



УДК 630*176.322.2

Особливості розмноження рослин *Fagus sylvatica* L. в культурі *in vitro*

М. М. Лісовий¹, А. П. Іванюк²

Проведено експериментальні дослідження процесу мікроклонування бука лісового, а саме: отримання стерильної культури, ініціація росту, укорінення та адаптація клонів до умов *in vivo*. Наведено вплив концентрації та експозиції реагентів-стерилізаторів на успішність деконтамінації вихідних експлантів досліджуваного виду. Як вихідні експлантанти використано апекси із верхівкових бруньок, заготовлених у другій половині лютого. Застосовано ступінчасту схему деконтамінації рослинного матеріалу наступним чином: 15 с – 96%-й етанол; 24 год – протічна водою із детергентом; 15 хв – 30%-й розчин хлорки; 10 с – 70%-й етанол; 15 с – 2%-й розчин перексиду водню; 10 хв – 0,2%-й нітрат срібла із промиванням після кожного реагенту стерильною дистильованою водою; 10-15 с – 10%-й розчин «Цефазолін-КМП». Для ініціації експлантів протестовано живильні середовища Р-24, WPM та MS, модифіковані ауксинами НОК, ІОК, ІМК та цитокінінами БАП і кінетин у різних концентраціях та комбінаціях. Реалізація ризогенезу проходила на середовищі MS із зменшеною у 2-4 рази концентрацією основних мінеральних солей з тими ж стимуляторами, як для ініціації. Адаптацію клонів виконували на наступних субстратах: суміш дернового ґрунту з великозернистим піском і торфом у співвідношенні 1:1:1; великозернистий пісок; дерновий ґрунт з великозернистим піском (1:1); готові торфотаблетки («Jiffy-7 Forestry»). Встановлено, що найбільшу кількість ініційованих експлантів бука лісового (96%) забезпечує живильне середовище MS, модифіковане стимуляторами 2,0 мг/л НОК + 0,5 мг/л ІМК + 0,5 мг/л К + 0,5 мг/л БАП. Доведено, що підвищений вміст ауксину чи цитокініну, або повна відсутність одного з них спричиняє загибель рослинного матеріалу. Успішне адвентивне коренеутворення експлантів бука лісового (96%) забезпечує використання живильного середовища за рецептом: 0,5 MS + 1,0 мг/л НОК + 1,0 мг/л ІМК. У випадку зниження кількості мінеральних солей у чотири рази значно зменшується здатність рослин-регенерантів до ризогенезу. Найефективнішим субстратом для адаптації клонів бука лісового є простерилізовані торфотаблетки, які забезпечили 94% життєздатних рослин на 30-ту добу культивування.

Ключові слова: деконтамінація; ініціація; ризогенез; адаптація; мікроклонування, експлант.

Вступ (Introduction). Бук лісовий (*Fagus sylvatica* L.), як деревний вид, можна вважати одним із найбільш поширених та господарсько-цінних на теренах Європи, що зумовлено його зростанням на переважаючій її частині та у різних природно-кліматичних умовах. Як чисті, так

мішані ліси бука лісового займають площу більшу ніж 12 млн га та поширені від півдня Скандинавії до Піренейського, Італійського та Балканського півостровів, а, крім цього, від південної частини Англії до України (Молотков, 1966). Буку лісовому належить четверте місце з-поміж усіх лісотвірних

¹ Лісовий Микола Миколайович – член-кореспондент Лісівничої академії наук України, доктор сільськогосподарських наук, завідувач кафедри лісових культур і лісової селекції. Національний лісотехнічний університет України, вул. Генерала Чупринки, 103, Львів, 79057, Україна. Тел.: +38-067-701-48-08. E-mail: m.lisovyj@nltu.edu.ua ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7624-1052>

² Іванюк Андрій Петрович – кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри лісових культур і лісової селекції. Національний лісотехнічний університет України, вул. Генерала Чупринки, 103, Львів, 79057, Україна. Тел.: +38-050-971-67-31. E-mail: ivanykandr@ukr.net ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1489-4733>

видів України за вкритою лісом площею (Державне агентство лісових ресурсів України, 2024).

Окрему цінність, зокрема для міського озеленення, становить значний генетичний поліморфізм деревного виду та, відповідно, наявність декоративних (морфологічних) форм за кольором і формою листових пластин, габітусом крони, цілою низкою комбінованих ознак. У літературі описано понад 100 відмін *Fagus sylvatica* та детально висвітлено шляхи їх використання у садово-парковому господарстві (Лісовий, 2009; Лісовий, Гузь, 2022). Окремо варто зазначити, що за своєю естетичною цінністю бук лісовий в асоціації грабові бучини з осокою волосистою відносять до найвищого класу за шкалою В. П. Кучерявого (2005).

Цінність деревного виду зумовлює потребу в ефективному виробництві садивного матеріалу конкретних його генотипів, що може бути забезпечено вегетативними способами розмноження, зокрема і мікроклонуванням (культурою *in vitro*). До основних переваг цього способу належить можливість оздоровлення і продукування необхідної кількості рослин з одиниці вихідного експланта, що забезпечується етапом намноження. Проте основною перевагою є повна генетична ідентичність клонів із материнською особиною (Лісовий, 2009).

Загалом процес мікроклонування рослин полягає у виконанні наступних основних процесів: деконтамінація (стерилізація), ініціація (стимулювання росту експланта), ризогенез та адаптація. На першому етапі необхідно отримати стерильну культуру, тобто вивільнити вихідний рослинний матеріал від патогенної мікрофлори. Ретельне дотримання цієї умови у подальшому забезпечить успіх усіх наступних етапів. Такої стерилізації досягають використанням спеціального комплексу хімічних агентів. Важливим аспектом є збереження максимальної кількості життєздатних експлантів, а тому потрібно точно підібрати концентрації, типи і комбінації реагентів. Ініціація та ризогенез забезпечуються складом застосованого живильного середовища та модифікацією його відповідними стимуляторами росту рослин (аукинового та цитокінінового походження). На етапі адаптації, отримані укоріненні експланти потрібно акліматизувати до природних умов навколишнього середовища (Мусієнко, Паніюта, 2005; Колесніченко, Слюсар, Якобчук, 2009; Badoni, & Chauhan, 2010; Гожан та ін., 2014; Лісовий, Гузь, 2022).

Враховуючи значні переваги мікроклонального розмноження рослин та господарську цінність досліджуваного деревного виду, виникає актуальна необхідність здійснення досліджень з розмноження його в умовах *in vitro*.

Мета дослідження полягає у встановленні оптимальних умов проходження основних етапів при розмноженні в культурі *in vitro* *Fagus sylvatica* L.

Практична значимість результатів дослідження полягає у забезпеченні збереження селекційно-цінних генотипів бука лісового як з погляду висо-

кої продуктивності, так з погляду збереження різних декоративних властивостей.

Об'єкти і методика досліджень (Objects and methods). *Об'єкт дослідження* – процеси розмноження *Fagus sylvatica* L. в культурі *in vitro*. *Предмет дослідження* – укорінені експланти (клони) *Fagus sylvatica* L.

Досягнення мети роботи передбачає виконання наступних основних *завдань*: встановити вплив концентрацій та експозицій реагентів для успішної деконтамінації експлантів; визначити склад живильних середовищ для ініціації, та ризогенезу клонів досліджуваного виду.

Дослідження з мікроклонування бука лісового були проведені у лабораторії культури тканин кафедри лісових культур і лісової селекції НЛТУ України за загальноприйнятими біотехнологічними методиками у певній модифікації (Гузь, Гречаник, & Лісовий, 2009; Лісовий, 2015; Lisovyj, & Guz, 2017; Yaroshchuk et al., 2020).

Для досліджень з мікроклонування бука лісового як експланти використали апекси із верхівкових бруньок, заготовлені у другій половині лютого. Деконтамінацію рослинного матеріалу виконували за встановленим нами раніше протоколом (Гузь та ін., 2009), а, саме, здійснено послідовний обробіток наступним чином: 15 с – 96%-й C_2H_5OH (етанол); 24 год – протічна вода із детергентом; 15 хв – 30%-й розчин $NaClO$ (хлорка); 10 с – 70%-й C_2H_5OH ; 15 с – 2%-й розчин H_2O_2 (пероксид водню); 10 хв – 0,2%-й $AgNO_3$ (нітрат срібла) із промиванням після кожного реагенту дистильованою водою. Безпосередньо перед пасажом виконували обробіток експлантів впродовж 10-15 с у 10%-му розчині антибіотику «Цефазолін-КМП». Простерилізовані експланти культивували за 16-годинного фотоперіоду (3 кЛк) за температури 21-22°C і відносній вологості повітря 33-35%.

Для ініціації експлантів досліджуваного виду використали три типи живильних середовищ – Р-24, WPM та MS, модифіковані із допомогою різних співвідношень та концентрацій ауксинів: НОК (α -нафтилоцтова кислота); ІОК (індоміл-3-оцтова кислота); ІМК (β -індомілмасляна кислота) та цитокінінів: БАП (6-бензиламінопурин) і кінетин (табл. 1).

Отже, модифікація досліджуваних живильних середовищ проводилась однаковими комбінаціями та концентраціями ауксинів і цитокінінів по десять варіантів для кожного.

Для реалізації ризогенезу ініційованих експлантів використовували лише середовище MS, яке проявило себе найбільш результативно на попередньому етапі, і модифіковане наступним чином: у 2-4 рази зменшено концентрацію основних мінеральних солей; кількість цукрози зменшено до 0,5-1,0% і в окремих варіантах повністю вилучено цитокініни (табл. 2). Для встановлення оптимального складу живильного середовища для укорінення експлантів бука лісового протестовано десять його варіацій.

Таблиця 1. Модифікація живильних середовищ для ініціації
Table 1. Modification of nutrient media for initiation

Варіант досліджу	Середовище	Ауксини, мг/л			Цитокініни, мг/л	
		НОК	ІОК	ІМК	кінетин	БАП
1	Застосовані модифікації ідентичні для кожного живильного середовища (P-24, WPM, MS)	0,5	0,5	–	0,5	0,5
2		1,0	0,5	0,5	1,0	–
3		–	1,0	1,0	–	0,5
4		–	2,0	1,0	2,0	2,0
5		2,0	–	0,5	0,5	0,5
6		5,0	–	–	5,0	5,0
7		–	5,0	–	–	5,0
8		6,0	–	1,0	0,5	0,5
9		–	–	–	5,0	5,0
10		10,0	1,0	–	–	–

Таблиця 2. Модифікація живильних середовищ для ризогенезу
Table 2. Modification of nutrient media for rhizogenesis

Варіант досліджу	Середовище	Ауксини, мг/л			Цитокініни, мг/л	
		НОК	ІОК	ІМК	кінетин	БАП
1	0,5 MS	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5
2	0,5 MS	1,0	–	1,0	–	–
3	0,5 MS	–	1,0	1,0	0,5	–
4	0,5 MS	1,0	1,0	–	–	0,5
5	0,5 MS	1,0	1,0	1,0	–	–
6	0,25 MS	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5
7	0,25 MS	1,0	–	1,0	–	–
8	0,25 MS	–	1,0	1,0	0,5	–
9	0,25 MS	1,0	1,0	–	–	0,5
10	0,25 MS	1,0	1,0	1,0	–	–

На останньому етапі, як компонент субстрату для адаптації укорінених клонів досліджуваного виду, було використано: 1) суміш дернового ґрунту з великозернистим піском і торфом у співвідношенні 1 : 1 : 1; 2) великозернистий пісок; 3) дерновий ґрунт з великозернистим піском (1 : 1); 4) готові торфотаблетки («Jiffy-7 Forestry»). Всі чотири типи субстратів було простерилізовано за температури +90°C протягом 1,5 год та попередньо оброблено 0,5%-им розчином KMnO₄.

Результати (Results). Культивування рослинного матеріалу бука лісового на першому етапі

тривало 28-32 діб. У процесі ініціації експлантів досліджуваного виду на живильних середовищах з підвищеним вмістом цитокінінів відбувалось поступове їх нагромадження у тканинах понад необхідний фізіологічний рівень, що спричиняло інгібуючий ефект, а, відповідно, і пригнічення проліферації пазушних меристем і пониження можливості рослин до ризогенезу. На 10-15 добу від початку ініціації спостерігали пригнічення росту експлантів аж до цілковитого його припинення на середовищах із концентрацією цитокінінів понад 2 мг/л. Подібну тенденцію (на 18-22 добу)

спостережено у клонів на середовищах з вмістом ауксинів понад 5 мг/л. На середовищах без ауксинів ріст експлантатів не відмічено взагалі. Зведені результати ініціації на всіх модифікаціях живильних середовищ подано у табл. 3.

Таблиця 3. Результати ініціації досліджуваних експлантатів

Table 3. Results of the initiation of the studied explants

Варіант досліджу	1-й етап (через 15 діб)		2-й етап (через 25 діб)	
	Пригнічені, %	Ростуть, %	Пригнічені, %	Ростуть, %
1	16	84	42	58
2	10	90	18	82
3	12	88	22	78
4	64	36	82	18
5	–	100	2	98
6	92	8	100	–
7	100	–	–	–
8	6	94	96	4
9	100	–	–	–
10	4	96	100	–
11	24	76	66	34
12	26	74	60	40
13	18	82	70	30
14	86	14	94	6
15	14	86	44	56
16	10	–	–	–
17	98	2	98	2
18	10	90	100	–
19	100	–	–	–
20	–	100	96	4
21	72	28	78	22
22	82	18	100	–
23	42	58	90	10
24	100	–	–	–
25	26	74	54	46
26	100	–	–	–
27	100	–	–	–
28	56	44	100	–
29	98	2	100	–
30	26	74	100	–

Отже, найефективнішою ініціація була у варіантах дослідів: № 5 (98%) – MS+2,0 мг/л НОК+0,5 мг/л ІМК+0,5 мг/л К+0,5 мг/л БАП; № 2 (82%) – MS+1,0 мг/л НОК+0,5 мг/л ІОК+0,5 мг/л ІМК+1,0 мг/л К; № 3 (78%) – MS+1,0 ІОК+1,0 ІМК+0,5 БАП; № 15 (56%) – WPM+2,0 мг/л НОК+0,5 мг/л ІМК+0,5 мг/л К+0,5 мг/л БАП (рис. 1). Модифікації живильних середовищ, де життєздатність експлантатів була нижчою ніж 50% застосовувати, на наш погляд, недоцільно.

Варто зазначити, що на всіх типах середовища, які характеризувались підвищеним вмістом ауксину чи цитокініну, або із повним виключенням однієї із груп стимуляторів, відзначено загибель 100% рослинного матеріалу.

Спостереження за процесами ризогенезу експлантатів бука лісового виконували протягом 35 діб (табл. 4).

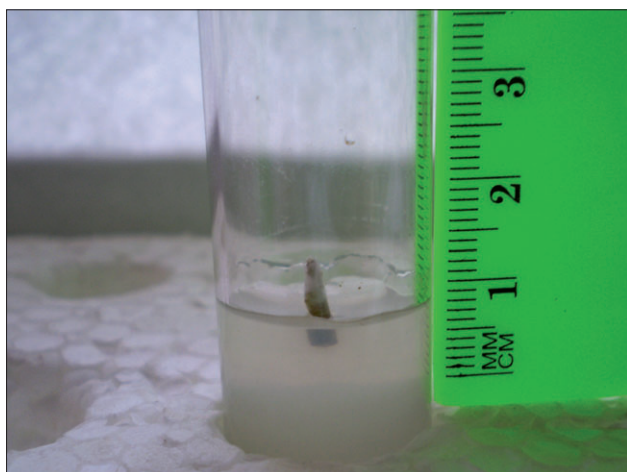
Таблиця 4. Результати укорінення експлантатів

Table 4. Results of rooting of explants

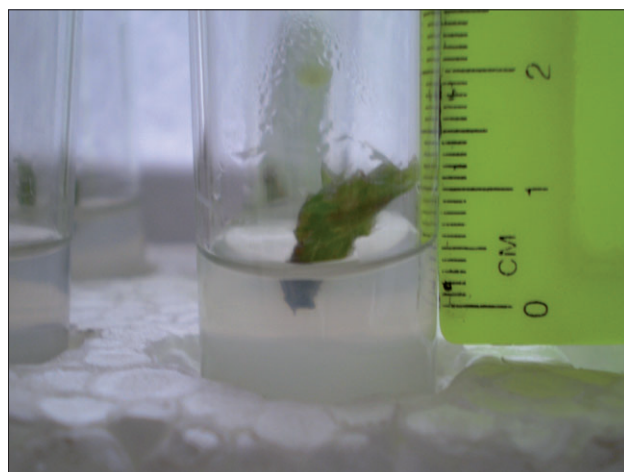
Варіант досліджу	Укорінилось (на 20-ту добу), %	Укорінилось (на 35-ту добу), %
1	–	–
2	12	96
3	–	–
4	–	–
5	24	76
6	–	–
7	18	48
8	–	–
9	–	–
10	14	58

За результатами досліджень, на живильних середовищах, до складу яких вносили цитокініни, процес укорінення не відбувався взагалі. Найкращі результати укорінення експлантатів спостережено за їх культивування у варіанті дослідів № 2 та № 5 – 96% і 76% відповідно (рис. 2-3). Дещо гірші результати отримано у варіантах дослідів № 7 і № 10 – 48% та 58% відповідно. На наш погляд, причина полягає в тому, що в останньому випадку кількість мінеральних солей була зменшена аж у чотири рази порівняно із вихідним живильним середовищем, а тому є недостатньою для забезпечення належного живлення експлантатів.

Перед пересаджуванням укорінених експлантів для адаптації до умов довкілля, щоб запобігти зараженню, усі процеси виконували у стерильних умовах. Отримані результати подано у табл. 5.



a)



b)



c)



d)

Рис. 1. Експланти досліджуваного виду: а) 1-ша доба культивування; б) 7-га доба культивування; в) 15-та доба культивування; г) 30-та доба культивування

Fig. 1. Explants of the studied species: a) 1st day of cultivation; b) 7th day of cultivation; c) the 15th day of cultivation; d) 30th day of cultivation



Рис. 2. Процес укорінення експлантів
Fig. 2. The process of rooting of explants



Рис. 3. Укорінений експлант
Fig. 3. An explant that took root

Таблиця 5. Результати адаптації клонів
Table 5. Results of adaptation of clones

Варіант субстрату	Кількість живих експлантів на 15-ту добу, %	Кількість живих експлантів на 30-ту добу, %
Великозернистий пісок	34	10
Дерновий ґрунт з великозернистим піском (1 : 1)	48	6
Суміш дернового ґрунту з великозернистим піском і торфом у співвідношенні 1 : 1 : 1	82	74
Торфотаблетки	92	94

Отже, найефективнішим субстратом для адаптації клонів бука лісового були торфотаблетки, за використання яких життєздатність рослин спостережено на рівні 94% на 30-ту добу вирощування та суміш дернового ґрунту з великозернистим піском і торфом у співвідношенні 1 : 1 : 1 (74%). На двох інших субстратах практично усі клони загинули.

У перший період процесу адаптації (25-30 діб) клони накривали простерилізованими скляними ємностями, що запобігало дефіциту вологи у експлантатів. На дорошування рослини-регенеранти поміщали до культуральної кімнати на 30 діб. Після цього розпочинали загартовувати клони поступовим зниженням вологості повітря, що спричинило утворення нових фотосинтезуючих листових пластин. З цієї метою із клонів знімали скляні ємності – спочатку вдень із 9⁰⁰ до 17⁰⁰ протягом 10-ти діб, а пізніше рослини повністю відкривали і переміщали до культивацийних споруд на дорошування (рис. 4-5).

Таким чином, експериментально встановлено оптимальні умови (схема деконтамінації, живильні середовища для ініціації та ризогенезу, а також протокол адаптації) для ефективного розмноження в культурі *in vitro* рослин *Fagus sylvatica*.



Рис. 4. Пересаджений клон
Fig. 4. Transplanted clone

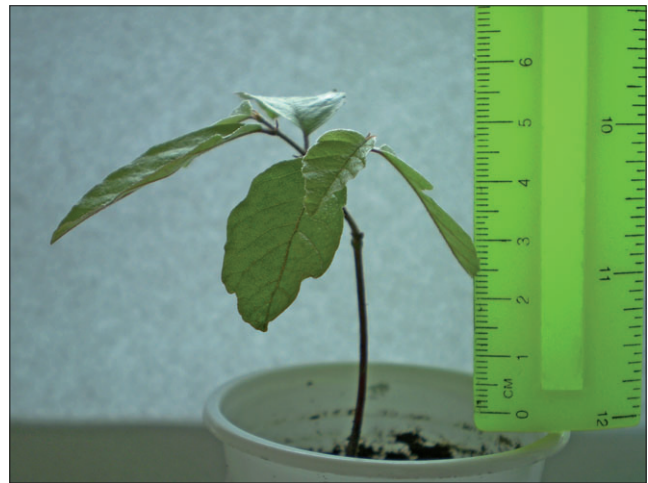


Рис. 5. Адаптований клон
Fig. 5. Adapted clone

Дискусія (Discussion). Необхідно зазначити, що у літературних джерелах наявна відносно незначна кількість наукових праць, матеріал яких охоплював би увесь цикл мікроклонування *Fagus sylvatica*.

Зокрема, проаналізовано результати введення у культуру експлантів досліджуваного виду (Чорнобров, & Олексійченко, 2014). Встановлено, що ефективність деконтамінації експлантатів вище ніж 70% спостерігалась у випадку їх ізолювання із материнської особини у квітні-червні та обробітку протягом 3 хв 1%-им розчином AgNO_3 із наступним перенесенням у 2,5%-ий розчин NaClO (Чорнобров, Олексійченко, 2014).

Цікавими є результати досліджень мікроклонування бука лісового з використанням живильних середовищ WPM та DKW (Гречаник, Базюк, Каганяк, & Гриник, 2000). Найкращого результату було досягнуто за використання, як експлантатів, бруньок з ювенільних особин, які культивували на середовищах із додаванням 0,2 мг/л ІОК та 0,1 мг/л БАП. Також позитивні результати зафіксовано у випадку використання сегментів гіпокотилів на середовищах із 0,1 мг/л НОК та 0,6 мг/л БАП.

Використання середовища Гамбурга (за Уайтом) із додаванням вітамінів (В1, В6, РР, по 0,1 мг/л), сахарози – 20 г/л; БАП (6-бензоамінопурин) –

0,4 мг/л; аскорбінової кислоти по 5 мг/л; α -НОК (α -нафтилоцтова кислота) – 0,2 мг/л; аденіну – 19 мг/л; менозиту – 100 мг/л, забезпечує коефіцієнт розмноження експлантів *Fagus sylvatica* у культурі за 30 діб на рівні 4,5-6,5 (Козлов, 2003).

Вивчення впливу PPM™ (Plant Preservative Mixture™) на деконтамінацію експлантів бука лісового показало, що рослинний матеріал, культивований на середовищі WPM із додаванням 2 мл/л PPM™ забезпечує отримання близько 70-75% стерильних культур, що є доволі високим показником (Singh, 2023).

Цікавими є результати досліджень щодо встановлення ефективності індукування соматичного ембріогенезу та органогенезу рослин *Fagus sylvatica* L. *in vitro* (Hazubska-Przybył, Chmielarz, & Wojarczuk, 2015). Експланти заготовляли із свіжого насіння та пасажували їх на живильне середовище, модифіковане зеатином, 2,4-D та/або ВА (бензиладеніном). Як живильні, використовували середовища WPM, WPM і MSG. Найефективнішим виявилось середовище WPM, на якому до 15% експлантів утворили адвентивні бруньки

Існують також дані щодо перспективи розмноження *in vitro* *Fagus sylvatica* L. із ювенільних тканин (Vieitez, Ferro, & Ballester, 1993). Для цього використовували ембріони із насіння, які культивували на живильному середовищі WPM із додаванням 0,5 мг/літр ВА + 2 мг/літр zeatin + 0,2 мг/літр NAA, що дало позитивні результати.

L.N. Barry (1991) встановив, що стимулююча дія регуляторів росту рослин на розвиток експлантів бука лісового в умовах *in vitro* суттєво залежала від ступеня спокою бруньок, тобто від терміну їх заготівлі. Культивування відбувалось на базальному середовищі з модифікацією його IAA, GA та ВА. Зокрема, найкращу ініціацію спостережено у випадку заготівлі рослинного матеріалу в січні-лютому.

Також встановлено, що найкращої ініціації росту адвентивних пагонів було досягнуто за культивування проксимальних зрізів листових пластин на живильному середовищі із додаванням 2,9 мкМ індол-3-оцтової кислоти у комбінації із 8,9 мкМ бензиладеніну або 2,3 мкМ тидіазурону (Vieitez, & San-Jose, 1996).

Зазначимо, що деякі дослідження присвячені перебігу окремих етапів мікроклонування бука лісового з погляду перспективи використання як соматичного ембріогенезу, так і органогенезу. Для цього використовували різноманітні варіанти експлантів (бруньки, сегменти листових пластин, насіння, каллус (Ahuja, 1984; Chalupa, 2004).

Відзначено значну актуальність досліджень з розмноження бука лісового мікроклонуванням (Lisovyj, & Guz, 2017). Експериментально доведено важливість ретельного вивчення впливу концентрації та експозиції обробітку хімічних агентів на деконтамінацію вихідних експлантів. Зокрема, підтверджено доцільність використання розчинів

AgNO₃ та NaClO для успішної хіміотерапії (Чорнобров, Олексійченко, 2014) Найдоцільніше для мікроклонування бука лісового використовувати апекси із ювенільних бруньок (Гузь та ін., 2009), а найкращим періодом їх заготівлі є місяць лютий (Barry, 1991). Доведено необхідність використання стимуляторів росту рослин ауксинової природи, зокрема НОК та ІОК для індукування процесів ініціації росту експлантів, а також підтверджено інгібуючу дію цитокініну на ці процеси (Vieitez et al., 1993; Vieitez, & San-Jose, 1996; Козлов, 2003). Варто зазначити, що для культивування експлантів бука лісового на усіх етапах мікроклонування є живильне середовище за рецептом MS.

Висновки (Conclusions). Бук лісовий становить значну господарську цінність як для лісового, так і садово-паркового господарства, що і спричиняє необхідність удосконалення виробництва садивного матеріалу із конкретними спадковими властивостями та ознаками.

Експериментально встановлено, що підвищений вміст у живильному середовищі цитокінінів призводить до інгібування росту експлантів на першому етапі культивування. Подібний ефект спричиняє вміст ауксинів понад 5 мг/л, а також повна відсутність речовин ауксинової природи. Оптимальні умови для ініціації експлантів бука лісового передбачають використання наступної модифікації живильного середовища: MS + 2,0 мг/л НОК + 0,5 мг/л ІМК + 0,5 мг/л К + 0,5 мг/л БАП, яка забезпечує успішність на рівні 98%. Потрібно окремо зазначити, що наявність у живильному середовищі речовин цитокінінового типу спричиняє повну відсутність ризогенезу у клонів. Найкращим варіантом, який забезпечує адвентивне коренування експлантів бука лісового, є використання наступного рецепту живильного середовища: 0,5 MS + 1,0 мг/л НОК + 1,0 мг/л ІМК. Зменшення кількості мінеральних солей у чотири рази, порівняно із базовим середовищем, також знижує здатність рослин-регенерантів до укорінення.

Найкращим субстратом для поступової адаптації клонів бука лісового є готові простерилізовані торфотаблетки, які забезпечили 94% життєздатних рослин на 30-ту добу культивування.

Потребує подальших ґрунтовних досліджень можливість мультиплікації клонів досліджуваного виду із встановленням коефіцієнту намноження.

Список літератури (References)

- Гожан, М.Я., Гузь, М.М., Гречаник, Р.М., Лісовий, М.М. (2014). Особливості реалізації етапу ініціації експлантів культиварів роду *Picea* A. Dietr. *in vitro*. Науковий вісник НЛТУ України, 24(7), 37-42. [Gozhan, M. Ya., Guz, M. M., Grechanyk, R. M., & Lisovyi, M. M. (2014). Peculiarities of implementation of the stage of initiation of explants

- of *Picea* cultivars A. Dietr. *in vitro*. *Scientific Bulletin of Ukrainian National Forestry University*, 24(7), 37-42. Retrieved from https://nv.nltu.edu.ua/Archive/2014/24_7/index.htm (in Ukrainian)
- Гречаник, Р.М., Базюк, О.Ф., Каганяк, Ю.Й., & Гриник, Г.Г. (2000). Мікроклональне розмноження бука лісового. *Науковий вісник УкрДЛТУ «Лісівницькі дослідження в Україні»*, 10(4), 137-142. [Grechanyk, R.M., Bazyuk, O.F., Kaganyak, Y.Y., & Hrynyk, H.G. (2000). Microclonal propagation of European beech. *Scientific Bulletin of Ukrainian State Forestry University "Forestry Research in Ukraine"*, 10(4), 137-142. Retrieved from https://nv.nltu.edu.ua/Archive/2000/10_4/index.htm] (in Ukrainian)
- Гузь, М.М., Гречаник, Р.М., & Лісовий, М.М. (2009). Стерилізація вихідних експлантів морфологічних форм бука лісового при розмноженні *in vitro*. *Науковий вісник НЛТУ України*, 19(10), 7-10. [Guz, M.M., Grechanyk, R.M., & Lisovyi, M.M. (2009). Sterilization of initial explants of morphological forms of European beech during *in vitro* propagation. *Scientific Bulletin of Ukrainian National Forestry University*, 19(10), 7-10. Retrieved from https://nv.nltu.edu.ua/Archive/2009/19_10/index.htm] (in Ukrainian)
- Державне агентство лісових ресурсів України (2024). [State Agency of Forest Resources of Ukraine (2024). Retrieved from <https://forest.gov.ua/>] (in Ukrainian)
- Козлов, В.Г. (2003). *Інтродукція видів і форм бука (Fagus L.) у Правобережному Лісостепу України та перспективи використання їх в культурі*. Умань: Уманське виробничо-поліграфічне видавництво. [Kozlov, V.G. (2003). *Introduction of species and forms of beech (Fagus L.) in the Right Bank Forest Steppe of Ukraine and prospects for their use in culture*. Uman: Uman production and printing publishing house] (in Ukrainian)
- Колесніченко, О.В., Слюсар, С.І., Якобчук, О.М. (2009). *Методичні рекомендації з розмноження деревних декоративних рослин Ботанічного саду НУБіП України*. Київ: НУБіП України. [Kolesnichenko, O.V., Slyusar, S.I., Yakobchuk, O.M. (2009). *Methodical recommendations for the propagation of woody ornamental plants of the Botanical Garden of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine*. Kyiv: National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine] (in Ukrainian)
- Кучерявий, В.П. (2005). *Озеленення населених місць*. Львів: Світ. [Kucheryavyy, V.P. (2005). *Landscaping of populated areas*. Lviv: Svit] (in Ukrainian)
- Лісовий, М.М., & Гузь, М.М. (2022). Бук лісовий: поліморфізм, розмноження та використання. Львів: ПП «Новий світ-2000». [Lisovyi, M.M., & Guz, M.M. (2022). *European beech: polymorphism, reproduction and use*. Lviv: PP "Novyy svit-2000"] (in Ukrainian)
- Лісовий, М.М. (2009). Поліморфність бука лісового. *Науковий вісник НЛТУ України*, 19(3), 33-37. [Lisovyi, M.M. (2009). Polymorphism of forest beech. *Scientific Bulletin of Ukrainian National Forestry University*, 19(3), 33-37. Retrieved from https://nv.nltu.edu.ua/Archive/2009/19_3/index.htm] (in Ukrainian)
- Лісовий, М.М. (2015). Особливості стерилізації та введення в культуру *in vitro* експлантів *Taxus baccata* L. *Науковий вісник НЛТУ України*, 25(5), 8-13. [Lisovyi, M.M. (2015). Peculiarities of sterilization and introduction into *in vitro* culture of explants of *Taxus baccata* L. *Scientific Bulletin of Ukrainian National Forestry University*, 25(5), 8-13. Retrieved from <https://nv.nltu.edu.ua/index.php/journal/article/view/979>] (in Ukrainian)
- Мусієнко, М.М., Панюта, О.О. (2005). *Біотехнологія рослин*. Київ: ВПЦ «Київський університет». [Musienko, M.M., Panyuta, O.O. (2005). *Biotechnology of plants*. Kyiv: VOC "Kyiv University"] (in Ukrainian)
- Чорнобров, О.Ю., Олексійченко, Н.О. (2014). Особливості введення в культуру *in vitro* рослин бука лісового (*Fagus sylvatica* L.). *Лісове і садово-паркове господарство*, 5, 23-28. [Chornobrov, O.Yu., & Oleksiichenko, N.O. (2014). Peculiarities of *in vitro* cultivation of beech (*Fagus sylvatica* L.) plants. *Forestry and horticulture*, 5, 23-28. Retrieved from http://nbuv.gov.ua/UJRN/licgoc_2014_5_12] (in Ukrainian)
- Ahuja, M.R. (1984). A commercially feasible micropropagation methods for aspen. *Silvae Genetica*, 33. Retrieved from https://digitalcommons.usu.edu/aspen_bib/4067/
- Badoni, A., & Chauhan, J.S. (2010). *In vitro* sterilization protocol for micropropagation of *Solanum tuberosum* cv. Kufri Himilini. *Academia Arena* 2(4). Retrieved from https://www.sciencepub.net/academia/aa0204/03_0977_Anoop_Badoni_aa0204_24_27.pdf
- Barry, L.N. (1991). *In vitro* Development of Mature *Fagus sylvatica* L. buds II. Seasonal Changes in The Response to Plant Growth Regulators. *Journal of Plant Physiology*, 138(2). Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0176161711802592>
- Chalupa, V. (2004). *In vitro* propagation of European larch (*Larix decidua* Mill.). *Journal of Forestry Science*, 50(12), 553-558. Retrieved from <https://www.agriculturejournals.cz/pdfs/jfs/2004/12/01.pdf>
- Hazubska-Przybył, T., Chmielarz, P., & Bojarczuk, K. (2015). *In vitro* responses of various explants of *Fagus sylvatica*. *Dendrobiology*, 73, 135-145. Retrieved from file:///C:/Users/User/Downloads/In_vitro_responses_of_various_expla.pdf
- Lisovyi, M., & Guz, M. (2017). Prospects of reproduction of genetic resources of the main forest-forming gymnosperm species of Ukraine by breeding *in vitro*. *Scientific Bulletin of Ukrainian National Forestry University*, 27(8), 70-75. <https://doi.org/10.15421/40270810>
- Singh, A. (2023). Assessing the Effectiveness of PPM™ in European Beech (*Fagus sylvatica*) Tissue Culture. *Plant Cell Technology*. Retrieved from <https://plantcelltechnology.com/blogs/blog/blogassessing-the-effectiveness-of-ppm-in-european-beech-fagus-sylvatica-tissue-culture>. Pet therapy. (n.d.).

- Vieitez, A.M., Ferro, E.M., & Ballester, A. (1993). Micropropagation of *Fagus sylvatica* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 29(4), 183-186. Retrieved from <https://www.jstor.org/stable/4293000>
- Vieitez, A.M., & San-Jose, M.C. (1996). Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 32, 140-147. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02822757>
- Yaroshchuk, R., Guz, M., Kovalenko, I., Zherdetska, S., & Lisovyj, M. (2020). Features of the in vitro propagation of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. *Modern Phytomorphology*, 14, 4-12. Retrieved from <https://www.phytomorphology.com/articles/features-of-the-in-vitro-propagation-of-pseudotsuga-menziesii-mirb-franco.pdf>

Results of propagation of *Fagus sylvatica* L. plants *in vitro*

M. Lisovyj¹, A. Ivaniuk²

A number of experimental studies have been conducted regarding the modification of the main stages of microcloning of *Fagus sylvatica* L., namely: features of decontamination of plant material, initiation of growth and rhizogenesis of explants and adaptation of clones to *in vivo* conditions. The influence of the concentration and duration of treatment with chemical sterilant agents on the yield of aseptic explants of the species under study is characterized. The methodology for conducting experimental studies on the reproduction of *Fagus sylvatica* L. *in vitro* culture is presented. It was found that it is most effective to use apical buds, harvested in the second half of February, as the starting plant material.

A stepwise scheme of chemotherapy for the initial explants was used, which ensured maximum decon-

tamination: a 15-second treatment with 96% C₂H₅OH (ethanol); a 24-hour treatment with running water with detergent; a 15-minute treatment with 30% NaClO solution (chlorine); a 10-second treatment with 70% C₂H₅OH; a 15-second treatment with 2% solution of H₂O₂ (hydrogen peroxide); a 10-minute treatment with 0.2% AgNO₃ (silver nitrate) with washing out with sterile distilled water after each reagent. Immediately before the passage, the explants were treated for 10-15 seconds with a 10% solution of the antibiotic "Cefazolin-KMR".

Studies were conducted on the effectiveness of three types of nutrient media, namely P-24, WPM and MS, which were modified using different ratios and concentrations of auxins: NAA (α -naphthylacetic acid), IAA (indomyl-3-acetic acid), IBA (β -indolylbutyric acid) and cytokinins: BAP (6-benzylaminopurine) and K (kinetin) in various concentrations and combinations for the initiation of explants. Rhizogenesis of the initiated explants was carried out only on the MS medium, which proved to be the most effective at the initiation stage, modified as follows: the concentration of the main mineral salts was reduced by 2-4 times, the amount of sucrose was reduced to 0.5-1.0%, and in some variants cytokinin was completely extracted. Adaptation of regenerant plants in four types of substrate was carried out: a mixture of soddy soil with coarse-grained sand and peat in a ratio of 1:1:1; coarse-grained sand; soddy soil with coarse-grained sand (1:1); peat tablets ("Jiffy-7 Forestry"). All the substrates were sterilized at a temperature of +90 °C for 1.5 hours and pre-treated with a 0.5% KMnO₄ solution.

It was found that the MS nutrient medium modified with stimulants 2.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l K + 0.5 mg/l BAP provides the highest number of initiated explants of *Fagus sylvatica* L. (96%). It was revealed that with an increased content of auxin or cytokinin or their absence in the nutrient medium, the death of the plant material of the species under study occurs. The study showed that the use of a 0.5 MS nutrient medium modified with 1.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l IBA provides a high percentage of adventitious root formation in the plants under study (96%). A 4-fold decrease in the concentration of mineral salts in the nutrient medium makes the ability of *Fagus sylvatica* L. clones to rhizogenesis virtually impossible. It was found that the adaptation of regenerant plants of the studied species is best carried out with the use of sterilized peat tablets, which ensures a success rate of 94% in 30 days of cultivation.

Key words: decontamination; initiation; rhizogenesis; adaptation; micropropagation, explant.

¹ Mykola Lisovyj – Doctor of Agricultural Sciences, Head of the Department of Forest Crops and Forest Breeding. Ukrainian National Forestry University, 103 General Chuprynka st., Lviv, 79057, Ukraine. Phone: +38-067-701-48-08. E-mail: m.lisovyj@nltu.edu.ua ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7624-1052>

² Andrii Ivaniuk – Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor at the Department of Forest Crops and Forest Breeding. Ukrainian National Forestry University, 103 General Chuprynka st., Lviv, 79057, Ukraine. Phone: +38-050-971-67-31. E-mail: ivanykandr@ukr.net ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1489-4733>