

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет агротехнологій та природокористування
Кафедра біотехнології та хімії

Допущено до захисту

Завідувач кафедри Коваленко В.М.

«»2025р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
ЗА ПЕРШИМ (БАКАЛАВРСЬКИМ) РІВНЕМ ВИЩОЇ ОСВІТИ
ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ IN VITRO РОСЛИН GINKGO
BILOVA TA ОСОБЛИВОСТІ ЇХ ВИРОЩУВАННЯ

за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Виконала

.....
Підпис

Швець Е.І.

Прізвище, ініціали

Група

БІО2001

Назва групи

Науковий керівник

.....
Підпис

Коваленко В.М.

Прізвище, ініціали

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Факультет агротехнологій та природокористування

Кафедра біотехнології та хімії

Освітній ступінь - "Бакалавр"

Спеціальність – 162 "Біотехнології та біоінженерія"

“ЗАТВЕРДЖУЮ”:

Завідувач кафедри

_____ В.М. Коваленко

" ____ " _____ 2025 р.

ЗАВДАННЯ

на кваліфікаційну роботу

Швеця Едуарда Ігоровича

ПІБ студента

1. Тема роботи "Введення в культуру in vitro рослин Ginkgo biloba та особливості їх вирощування"

Затверджено наказом по університету від “ ____ ” _____ 202__ р. № _____

2. Термін здачі студентом закінченої роботи на кафедру _____.

3. Вихідні дані до роботи:

- *місце проведення досліджень:* ПНДЛ «Інститут проблем картоплярства Північного сходу України» _____

- *методичне забезпечення:* _____

- *схема досліду:* було відбрано по 10 листочків та пагонів із виду Ginkgo biloba

4. Перелік завдань, які будуть виконуватися в роботі: підбір поживних середовищ, особливості меристемних тканин гінго, особливості укорінення рослин отриманих у культурі in vitro, пересаджування на поживне середовище з метою утворення кореневої системи.

Керівник кваліфікаційної роботи к.с.-г.н., доцент Коваленко В.М.

Завдання прийняв до виконання _____

Дата отримання завдання « ____ » _____ 2025 р.

АНОТАЦІЯ

Швець Е.І., "Введення в культуру *in vitro* рослин *Ginkgo biloba* та особливості їх вирощування"

Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня бакалавр за спеціальністю (162 – Біотехнології та біоінженерія). – Сумський національний аграрний університет Міністерства освіти і науки України, Суми, 2025.

Досліджено особливості введення рослин Гінго білоба (*Ginkgo biloba*) у культуру *in vitro* та аналіз умов їх вирощування. У роботі згадується сучасні методи мікроклонального розмноження, переваги технології *in vitro* для збереження та масового розмноження цінних лікарських і декоративних рослин.

Досліджено ключові аспекти, що впливають на успішне введення *Ginkgo biloba* в стерильні умови: підготовка експлантів, оптимізація складу живильного середовища, контроль стерильності, а також стимуляція росту та розвитку рослинних організмів. Визначено оптимальні концентрації регуляторів росту, світлові та температурні умови, що сприяють активному формуванню калусу, органогенезу та коренеутворення.

Отримані результати можуть бути використані для вдосконалення технологій вирощування *Ginkgo biloba in vitro*, що є актуальним для фармацевтичної промисловості, зеленого будівництва та охорони рослинного біорізноманіття.

Ключові слова: *Ginkgo biloba*, введення в культуру, культура *in vitro*, мікроклональне розмноження, живильне середовище, стерильні умови, біотехнологія рослин.

ABSTRACT

Shvets E.I., "*Introduction to in vitro culture of Ginkgo biloba plants and features of their cultivation*" Qualification thesis for obtaining a Bachelor's degree in specialty (162 – Biotechnology and Bioengineering). – Sumy National Agrarian University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Sumy, 2025.

The study examines the peculiarities of introducing *Ginkgo biloba* plants into in vitro culture and analyzes the conditions for their cultivation. The work highlights modern methods of microclonal propagation and the advantages of in vitro technology for the preservation and mass reproduction of valuable medicinal and ornamental plants.

Key aspects influencing the successful introduction of *Ginkgo biloba* into sterile conditions were studied: explant preparation, optimization of the nutrient medium, sterility control, and stimulation of growth and development of plant organisms. Optimal concentrations of growth regulators, light, and temperature conditions promoting active callus formation, organogenesis, and root formation were identified.

The obtained results can be used to improve in vitro cultivation technologies for *Ginkgo biloba*, which is relevant for the pharmaceutical industry, green construction, and the conservation of plant biodiversity.

Keywords: *Ginkgo biloba*, culture introduction, in vitro culture, microclonal propagation, nutrient medium, sterile conditions, plant biotechnology.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1.....	8
ПОХОДЖЕННЯ, ЕВОЛЮЦІЯ ТА АРЕАЛ РОЗПОВСЮДЖЕННЯ GINKGO BILOBA	8
1.1. Географічне поширення, екологічні умови та рослинні угруповання <i>Ginkgo biloba</i>	8
1.2. Особливості будови <i>Ginkgo biloba</i>	10
1.3. Особливості розмноження <i>in vitro</i> <i>Ginkgo biloba</i>	12
РОЗДІЛ 2.....	15
МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ДЛЯ GINKGO BILOBA	15
2.1. Дослідження з регенерації та розмноження <i>Ginkgo biloba in vitro</i> ...	15
2.2. Підготовка рослинного матеріалу, його стерилізація, та особливості введення в культуру <i>in vitro</i>	17
2.3. Період адаптації рослин <i>Ginkgo biloba</i> від <i>in vitro</i> до <i>ex vitro</i>	26
РОЗДІЛ 3.....	28
ДОСЛІДЖЕННЯ КУЛЬТИВУВАННЯ РОСЛИН ГІНГО БІЛОБА, ТА ЗБІЛЬШЕННЯ ЙОГО КОЕФІЦІЄНТ РОЗМНОЖЕННЯ.....	28
ВИСНОВОК	35
СПИСОК ВИОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	38

ВСТУП

Рослини займають особливе місцем у житті людини, виконуючи не лише екологічну, але й соціально-економічну функцію. Серед різноманіття видів особливу увагу вчених привертає Гінкго білоба (*Ginkgo biloba*) — реліктова рослина, яка є одним із найдавніших видів дерев на Землі. Гінкго знає своїми унікальними лікарськими властивостями, стійкістю до стресових умов довкілля, а також естетичною цінністю. Однак у природі цей вид є досить рідкісним і потребує активного збереження та відтворення [1].

Зважаючи на виклики, пов'язані з обмеженням природних ресурсів, збереження генетичного матеріалу рослин та їх культивування стає додатковим завданням. Одним із сучасних підходів, що забезпечує збереження та відтворення цін, є використання технологій культури *in vitro*. Ця методика дозволяє вирощувати рослини в контрольованих умовах, що забезпечує високу ефективність розмноження, збереження генетичної чистоти та отримання якісного посадкового матеріалу.

Актуальність теми: забезпечити розробку ефективних методів введення *Ginkgo biloba* в культуру *in vitro*, вивчення його морфогенетичних особливостей та адаптації до умов вирощування. Досягнення в цій галузі може мати велике значення як для збереження біорізноманіття, так і для розвитку фармацевтичної, косметичної та аграрної промисловості.

Мета дослідження: розробити та обґрунтувати методику введення Гінкго білоба в культуру *in vitro*, створити оптимальні умови для успішного росту та розвитку рослин, а також дослідити особливості їх морфогенезу та адаптації до стерильних умов *in vitro*.

Об'єкт дослідження: рослини Гінкго білоба (*Ginkgo biloba*), вирощені в умовах *in vitro*.

Предмет дослідження: процеси введення *Ginkgo biloba* в культуру *in vitro*, фактори, що впливають на морфогенез, ріст та розвиток рослин, а також особливості їх адаптації.

Завдання дослідження: провести аналіз сучасної літератури щодо особливостей культивування рослин гінкго білоба *in vitro*. Розробити методику стерилізації та підготовки вихідного рослинного матеріалу для введення в культуру *in vitro*. Визначити оптимальний, для росту та розвитку рослин, склад живильних середовищ. Дослідити вплив фізіологічних факторів (температури, освітлення, фотоперіоду) на морфогенез рослин. Оцінити особливості адаптації рослин до екс-вітро в умовах після перенесення з *in vitro*. Формулювати рекомендації для подальшого розмноження та культивування Гінкго білоба в умовах *in vitro*.

Наукова новизна дослідження: пропонуємо нові підходи щодо оцінки та вдосконалення комплексної методики введення рослин гінкго білоба в культуру *in vitro*, підбір та приготування поживного середовища адаптованого для специфічного виду. Дослідження впливу різного складу та компонентів живильних середовищ та фізіологічних умов на ріст і розвиток рослин. Встановлено оптимальні умови для отримання життєздатних рослин, а також для їх адаптації до умов екс-вітро. Отримані результати можуть бути використані для збереження генетичних ресурсів та подальшого масштабного розмноження рослин гінкго білоба.

РОЗДІЛ 1

ПОХОДЖЕННЯ, ЕВОЛЮЦІЯ ТА АРЕАЛ РОЗПОВСЮДЖЕННЯ GINKGO BILOBA

1.1. Географічне поширення, екологічні умови та рослинні угруповання *Ginkgo biloba*.

Гінкго білоба (*Ginkgo biloba*) — унікальне листопадне дерево, єдиний сучасний представник роду гінкго та родини гінкгових. Це «живий викопний» вид, що існує на Землі понад 200 мільйонів років, зберігаючи свої прадавні риси без значних змін.

Гінкго білоба — це велике та високе дерево, яке може досягати висоти від 20 до 35 метрів, а деякі екземпляри в Китаї перевищують 50 метрів. Молоді дерева мають вузьку, пірамідальну крону, яка з віком стає ширшою і розлогою. Кора сірого кольору, з віком стає глибоко тріщинуватою [2].



Малюнок 1.1. Гінго білоба наприкінці осені

Листя гінкго має унікальну віялоподібну форму з V-подібним вирізом на кінці, що розділяє листок на дві симетричні частини — лопаті. Ця характерна риса дала підставу для назви виду — *biloba*, що означає «дволопатевий». Восени листя набуває яскраво-жовтого кольору, створюючи ефектне видовище.



Малюнок 1.2. Листок *Ginkgo biloba*

Гінкго — дводомна рослина, тобто має окремо чоловічі та жіночі особини. Чоловічі дерева утворюють сережкоподібні пилкові шишки, а жіночі — насінні зачатки на довгих ніжках. Запилення відбувається вітром пізньою весною, а дозрівання насіння — восени [3].

Насіння гінкго має м'ясисту оболонку, яка при розкладанні видає неприємний запах, тому в міському озелененні перевагу надають чоловічим деревам.

Гінкго білоба відзначається високою стійкістю до міських умов, забруднення повітря, шкідників та хвороб. Це дерево може жити понад 1000 років і витримує суворі кліматичні умови. Воно також здатне відновлюватися після пошкоджень, утворюючи нові пагони з основи стовбура [4].

У природі гінкго зростає в листяних лісах і долинах на кислих ґрунтах з хорошим дренажем. Хоча раніше вважалося, що гінкго зник у дикій природі, нині відомі популяції в горах Південно-Західного Китаю, які можуть бути дикими.

Завдяки декоративним властивостям, гінкго широко використовується в озелененні міст, парків та садів. Його листя також застосовується в традиційній медицині для покращення кровообігу та когнітивних функцій. Витяжки з листя гінкго містять флавоноїди й терпеноїди, які мають антиоксидантні та протизапальні якості.

Однак слід зазначити, що наукові дослідження щодо ефективності гінкго в лікуванні різних захворювань мають суперечливі результати, і його застосування повинно бути обґрунтованим та під контролем фахівців.

Гінкго має особливе місце в культурі Східної Азії. У Китаї та Японії його часто висаджують біля храмів і в садах. Листя гінкго є символом Токійського університету, а саме дерево — офіційним деревом Токіо та Сеула.

Завдяки своїй витривалості та довговічності, гінкго білоба символізує стійкість, надію та зв'язок між минулим і майбутнім [5].

Еволюційна історія гінкго свідчить про його зв'язок з вологими середовищами. Упродовж палеозою та мезозою гінкго зростало в прибережних екосистемах, що вплинуло на його сучасну екологічну консервативність. Попри зміни клімату, суттєвого скорочення природного ареалу гінкго в Китаї не прогнозується.

Гінкго росте на різноманітному рельєфі: на схилах (до 58°), у ярках, біля скель. Наприклад, у провінції Гуйчжоу гінкго розміщується на середніх схилах до 30°.

Найкращі умови для гінкго — глибокі, добре дреновані родючі піщані суглинки, з рівнем ґрунтових вод нижче 1 м. Проте воно витримує і піщані, мулисті, глинисті ґрунти. Підходять ґрунти, утворені з гранітів, гнейсів, сланців, вапняків тощо. Індекс екологічної індикації для азоту (N) становить 2, що свідчить про здатність рости на бідних ґрунтах. Гінкго витримує рН від 4,5 до 8,5, оптимальний — 6,0–8,0 [6].

Дерево посухостійке, але чутливе до перезволоження. При затопленні сіянці можуть загинути за тиждень. Екологічний індекс для вологості — 6, що свідчить про несприйнятливості до надлишкової вологи [7].

1.2. Особливості будови *Ginkgo biloba*.

Гінкго — велике листяне дерево. Розгалуження моноподіальне. Кронка конічна на молодому етапі розвитку і широкояйцевидна у зрілому віці. Щільна біла деревина має пряме зерно і в основному складається з трахеїдів з невеликою кількістю паренхіми ксилеми. Вона характеризується недостатньою міцністю і довговічністю, а

також меншою щільністю ($0,5 \text{ г/см}^3$) порівняно з багатьма хвойними деревами. У порівнянні з іншими хвойними, деревина гінкго містить трахеїди, які розташовані неправильно. Трахеїди мають довжину від 2180 до 5710 мкм і тангенціальний діаметр від 25 до 48 мкм [8].

Гінкго має типову стрижневу кореневу систему. Анатомічно молодий корінь гінкго є диархом, але з часом стає тетрархом або гекзархом. Стрижневий корінь сильно розгалужений і глибоко проникає в ґрунт. Розмах кореневої системи вдвічі (1,9–2,5 рази) перевищує діаметр крони. Наприклад, для тисячолітнього гінкго при висоті 30 м і діаметрі крони 40 м радіус поширення кореневої системи становить понад 37 м. Глибина коренів може досягати 5 м за умови росту на пухкому ґрунті з нейтральним рН, низьким рівнем ґрунтових вод і вологістю ґрунту 40–60%. Однак розподіл тонких коренів зазвичай неглибокий. Тонкі корені переважно поширені в верхньому шарі ґрунту, що не перевищує 80 см, особливо між 20 і 70 см, що становить 76,4% від загальної біомаси коренів і 81,1% від біомаси дрібних коренів. Бруньки гінкго жовтувато-коричневі та яйцеподібні, з бруньковими лусками, включаючи два типи бруньок: чисто вегетативні та змішані, що містять як вегетативні, так і репродуктивні бруньки. Вегетативні бруньки зазвичай розвиваються у гілки та листя на стадії вегетативного росту, тоді як змішані бруньки формують листя та стробіли на коротких пагонах на стадії репродуктивного росту. Крім того, всі частини стовбура мають приховані бруньки, що надає дереву значну здатність до омолодження та регенерації [9].

Гінкго має два види пагонів: довгі та короткі. Довгі пагони відрізняються подовженими міжвузлями та відрізняються маленькими серцевиною і корою, в той час як короткі пагони мають кількість скорочених міжвузлів і мають більші серцевинні й коркові частини. Довгі пагони формують основну структуру дерева та нові точки росту, тоді як короткі пагони відповідають за утворення необхідного листя і всіх репродуктивних органів. Швидкість росту довгих пагонів може досягати 100 см на рік,

у порівнянні з 0,3 см для коротких. Короткі пагони мають тривалий життєвий цикл і можуть залишатися плоди [10].

Деякі сталактитоподібні гілки зустрічаються на старих деревах гінкго, відомих як «chichi» в Японії та «zhonggu» в Китаї. Ці незвичайні нарости були вперше описані Фуджі (1895), який вважав їх «патологічними утвореннями», що розвиваються разом із вбудованими бруньками пагонів. Анатомічні «чичі» формуються в усіх саджанців гінкго як частина їхнього нормального розвитку з бруньок, розташованих у пазухах двох сім'ядолей. Як надземні, так і прикореневі «чичі» можуть утворювати вегетативні пагони та додаткові корені, якщо їх відділити від материнського стовбура і посадити в ґрунт головою вниз. Онтогенез базальних «чичі» тісно пов'язаний із патогенним стресом і посухою, що може бути адаптивною стратегією для гінкго у важких умовах. Вегетативне відновлення за допомогою базальних «чичів» не тільки сприяло довготривалому існуванню гінкго в лісах Китаю, але, ймовірно, також тривало у виживанні ролі роду з крейдяного періоду [11].

Листя на довгих пагонах має черешок довжиною 2–5 см, а на коротких – лише 1–4 см. Середня площа листа на довгих пагонах становить 50,5 см², а на коротких — 28,3 см². Іноді листя може бути строкатим або мати трубчасту форму. Деякі сорти гінкго можуть також розвивати яйцеклітини на листках і давати насіння.

Листя гіпостоматозне з переважно розташованими продихами на абаксіальній (нижній) поверхні. Іноді повноцінні продихи зустрічаються й на адаксіальній поверхні. Продиховий апарат має гапдохейлічний тип і нерівномірно розподілений між венами. Середня довжина клітин, що оточують продихи, становить 45,9–55,7 мкм. Щільність устьиків варіюється від 100 до 140 на мм² і є чутливою до різних факторів навколишнього середовища, зокрема вологості, сонячного світла, тіні та атмосферного CO₂ [12].

1.3. Особливості розмноження *in vitro* *Ginkgo biloba*.

У зв'язку з цим, методи мікроклонального розмноження *in vitro* стають перспективними для масового виробництва однорідного посадкового матеріалу та збереження цінних генотипів.

Для культивування *Ginkgo biloba in vitro* використовуються різні типи тканин. Це вузли з пазушними бруньками, верхівкові бруньки, частини листків, ембріони, отримані з насіння. На ефективність культивування *Ginkgo biloba in vitro* також впливає сезонність та вік матеріалу. Для цього використовують дерев'яні сегменти заготовлені в період спокою (зима) мають високий рівень контамінації та низьку регенераційну здатність, трав'яні сегменти заготовлені в період активного росту (весна-літо) мають кращу стерильність та морфогенетичний потенціал [13].

Наступним етапом у мікроклональному розмноженні є стерилізація. Вона виконується різними методами. Наступні з них це поверхнева стерилізація. Для неї використовують етанол, гіпохлорид натрію або інші дезінфікуючі агенти. Ця стерилізація допомагає вбити більшість бактерій, грибків, мікроорганізмів які були на поверхні рослини. Наступний вид стерилізації це стерилізація самого середовища. Для цього використовують антибіотики. Їх додають до середовища щоб не було бактеріальної контамінації.

Базові середовища для вирощування *Ginkgo biloba in vitro*:

- MS (Murashige and Skoog)
- WPM (Woody Plant Medium)

До цих середовищ можуть додавати регулятори росту. Це такі як, цитокініни -- стимулюють формування пагонів, 6-бензиламінопурин (6-БАП) -- ефективний для індукції пагонів, кінетин (Кін) -- у високих концентраціях може інгібувати розвиток пагонів, ауксини -- сприяють укоріненню, індол-3-оцтова кислота (ІОК) -- ефективна для індукції коренів, індол-3-масляна кислота (ІМК) -- сприяє формуванню довгих коренів, гідролізат казеїну (ГК) -- стимулює розвиток пазушних бруньок та множинних пагонів [14].

Трав'янисті нодальні сегменти при культивуванні на середовищі MS з додаванням ГК (500 мг/л) до 85% експлантів формують пагони, з яких 35% утворюють множинні пагони. Дерев'янисті сегменти не показують значної регенераційної здатності.

Для культивування *Ginkgo biloba* використовують два види пагонів, а саме короткі пагони які мають щільні міжвузля, характеризуються повільним ростом, обмеженою кількістю листків та довгі пагони, які мають розділені міжвузля, активний апікальний ріст, спіральне розташування листків. Ці типи пагонів відповідають природному диморфізму росту *Ginkgo biloba*.

Для індукції коренів використовують середовище WPM з ІОК (1 мг/л) та аскорбіновою кислотою (2 г/л). При даній технології досягається 100% укорінення з середньою довжиною коренів 8,5 см [15].

Наступна речовина що для цього використовується це AgNO_3 (23,6 мкМ). Вона покращує укорінення та розвиток кореневої системи.

Головним етапом перед висадкою в ґрунт є акліматизація. Для цього рослину після колби пересаджують в умови закритого ґрунту де підтримується температура, вологість, світловий день та інші умови. Їх поступово змінюють і роблять схожими на умови у яких *Ginkgo biloba* буде рости [16].

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ДЛЯ GINKGO BILOBA

2.1. Дослідження з регенерації та розмноження *Ginkgo biloba* in vitro

Генеративне розмноження *Ginkgo biloba* ускладнене через низку факторів, зокрема дводомність, тривалий ювенільний період, довгий репродуктивний цикл, низьку швидкість проростання, короткий період життєздатності насіння та його рекальцитрантну природу. Вегетативне розмноження живцями також має низьку ефективність і значною мірою залежить від ювенільного стану експлантів. Для подолання цих труднощів та впровадження масштабного й швидкого способу культивування цієї лікарської рослини попередні дослідження пропонували використання розмноження *in vitro* як альтернативного й ефективного методу [17].



Малюнок 2.1. Готовий рослинний матеріал *Ginkgo biloba* для початку роботи

У цьому дослідженні ключовим аспектом є використання методу прямої регенерації з етапом індукції калусу, що може бути одним із найефективніших способів збереження материнської зародкової плазми рослин. Оптимізація умов мікророзмноження *in vitro* залежить від різних чинників, зокрема типу експлантів та гормонального складу живильного середовища. Як показали попередні дослідження, а

також результати цього експерименту, ці фактори відіграють визначальну роль у процесі регенерації [18].

Наприклад, листочки та пагони з рослин *G. biloba* використовувалися як експланти та культивувалися на середовищі MS, що містить різні види регуляторів росту рослин, включаючи БАД (6-бензиладенін), НОК (нафталіновоцтова кислота) Кін (кінетин) та ІОК (індол-3-оцтова кислота). Меристеми утворювали калус із широким спектром текстур та кольорів разом із поодинокими або рідкісними множинними пагонами на середовищі MS з різними регуляторами росту. Наприклад, у середовищах, що містять ІОК, Кін експланти з листочків та пагонів утворювали темно-зелений калус та один окремий пагін у 30% та 80% культур відповідно. На середовищі, що містить ІОК, БАД експланти утворювали набагато більший калус та пагони у 20% експлантів з листочків та у 60% з пагонів [19].



Малюнок 2.2. Приготовлені пагони та листочки до початку стерилізації

Інший експеримент, проведений у цьому контексті, також показав, як тип експлантів та регулятори росту рослин, а також ендосперм вплинули на регенерацію пагонів та коренів *G. biloba*. Вплив двох типів експлантів (здерев'янілі та трав'янисті вузлові сегменти) від дорослих рослин *G. biloba* та вплив гідролізованого казеїну (500

мг/л), кінетину (0,46 та 4,65 мкМ) та АС (1,5 г/л) оцінювали на індукцію та розвиток нових пагонів. Результати показали, що здерев'янілі вузлові сегменти не утворювали пахвових пагонів. Однак вузлові сегменти з трав'янистих пагонів демонстрували високу морфогенну здатність *in vitro*. Результати також продемонстрували істотну роль гідролізованого казеїну для індукції пахвових пагонів та подальшого розмноження. В іншому дослідженні різні стадії розвитку калусу *G. biloba* культивували на середовищі MS, доповненому різними 2,4-D, НОК, БАД та зеатином або різними концентраціями 2,4-D окремо [20].

Більшість попередніх досліджень, проведених у цій галузі, були зосереджені на застосуванні зиготних ембріонів та пророщених *in vitro* сіянців як експлантів, які важко зібрати, де цей вид не є ендемічним і не росте природним шляхом. Що робить це дослідження визначним, так це використання вегетативних сегментів як експлантів, а також застосування звичайного культурального середовища та регуляторів росту рослин, які легко приготувати [21].

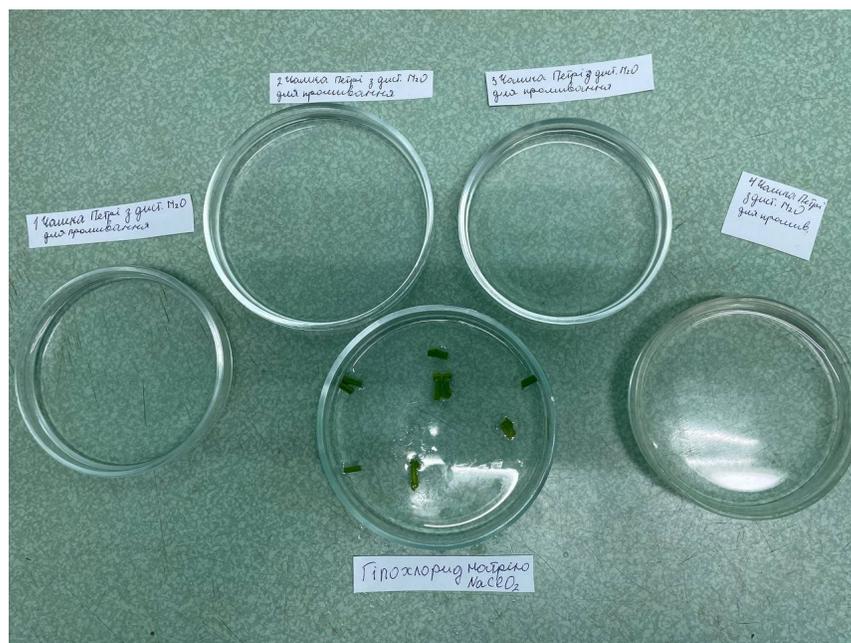
2.2. Підготовка рослинного матеріалу, його стерилізація, та особливості введення в культуру *in vitro*.

Матеріалом для культивування стали молоді вегетативні органи *G. biloba*, що росте на території СНАУ. Розкриваються молоді листя та пагони були зібрані нами у період початку вегетаційного сезону. Найбільш кращими для експерименту були пагони та листочки, які мали темнувато-зелений колір листя та мали дуже гарний вигляд. Пагони та листочки не повинні мати ніяких деєктів [22].

Листова пластинка дорослої рослини *G. biloba* навіть на початку вегетаційного періоду має розміри від 2 до 6 см, тому перед висадкою на середовище проводили поділ листя на рівні частини [23].

Культивування проводили на середовищі Мурасизі – Скуга з авторською варіацією, з додаванням фітогормонів 6-БАП та кінетин. Згідно попередньому

літературному пошуку, одночасне використання 6-БАП та кінетин дає оптимальні результати, формується швидкозростаюча культура *G. biloba*.



Малюнок 2.3. Пагони стерилізуються у гіпохлориді

Перед висаджуванням матеріалу на середовище проводили стерилізацію посадкового матеріалу з варіацією стандартної методики, часто використовуваної у біотехнології. Листя та зелені стебла занурювали у воду з миючим засобом з аналогічним Tween 20 чинним ефектом, а після промивали під проточною водою. Матеріал поміщали в окрему посуд так, щоб у процесі стерилізації всі тканини були повністю занурені в розчин. На першому етапі, листя та зелені стебла поміщали у гіпохлорид на 60 с. На останньому етапі проводили відмивання протягом 15 хвилин у стерильній воді у чотирьоразовій повторності [24].



Малюнок 2.4. Пагони промиваються у другій чашці Петрі із дистильованою ВОДОЮ

Світловий день становив 16 годин, температурний діапазон – 20–25 °С

У ході проведених первинних експериментів по підборі компонентного складу середовища для культивування *G. biloba* в умовах *in vitro* нами була отримана культура швидкозростаючих калусних клітин, яку зручно використовувати надалі для розмноження нечисленних представників даного таксона, а також для вивчення складу біологічно активних компонентів у різних варіантах екстрактів. Наступне спрямоване гормональне індукування зростання розділених частин калюса дозволить вивести різноманітні лінії *G. biloba* [25].

Розвиток калусних клітин на поверхні експлантів почалося через два тижня після посадки. Швидше всього на гормональну стимуляцію відповіли стеблові частини рослини. Результати отримані нами про хід початку зростання експлантів, відповідають даним, представленим у більш ранній роботі Ченг. Зростання калусів на поверхні молодих листочків починався із запізненням у 5–6 днів і локалізувався у черешковій області. Отже, тканини власне молодих листочків *G. biloba* мають невисоку проліферативну активність за винятком причерешкових областей, що підтверджує результат, отримані в Таврійському університеті.



Малюнок 2.5. Листочки стерилізуються у гіпохлориді натрію

Слабко диференційований каллус сформувався у великому обсязі в районі черешка, на поверхні поживною середовища. Через місяць після посадки були зроблено фотографії. Частина калюса мала жовто-коричневий колір, а інша його частина – світлий жовтозелений. Ймовірно, це пов'язано зі ступенем освітленості в період активного зростання експланту. Швидше всього, що утворився каллус був закритий від світла частиною листовий платівки. Світлий жовто-зелений колір характерний для нормально розвивається калюса, який здатний до тривалого існуванню та швидкому зростання [26].

Через 5 тижнів після появи калюса сталося відмирання великих ділянок. Через два місяця після посадки була зроблена друга серія фотографій. Видно значне погіршення стану калусний тканини. Її обсяг збільшився, але частина тканини початку відмирати, що каже про погіршення харчування, а також може свідчити про зниження якості поживною середовища.



Малюнок 2.6. Листочки промиваються у третій чашці Петрі із дистильованою водою

Для збереження культури нами проведено повторна пересадка на свіжоприготовлену поживну середу з тим ж складом Мурасіге - Скуга. Поки що невідомо, що саме вплинуло на відмирання калюсу. Одна з можливих причин – неправильно підібрана концентрація солей, макро- та мікроелементів у середовищі. На початку зростання вони стимулювали розподіл і швидкий зростання калюсу, але поступово могли призвести до гноблення через зміни співвідношення макро- та мікроелементів. Також не стоїть забувати про вплив світла і температури, які грають визначальну участь у розвитку рослини. Для успішного введення в культуру *in vitro* експланти необхідно частіше пересаджувати на свіже середовище, щоб виключити швидке відмирання калусних тканин [27].

Концентрація фітогормонів у даному варіанті середовища була підібрана оптимально, що дозволило експлантам успішно розвиватися протягом першого місяця. Необхідно відзначити, що зростання та розвиток культури *G. biloba* йде хвилеподібно. Періоди активного зростання змінюються рівними періодами спокою, коли приросту нових тканин не спостерігається. При аналізі різних літературних джерел нами був

визначено оптимальний коридор змісту фітогормонів у середовищі. Концентрація не повинна виходити за межі 0,5-3 мг для кожного гормону. При концентрації гормонів нижче або вище даного діапазону каллус не утворюється або має низьку частоту клітинних поділів на перших етапах розвитку та формування культури [28].

Ми припускаємо, що високі концентрації гормонів у середовищі сприяли стагнації ростових процесів культури *G. biloba*. Є ймовірність, що дана концентрація виявилася згубна при наступному зростанні культури та можливо призвела до підвищення секреції вторинних метаболітів. У ряді робіт зазначено, що концентрація фітогормонів для успішної продукції калюсу та швидкого освіти метаболітів, відрізняється [29].

Частина посадженого матеріалу загинула внаслідок зараження патогенної флорою, що з'явилося результатом неякісної стерилізації посадкового матеріалу. Так як листя були висаджені окремо, вони залишилися здорові. Саме листочки виявилися схильні активному зараженню. Використання матеріалу, запозиченого з закритих оранжерів, не завжди виявляється успішним, так як несе на своєю поверхні безліч патогенних організмів, частина з яких може загинути при стерилізації, а частина зберегти свою активність (наприклад, віруси). Робота з апікальними частинами рослин відрізняється більше кропітким підходом. Нами буде продовжено робота по підборі матеріалів для стерилізації. Так як після очищення від ниркових луска самі зародкові листя ми не обробляли, можливо, і цей факт надав несприятливих ефект. На жаль, обробити зародкові листочки, пошкодивши їх, дуже складно [30].



Малюнок 2.7. Мікророзмноження *G. biloba* in vitro. А) Регенерація пагонів після 60 днів культивування; В) Регенерація коренів після 30 днів культивування; С) Перенесення регенованих рослин з культури in vitro у ґрунт; D) Витримування рослин під пластиковою кришкою для акліматизації

2.3. Період адаптації рослин *Ginkgo biloba* від in vitro до ex vitro.

Спектральна якість світла впливає на розвиток рослин in vitro та ex vitro. Початкові стадії ex vitro в контрольованих умовах штучного освітлення можуть позитивно впливати на ріст рослин порівняно з природними умовами освітлення в теплиці. Різні джерела штучного світла, такі як люмінесцентні лампи, натрієві лампи високого тиску та світлодіоди (LED), можуть використовуватися для вирощування рослин у приміщенні. Кожен тип ламп має відхилення в інтенсивності та якості світла від природного світла. Відмінності більш виражені в далекому червоному діапазоні. Сині та червоні світлодіоди в основному використовуються для вирощування рослин, оскільки їхній спектральний розподіл потужності оптимальний для фотосинтезу. Додавання далекого червоного та зеленого світла до синього та червоного може збільшити накопичення біомаси та змінити морфогенез під час стадії адаптації ex vitro [31].

Склад садового субстрату, що замінює ґрунт, може впливати на ріст рослин та їх морфологічний розвиток. Субстрати з кількох інгредієнтів готуються для акліматизації ex vitro, щоб забезпечити найкращі умови для поступового дозрівання коренів. У більшості випадків субстрати готують з торфу, вермикуліту, перліту та піску. Додавання джерела поживних речовин, наприклад, мінеральних добрив або компосту,

покращує розвиток рослин під час адаптації *ex vitro*. Додавання коров'ячого гною до субстратних сумішей є варіантом для забезпечення джерела поживних речовин, стабілізації рН субстрату та пригнічення розвитку патогенів. Однак немає даних про вплив додавання коров'ячого гною до субстратних сумішей на успіх акліматизації *Ginkgo biloba ex vitro* [32].

При великомасштабному розмноженні критично важливими є як оптимальні умови вирощування, так і економічна прибутковість. Зменшення розміру контейнера забезпечує вагому економічну користь через зниження витрат на утримання на одиницю площі. Однак, зменшуючи розмір контейнера, можна зменшити розвиток коренів та фотосинтетичну активність, що впливає на ріст рослин. Контейнери з об'ємом комірок менше 100 мл зазвичай використовуються для виробництва розсади лікарських рослин. Експерименти з акліматизації *Ginkgo biloba* проводилися в горщиках об'ємом понад 200 мл. Тому необхідні дослідження акліматизації згідно з потребами галузі [33].

Навіть якщо розмножені *in vitro* саджанці можна висаджувати безпосередньо на сільськогосподарських полях, поступова адаптація до польових умов є кращою для збільшення виживання. Початкова енергія росту саджанців, дата посадки, затінення, температура ґрунту та повітря можуть впливати на виживання та розвиток саджанців у польових умовах. Визначення оптимальної дати посадки є критично важливим, особливо в умовах Північної Європи, оскільки рослинам необхідно розвинути стійку кореневу систему та зібрати достатню кількість поживних речовин для успішної зимівлі. [34].

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ КУЛЬТИВУВАННЯ РОСЛИН ГІНГО БІЛОБА, ТА ЗБІЛЬШЕННЯ ЙОГО КОЕФІЦІЄНТ РОЗМНОЖЕННЯ

Наше дослідження розпочалося з приготування поживного середовища. Спочатку готувалися окремо макросолі, мікросолі, Fe-хелат, тіамін (вітамін B1), піридоксин (вітамін B6), аскорбінова кислота, мезоінозит (вітамін B8) та нікотинова кислота. Їх кількість зазначена у таблиці 1.

Після приготування маточних розчинів, ми приступили до змішування кормкомпонентів поживного середовища у потрібній кількості яка зазначена у таблиці 1. Потім ми у півлітровій посудині на електроплиті розчиняли агар у відношенні, що на 1 літр поживного середовища потрібно агару 15 грам.

Після того як агара повністю розчинився ми його потримали на ввімкненій електроплиті ще 30 хв, для повного розчинення мікрочастинок агару. Бо якщо не повністю розчинити то під час змішування з поживним середовищем у ньому почнуть з'являтися маленькі біло-прозорі пластинки агару.

Після змішування всіх компонентів поживного середовища ми розлили його по баночок, закрили плівкою та зверху кришечками, щоб у середовище не потрапили різні бактерії, віруси та грибки після автоклавування.

Після даних маніпуляцій ми штатив з баночками поставили у горизонтальний автоклав. Туда ще поставили двохлітрову колбу з водою, щоб вона простерилізувалася, ця колба була накрита скляною щільною кришкою. У автоклав ще також поклали вирізані паперові квадратики на яких буде відбуватися розрізання та інші маніпуляції з *Ginkgo biloba*. Також ми поклали скальпель, маленькі ножнички, пінцет та чашки петрі на яких та якими будемо проводити маніпуляцію. Ці всі інструменти попередньо були промиті у дистильованій воді та покладені у паперовий пакетик, який завернули.

Автоклавування відбувалося при тиску у 2 атмосфери протягом 40 хв. Дана методика стерилізації дає 100% стерилізацію всього що було покладено у автоклав. Після завершення стерилізації всі бумажні пакетики та штатив з баночками був

перенесений у прекурсорну, яка попередньо стерилізувалася дві години під ультрафіолетом.

Таблиця 3.1

Середовище Мурасіге-Скуга для вирощування меристем *Ginkgo biloba*

Макросолі	г/л маточного розчину		На 1 літр середовища брати маточного розчину
NH ₄ O ₃	33	50 мл	
KNO ₃	38		
KH ₂ PO ₄	3,4		
MgSO ₄ – 7H ₂ O	3,5		
	мг/л маточного розчину	2 мл	
CaCl ₂ – 2H ₂ O	440		
Мікросолі	мг/л маточного розчину	1 мл	
H ₃ BO ₃	6200		
MnSO ₄ – 4H ₂ O	22300		
ZnSO ₄ – 7H ₂ O	8500		
KJ	830		
CuSO ₄ – 5H ₂ O	25		
CoCl ₂ – 6H ₂ O	25		
Na ₂ MoO ₄ – 2H ₂ O	25		
Fe - хелат	мг/100мл маточного розчину	5 мл	
FeSO – 7H ₂ O	557		
Трилон Б	745		
Фітогормони	Кількість на маточний розчин		
Тіамін, B ₁	1 ампула на 60 мл	1,6 мл	
Піридоксин, B ₆	1 мпула на 50 мл	1 мл	
Аскорбінова к-та	50 мг на 50 мл	3 мл	
Сахароза		20 г	
Агар		15 г	
Мезоінозит, B8		100 мг	
Нікотинова кислота, PP		1 мг	

З таблиці 2 мікросолі, макросолі та Fe-хелат, вітаміни B₁, B₆, аскорбінова кислота, сахароза та агар є основним компонентом середовища Мурасіге-Скуга, а інші фітогормони вже додаються ті які потрібні для певного виду рослини. У моєму модифікованому середовищі були використані такі фітогормони: мезоінозит (B8),

нікотинова кислота (PP). Дане середовище створене таким чином щоб ропосати калюсогенез у експлантів.

Мезоінозит (B8) має антистресову дію для рослини, сприяє росту клітин, регулює обмін речовин та покращує засвоєння поживних елементів з середовища. Нікотинова кислота активізує обмін речовин у рослині, також має антистресову дію, антиоксидантна властивість.

У вигляді експланту бралися як пагони так і листочки *Ginkgo biloba*. Всього було 10 пагонів та 10 листочків. Вони були спочатку простерилізовані у гіпохлориді натрію. Гіпохлорид натрію у народі хлорка, готувався так, розчиняли 1 грам порошку гіпохлориду натрію у 40 мілілітрах дистильованої води.

Потім простерилізовані пагони та листочки були промиті по черзі у 4 чашках петрі з дистильованою водою. У чашку петрі вміщалося по 3 листочка та по 5 пагонів тому промивка від гіпохлориду натрію відбувалася у декілька етапів та повторень. У кожній чашці петрі з дистильованою водою листочки та пагони промивалися по 2 хвилини. Це робилося щоб повністю змити з експланту гіпохлорид натрію і у майбутньому не зіпсувати рослинний матеріал та поживне середовище. Після цього пагони та листочки були перенесені у баночки з поживним середовищем. Потім ці ємності перенесені під світло із регульованим світловим періодом 16 годин світла та 8 годин темряви.

Таблиця 3.2

Вплив складу поживного середовища на розвиток рослин

	3 тижні	6 тижнів	8 тижнів	9 тижнів
Пагін	2	5	8	9
Листок	1	3	6	7

З таблиці 3 можна побачити що за 4 місяці культивування з 10 пагонів вижило та утворився калюс у девяти з десяти баночках з експлантами. Беручи до уваги листочки то з ними ситуація трішки гірша з 10 експлантів вижило тільки 7. На цьому моменті

можно зробити висновок що беручи пагін як експлант для введення *Ginkgo biloba* в культур *in vitro* можна отримати більше здорових та розвинутих баночок з калюсом.

Наступне середовище яке готувалося було для утворення органів рослини, а саме пагонів та листочків. Для цього до попередньо використаного середовища додалися два фітогормони. А саме 6-Бензиламінопурин (6-БАП) у відношення 0,3 мг на літр поживного середовища. БАП є природнім цитокініном який добре впливає на рослину, та спонукає її утворювати пагони та листочки. Також сюди ж додався ще один фітогормон – кінетин, у відношенні 0,7 мг на літр поживного середовища. Він грає ключову роль в утворенні пагонів та листочків. Також є хорошим антистресом для рослини. У нашому випадку цей фітогормон є доцільним, тому що рослина, а саме пагони та листочки перенесли та перенесуть великий стрес під час пересадки.

Ми брали кожну баночку з калюсом винімали звітти утворений калюс розділяли його простерилізованим у автоклаві скалпелем на 3 частини та переносив у нову баночку з новим середовищем. Отже калюс що утворився з пагонів був розділений на 27 баночок з новим середовищем який містив БАП та кінетин. Таким же способом ми отримали 21 баночку з калюсом з листочків.

Далі протягом наступного місяця даний калюс проростав утворюючи пагони та листочки.

Таблиця 3.3

Приживлення рослин залежно від підібраного зразка, шт.

Експланти, які були використані у досліді	Всього що було	Прийнялися
Пагони	27	25
Листочки	21	20

Отже з даної таблиці можна зробити висновок що не так багато рослин і заразилося. Беручи до уваги ті що були вирощені з пагонів у них не вижило 2

рослини, тому що під час пересадки калюсу у баночку потрапив якийсь вірус, бактерія або грибок і вся баночка почорніла. З листочків загинула лише 1 рослина.

Після місяця проростання рослини були заввишки 3-5 см. Ми почали їх пересадку на нове середовище, ще такими малими тому що не хотіли пошкоджувати дорослу рослину у якої буде більше листочків.

Дані рослин не утворили коренів. Так це і не дивно, тому що у цьому середовищі були лише цитокініни. А вони як відомо стимулюють лише утворення пагонів та органогенез.

Після успішного проростання пагонів та утворення перших листочків ми почали готувати нове середовище для утворення коренів. Для цього ми брали поживне середовище склад якого написано у таблиці 1. До цього поживного середовища Мурасіге-Скуга ми додали кінетин у відношенні 0,7 мг на літр середовища. Ми його додали тому що рослини були ще малими, а після додавання ауксинів не гарантувалося, що пагін продовже рости. Також до поживного середовища додалися ауксини, а саме індол-3-масляна кислота (ІМК) у відношенні 0,3 мг на літр середовища. Також додали індол-3-оцтову кислоту (ІОК) у відношення 0,3 мг на літр поживного середовища. Дані речовини є хорошими ауксинами для нашого дослідження, тому що вони швидко “змушують” рослину утворювати корені, також вони є антистресантами, а для нас це важливий аспект підбору фітогормонів, бо під час пересадки рослина отримує стрес.

Кожну рослину що утворилася ми пересадили у нову баночку з новим середовищем для початку утворення коренів та продовження росту пагонів завдяки кінетину.

Через місяць корені та самі рослини досягли верху баночок. Це свідчить про правильно підібрані фітогормони та їх кількість у середовищі.

Таблиця 3.4

Утворення кореневої системи залежно від виду експланту, шт.

Експланти які були використані у досліді	Всього рослин до пересаджування у нове середовище	Рослини, що утворили кореневу систему
Пагони	25	24
Листочки	20	15

Беручи до уваги баночки у яких рослини були отримані з експлантів пагона *Ginkgo biloba* не вижило тобто заразилося 1 баночка. Якщо брати до уваги листочок як експлант для культивування *Ginkgo biloba* то з 20 баночок з рослинами вижило лише 15.

Тому можна зробити висновок що пагін для культивування *Ginkgo biloba* є найкращим експлантом для вирощування *in vitro*.

Після 6 місяців культивування *Ginkgo biloba* рослин що утворилися можна було висаджувати в умови закритого ґрунту. Субстратом для цього слугував Поліський торф. Він має необхідний рН (6,5) та необхідну кількість поживних елементів для рослин *Ginkgo biloba*.

Мікроклональні рослини *Ginkgo biloba* були посаджені у вазончики з даним торфом і перенесені у теблицю де котролювалася вологість температура та освітлення. Поступово ці показники наближали до показників навколишнього середовища. Всі рослини показали себе добре під час акліматизації. Бо не зважаючи чи експлантом був листочок чи пагін всі рослини добре пристосувалися. Пристосування велося протягом місяця. Це робилося, щоб рослина не отримала відразу великого стресу та не загинула.

Отже для хорошого введення *Ginkgo biloba* в культуру *in vitro* краще використовувати пагони а не листочки. У пагонах міститься більше твірних тканин та клітин ніж у листочку, а також важливу роль грає стерильність під час пересаджування з баночки у баночку, а також склад поживного середовища.

ВИСНОВОК

У результаті проведеного дослідження було здійснено комплексний аналіз біологічних, морфофізіологічних та біотехнологічних особливостей *Ginkgo biloba* — єдиного сучасного представника реліктової родини гінкгових, що дійшов до нас із мезозойської ери. Проведена робота підтверджує надзвичайну наукову та практичну цінність цієї рослини, а також обґрунтовує доцільність її широкого застосування в медицині, фармакології, біотехнології, озелененні урбанізованих територій, а також у програмах збереження біорізноманіття.

У межах роботи було досліджено природний ареал гінкго, його історію, географічне походження, особливості росту в дикій природі та умовах культивування. На підставі аналізу літературних джерел та практичного досвіду встановлено, що *Ginkgo biloba* виявляє високий рівень екологічної пластичності. Він може зростати на різноманітних типах ґрунтів, витримує забруднення повітря, має високу стійкість до шкідників і патогенів, що робить його надзвичайно перспективним для використання у міському озелененні та рекультивації техногенно порушених територій.

Виявлено значні труднощі при розмноженні гінкго традиційними методами — генеративним та вегетативним. Тривалий ювенільний період, дводомність, короткий період життєздатності насіння та низька регенераційна здатність живців обмежують можливості масового розмноження виду. Саме тому особливу актуальність набуває використання методів мікроклонального розмноження *in vitro*, які забезпечують швидке, ефективне та масове отримання однорідного посадкового матеріалу з цінними ознаками.

Під час дослідження було розроблено та апробовано власну методику введення *Ginkgo biloba* в культуру *in vitro*. Здійснено оптимізацію процесів стерилізації та підготовки вихідного рослинного матеріалу, що дало змогу мінімізувати контамінацію та підвищити виживаність експлантів. Встановлено, що найефективнішим вихідним матеріалом є трав'янисті пагони, які демонструють вищу регенераційну здатність порівняно з листовими експлантами. Запропоноване модифіковане поживне

середовище на основі формули Мурасіге-Скуга з додаванням цитокінінів (6-БАП, кінетин) та ауксинів (ІОК, ІМК), а також вітамінів та антистресантів (мезоінозит, нікотинова кислота), сприяло утворенню високоякісного калюсу та подальшій органогенезі.

У результаті культивування експлантів у контрольованих умовах отримано стабільну калюсну культуру, яка слугувала основою для індукції нових пагонів і листків. Дослідження довели, що при правильному гормональному балансі можна досягти високого коефіцієнта розмноження, що підтверджено приживанням у 92,6% випадків для пагонів та 95,2% — для листових експлантів після стадії проростання. Усі мікроклональні рослини успішно пройшли етап укорінення та подальшої акліматизації до умов *ex vitro*. Визначено, що для ефективного розвитку кореневої системи доцільним є використання WPM середовища з додаванням ІОК, ІМК та аскорбінової кислоти.

Особливу увагу в дослідженні приділено етапу акліматизації. Проведений аналіз підтвердив, що поступовий перехід з умов стерильного культивування до відкритого ґрунту з використанням субстратів на основі поліського торфу забезпечує високий рівень виживання мікроклональних рослин. Підтверджено, що світловий режим (16 годин світла), вологість, температура та поступове наближення до природних умов сприяють формуванню стійкої та життєздатної рослини *Ginkgo biloba*.

Таким чином, за результатами дипломної роботи було досягнуто наступного:

- Уперше для умов оранжерейного культивування в Україні було апробовано ефективну методику мікроклонального розмноження *Ginkgo biloba*.
- Визначено оптимальні умови для стерилізації вихідного матеріалу, склад поживного середовища та гормональний баланс, що забезпечують високий відсоток регенерації та приживлення експлантів.
- Проведено порівняльний аналіз ефективності використання пагонів та листків як експлантів; встановлено перевагу пагонів.

- Запропоновано підхід до поетапної акліматизації, що забезпечив 100% виживання при перенесенні в умови теплиці.
- Отримані результати створюють підґрунтя для подальшого промислового розмноження гінкго в біотехнологічних умовах та збереження його генетичного потенціалу.

У перспективі результати дослідження можуть бути застосовані у селекційній практиці, збереженні генофонду рідкісних рослин, підвищенні біологічної різноманітності ботанічних садів та створенні екологічно сталих агроландшафтів. Водночас продовження наукових робіт у напрямку тонкого налаштування гормонального фону, подолання соматональних варіацій та вивчення вторинного метаболізму калюсних ліній *Ginkgo biloba* відкриває нові горизонти в галузі біотехнології лікарських рослин.

СПИСОК ВИОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ковальов В.М., Павлій О.І., Ісакова Т.І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин: Підручник. – Харків: "Прапор", вид-во НФАУ, 2000. – 704 с.
2. Всемирная энциклопедия: Биология (Адамчик М.В., Адамчик В.В., Андерсен Э.В., Барташевич А.Р. и др.; За ред. Адамчика М.В.). – Минск: Современный литератор, 2004. – С. 132-133.
3. Маринич І.С., Балабушка В.К., Ібрагім Л.В. Розмноження хвойних дерев та кущів: Методичні рекомендації. – К.: КП "Редакція журналу "Дім, сад, город", 2005. – 32 с.
4. Заячук В.Я. Дендрологія. Голонасінні: Навч. пос. – Львів: ТЗОВ "Фірма "Камула", 2005. – С. 14-17.
5. Словник таксономічних назв деревних рослин (Івченко А.І., Мазепа М.Й., Мельник Ю.А. та ін.; За ред. Кучерявого В.П.). – Львів: Світ, 2001. – 148 с.
6. Баранецький ГГ., Гречаник Р.М. Лісова генетика. – Львів: ТЗОВ "Фірма "Камула", 2005. – 360 с.
7. Jacobs BP and Browner WS. Ginkgo biloba: a living fossil. Am. J.
8. Chan PC, Xia Q, and Fu PP. Ginkgo Biloba Leave Extract: Biological, Medicinal, and Toxicological Effects. J. Environ. Sci. Heal. C 2007; 25: 211 -244.
9. Sabater-Jara AB, Souliman -Youssef S, Novo -Uzal E, Almagro L, Belchi' - Navarro S and Pedren~o MA. Biotechnological approaches to enhance the biosynthesis of ginkgolides and bilobalide in Ginkgo biloba. Phytochem. Rev. 2013; 12:191 -205.
10. Cheng SY, Xu F and Wang Y. Advances in the study of flavonoids in Ginkgo biloba leaves. J. Med. Plants Res. 2009; 3: 1248-1252.
11. Weimann S, Roll S, Schwarzbach C, Vauth C and Willich SN. Effects of Ginkgo biloba in dementia: systematic review and meta -analysis. BMC Geriat r. 2010; 10: 1 -14.
12. Kumar Mohanta T, Tamboli Y and Zubaidha PK. Phytochemical and medicinal importance of Ginkgo biloba L. Nat. Prod. Res. 2014; 28: 746 - 752.

13. Zhou L, Meng Q, Quian T and Yang Z. Ginkgo biloba extract enhances glucose tolerance in hyperinsulinism -induced hepatic cells. *J. Nat. Med.* 2011; 65: 50 -56.
14. Van Beek TA. Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts. *J. Chromatogr.* 2002; 937: 21 -55.
15. Isah T. Nodal segment explant type and preconditioning influence in vitro shoot morphogenesis in Ginkgo biloba L. *Plant Physiol. Rep.* 2019.
16. Yuan Z, Tian Y, He F and Zhou H. Endophytes from Ginkgo biloba and their secondary metabolites. *Chin. Med.* 2019; 14: 51.
17. Tommasi F, Scaramuzzi F. In vitro propagation of Ginkgo biloba by using various bud cultures. *Biol. Plantarum* 2004; 48: 297 -300.
18. Mantovani NC, Grando MF, Xavier A and Otoni WC. In vitro shoot induction and multiplication from nodal segments of adult Ginkgo biloba plants. *Hortic. Bras.* 2013; 31: 184 -189.
19. Chaudhury A, Power JB, Davey MR. High frequency direct plant regeneration from leaf and petals of Cape Primrose (*Streptocarpus*). *JCSB* 2010; 13: 107 -112.
20. Toliat M, Abdoli M, Ghorbani -Meshgin M, Khalighi -Sigaroodi F and Omid, M. Investigation of in vitro culture of Ginkgo biloba through tissue culture of different explants. *J. Med. Plants* 2009; 8: 156-163.
21. Choi PS, Cho DH and Soh WY. Shoot organogenesis from immature zygotic embryo cultures of Ginkgo biloba. *Biol. plantarum* 2003; 47: 309 -312.
22. Mccown BH and Sellmer JC. General Media and Vessels Suitable for Woody Plant Culture. *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Springer, Dordrecht, 1987 , pp : 4 -16.
23. Chandana BC, Kumari Nagaveni HC, Lakshmana D, Shashikala SK and Heena MS. Role of plant tissue culture in micropropagation, secondary metabolites production and conservation of some endangered medicinal crops. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 2018; 3: 246 -251.
24. Camper ND, Coker PS, Wedge DE and Keese RJ. In vitro culture of Ginkgo. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 1997; 33: 125 -127. doi: 10.1007/s11627 -997 -0009 - 7 .

25. Choi PS, Cho D and Soh WY. Shoot organogenesis from immature zygotic embryo cultures of *Ginkgo biloba*. *Biol. Plantarum* 2003; 47: 309 -312.
26. Friedman WE. Morphogenesis and experimental aspects of growth and development of the male gametophyte of *Ginkgo biloba* in Vitro. *Am. J. Bot.* 1987; 74: 1816 -1830.
27. Mukhambetzhonov SK. Culture of nonfertilized female gametophytes in vitro. *Plant Cell Tiss. Org.* 1997; 48: 111-119.
28. Hassan SAM and Zayed NS. Factor controlling micropropagation of fruit trees : a review. *Science International* 2018; 6: 1 -10.
29. Xiong H, Sun H, Zou F and Fan X. Micropropagation of Chinquapin (*Castanea henryi*) using axillary shoots and cotyledonary nodes. *Hortic. Sci.* 2018; 53: 1482 -1486.
30. Ridzuan NI, Abdullah N, Vun YL and Supramaniam CV. Micropropagation and defence enzymes assessment of *Moringa oleifera* L. plantlets using nodal segments as explants. *S. Afr. J. Bot.* 2019; 129: 56 -61.
31. Erland LAE, Shukla MR, Glover WB and Saxena PK. A Simple and efficient method for analysis of plant growth regulators: a new tool in the chest to combat recalcitrance in plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org.* 2017; 131: 459 - 470.
32. Shirin F and Rana PK. In vitro plantlet regeneration from nodal explants of field-grown culms in *Bambusa glaucescens* willd. *Plant Biotechnol Rep.* 2007; 1:141 -147.
33. Saha S, Mori H and Hattori K. Synergistic effect of kinenin and benzyl adenine plays a vital role in high frequency regeneration from cotyledon explants of bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) in relation to ethylene production. *Breed Sci.* 2007; 57: 197 -202.
34. Amiri S, Panahi B, Mohammadi R and Fattahi F. Effect of plant growth regulator combination on direct in vitro regeneration of Persian Lilac (*Melia azedarach* L.). *Proc. Natl Acad. Sci. B: Biol. Sci.* 2020; 90: 261 - 265.