зберігається, а додаткові корені формуються на межі між гіпокотилем і первинним коренем. У багаторічних видів з горизонтальним симподіальним кореневищем гіпокотиль також утворює додаткові корені, які згодом замінюють первинну кореневу систему. Види з горизонтальним моноподіальним кореневищем, як, наприклад, у *Hepatica*, рідко зустрічаються в родині. У рослин з прямостоячим кореневищем, таких як аквілегія, як первинний корінь, так і гіпокотиль можуть розвиватися в основну кореневу систему. У *Ranunculus* та споріднених видів додаткові корені формуються на сім'ядольному вузлі, при цьому первинний корінь і гіпокотиль поступово відмирають після проростання, як у однорічних, так і у багаторічних видів [13].

Видовий склад родини жовтецевих суттєво впливає на структуру рослинних угруповань. Представники цієї родини часто виступають домінантами або асектаторами у різних типах ценозів.

1.2. Народногосподарське значення родини Жовтецеві

Більшість видів родини жовтецевих, включаючи *Aconitum*, *Delphinium*, *Ranunculus*, *Actaea* та *Cimicifuga europaea*, є отруйними рослинами. Однак, ці рослини мають важливе місце в житті людини завдяки своїм декоративним властивостям, і вже тривалий час вирощуються в садах у вигляді різних сортів, таких як *Aconitum*, *Delphinium*, *Clematis*, *Aquilegia*, *Consolida orientalis*, *Actaea spicata*, *Trollius europaeus* [11]. Деякі з цих видів, зокрема *Caltha* та *Actaea*, також використовуються для отримання барвників.

У медицині поширене використання таких видів, як *Adonis vernalis*, *Actaea spicata*, *Hepatica nobilis*, а також представників родів *Caltha*, *Ficaria*, і *Ranunculus*.

Рід *Aconitum* включає близько 400 видів, деякі з яких мають важливе медичне значення. Численні дослідження підтверджують, що багато видів цього роду володіють вираженими фармакологічними властивостями та мають високий терапевтичний потенціал для лікування різних захворювань. Традиційно, види *Aconitum* використовувалися для лікування ряду хвороб, зокрема нервових розладів, болю, запалень, захворювань нирок, ревматизму, діабету та серцевих захворювань. Лікувальні властивості цих рослин обумовлені наявністю різних класів вторинних метаболітів.

Один з представників роду *Aconitum* – аконіт низький (*Aconitum napum*). З лікувальною метою використовують корені цієї рослини, які мають веретеноподібну або бульбоподібну форму. У міжнародній фармацевтичній індустрії також існують рекомендації щодо застосування листя аконітів. Варто зазначити, що всі ці види є отруйними.

Подальші фітохімічні дослідження видів *Aconitum* можуть виявити нові природні сполуки, що мають терапевтичний потенціал і можуть бути використані в медицині [14].

Рослини роду *Pulsatilla* мають у своєму складі велику кількість тритерпеноїдних сапонінів, які проявляють регуляторний ефект на апоптоз, аутофагію, проліферацію та імунітет клітин [17].

Щоб краще зрозуміти фармакологічні властивості та механізми дії рослин роду *Pulsatilla* було виділено певну кількість сполук, зокрема і сапоніни – основні біологічно активні компоненти цих трав. Встановлено існування восьми типів сапонінів на основі їх агліконів, і виявлено 68 видів цих сполук у *Pulsatilla*. Серед них PSA, AB4, PSD, PSE та раддеанозид R13, що проявляють виражені біологічні ефекти: протипухлинну, антиоксидантну, імуномодулюючу, протизапальну, антимікробну та захисну дію [19]. Вплив сапонінів пов'язаний із регуляцією багатьох клітинних процесів і сигнальних шляхів. Однак, жоден із компонентів, включно з сапонінами цього роду, поки що не досяг стадії клінічного застосування як терапевтичний засіб.

В останні роки зростає кількість досліджень, які присвячені протираковій дії китайської фітотерапії, що має меншу токсичність та ширший спектр мішеней порівняно з хіміотерапією [18]. Нещодавно було встановлено, що сапоніни з роду *Pulsatilla* є активними компонентами, які можуть впливати на різні види ракових клітин через різноманітні механізми.

Рослини роду *Ranunculus* містять широкий спектр біоактивних сполук, таких як флавоноїди, органічні кислоти, лактонові сполуки, глікозиди, стероли, полісахариди та мікроелементи. Ці речовини взаємодіють, забезпечуючи протизапальні, протиракові, антибактеріальні, протитуберкульозні властивості. Традиційні характеристики китайської медицини, зокрема здатність усувати жар і здійснювати детоксикацію, підкреслюють важливість цього роду в етнічній медицині [15]. Останні наукові досягнення та розробка фармацевтичних препаратів привели до участі представників цього роду у клінічних та епідеміологічних дослідженнях. Хоча фармакологічну активність вивчали і в багатьох інших споріднених видах, нові біологічно активні сполуки, виявлені у видах *Ranunculus* з високою фармакологічною ефективністю, показують перспективи для використання в нутрицевтиці та фармацевтиці.

Анемона жовтецева (*Anemone ranunculoides*) є однією з цінних лікарських і водночас рідкісних рослин (рис. 1.1). Анемона росте у розсіяних затінених листяних лісах і є рідкісним видом, що потребує охорони. Листя анемони жовтецевої володіє наркотичними властивостями. У складі рослини виявлено камфору – анемонол, який при розпаді виділяє анемонин, що використовується в медичній практиці як знеболювальний та антиспазматичний засіб.



Рис. 1.1. Анемона жовтецева (*Anemone ranunculoides*) [20]

1.3. Характеристика представника родини Жовтецеві – сну альпійського (*Pulsatilla alba*)

Сон альпійський (*Pulsatilla alba* Reichenb.) – багаторічна трав'яниста рослина, що має висоту близько 15-30 сантиметрів (рис.1.2). Ця рослина відноситься до групи гемікриптофітів. Під час настання несприятливих умов, бруньки відновлення рослини розміщуються на рівні ґрунту або частково занурені у нього та захищені рослинною підстилкою чи снігом. *Pulsatilla alba* має міцне темно-коричневе або чорнувате кореневище та прямостояче стебло,

вкрите волосками. Пізніше стебло стає голим, на ньому розміщуються 1-3 довгочерешкові прикореневі листки. Ці листки короткі з яйцеподібно-трикутними пластинками, які розсічені на 2–3 пірчаторозділені частки з ланцетними лопатями [24].



Рис. 1.2. Загальний вигляд рослини *Pulsatilla alba* (г. Мангарт, Східні Юлійські Альпи, Словенія) [23]

Поодинокі квітки майже прямостоячі завдяки квітконіжкам, які подовжуються під час плодоношення. Оцвітина складається з 6 пелюсткоподібних чашолистків, білого кольору з синьо-фіолетовою зовнішньою стороною, рясно опушена. Квітки не мають нектарників [24]. Період цвітіння триває з травня по липень, плодоношення розпочинається у липні і закінчується у серпні. Розмноження рослин даного виду можливе кількома способами: насінням або вегетативно за допомогою стolonів [21].

Плодом слугує багатогорішок, який складається з горішків пірчасто опушеними остями [25].

У довідковій літературі можна зустріти інші назви цієї рослини: праліска альпійська, дрімота, сон Шерфеля, сон-зілля, сонник, вітроцвіт, сон-трава біла тощо.

Ареал сну альпійського фрагментований та розташований на достатньо великих географічних відстанях: охоплює територію від півночі Іспанії до Сербії та Карпат. Вид *Pulsatilla alba* часто зустрічається на луках і скелястих ділянках субальпійських та альпійських зон. Найбільш типові місця зростання цього виду – це гірські пасовища вище верхньої межі лісу, трав'янисті місця в карсті, сухі луки в пухкому гірському лісі біля його верхньої межі. Ростає на неглибоких і глибоких ґрунтах, на крем'янистих, зрідка також на базальних субстратах в угрупованнях *Nardion* і *Callamagrostion villosae* [27].

Сон білий є мезофітом, тобто належить до рослин, які адаптовані до існування у середовищі із помірним зволоженням ґрунту, займає проміжне місце між гігрофітами та ксерофітами. Цей вид є високогірним. На території України цю рослину можна знайти на Мармароському масиві, у Чорногорі (гора Ребра, Петрос, Шпиці), Свидовці, Горганах (рис. 1.3). Якщо говорити про центральні регіони України – сон альпійський зростає у заповіднику "Блакитні дуби" в Київській області [21].

Популяції рослин даного виду є нечисельними та налічують 1-5 рослин на 1 м², а одна така популяція може займати площу до 100 м² переважно з неповночленими віковими спектрами [25].

Pulsatilla alba містить велику кількість біологічно активних речовин. До її складу входять таніни, фітонциди, сапоніни (наприклад, гедерагенін і патензин) [28], органічні кислоти, флавоноїди, а також характерний для роду глікозид ранункулін. Останній під час сушіння перетворюється на ряд сполук, включаючи анемонін і анемонову кислоту [29], що надають рослині антимікробні, протигрибкові та седативні властивості. Листя рослини містить вітамін С, органічні кислоти, алкалоїди та макро- і мікроелементи, а насіння – жирні олії.

Також варто зазначити, що сон альпійський багатий на ефірні олії, тритерпеноїди, стерини, хелідонову кислоту, сапоніни та кумарини.

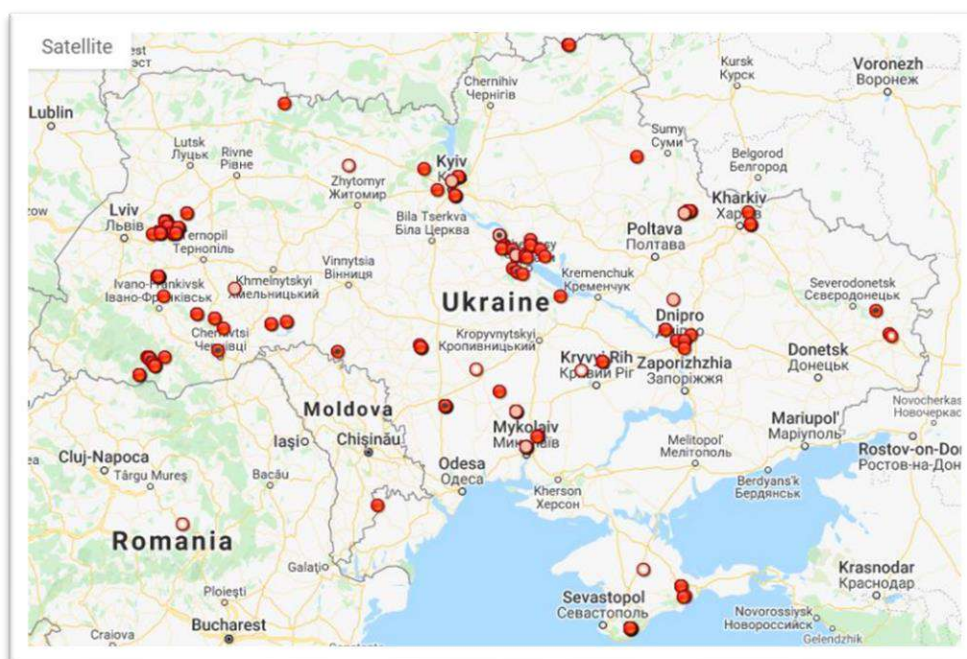


Рис. 1.3. Поширення ареалу сну альпійського на території України [21]

Pulsatilla alba традиційно використовувалася в народній медицині для лікування широкого спектру захворювань. Сучасні дослідження підтверджують її фармакологічний потенціал. Спиртові екстракти сну білого демонструють ефективність при лікуванні запальних процесів, включаючи шкірні захворювання та ревматизм [32]. Крім того, рослина має протипухлинні властивості та використовується для лікування різних видів раку.

В народній медицині відвари та настої *Pulsatilla alba* застосовувалися для лікування нервових розладів, захворювань очей та органів дихання. У народній косметології *Pulsatilla alba* знайшла широке застосування завдяки своїм заспокійливим та протизапальним властивостям. Цю рослину використовували для приготування масок для обличчя, які допомагали пом'якшити шкіру, зняти почервоніння та боротися із висипаннями. Слід додати, що рослина знайшла застосування в ополіскуванні волосся [33], надаючи йому блиску та здорового вигляду.

Незважаючи на широкий спектр лікувальних властивостей, використання *Pulsatilla alba* вимагає обережності. Рослина у свіжому вигляді може подразнювати слизові оболонки шлунково-кишкового тракту та нирок. Самолікування препаратами на основі сон-трави категорично протипоказане через її токсичність.

Виходячи з використання *Pulsatilla alba* в народній медицині та сучасних даних про її багатий хімічний склад та біологічну активність, можна зробити висновок про перспективність цієї рослини як джерела для розробки нових фітопрепаратів.

Сон білий належить до переліку рослин, використання сировини яких заборонено для виробництва лікарських засобів у країні. Окрім того, цей вид віднесений до категорії рідкісних і включений до Червоної книги України [30]. Ця рослина охороняється на території Карпатського біосферного заповідника та Карпатського національного природного парку. Однією з головних причин скорочення чисельності популяцій *Pulsatilla alba* є антропогенний вплив [31]. Інтенсивне відвідування гірських регіонів призвело до порушення природних екосистем і знищення місць зростання цього виду. Через обмеженість придатних для зростання умов та вузьку екологічну нішу цей вид є особливо вразливим.

З огляду на специфічні екологічні умови зростання сну альпійського та його охоронний статус, доцільним є застосування методу культури клітин і тканин *in vitro*. Ця сучасна біотехнологічна методика дозволяє отримувати біологічно активні речовини цілорічно та незалежно від природних факторів, забезпечуючи стабільне постачання сировини для фармацевтичних досліджень.

РОЗДІЛ 2. ПРЕДМЕТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Основи мікроклонального розмноження рослин

Мікроклональне розмноження — це сучасний метод безстатевого розмноження рослин *in vitro*, який дозволяє отримати рослини, ідентичні вихідній формі [34]. Клональне мікророзмноження є одним із найбільш сучасних комерційних застосувань культури рослинних тканин. Цей метод надає великі можливості для відтворення видів, що зазвичай розмножуються нестатевим шляхом, і є цінним для видів із труднощами у проростанні насіння, зокрема тих, чиє насіння має короткий термін життєздатності. Завдяки цьому мікророзмноження стає ефективною альтернативою для розмноження таких рослин. Хоча цей метод підходить для більшості видів, його доцільно використовувати лише для тих, що мають економічну цінність [38].

На комерційному рівні клональне мікророзмноження найбільш поширене у виробництві декоративних рослин. Процедура може реалізовуватися кількома основними шляхами:

- стимуляцією розвитку верхівкових чи пазушних бруньок із подальшим укоріненням;
- індукцією утворення адвентивних бруньок та їх укоріненням;
- формуванням і пророщенням соматичних зародків.

Кожен із методів застосовується з різною ефективністю залежно від генотипу рослини, складу живильного середовища та умов культивування.

Основним принципом мікроклонального розмноження є явище тотипотентності соматичних клітин. Тотипотентність — це здатність однієї клітини ділитися і давати початок усім диференційованим клітинам організму.

Розвиток рослинного організму з однієї клітини – зиготи є результатом складних процесів клітинного поділу та спеціалізації. Диференційовані клітини, як правило, втрачають здатність до необмеженого поділу. Однак, за певних умов, вони можуть повернути цю здатність і перейти в стан недиференційованих клітин. Цей процес, відомий як дедиференціація, є першим етапом регенерації.

Наступним етапом є редиференціяція, під час якого клітини набувають нових функцій і формують різноманітні тканини та органи рослини. Таким чином, завдяки циклічним процесам дедиференціяції та редиференціяції, рослинні клітини зберігають здатність до повної регенерації, що лежить в основі мікроклонального розмноження.

До переваг цього методу відносять:

- отримання великого числа рослин протягом певного періоду, що значно скорочує час у порівнянні зі звичайними методами;
- можливість вирощувати, зберігати та підтримувати велику кількість рослин у компактних умовах, що забезпечує економічну вигоду;
- методика також широко застосовується для збереження генетичного матеріалу та захисту видів, які знаходяться під загрозою зникнення, оскільки деякі види рослин мають обмежений термін зберігання насіння та вегетативних органів, тоді як меристемні клітини зберігаються краще, виживають після кріоконсервації та відновлюються у безпатогенні рослини, коли це необхідно;
- клональне мікророзмноження на великому масштабі в короткі строки також дозволяє знизити час вирощування до 40-50%. У квіткових культур завдяки цьому методу можна багаторазово підвищувати врожайність.

Процес заснований на стимуляції росту верхівкових та пазушних бруньок за допомогою цитокінінів, що призводить до утворення нових пагонів. Після формування кожен осередок пагонів розділяється, переноситься на свіже поживне середовище, і цикл повторюється.

Індуковане цитокінінами розростання верхівкових та пазушних бруньок, кожна з яких дає початок новому осередку пагонів, є основоположним фактором, на якому заснований метод мікроклонального розмноження. Після формування осередку пагонів здійснюється його поділ на окремі групи пагонів, перенесення на свіже поживне середовище, далі процес повторюється [35].

Тривалість мікроклонального розмноження є видоспецифічною і може значно варіюватися. За сприятливих умов культивування, з одного експланта

можна отримати понад мільйон рослинних організмів протягом року. На цей процес впливають різноманітні чинники, серед яких склад живильного середовища, тип експланта, умови вирощування тощо.

Як вихідний матеріал для мікроклонального розмноження рослин використовують різні вегетативні органи, такі як апікальні та пазушні меристеми, молоде листя, квіткові елементи та підземні органи (цибулини, бульби). Однак, найбільш ефективними для отримання великої кількості регенерантів вважаються верхівкові та пазушні бруньки рослин, що активно ростуть.

2.2. Підбір та підготовка вихідного експланта для введення в асептичну культуру

Ефективність мікроклонального розмноження значною мірою залежить від правильного вибору вихідного матеріалу (експланта) та оптимізації умов культивування. Ці фактори безпосередньо впливають на швидкість розмноження та загальну економічну ефективність процесу.

Експлант – це будь-яка меристематична тканина, яка виділяється з материнської рослини і служить вихідним матеріалом для ініціації культур *in vitro* [36]. Зиготичні ембріони, як наймолодші тканини рослини, зазвичай демонструють високу регенераційну здатність в умовах культури *in vitro*. Саме тому насіння, що містить зиготичні ембріони, є одним з найпоширеніших експлантів для мікроклонального розмноження рослин. Ембріональна тканина, оточена ендоспермом та насінневою оболонкою, зберігає ювенільні характеристики, що сприяє ефективному індукуванню процесів регенерації.

При виборі експланта для культури *in vitro* необхідно врахувати низку фізіологічних та морфологічних факторів. Вік тканини є одним з найважливіших критеріїв, оскільки молоді тканини, як правило, демонструють вищу регенераційну здатність. Сезон збору також відіграє значну роль, адже фізіологічний стан рослини протягом року може впливати на її реакцію на культивування *in vitro*. Розмір експланта теж має значення: дрібні експланти

можуть потребувати додаткових поживних речовин, тоді як великі – містять власний запас поживних речовин. Крім того, важливо обирати експланти від здорових рослин, оскільки патогени та стресові умови можуть негативно вплинути на успішність культивування.

Вибір експланта може варіюватись залежно від цілей культури *in vitro*, таких як отримання регенерантів, позначення генетично модифікованих клонів або вивчення фізіологічних процесів, що відбуваються у рослині. Наприклад, для отримання регенерантів з метою покращення властивостей рослин (стресостійкості або врожайності), можуть використовуватись експланти зі спеціалізованих тканин, таких як ембріони, або пилкові зерна [37].

Одним з найпоширеніших і популярних експлантів для культури *in vitro* є меристематичні тканини. Меристема – це зона росту в рослині, де відбувається активне ділення клітин та регенерація тканин. Меристематичні тканини мають високу здатність до регенерації та формування нових рослин.

У деяких випадках, для культури *in vitro* можуть використовуватись інші типи експлантів, такі як листки, квітки, стебла. Вибір таких експлантів може залежати від вартості та доступності матеріалу, а також від особливостей конкретної рослини.

В якості експлантів для введення в асептичну культуру використали насіння *Pulsatilla alba*. Передусім, це обумовлено тим, що насіння має високу регенераційну здатність, тобто краще відповідає на умови *in vitro*. Це особливо важливо для сну альпійського, який має обмежену здатність до природного відновлення. Також варто додати, що насіння завдяки природному захисту зародка оболонкою, є внутрішньо стерильним, що знижує ризик зараження при введенні у культуру і спрощує асептичну обробку, забезпечуючи вищу стабільність культури.

2.3. Підготовка та стерилізація рослинного матеріалу та обладнання

Створення асептичних умов є ключовим етапом у культивуванні *Pulsatilla alba in vitro*. Такий підхід мінімізує ризик мікробного забруднення та

забезпечує точність експериментальних даних. Перед початком роботи необхідно провести стерилізацію ламінар-боксу, робочих інструментів, посуду, рослинного матеріалу, живильних середовищ та інших матеріалів, необхідних для дослідження.

Стерилізація ламінар-боксу. Головним призначенням ламінар-боксів є виконання різного роду роботи із культурами ізолюваних клітин та тканин, що потребують стерильності. Зазвичай умов стерильності ми досягаємо за допомогою використання бактеріальних фільтрів, встановлених у ламінар боксі, через які відбувається надходження повітря [39]. За 2 години до початку роботи ламінар-бокс ми вмикали бактерицидні лампи з ультрафіолетовим випромінюванням. У ламінарі першочергово необхідно розмістити спиртівку, сірники, фарфоровий стакан із 96%-вим спиртом та дистильованою водою. Всередині ламінар-бокс, спиртівку, підставку для інструментів протираємо 70%-вим спиртом.

Перед роботою необхідно вимити руки з милом, одягнути стерильний халат. Перед безпосереднім початком роботи у ламінарі потрібно протерти руки спиртом.

Стерилізація посуду. Добре вимитий посуд прополіскують у дистильованій воді та просушують. Для запобігання потрапляння на простерилізований посуд із повітря патогенної мікрофлори, яка може спричинити контамінацію, посуд перед початком стерилізації загортають у папір [39].

Далі посуд переносять у сухо жарову шафу та прогрівають за температури 160° С протягом двох годин. Цього часу достатньо для знешкодження всіх бактерій, їх спор та інших форм спокою. Слід додати, що температура вище за 175 ° С є недопустимою, оскільки можуть руйнуватися структура ватних пробок, а паперові обгортки стають ламкими.

Стерилізація інструментів. Попередню стерилізацію інструментів ми проводимо поміщаючи їх у сухо жарову шафу на 2 години за температури

140 ° C. Безпосередньо перед роботою та протягом процесу її виконання пінцети, скальпелі, бактеріологічні петлі) ми повторно стерилізуємо. З цією метою потрібно занурити інструменти у фарфоровий стакан із 96%-вим спиртом та обпалити у полум'ї пальника. Стерильний інструмент використовують для виконання лише однієї маніпуляції.

Стерилізація культурального середовища. Стерилізацію культуральних середовищ можна здійснити за допомогою різних методів, але одним з найбільш поширених і ефективних способів є автоклавування. Умови автоклавування поживних середовищ можуть варіюватись в залежності від типу середовища та вимог експерименту чи досліджу. Оптимальна температура для автоклавування середовищ зазвичай складає 121° C. Час автоклавування залежить від типу середовища та його об'єму. Здебільшого, рекомендований час стерилізації становить близько 15-20 хвилин після досягнення заданої температури та тиску [40, 41].

Варто пам'ятати, що робоча поверхня, автоклав та обладнання, яке використовується, мають бути стерильними та належним чином очищені. Необхідно ретельно дотримуватися правил стерильності, щоб уникнути контамінації продукту після стерилізації.

Стерилізація рослинного матеріалу. Контамінація культур рослин *in vitro* мікроорганізмами є серйозною проблемою, яка може призвести до втрати експериментальних матеріалів та неточності результатів досліджень. Тому забезпечення стерильності рослинного матеріалу є одним з ключових етапів культивування рослин *in vitro*. З метою отримання асептичного рослинного матеріалу у біотехнологічних лабораторіях зазвичай використовують певні стерилізуючі агенти.

Натрій гіпохлорит – один із найпоширеніших та ефективних засобів для стерилізації рослинного матеріалу. Натрій гіпохлорит є сильним окиснювачем і проявляє потужну антимікробну дію, що дозволяє ефективно знищувати бактерії, гриби, віруси та інші патогени із рослинного матеріалу. Принцип дії натрію гіпохлориту полягає у його здатності до окислення мікроорганізмів, що

призводить до руйнування їх клітинних структур та припинення життєво важливих функцій. При взаємодії із мікроорганізмами натрій гіпохлорит перетворюється на хлорну кислоту, яка є сильним антисептиком [39]. Для стерилізації рослинного матеріалу за допомогою натрій гіпохлориту, переважно застосовують розчини різної концентрації. Оптимальна концентрація розчину залежить від типу рослини та її чутливості до окислювальних агентів. Зазвичай діапазон концентрацій гіпохлориту натрію варіюється від 0,1% до 5%.

Етанол або *ізопропанол* є ефективними дезінфікуючими засобами, що набули широкого використання у біотехнологічних дослідженнях для обробки рослинних матеріалів. Механізм їхньої дії полягає в розчиненні ліпідних мембран мікроорганізмів та руйнуванні їхніх внутрішніх структур. Оптимальні концентрації для стерилізації рослинних матеріалів становлять 70-95% для етанолу та 50-70% для ізопропанолу.

Натрій гідроксид. Ця сполука є сильним лугом та має здатність до денатурації білків та розчинення жирів, наслідком якого є ефективне знищення контамінантів, що містяться у вихідному рослинному матеріалі. Дія натрій гідроксиду спрямована на руйнування клітинних мембран та елементів мікроорганізмів [41]. При взаємодії з білками, луг утворює амінокислотні солі, розчинні у воді. Цей процес призводить до денатурації білків. Стерилізація із використанням натрій гідроксиду вимагає дотримання певних умов та протоколів. Оптимальний діапазон концентрацій гідроксиду натрію складає від 1% до 10%.

Перекис водню також має окислювальні властивості та діє як потужний антисептик, що дозволяє ефективно прибрати забруднення та контамінацію з рослинного матеріалу. Перекис водню розкладається при контакті із рослинними тканинами або іншими органічними речовинами, виділяючи кисневі радикали. Саме ці радикали чинять деструктивний вплив на клітинну структуру мікроорганізмів. Оптимальна концентрація розчинів – 3-30%.

Натрій тіосульфат застосовують для нейтралізації хлору та його впливу на рослинний матеріал під час стерилізації. Він діє як агент, що допомагає

прибрати залишкові концентрації хлору після обробки, наприклад, гіпохлоритом натрію чи іншими хлоровмісними засобами.

Сірчана кислота володіє властивостями сильного кислотного середовища, що може знищити мікроорганізми та запобігти їхньому розмноженню. Високий показник кислотності забезпечує зниження рівня рН. Це є важливим для уникнення контамінації. Перед використанням сірчаної кислоти, необхідно враховувати її сильну кислотність. Її використання потребує обережного поводження та дотримання відповідних заходів безпеки.

Сулема (хлорид ртуті) рекомендовано застосовувати у випадках, коли інші методи стерилізації є неефективними або недоступними. Це може бути пов'язано із особливо чутливим рослинним матеріалом або з випадками, коли інші антисептичні засоби не дають достатнього ступеня стерильності. Варто пам'ятати, використання сулеми має певні обмеження та ризики. Зокрема, вона може чинити негативний вплив на рослинні клітини, знижуючи їхню життєздатність та здатність до регенерації. Також можлива негативна дія на генетичний матеріал рослин, що може вплинути на їх подальший розвиток та властивості [41].

Незважаючи на наявність сприятливих умов для проростання (вологості, кисню та відповідного субстрату), насіння багатьох рослин, зокрема і *Pulsatilla alba* не здатне відразу дати проростки, тому що повинно вийти зі стану ембріонального спокою.

Існує широкий спектр методів, які застосовують для подолання стану спокою насіння. Вибір конкретного методу залежить від типу насіння, тривалості періоду спокою та його причини. Так, наприклад, для подолання фізіологічного спокою насінневої оболонки використовують замочування у гарячій воді, механічну або хімічну обробку, а для подолання фізіологічного спокою зародка – стратифікацію.

Холодова стратифікація – це метод, який штучно відтворює природні умови, піддаючи насіння впливу низьких температур (від +1 до +6°C) та високої вологості протягом кількох місяців [42].

Під час виконання роботи здійснено попередню обробку насіння сну альпійського за допомогою холодової стратифікації при температурі 4-6°C протягом 90 діб. Наступним етапом стратифікації стало використання розчину гіберелової кислоти у таких концентраціях: 0,05 г/л; 0,1 г/л; 0,5 г/л та 1 г/л за експозиції 24 години.

Ефективність культивування рослинних тканин безпосередньо залежить від якості підготовки експериментального матеріалу. Одним із найважливіших етапів є вибір оптимального способу стерилізації експлантів та стерилізуючих агентів. З метою отримання асептичних експлантів для подальшого культивування здійснили стерилізацію насіння *Pulsatilla alba* у розчині 70%-го етанолу за експозиції 5 хв.

Потім було використано три різні стерилізаційні агенти: 25% розчин перекису водню, розчин «Білизни» у концентрації 1:3 (рис. 2.1) та 0,1% розчин сулеми. Експозиція для всіх варіантів складала 15 хв.



Рис. 2.1. Стерилізація насіння *Pulsatilla alba* у розчині «Білизни» з концентрацією 1:3

Після обробки стерилізуючими агентами насіння ретельно промивали дистильованою водою 3 рази по 7 хвилин для повного видалення залишків агентів з поверхні (рис 2.2).



Рис. 2.2. Промивання експлантів сну альпійського дистильованою водою

Завершальним етапом підготовки насіння до культивування *in vitro* було асептичне перенесення насіння на стерильний фільтрувальний папір у чашки Петрі, а потім у пеніцилінові флакони на живильне середовище.

2.4. Живильне середовище для асептичної культури

Успіх культивування рослинних тканин значною мірою залежить від правильно підбраного поживного середовища. Воно має забезпечувати оптимальне співвідношення макро- і мікроелементів, вітамінів, гормонів та інших речовин, необхідних для росту і розвитку рослинних клітин. Вибір поживного середовища є одним з ключових факторів, що впливають на морфогенез та регенерацію рослин.

Живильні середовища, що застосовуються для культивування рослинних клітин *in vitro*, включають комплексну суміш неорганічних солей, які містять основні елементи чи мінеральні іони. Крім того, до складу середовища входять органічні добавки, такі як вітаміни та амінокислоти, джерело вуглецю, загущувачі, регулятори росту для оптимізації процесу культивування.

Макроелементи:

- *Нітроген* сприяє синтезу амінокислот, критично важливий для клітинного поділу, фотосинтезу та енергетичних процесів у рослині. Крім того, азот входить до складу вітамінів;

- *Кальцій* забезпечує постійний поділ клітин та їх розвиток, бере участь у метаболізмі азоту, знижує дихання рослин і сприяє транспорту фотосинтезу з листя до плодових частин;

- *Фосфор* важливий для фотосинтезу, дихання, передачі енергії та клітинного поділу. Стимулює розвиток кореневої системи, підвищує якість плодів і зернових, забезпечує виживання рослин у суворих умовах та підвищує водозабезпечення;

- *Калій*: впливає на обмін вуглеводів, перерозподіл крохмалю, посилює фотосинтез, регулює ферментативні реакції та активує ензими, сприяє формуванню плодів і підвищує стійкість до захворювань;

- *Магній* — ключовий компонент для хлорофілу, підвищує мобільність фосфору, активізує рослинні ферменти та сприяє засвоєнню заліза;

- *Сірка* бере участь у синтезі амінокислот, сприяє утворенню ферментів, вітамінів та бульбочок у бобових культурах, а також відіграє важливу роль у формуванні насіння.

Мікроелементи, хоча і потрібні рослинам у незначних кількостях, є невід'ємною частиною їхнього живлення. Вони виконують важливі функції в обміні речовин, беручи участь у процесах фотосинтезу, дихання, синтезу білків і нуклеїнових кислот.

До числа мікроелементів належать марганець, йод, мідь, кобальт, бор, молібден, залізо та цинк. Залізо, наприклад, входить до складу багатьох ферментів, що забезпечують транспорт електронів у дихальному ланцюгу. Для забезпечення доступності заліза в поживному середовищі часто використовують хелати, такі як ЕДТА, які утворюють стійкі комплекси з іонами заліза, запобігаючи їх осадженню.

Вітаміни, як органічні сполуки, необхідні для нормального росту і розвитку рослинних клітин *in vitro*. Незважаючи на те, що рослини здатні синтезувати більшість вітамінів самостійно, в умовах культури тканин їх синтез може бути недостатнім для забезпечення оптимального росту. Тому до складу поживних середовищ часто включають екзогенні вітаміни, такі як тіамін,

нікотинова кислота, піридоксин та міоїнозитол. Ці вітаміни є кофакторами багатьох ферментів і відіграють ключову роль у регуляції метаболічних процесів.

Амінокислоти — більш доступне джерело азоту для рослинних клітин порівняно з неорганічними сполуками азоту. Це пов'язано з тим, що амінокислоти вже є органічними сполуками і можуть бути безпосередньо включені в метаболічні процеси клітини. Крім того, амінокислоти можуть позитивно впливати на ріст і розвиток рослинних клітин, стимулюючи синтез білка та інших важливих сполук.

Основним джерелом вуглецю у живильних середовищах слугує сахароза. Цей дисахарид легко засвоюється рослинами і під час метаболізму розщеплюється на глюкозу та фруктозу, які потім використовуються як будівельний матеріал для синтезу різних органічних сполук та як джерело енергії.

Основою для приготування поживних середовищ у процесі мікроклонального розмноження найчастіше слугують модифікації класичного середовища Мурасіге-Скуга. Однак, для успішного культивування різних видів рослин часто необхідний індивідуальний підбір компонентів поживного середовища. Процес розмноження може включати стимуляцію розвитку як пазушних, так і адвентивних бруньок, а також пряме утворення пагонів з тканин експланта.

Для введення *Pulsatilla alba* у культуру *in vitro* першочергово було використано поживне середовище Мурасіге-Скуга (1/2MS). Його збалансований мінеральний склад забезпечує оптимальні умови для росту та розвитку рослин, а можливість модифікації середовища дозволяє адаптувати його до специфічних вимог рослин. Склад живильного середовища, яке використовувалося в дослідженні, представлено нижче на рисунку 2.4.



Рис. 2.4. Склад живильного середовища Мурасіге-Скуга для введення *Pulsatilla alba* в асептичну культуру

Для подальшого культивування експлантів скористалися модифікованими середовищами Мурасіге-Скуга із додаванням регуляторів росту: індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК), кінетину (К), гіберелової кислоти (ГК), бензіламінопурина (БАП), нафтилоцтової кислоти (НОК) (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Середовища Мурасіге-Скуга, доповнені регуляторами росту

Регулятори росту, мг/л	Доповнені живильні середовища Мурасіге-Скуга		
	ЖС1	ЖС2	ЖС3
БАП	0,2	—	0,1
ІОК	0,5	—	1,0
Кінентин	—	0,5	—
НОК	—	1,5	—
ГК	—	—	0,2

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВВЕДЕННЯ *PULSATILLA ALBA* В АСЕПТИЧНУ КУЛЬТУРУ

В якості експлантів для введення сну альпійського в асептичну культуру використали насіння цієї рослини оскільки його збір є менш трудомістким та руйнівним для дикорослих популяцій порівняно з використанням дорослих рослин чи інших частин.

Насіння *Pulsatilla alba* є типовим для більшості представників свого роду. Воно має невеликий розмір, близько 3-5 мм, видовжену форму та опушення, яке забезпечує розповсюдження вітром (рис. 3.1). Забарвлення насіння може варіювати від світло-коричневого до сірого.



Рис. 3.1. Загальний вигляд насіння *Pulsatilla alba*

Оскільки насіння сну білого має складний процес проростання, першочергово проведено холодову стратифікацію протягом 90 діб при температурі 4-6°C. Наступним етапом обробки стала стратифікація розчином гіберелової кислоти у концентраціях 0,05 г/л; 0,1 г/л; 0,5 г/л та 1 г/л. Експозиція — 24 години.

З метою отримання асептичних експлантів для подальшого культивування здійснили стерилізацію насіння *Pulsatilla alba* застосовували різні схеми

стерилізації. На першому етапі проведено стерилізацію насіння у розчині 70%-го етанолу за експозиції 5 хв. Далі було застосовано три різні стерилізаційні агенти: 25% розчин перекису водню, розчин «Білизни» (концентрація 1:3) та 0,1% розчин сулеми. Експозиція для всіх варіантів складала 15 хвилин.

Після використання розчинів стериліантів насіння тричі промили у стерильній дистильованій воді. Експозиція — 7 хвилин. Повну схему стерилізації насіння сну білого наведено на рисунку 3.2 нижче.



Рис. 3.2. Схема передпосівної обробки та стерилізації насіння

Pulsatilla alba

Завершальним етапом підготовки насіння до культивування *in vitro* було асептичне перенесення насіння у чашки Петрі на стерильний фільтрувальний папір до повного просушування, а потім у пеніцилінові флакони на живильне агаризоване середовище (1/2 MS) (рис. 3.3).



Рис. 3.3. Асептичне насіння *Pulsatilla alba*, перенесене на живильне середовище 1/2 MS

Проростання насіння відбувалося у наступних умовах: освітлення — 2000 лк, температура — 23-25°C, вологість — 75-85%.

Оцінку ефективності стерилізації проводили на 7-у та 14-у добу культивування. У ході аналізу отриманих результатів (табл. 3.1) встановлено, що використання 25% розчину перекису водню (експозиція — 15 хвилин) забезпечило найвищий вихід стерильного насіння — 79-83%.

Встановлено, що передпосівна обробка насіння гібереловою кислотою у концентрації 0,5 г/л сприяє активації та проростанню насіння сну білого на 21-у добу культивування. Асептичні проростки отримано на 14 добу від початку проростання насіння (рис. 3.4). Після обробки насіння розчинами гіберелової кислоти (0,05 г/л; 0,1 г/л та 1 г/л) проростання не спостерігалось

Таблиця 3.1

Ефективність стерилізації насіння *Pulsatilla alba* за використання трьох різних стерилізуючих агентів

Доба культивування	Стерилізуючий агент	Експозиція, хв	Кількість стерильного насіння, %
7	0,1 % розчин HgCl ₂	15	41
	розчин «Білизни» 1:3	15	58
	25 % розчин H ₂ O ₂	15	83
14	0,1 % розчин HgCl ₂	15	33
	розчин «Білизни» 1:3	15	47
	25 % розчин H ₂ O ₂	15	79



Рис. 3.4. Рослини сну альпійського (*Pulsatilla alba*) на 14 добу після проростання насіння

За результатами спостережень виявлено, що на 28 добу (від проростання насіння) культивування ріст рослин сповільнився. Розвиток кореневої системи не фіксувався. З метою стимулювання ризогенезу та ростових процесів отримані експланти перенесли на модифіковані середовища Мурасіге-Скуга, доповнені регуляторами росту у різних концентраціях (рис. 3.5). Склад цих середовищ зазначений у розділі №2, таблиця 2.1.



Рис. 3.5. Рослин *Pulsatilla alba*, перенесені на модифіковані живильні середовища

Через 14 діб після перенесення на модифіковані поживні середовища здійснено аналіз отриманих результатів. Виявлено різну дію регуляторів росту на рослини сну білого. У досліді із середовищем №1, що доповнене 0,2 мг/л БАП; 0,5 мг/л ІОК та середовищем №3, доповненим 0,1 мг/л БАП; 1 мг/л ІОК та 0,2 мг/л ГК не було зафіксовано значного приросту біомаси.

Експланти, що були поміщені на ці середовища не продемонстрували активного формування нових структур, а видимі морфологічні зміни були незначними, що вказує на недостатню ефективність використання цих середовищ для стимуляції ростових процесів *in vitro* у даного виду.

На середовищі №2, що містило у своєму складі 0,5 мг/л кінетину та 1,5 мг/л НОК спостерігалася виражена реакція експлантів, а саме інтенсивне подовження

стебел (рис. 3.6), а також активне утворення нових листків. Окрім нарощування зелених частин, відбувалося збільшення кількості корневих зачатків, що свідчить про стимуляцію ризогенезу. Це може бути результатом правильного співвідношення регуляторів росту у середовищі, які сприяли як росту надземної частини, так і розвитку кореневої системи, підвищуючи стійкість та адаптивний потенціал рослин *in vitro*.



Рис. 3.6. Культивування *Pulsatilla alba* на середовищі із додаванням 0,5 мг/л кінетину та 1,5 мг/л НОК

Таким чином середовище, доповнене 0,5 мг/л кінетину та 1,5 мг/л НОК виявилось найбільш ефективним для стимулювання росту *Pulsatilla alba*, оскільки забезпечувало оптимальні умови одночасного розвитку надземних та підземних органів.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що у якості експлантів для введення у культуру *in vitro* сну альпійського є доцільним використання насіння цієї рослини, попередньо провівши холодovu стратифікацію при температурі 4-6°C протягом 90 діб та стратифікацію розчином гіберелової кислоти у концентрації 0,5 г/л.

2. Виявлено, що 25% розчин перекису водню за експозиції 15 хвилин є найбільш ефективним агентом для стерилізації насіння *Pulsatilla alba*. Його використання забезпечує найвищий вихід стерильного насіння — 79-83%.

3. Доведено, що для ініціації введення рослин сну альпійського в асептичну культуру достатньо використати базове живильне середовище Мурасіге-Скуга (1/2 MS). Однак при довготривалому культивуванні експлантів на даному середовищі спостерігається уповільнення процесів ризогенезу та накопичення біомаси.

4. Встановлено, що перенесення асептичних рослин *Pulsatilla alba* на модифіковане поживне середовище Мурасіге-Скуга з додаванням 0,5 мг/л кінетину та 1,5 мг/л НОК призводить до росту надземної частини та розвитку кореневої системи, підвищуючи стійкість та адаптивний потенціал рослин сну білого *in vitro*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дідух Ю. О., Маховська Л. Й. Біоекологічні особливості представників родини *Ranunculaceae* Juss. у флорі Надвірнянського району Івано-Франківської області. Збірник наукових праць з актуальних проблем економічних наук м. Запоріжжя, 29-30 листопада 2019 р. С. 136-139.
2. Новіков А.В. *Ranunculaceae* Західної України. II. Ключ і характеристика родів *Modern Phytomorphology* 8. 2015. С.169–182.
3. Emadzade, K., Lehnebach, C., Lockhart, P., & Hörandl, E. (2010). A molecular phylogeny, morphology and classification of genera of *Ranunculeae* (*Ranunculaceae*). *TAXON*, 59(3), 809–828. doi:10.1002/tax.593011.
4. Tamura M. *The Families and Genera of Vascular Plants*. Berlin. Springer – Verlag, 1993. Vol. 2. P. 563–583.
5. Goo, Y.-K. Therapeutic Potential of *Ranunculus* Species (*Ranunculaceae*): A Literature Review on Traditional Medicinal Herbs. *Plants* 2022, 11, 1599. <https://doi.org/10.3390/plants11121599>.
6. Almerekova, S.; Shchegoleva, N.; Abugalieva, S.; Turuspekov, Y. The molecular taxonomy of three endemic Central Asian species of *Ranunculus* (*Ranunculaceae*). *PLoS ONE* 2020, 15, e0240121.
7. Lockhart, P.J.; McLenachan, P.A.; Havell, D.; Glenny, D.; Huson, D.; Jensen, U. Phylogeny, radiation, and transoceanic dispersal of New Zealand alpine buttercups: Molecular evidence under split decomposition. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 2001, 88, 458–477.
8. Winkworth, R.C.; Wagstaff, S.J.; Glenny, D.; Lockhart, P.J. Evolution of the New Zealand mountain flora: Origins, diversification and dispersal. *Org. Divers. Evol.* 2005, 5, 237–247.
9. Suh, Y.J.; Lee, S.; Lee, S.H.; Lee, N.S. Molecular evidence for the taxonomic identity of Korean *Adonis* (*Ranunculaceae*). *J. Plant Res.* 2002, 115, 217–223.

10. Li, T.; Fu, X.; Deng, H.; Han, X.; Wen, F.; Xu, L. The complete chloroplast genome of *Ranunculus Cantoniensis*. *Mitochondrial DNA B* 2019, 4, 1095–1096.
11. Дідух Я. П., Бурда Р. І., Зиман С. М. Екофлора України. Том 2 / заг. ред. Я.П. Дідуха. К. : Фітосоціоцентр, 2004. 480 с.
12. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 75, No. 7 pp. 1800–1822, 2024 <https://doi.org/10.1093/jxb/erad492>.
13. Tamura, M. (1993). *Ranunculaceae*. *Flowering Plants · Dicotyledons*, 563–583. doi:10.1007/978-3-662-02899-5_67.
14. Ali, S., Chouhan, R., Sultan, P., Hassan, Q. P., & Gandhi, S. G. (2021). A comprehensive review of phytochemistry, pharmacology and toxicology of the genus *Aconitum L.* *Advances in Traditional Medicine*. doi:10.1007/s13596-021-00565-8
15. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Volume 76, Issue 6, June 2024, Pages 579–591, <https://doi.org/10.1093/jpp/rgad085>.
16. Фітотерапія карпатського краю. Алексєєв О.І., Гвоздецький П.І., Сушко Л.П., Філь В.М. – Дрогобич : Редакційно-видавничий відділ Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка, 2010. – 413 с.
17. Zhong et al. *Chinese Medicine* (2022). <https://doi.org/10.1186/s13020-022-00613-8>.
18. Sun Y, Liu J, Yu H, Gong C. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from the roots of *Pulsatilla chinensis* with less adverse reactions. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(5):584–90.
19. Deng S, Shanmugam M, Kumar A, Yap C, Sethi G, Bishayee A. Targeting autophagy using natural compounds for cancer prevention and therapy. *Cancer*. 2019;125(8):1228 – 46.
20. Електронний ресурс. Режим доступу: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:13507-2>.

21. Krvavych, A., Reviakina, N., Zhurakhivska, L., Hubytska, I., Konechna, R. (2021). *Pulsatilla alba*: analytical review of spread, chemical composition, biological activity and medical application. *ScienceRise: Biological Science*, 4 (29), 10–14. doi: <http://doi.org/10.15587/2519-8025.2021.249850>.
22. Weryszko-Chmielewska E, Sulborska A, Żuraw B, Chyżewska R, Sawidis T. Ecological aspects of the foral structure and fowering in *Pulsatilla* species. *Acta Agrobot.* 2017;70(3):1715. <https://doi.org/10.5586/aa.1715>.
23. Електронний ресурс. Режим доступу: <https://www.flickr.com/photos/atrnkoczy/18337465752/in/photostream/>.
24. Natural Products and Medicinal Properties of Carpathian (Romanian) Plants. Електронний ресурс. Режим доступу: https://www.google.com.ua/books/edition/Natural_Products_and_Medicinal_Property/Kor7EAAAQBAJ?hl=ru&gbpv=0.
25. Національна Академія Наук України. Державний природознавчий музей. Центр даних з біорізноманіття. . Електронний ресурс. Режим доступу: <http://dc.smnh.org/species/detail/species-5917.html>.
26. . Jürgens A, Dötterl S. Chemical composition of anther volatiles in *Ranunculaceae*: genera-specific profiles in *Anemone*, *Aquilegia*, *Pulsatilla*, *Ranunculus*, and *Trollius* species. *Am J Bot.* 2004;91(12):1969–1980. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.12.1969>.
27. *PULSATILLA ALPINA subsp. ALBA* Zamelis et Paegle – koniklec alpinsky bily/poniklec biely. Gabriela Leugnerová. 5.7.2007. <https://botany.cz/cs/pulsatilla-austriaca/>.
28. Strzałkowska-Abramek M., Jachuła J., Dmitruk M., & Pogroszewska E. (2016). Flowering phenology and pollen production of three early spring *Pulsatilla* species. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 15 (6), 333–346.
29. Müller M. B., Bertrams J., Stintzing F. C. (2020). Stability of protoanemonin in plant extracts from *Helleborus niger* L. and *Pulsatilla vulgaris* Mill. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 188. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113370>.

30. Проєкт Переліку видів рослин та грибів, що заносяться до Червоної книги України (рослинний світ). Міністерство захисту довкілля та природних ресурсів України. <https://mepr.gov.ua/news/32529.html> .
31. Кияк В., Штупун В., Білонога В. (2016). Кліматогенні загрози популяціям рідкісних і ендемічних видів рослин високогір'я Українських Карпат. Вісник Львівського університету. Серія біологічна, (74), 104–115.
32. Goyal S., Chawla R., & Kumar S. RECENT ADVANCES AND SPORADIC PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL REVIEW ON POTENTIAL HERBS OF THE GENUS “*PULSATILLA*”.
33. Сербін А. Г., Сіра Л. М., Слободянюк Т. О. Фармацевтична ботаніка: підруч. для вузів / за ред. Л. М. Сірої. Вінниця: Нова Книга, 2015. 488 с.
34. Мусієнко М.М., Панюта О.О. Біотехнологія рослин. Навчальний посібник. – Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005.
35. Кушнір Г. П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. – Київ, 2005.
36. Verjak, P., & Pammenter, N. W. (2017). Recalcitrance. Encyclopedia of Applied Plant Sciences, 532–539. doi:10.1016/b978-0-12-394807-6.00048-4.
37. Олійник О. О. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт із дисципліни «Біотехнологія в сільськогосподарському виробництві» студентами спеціальності 7.09010102 «Агрохімія та ґрунтознавство» денної та заочної форми навчання. – Рівне: НУВГП, 2013. – 16 с.
38. Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2018). An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. Methods in Molecular Biology, 3–13. doi:10.1007/978-1-4939-8594-4_1.
39. Задерей Н. С. Біотехнологія рослин: Навчально-методичний посібник. – Одеса: «Одеський національний університет імені І. І. Мечникова», 2015. – 84 с.
40. George J. W., Debergh P. C. Plant tissue culture procedures. In: Plant propagation by tissue culture. Springer Netherlands, 2008. P. 1-33.
41. Razdan M. K. Introduction to Plant Tissue Culture. Springer Netherlands, 2003.

42. Yang, B., Cheng, J., Wang, J., Cheng, Y., He, Y., Zhang, H., & Wang, Z. (2019). Physiological characteristics of cold stratification on seed dormancy release in rice. *Plant Growth Regulation*. doi:10.1007/s10725-019-00516-z.

ДОДАТОК А

Досягнення і перспективи в захисті та карантині рослин, 2024 р.

Фітопаразитичні нематоди трьох енергетичних культур для виробництва біопалива. <i>Луцюк А. С., Стефановська Т. Р.</i>	230
Особливості стерилізації вихідного матеріалу <i>Salvia officinalis</i> для введення в культуру in vitro. <i>Майданович Н.Р., Лобова О.В.</i>	232
Особливості методів стерилізації тюльпану для введення в умови in vitro. <i>Матвієнко А.О., Лобова О.В.</i>	235
Особливості дії біологічних препаратів при вирощуванні <i>Glycine max</i> L. <i>Маценко Я. С., Бородай В. В.</i>	237
Морфогенез та розмноження in vitro <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. <i>Моргун Є.Є., Кляченко О.Л.</i>	239
Застосування регуляторів росту стиму та регоплант у вирощуванні рослин міскантусу. <i>Остапенко К.В., Медков А.І., Бородай В.В., Стефановська Т.Р.</i>	241
Постасептична адаптація рослин регенерантів in vitro туї західної. <i>Павленко Ю.С., Коломіць Ю.В.</i>	242
Біологічно активні компоненти та мінеральні солі як ключові фактори в рості та використанні грибів <i>Pleurotus ostreatus</i> Kumm. <i>Пигичко Р.О., Бойко О.А.</i>	244
Підбір живильногосередовища для одержання калюсу непентесу чудового (<i>Nepenthes mirabilis</i>) в умовах in vitro. <i>Пула В.С., Коломіць Ю.В.</i>	246
Стратегії застосування культивування <i>Daucus carota</i> in vitro для підвищення біорезистентності та виробництва корисних біопродуктів. <i>Самолук А. А., Коломіць Ю. В.</i>	248
Вплив вуглецевих наноматеріалів на фізіологічні показники та структуру коренів сільськогосподарських рослин. <i>Северін С.М., Ткаченко Т.А.</i>	250
Мікроклональне розмноження змієголовника молдавського (<i>Dracocephalum moldavica</i> L.). <i>Сипченко О. Ю., Лобова О. В.</i>	252
Вплив біологічних активних речовин грибів роду <i>Daedaleopsis j. Schrot.</i> на ріст і розвиток овочевих культур. <i>Сірик А.Є., Бойко О. А.</i>	254
Ефективність комплексного застосування біопрепаратів в технології вирощування сої. <i>Словінський В.В., Бородай В.В.</i>	255
Оцінка препарату на основі с6-hsl (п-гексанойл-гомосеринлактон) для адаптації живців картоплі in vitro. <i>Царуліца О., Лісовий М.М.</i>	257
Введення <i>Pulsatilla alba</i> в культуру in vitro. <i>Швець В. В., Лобова О.В.</i>	259
Ксилотрофні базидієві гриби та їх використання в моніторингу екосистем. <i>Швець Д.О., Бойко О.А.</i>	261
Оптимізація біотехнології виробництва вакцин для птахівництва. <i>Шевченко А.В., Бородай В.В.</i>	262
Дослідження біосенсорного детектування мікотоксинів в різних матрицях. <i>Шкарбан П.О., Таран О.П.</i>	264
Отримання та використання полісахаридів гливи звичайної (<i>Pleurotus ostreatus</i> Kumm.) Для росту і розвитку зернобобових культур <i>Шмиголь П.А., Бойко О.А.</i>	266
Отримання та використання полісахаридів гливи звичайної (<i>Pleurotus ostreatus</i> Kumm.) Для росту і розвитку зернобобових культур. <i>Шмиголь П.А., Бойко О.А.</i>	267

physiological responses of winter wheat under simulated acid rain / I.V. Kosakivska, L.M. Babenko, K.O. Romanenko, O.A. Futorna // Доповіді Національної академії наук України. – 2020. – № 8. – С. 92-100. doi.org/10.15407/dopovidi2020.08.092

2. Taran, O., Babenko L., Moshynets O. et al. Callusogenesis of the explants Cucurbita pepo var. Giraumonti in culture in vitro under the influence of N-Hexanoyl-L-Gomoserinlaktone // Biological Systems Theory and Innovation. - 2018.- 287 - P.120–130. Doi:10.31548/biologiya2018.287.120.

3. Babenko, L. M., Moshy`necz`, E. V., Rogal`sky`j, S. P., Shherbatyuk, N. N., Suslova, O. S., Kosakovskaya, Y`V. Influence of presowing priming with N-hexanoyl-L-homoserine lactone on the formation of rhizosphere microflora and yield structure of Triticum aestivum L // The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology. – 2017. -№1, P, 106–118.

УДК 602.6:57.085.2

ВВЕДЕННЯ *PULSATILLA ALBA* В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Швець В. В., магістр 1-го року навчання

Науковий керівник: **Лобова О.В.**, к.б.н., доцент

Національний університет біоресурсів і природокористування України

e-mail: shvetsvladyslavl6@gmail.com

Сьогодні спостерігається зростаючий інтерес до використання природних рослинних компонентів у фармацевтичній промисловості. Багато лікарських препаратів на світовому ринку додають до складу природні рослинні інгредієнти. Це підкреслює важливість пошуку нових джерел біологічно активних речовин для фармації. Рослини з родини *Ranunculaceae* містять численні біологічно активні сполуки, і їх сировина може слугувати вихідним матеріалом для отримання цих речовин [1].

Багато цінних лікарських рослин родини *Ranunculaceae* ростуть в високогірних районах і знаходяться під загрозою зникнення. Деякі з них занесені до Червоної книги України та інших країн. Їхні природні ресурси зменшуються через різні фактори, включаючи людську діяльність, і вони втрачають здатність до природного відновлення.

Однією із найбільш відомих рослин родини *Ranunculaceae* є *Pulsatilla alba*.

Pulsatilla alba, відома також як Сон білий є багаторічною трав'янистою рослиною. Їй також приписують інші назви, такі як сон-трава біла, праліска альпійська, дрімота, сон альпійський, сон Шерфеля тощо.

Pulsatilla alba зростає на луках і в скелястих районах субальпійського та альпійського поясів.

Сон білий внесений до Червоної книги України як рідкісний вид, що зростає в високогірних районах. Зменшення чисельності цього виду пов'язане з обмеженістю потрібних субстратів, вузьким діапазоном екологічних умов та людською діяльністю. Значущий вплив на зменшення популяції спостерігається через пошкодження трав'яного покриву гір, особливо через антропогенне навантаження, зокрема, через надмірний туризм у Карпатах в останні роки.

Ця рослина тривалий час використовувалася в народній медицині України та різних країн Європи. *Pulsatilla alba* є сильним протипухлинним засобом і використовується для лікування раку різної локалізації (рак матки, молочної залози, шлунково-кишкового тракту, простати, легень). Відомо, що рослини роду *Pulsatilla* містять сапоніни, які можуть змінювати метаболізм ракових клітин, регулюючи шлях MAPK (мітоген-активованої протеїнкінази) [2].

Характерним компонентом більшості видів *Ranunculaceae* є глікозид протоанемонін, який має антимикробні та фунгіцидні властивості, має антимуутагенну, седативну дію, активує макрофаги в організмі [3].

У листі рослин роду *Pulsatilla* виявлено органічні кислоти, сліди алкалоїдів, вітаміни, зокрема вітамін С, смолисті та дубильні речовини, близько 20 різних макро- і мікроелементів. Насіння містить жирні олії. Трава містить ефірні олії, γ -лактони, тритерпеноїди, стерини (сигостерин), хелідонову кислоту, кумарини. Слід також відзначити значну кількість дубильних речовин, летких кислот, сапонінів (гедерагенін, патензин) і флавоноїдів у рослині [4]. Численні дослідження показали, що домінуючим класом сполук є жирні кислоти (78,2–96,5%), протоанемонін (48,4%) та пентадекан.

Pulsatilla alba є рідкісною рослиною, тому дослідження спрямовані на збереження виду, культивування, синтез аналогів біологічно активних речовин, що містяться в рослині, а також біотехнологічні методи отримання біомаси з *Pulsatilla alba*.

Список використаних джерел:

1. Kyiak, V., Shtupun, V., Bilonoha, V. (2016). Climatic threats to population of rare and endemic plants in upper part of the Ukrainian Carpathians. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*, 74, 104–115
2. Zhou, P.; Wang, Y.; Li, B.; Liu, J.; Han, W.; He, X. Inhibitory Effect of Total Saponins of *Pulsatilla* on Inflammatory Microenvironment of Lung Cancer Mice and Its Mechanism. *Rev. Científica-Fac. De Cienc. Vet.* 2020, 30, 646–654.
3. Dzhus, L. L., Chekanov, M. M., Didenko, I. P., Yurkova, M. O. (2020). *Likarski travianysti roslyny rodyny Ranunculaceae juss.v natsionalnomu*

<i>Хлопчур О.О., Боголюбов В.М.</i> АКТУАЛЬНІСТЬ ДОСЛІДЖЕННЯ РІВНЯ ЕКОЛОГІЧНОЇ ОСВІТИ В ШКОЛЯРІВ. ВИЗНАЧЕННЯ РОЗМІРУ ВИБІРКИ ДЛЯ ОПИТУВАННЯ.....	283
<i>Царуліца О.Р., Лісовий М.М.</i> ОЦІНКА ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ C6-HSL (N-ГЕКСАНОІЛ-ГОМОСЕРИНАКТОН) ДЛЯ АДАПТАЦІЇ ЖИВЦІВ КАРТОПЛІ <i>IN VITRO</i>.....	285
<i>Шаран Т.В., Павлюк С.Д.</i> ВПЛИВ АНТРОПОГЕННИХ ЧИННИКІВ НА ЯКІСТЬ АТМОСФЕРНОГО ПОВІТРЯ ДАРНИЦЬКОГО РАЙОНУ МІСТА КИЄВА.....	287
<i>Швець В.В., Лобова О.В.</i> ВВЕДЕННЯ <i>PULSATILLA ALBA</i> В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO</i>.....	289
<i>Швець Д.О., Бойко О.А.</i> ХАРАКТЕРИСТИКА КСИЛОТРОФНИХ БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ В МОНІТОРИНГУ ЕКОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ.....	291
<i>Швець І.В., Березінська Я.Л.</i> НЕГАТИВНІ ЗМІНИ В НАВКОЛИШНЬОМУ СЕРЕДОВИЩІ В ЗВ'ЯЗКУ З ВІЙСЬКОВИМ ВТОРГНЕННЯМ РОСІЇ В УКРАЇНУ.....	292
<i>Швець-Машикар А.С., Строкаль В.П.</i> БАСЕЙН РІЧКИ ДЕСНА: АНАЛІЗ ДАНИХ З ВИЗНАЧЕННЯ ТОЧКОВИХ ТА ДИФУЗНИХ ДЖЕРЕЛ ЗАБРУДНЕННЯ.....	294
<i>Шевченко А.В., Бородай В.В.</i> ЕКОЛОГІЧНІ ПЕРСПЕКТИВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ВАКЦИН ДЛЯ ПТАХІВНИЦТВА.....	296
<i>Шеремет А.М., Діденко І.А.</i> ОСОБЛИВОСТІ ВТОРИННОЇ ПЕРЕРОБКИ ЕЛЕКТРОННИХ ВІДХОДІВ.....	298
<i>Шкарбан П.О., Таран О.П.</i> ДОСЛІДЖЕННЯ БІОСЕНСОРНОГО ДЕТЕКТУВАННЯ МІКОТОКСИНІВ В РІЗНИХ МАТРИЦЯХ.....	300
<i>Шмальова М., Лісовий М.М.</i> СКРИНІНГ ШТАМІВ <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> З ВИСОКОЮ ЕНТОМОЦИДНОЮ АКТИВНІСТЮ.....	302
<i>Шмиголь П.А., Бойко О.А.</i> ОТРИМАННЯ ТА ВИКОРИСТАННЯ ПОЛІСАХАРИДІВ ГЛИВИ ЗВИЧАЙНОЇ (<i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> KUMM.) ДЛЯ РОСТУ І РОЗВИТКУ ЗЕРНОБОБОВИХ КУЛЬТУР.....	304
<i>Шовківська К.В., Сальнікова А.В.</i> АНАЛІЗ АНТРОПОГЕННОГО ВПЛИВУ НА ЕКОЛОГІЧНИЙ СТАН КИЇВСЬКОГО ВОДОСХОВИЩА ПОБЛИЗУ СЕЛА ЛЮТІЖ У ВИШГОРОДСЬКОМУ РАЙОНІ.....	306
<i>Яцишина Ю.П., Міняйло А.А.</i> ЕКОЛОГІЧНІ ЗБИТКИ ЗАВДАНІ ДОВКІЛЛЮ В НАСЛІДОК РУЙНАЦІЇ ДАМБИ ПІВНІЧНОКРИМСЬКОГО КАНАЛУ.....	308

забруднення повітря з часом. Короточасні вимірювання можуть не відображати всіх варіацій рівня забруднення, оскільки забруднення може змінюватися відповідно до погодних умов, сезонів року та різних факторів впливу [3].

Список використаних джерел:

1. Ю.Ф. Гутаревич, Д.В. Зеркалов, А.Г. Говорун та ін., Навчальний посібник, Екологія та автомобільний транспорт. 2006. – 292 с.
2. Екологічний паспорт Дарницького району м. Києва станом на 31 серпня 2018 року (Аналіз екологічного стану Дарницького району міста Києва). URL:https://dam.kyivcity.gov.ua/files/2018/9/13/Pasport_ekologichniy_2018.pdf
3. Програма державного моніторингу у галузі охорони атмосферного повітря агломерації «Київ» на 2021 - 2025 роки, 2021.- 66с.
4. SaveEcoBot. Єдина в Україні екологічна система [Електронний ресурс] / Eco Bot Save – Режим доступу: <https://www.saveecobot.com/maps#12/50.4162/30.7257/aqi>

УДК 602.6:57.085.2

ВВЕДЕННЯ *PULSATILLA ALBA* В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Швець В.В., студент 1 курсу ОС Магістр

Лобова О.В., к.б.н., доцент кафедри екобіотехнології та біорізноманіття
Національний університет біоресурсів і природокористування України

Сучасний екологічний кризис вимагає пошуку нових підходів до збереження рослинного біорізноманіття та оптимізації технологій захисту довкілля. Введення рідкісних і цінних видів, таких як *Pulsatilla alba*, в культуру *in vitro* може бути ефективним методом збереження даної лікарської рослини та її масового розмноження. Використання технології культури *in vitro* для збереження *Pulsatilla alba* має також важливий екологічний аспект. Ця техніка дозволяє зменшити необхідність збору матеріалу з природних популяцій, що сприяє збереженню їхнього природного середовища та мінімізації антропогенного впливу.

Pulsatilla alba є цінним рослинним видом, який відіграє важливу роль у підтримці біорізноманіття та стабільності екосистем. Втрата виду може призвести до деградації природних угруповань та порушення екологічної рівноваги [1]. Важливість збереження *Pulsatilla alba* відображається в її ролі як біоіндикатора стану природних екосистем. Цей вид може бути використаний для моніторингу стану довкілля та визначення рівня антропогенного впливу на природні угруповання

Введення *Pulsatilla alba* в культуру *in vitro* дозволяє зберегти генетичний матеріал рослини в стерильних умовах, виключаючи ризик втрати генетичної інформації внаслідок зовнішніх факторів, таких як хвороби, шкідники та антропогенний вплив. Сучасні методи культури *in vitro* можуть бути ефективно адаптовані для масового розмноження *Pulsatilla alba*, що є важливим для програм відновлення популяцій та збереження біорізноманіття. Ці методи можуть включати оптимізацію складу та концентрації поживних речовин, світлового режиму, температурних умов та фізіологічних регуляторів росту. Культура *in vitro* дозволяє виробляти стерильний матеріал рослин для досліджень та експериментів, що є важливим для розуміння фізіологічних та біохімічних процесів даного виду.

В медицині *Pulsatilla alba* використовується як сировина для виробництва гомеопатичних препаратів, які використовуються для лікування захворювань дихальних шляхів, гінекологічних розладів, а також для зняття запалення та болю. Екстракти з *Pulsatilla alba* містять біологічно активні речовини, які проявляють протизапальну, антимікробну та знеболювальну дію [2]. У промисловості даний вид також може мати великий потенціал. Рослина містить сполуки, які можуть бути використані в косметичній промисловості для виробництва натуральних косметичних засобів, так як вона сприяє зволоженню та заспокоєнню шкіри [3].

Таким чином, розширення культури *Pulsatilla alba in vitro* може стати основою для виробництва високоякісних гомеопатичних препаратів, біоактивних добавок, натуральних косметичних продуктів та природних фарбників, що відкриває нові перспективи для використання цього цінного рослинного ресурсу в медицині та промисловості.

Введення в культуру *in vitro* є перспективним напрямком в контексті екологічного контролю і безпеки, оцінки та збереження біорізноманіття, моніторингу довкілля та технології захисту довкілля.

Список використаних джерел:

1. Кияк В.Г. 2013. Малі популяції рідкісних видів рослин високогір'я Українських Карпат. Львів: Ліга-Прес. С. 73.
2. Хропот О.С., Конечний Ю.Т., Колб Ю.І., Конечна Р.Т., Новіков В.П. 2019. Вивчення гострої токсичності та протизапальної активності спиртових екстрактів трави сну білого (*Pulsatilla alba*). Фармацевтичний часопис. № 2. С. 60–66. DOI: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2019.2.10189>
3. Kolb Y., Konechna R., Hropot O.S., Novikov VP Possibility of using *Pulsatilla alba* in cosmetology and pharmacy// Scientific and technical progress and optimization of technological processes of drug use: materials 6 Scientific and practical conferences with international participation (November 10–11, 2016. Ternopil). 2016. С. 284.