

Проблеми та перспективи збереження видів роду *Carlina* L. флори України в умовах *in situ*, *ex situ*, *in vitro*

Христина М. Колісник, Наталія Б. Кравець, Людмила Р. Грицак, Мар'яна З. Прокоп'як, Надія М. Дробик ✉

Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, м. Тернопіль, Україна, e-mail: kolisnyk@chem-bio.com.ua, kravets1979n@ukr.net, hrytsak1972@gmail.com, mosula@chem-bio.com.ua
ORCID ID 0000-0002-2872-5201, ORCID ID 0000-0002-2846-4208, ORCID ID 0000-0002-8927-8687

✉ drobyk.n@gmail.com

Реферат

Мета. Визначити проблеми збереження видів *Carlina acaulis* L., *C. cirsioides* Klok та *C. onopordifolia* Besser ex Szafer, Kulcz. et Pawl. *in situ* та *ex situ* та оптимізувати умови їх введення *in vitro*. **Методу.** Для отримання та вкорінення асептичних проростків насіння піддавали передпосівній обробці розчином гіберелової кислоти (ГК₃) або індолілмасляної кислоти (ІМК). Простерилізоване насіння висаджували на агаризоване живильне середовище Мурасіге-Скуга з половинним вмістом макро- і мікросолей (МС/2), без регуляторів росту. Для мікроклонального розмноження цих видів використовували розетки 2–3 місячних особин, які культивували на агаризованому середовищі МС/2, доповнене кінетином (Кін) (від 1–3 мг/л) та 0,1 мг/л 1-нафтилоцтової кислоти (НОК). **Результати.** З'ясовано, що при замочуванні насіння *C. acaulis*, *C. cirsioides* та *C. onopordifolia* у розчині ГК₃, відсоток формування коренів складав 33,3 %, 33,3 % та 22,2 % відповідно. Передпосівна обробка насіння перед стерилізацією у розчині ІМК концентрацією 1000 мг/л протягом 2–4 год була ефективніша. Відсоток формування коренів у *C. acaulis*, *C. cirsioides* і *C. onopordifolia* був у 2,4–4,5 рази вищий у порівнянні з обробкою розчином ГК₃. Середовище МС/2, доповнене НОК та Кін, найкраще забезпечувало формування мікроклонів. У рослин *C. cirsioides* цей показник за 6 місяців культивування становив 6,6–6,8 розеток на живець, у рослин *C. acaulis* та *C. onopordifolia* — 4,2–5,0 та 4,8–5,2

відповідно. Для підвищення відсотку вкорінення мікроклонів доцільним виявилось замочування їх у розчині ІМК концентрацією 1000 мг/л упродовж 1 хв. **Висновки.** Досягнуто підвищення відсотків укорінення рослин *C. cirsioides* і *C. onopordifolia* до 100 %, *C. acaulis* — до 80 %, а також уникнено травмування проростків і змін концентрації розчину ІМК, які можуть виникати під час стерилізації за високих температур, унаслідок використання нестерильного розчину цього регулятора росту. Підібрано умови для мікроклонального розмноження *C. acaulis*, *C. cirsioides* і *C. onopordifolia* та розроблено схеми вкорінення отриманих мікроклонів *in vitro*.

Ключові слова: *Carlina acaulis*, *Carlina cirsioides*, *Carlina onopordifolia*, проростання насіння, мікроклональне розмноження, вкорінення живців.

Problems and prospects of *in situ*, *ex situ*, *in vitro* conservation of *Carlina* L. species in Ukraine

Khrystyna M. Kolisnyk, Nataliia B. Kravets, Liudmyla R. Hrytsak, Mariana Z. Prokopiak, Nadiia M. Drobyk ✉

Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University, Ternopil, Ukraine,
e-mail: kolisnyk@chem-bio.com.ua, kravets1979n@ukr.net,
hrytsak1972@gmail.com, mosula@chem-bio.com.ua
ORCID ID 0000-0002-2872-5201, ORCID ID 0000-0002-2846-4208,
ORCID ID 0000-0002-8927-8687

✉ drobyk.n@gmail.com

Abstract

Aim. The aim was to investigate the problems of *in situ*, and *ex situ* conservation of *Carlina acaulis* L., *Carlina cirsioides* Klok, and *Carlina onopordifolia* Besser ex Szafer, Kulcz. et Pawl. and to optimize the conditions of their *in vitro* culture. **Methods.** The seeds of *C. acaulis*, *C. cirsioides*, and *C. onopordifolia* had a pre-sowing treatment with a gibberellic acid solution (GA₃) or indole-3-butyric acid solution (IBA) in order to obtain and root aseptic seedlings. The sterilized seeds were planted in sterile Petri dishes on semi-solid Murashige and Skoog (MS) medium with decreased macro- and microsalts concentrations (MS/2) without growth regulators. For microclonal propagation of these species, we used the rosettes of 2–3-month specimens and planted them on semi-solid Murashige and Skoog medium with decreased macro- and microsalts concentrations (MS/2) supplemented with kinetin (Kin) (1–3 mg/l) and 0.1 mg/l of 1-naphthaleneacetic acid (NAA). **Results.** After soaking the seeds in gibberellic acid solution, the percentage of root formation of *C. acaulis*, *C. cirsioides*, and *C. onopordifolia* was 33.3 %, 33.3 %, and 22.2 % respectively. The pre-sowing treatment of *Carlina* seeds before sterilization in IBA solution at a concentration of 1000 mg/l for 2–4 h had a positive effect. The percentages of root formation of *C. acaulis*, *C. cirsioides*, and *C. onordordifolia* were 2.4–4.5 times higher than that after treatment in GA₃ solution. MS/2 medium

supplemented with growth regulators (NAA and Kin) was the most efficient to provide the formation of microclones. For 6 months of cultivation the formation of *C. cirsioides* microclones was 6.6–6.8 rosettes per seedling, for *C. acaulis* and *C. onopordifolia* plants it was 4.2–5.0 and 4.8–5.2, respectively. Soaking of *Carlina* microclones in indole-3-butyric acid solution at a concentration of 1000 mg/l for 1 min increased the percentage of their rooting. **Conclusions.** We increased the percentage of rooting of *C. cirsioides* and *C. onopordifolia* plants to 100 % and the rooting of *C. acaulis* plants to 80 %. We avoided injuring the seedlings and change of IBA concentrations in the solution during sterilization at high temperatures by using the non-sterile solution of this growth regulator. The conditions for the microclonal propagation of *C. acaulis*, *C. cirsioides*, and *C. onopordifolia* have been chosen. We have worked out the schemes for the rooting of *in vitro* microclones.

Key words: *Carlina acaulis*, *Carlina cirsioides*, *Carlina onopordifolia*, seed germination, microclonal propagation, rooting of seedlings.

Вступ/Introduction. Охорона флористичного різноманіття — одна з найважливіших проблем сучасності. Інтенсивне винищення рослин призводить до фрагментації їхніх ареалів та елімінації популяцій. У зв'язку з цим велика кількість цінних видів рослин зі складною біологією розвитку, які консортивно пов'язані з іншими компонентами екосистем, безповоротно зникають. Зникнення цих видів може мати катастрофічні наслідки для біосфери, тому важливою запорукою у справі охорони раритетних видів є їх виявлення і запровадження системних механізмів збереження. До таких рослин належать види роду *Carlina* L., зокрема, відкасник татарниколистий — *Carlina onopordifolia* Besser ex Szafer, Kulcz. et Pawł та відкасник осотоподібний — *Carlina cirsioides* Клоков, які занесені до Червоної книги України і мають статус вразливих (Red data book..., 2009). Інший вид цього роду — *Carlina acaulis* L. — через постійне скорочення місцезростань належить до регіонально рідкісних рослин Львівської області (Ofitsiyni pereliku ..., 2012).

Основні сучасні стратегії збереження фіторізноманіття базуються на технологіях *in situ* та *ex situ*, які передбачають розширення мережі природо-заповідних територій та створення живих колекцій рідкісних видів рослин в умовах ботанічних садів. Перспективними є також технології *in vitro*. З огляду на це, мета дослідження полягала у вивченні проблеми збереження видів *C. acaulis*, *C. cirsioides* і *C. onopordifolia* *in situ*, *ex situ* та оптимізації умов їх введення *in vitro*.

Матеріали і методи/Materials and Methodology. Для аналізу проблеми збереження видів *C. onopordifolia*, *C. cirsioides* та *C. acaulis* в умовах *in situ* та *ex situ* використовували матеріали ряду наукових праць (Red data book..., 2009; Navrylenko & Slepchenko, 2010; Melnik et al., 2014; Melnyk et al., 2021; Skoroplias, 2014a,b; Yefremova et al., 2009). Для введення *in vitro* видів *C. onopordifolia*, *C. cirsioides* використовували насіння, зібране співробітниками лабораторії екології та біології Тернопільського національного педагогічного

університету імені Володимира Гнатюка у ботанічному заказнику «Голицький» поблизу с. Гутисько (Бережанський район, Тернопільська область) та насіння *C. acaulis*, зібране у с. Лазещина (Рахівський район, Закарпатська область).

Для отримання асептичних проростків досліджуваних видів, насіння піддавали передпосівній обробці розчином гіберелової кислоти (ГК₃) або розчином індоліл-3-масляної кислоти (ІМК), а відтак стерилізували протягом 35 хв у 15 %-му розчині H₂O₂. Простерилізоване насіння висаджували у стерильні чашки Петрі на агаризоване живильне середовище Мурасіге-Скуга (Murashige & Skoog, 1962) (МС) з половинним вмістом макро- і мікросолей (МС/2) без регуляторів росту. Пророщували насіння на світлі (2000–2500 лк) за температури +20–22°C та вологості 80 %.

Мікроклональне розмноження *C. acaulis*, *C. cirsioides* і *C. onopordifolia* проводили способом прямого морфогенезу, використовуючи розетки дво-тримісячних особин. Ефективність мікроклонального розмноження оцінювали через 1–6 місяців культивування, визначаючи середню кількість розеток з мікроклонами у розрахунку на одну розетку (живець). Під час підбору умов для мікроклонального розмноження використовували агаризоване середовище МС/2, яке доповнювали комбінаціями різних концентрацій кінетину (Кін) (від 1–3 мг/л) та 0,1 мг/л 1-нафтилоцтової кислоти (НОК). Отримані мікроклонуваннями розетки із 3–5 парами листків висаджували на живильне середовище МС/2 без регуляторів росту та підбирали умови для їхнього росту і вкорінення. Отримані результати опрацьовували статистично.

Результати та обговорення/Results and Discussion. Аналіз наукових праць показує, що для реліктового виду *C. onopordifolia* властивий диз'юнктивний ареал, який охоплює Волино-Подільську (Україна), Люблінську і Малопольську (Польща) височини. У межах Польщі виявлено п'ять локалітетів цього виду. Основна частина місцезнаходжень *C. onopordifolia* сконцентрована на заході Волино-Поділля, у межах Івано-Франківської, Львівської, Тернопільської та Рівненської областей. З 20 локалітетів, зафіксованих у цій частині ареалу, до наших днів збереглися 16, у тому числі 14 на Подільській височині та 2 на Волинській. Цей вид занесено не лише до Червоної книги України, а й Польщі, Європейського Червоного списку МСОП та додатку до 1 Бернської конвенції (Melnik et al., 2014). *C. cirsioides* — малопольсько-люблінсько-волиноподільсько-придніпровський, ендемічний, багаторічний полікарпічний вид, внесений не лише до Червоної книги України, а й Європейського червоного списку (Skoropljas, 2014a). Ареал виду охоплює частину Польщі та України, а саме Подільську височину та південну частину Полісся (Skoropljas, 2014a). Варто зазначити, що з-поміж дослідників відсутній єдиний погляд щодо видової самостійності виду *C. cirsioides* (Melnyk et al., 2021; Meusel & Kästner). Зокрема Мельник В. І. із співавторами за результатами порівняльних морфологічних, хорологічних та еколого-ценотичних аналізів пропонують розглядати цей вид у статусі підвиду *Carlina acaulis caulescens* (Melnyk et al., 2021). Тому, доцільно взяти під охорону всі популяції виду *C. acaulis* поблизу східної межі його поширення, які безпосередньо прилягають

до карпатської частини ареалу *C. acaulis* та до його рівнинних популяцій в Польщі (Melnyk et al., 2021).

Лучно-степові угруповання, до яких приурочені популяції *C. cirsioides*, є унікальними осередками не лише цього виду, а й інших рідкісних видів, занесених до Червоної книги України (2009 р.): *Adonis vernalis* L., *Astragalus onobrychis* L., *Crambe tataria* Sebeók, *Chamaecytisus blockianus* (Pawt.) Klask., *Chamaecytisus podolicus* (Blocki) Klaskova, *Trifolium rubens* L., *Thalictrum foetidum* L., *Stipa capillata* L., *Stipa majalis* Klovov, *Stipa pennata* L., *Stipa tirsia* Steven, *Iris hungarica* Waldst. et Kit. (Skoroplias, 2014a).

C. acaulis належить до європейських рівнинно-субальпійських видів. Він поширений у горах Центральної та Південної Європи, на Балканах, зокрема в Болгарії й державах колишньої Югославії, Середземномор'ї та на півдні Росії. У межах території України найчастіше трапляється в Карпатських горах (лісовий-альпійський пояс).

Рослини роду *Carlina* є продуцентами унікального комплексу біологічно активних речовин. Корінь відкашників містить дубильні й смолисті речовини, інулін (12–18 %), ефірну олію (1–2 %) та цукор, а листки — флавоноїди: 7-глікозид апігеніна, орієнтин, гомоорієнтин, вітексин, ізошафтозид (Petrina et al., 2013). Скорочення ареалів рідкісних видів роду *Carlina*, відбувається внаслідок антропогенного навантаження (витоптування за надмірного випасання худоби, скошування в період цвітіння, викопування та зривання надземної частини рослин для потреб народної медицини), а також кліматичних змін, що призводять до трансформації середовища та заростання локалітетів цих видів чагарниковою рослинністю (Skoroplias, 2014b).

Заліснення лучно-степових ценозів — це одна з основних причин регресу популяцій видів *Carlina*. Тому, охорона лучно-степових угруповань є необхідною умовою збереження генетичного та видового різноманіття цього роду. Популяції *C. onopordifolia* та *C. cirsioides* охороняються у Львівській обл. у ботанічній пам'ятці загальнодержавного значення «Лиса гора та гора Сипуха», у ботанічних пам'ятках природи місцевого значення «Біла гора», «Жулицька», «Стінка», «Макітра» (всі вони ввійшли до новоствореного Національного природного парку «Північне Поділля»); в Івано-Франківській обл. охороняється у ботанічній пам'ятці природи загальнодержавного значення «Чортова гора» та ботанічній пам'ятці природи місцевого значення «Великі Голди»; у Тернопільській обл. охороняється на території Голицького заказника загальнодержавного значення та ботанічного заказника «Гора Курилиха»; у Рівненській обл. охороняється в ботанічних заказниках «Смордва» і «Грабовщина» (Melnik et al., 2014). Аналіз наукових праць (Skoroplias, 2014b) показує, що природне самопідтримання видів у багатьох цих локалітетах є ускладненим; кількість особин прегенеративної групи зменшується через задерніння та сільватизацію. Це зумовлює потребу розробки технологій отримання садивного матеріалу, який можна використовувати для стабілізації чисельного складу популяцій та у репатріаційних проектах.

Дослідження показують, що незважаючи на складну біологію, види роду *Carlina* успішно інтродуковані в умови ботанічних садів Національного лісотехнічного університету України і Львівського національного університету імені Івана Франка (Yefremova et al., 2009) і дендропарку «Асканія-Нова» (Navrylenko & Slepchenko, 2010). Проте застосування технологій *ex situ* не позбавлене певних ризиків: через обмежену кількість вихідних генотипів рідкісних видів в ізольованих польових колекціях може проявлятися інбредна депресія (Aguilar et al., 2008; Belokurova, 2010); існує ризик спонтанної гібридизації з іншими видами або втрати матеріалу через інфікування патогенами (Maunder et al., 2004). Окрім того вирощування видів у еколого-географічних умовах, відмінних від природних місць їхнього росту, часто призводить до гальмування експресії одних генів та посилення ролі інших, а також до змін каріотипу. Тому, це відображається на генотипі, фенотипі та адаптивному потенціалі садивного матеріалу (Hrytsak & Drobyk, 2019).

Альтернативою відомим технологіям отримання садивного матеріалу *ex situ* можуть бути технології *in vitro*, які мають низку переваг над традиційним вирощуванням рослин (Belokurova, 2010). Незважаючи на специфічність фізико-хімічних умов культивування *in vitro*, на прикладі видів роду *Gentiana* L. (Hrytsak et al., 2018; Hrytsak & Drobyk, 2019) нами показано, що оптимізацією світлового, температурного режимів, режиму вологості та елементного складу жильного середовища можна цілеспрямовано впливати на морфогенез рослин *in vitro*, роботу їх фотосинтетичного апарату, параметри водного балансу тощо та отримувати садивний матеріал із високим адаптивним потенціалом до умов *in situ*.

У процесі розроблення технології культивування *in vitro* видів роду *Carlina* з'ясовано, що схожість насіння *C. acaulis*, *C. cirsioides* і *C. onopordifolia* після попередньої обробки розчином ГК₃ концентрацією 1000 мг/л протягом 16–18 год становила 71 %, 100 %, 100 % відповідно. При цьому відсоток формування коренів складав 33,3 %, 33,3 %, 22,2 % відповідно. У контрольному варіанті (без регуляторів росту) схожість насіння *C. cirsioides* та *C. onopordifolia* становила по 100 %, а у *C. acaulis* була в 1,2 рази меншою у порівнянні з обробленим розчином ГК₃ насінням. За таких умов вкорінення отриманих проростків *in vitro* відбувалося складно, коренева система формувалася лише в окремих випадках, натомість на висаджених пагонах утворювався калюс, що негативно впливало як на саме вкорінення, так і на подальший розвиток кореневої системи. Отримані нами результати узгоджуються з літературними даними про те, що проростки та регенеранти рослин роду *Carlina* характеризуються особливо низьким ризогенезом та адаптаційною здатністю через особливості будови кореня (Navrylenko & Slepchenko, 2010; Yefremova et al., 2009).

Враховуючи вищезазначене, наші подальші дослідження були спрямовані на підбір складу живильного середовища для росту та вкорінення асептичних проростків відкашників.

У науковій літературі представлені відомості про введення (Petrina et al., 2013) та особливості вкорінення рослин *C. acaulis* в умовах *in vitro* (Trejgell et al., 2009). Для формування коренів у рослин *C. acaulis* дослідники використовували живильні середовища МС та МС/2, доповнені такими регуляторами росту: 1-нафтилоцтовою кислотою (НОК), індолілоцтовою кислотою (ІОК) або ІМК у концентрації 0,01 мг/л або 0,1 мг/л. За таких умов відсоток формування коренів у розмножуваних *in vitro* рослин становив від 44,8 до 90 % (Trejgell et al., 2009). Використання нами цього способу вкорінення не дало позитивних результатів. Для підвищення ефективності вкорінення отриманих шляхом мікроклонування живців іншого виду роду *Carlina* — *Carlina diae* (Rech. f.) Meusel and A. Kástner, грецькими вченими також використовувалася ІМК (Grigoriadou et al., 2020).

У літературних джерелах повідомляється про двоетапний спосіб вирощування *C. onopordifolia* в умовах *in vitro* (Trejgell & Tretyn, 2011). При цьому стерильні проростки *C. onopordifolia* замочували у розчині ІМК у концентраціях 10 мг/л, 100 мг/л або 1000 мг/л протягом 60 с. При замочуванні проростків у різних концентраціях ІМК, відсоток формування коренів становив 70 %, 52,7 % і 84,8 % відповідно (Trejgell & Tretyn, 2011). Застосування нами такого підходу, суть якого полягала в отриманні асептичних проростків унаслідок пророщування в умовах *in vitro* простерилізованого насіння — на першому етапі, та замочуванні отриманих асептичних проростків протягом 60 с у розчині ІМК концентрацією 1000 мг/л — на другому етапі, сприяло підвищенню показників укорінення рослин *C. onopordifolia* і *C. cirsioides* до 76,2 % та 74,3 % відповідно.

Однак, як показали наші дослідження, такий підхід має певні вади, а саме: проростки під час такого замочування травмуються; для замочування потрібний стерильний розчин ІМК у достатній кількості та асептичні умови; цей стерильний розчин не може багаторазово використовуватися, оскільки швидко інфікується, а за повторної стерилізації при високих температурах ця термолабільна сполука розкладається. Процес укорінення рослин відкасників таким способом є досить трудомістким.

Щоб збільшити кількість коренів у асептичних проростків досліджуваних видів необхідно було підібрати умови, що сприяли б формуванню коренів та давали змогу уникнути травмування проростків. З цією метою насіння відкасників перед стерилізацією замочували у розчині ІМК. Оптимальним виявилось замочування у розчині концентрацією 1000 мг/л протягом 2–4 год; ефективність коренеутворення відкасників за таких умов зростала до 80–100 %, калюс біля основи пагону не утворювався (рис. 1).

Аналіз отриманих результатів показав, що відсоток формування коренів при замочуванні у розчині ІМК для *C. acaulis* та *C. cirsioides* був у 2,4 і 3 рази вищим у порівнянні з контролем та за оброблення розчином ГК₃. Для *C. onopordifolia* цей показник був у 3 рази вищим, ніж у контролі та у 4,5 рази, ніж при замочуванні у розчині ГК₃.



C. acaulis



C. onopordifolia



C. cirsioides

Рисунок 1. Проростання замоченого у розчині індоліл-3-масляної кислоти (ІМК) насіння та вкорінення *in vitro* проростків видів *Carlina*.

Figure 1. Germination of seeds soaked in indole-3-butyric acid (IBA) solution and *in vitro* rooting of *Carlina* species seedlings.

Отримані асептичні рослини відкасників вирощували у живильному середовищі МС без регуляторів росту (рис. 2).



C. acaulis



C. onopordifolia



C. cirsioides

Рисунок 2. Ріст рослин видів *Carlina* в агаризованому живильному середовищі МС без регуляторів росту.

Figure 2. Growth of *Carlina* species plants on semi-solid Murashige and Skoog (MS) medium without growth regulators.

У ході наших досліджень рослини відкасників (по 6–8 особин) були висаджені на середовища з додаванням 0,1 мг/л НОК та різною концентрацією Кін від 1 мг/л до 3 мг/л. У мікроживців через 20–30 діб утворювалися бічні пагони. При тривалішому культивуванні (упродовж 5–6 місяців) формування розеток відбувалося повільно, коренева система у рослин практично не формувалася і згодом вони починали жовтіти. З'ясовано, що збільшення у живильному середовищі МС/2 концентрації регулятора росту Кін з 1 мг/л до

3 мг/л неістотно впливало на формування кількості розеток в усіх досліджуваних видів.

На основі серії експериментів з'ясовано, що пересаджування відкашників з метою покращення їхнього вкорінення найкраще проводити за наведеною нижче схемою (рис. 3).

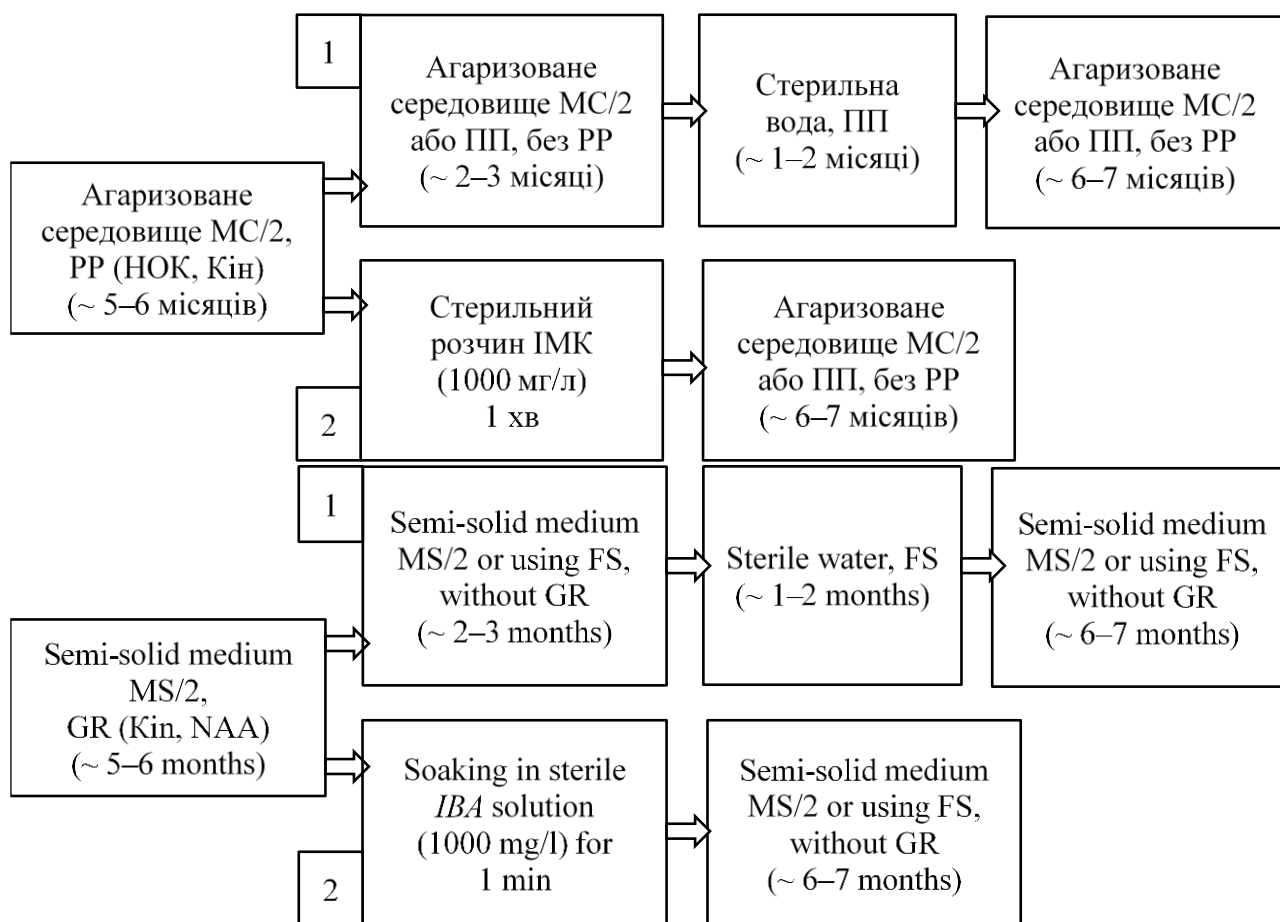


Рисунок 3. Схема оптимізації вкорінення мікроклонів видів *Carlina*:

MS/2 — живильне середовище Мурасіге-Скуга з половинним вмістом макро- і мікросолей, ПП — поролонові підкладки, РР — регулятори росту, НОК — 1-нафтилоцтової кислоти, Кін — кінетин, ІМК — індолілмасляна кислота, ~ — тривалість культивування.

Figure 3. Scheme of optimization of *Carlina* species microclones rooting: MS/2—Murashige and Skoog nutrient medium with decreased macro- and microsalts concentrations, FS—foam substrates, GR—growth regulators, Kin—kinetin, NAA—1-naphthaleneacetic acid, IBA—indole-3-butyric acid, ~ —duration of cultivation.

З'ясовано, що через один місяць культивування на живильному середовищі MS/2 з додаванням 0,1 мг/л НОК та 1 мг/л Кін кількість утворених мікроклонів досліджених видів складала 1,4–3,5 у розрахунку на висаджену розетку. Середня кількість мікроклонів на один живець через 6 місяців

культивування становила для рослин: *C. acaulis* — 4,2, *C. cirsioides* — 6,8, *C. onopordifolia* — 4,8 (рис. 4).

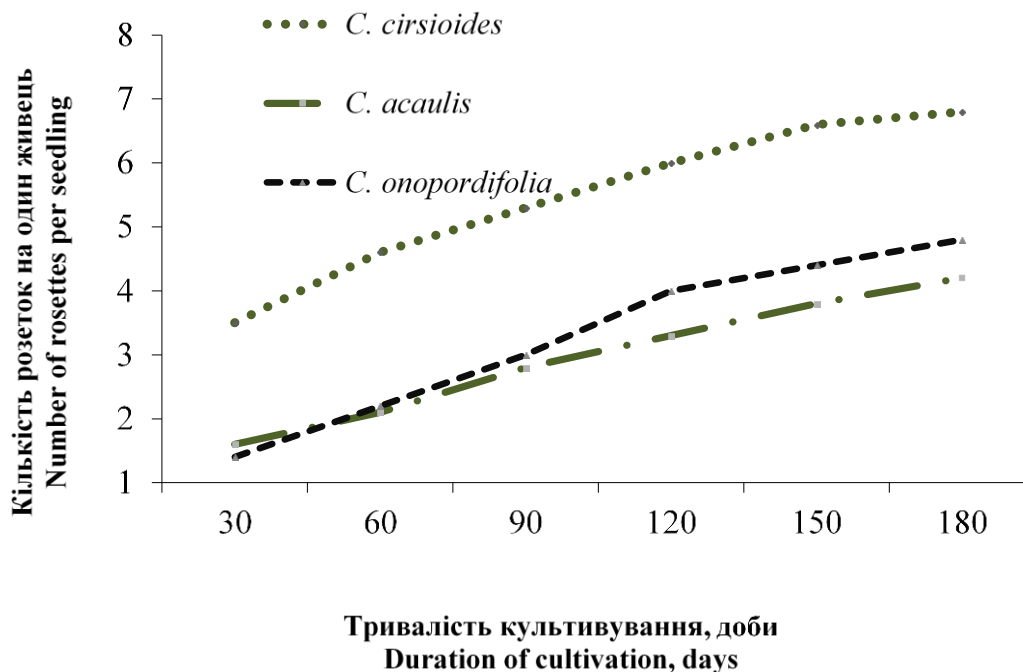


Рисунок 4. Мікроклональне розмноження видів *C. cirsioides*, *C. acaulis* та *C. onopordifolia* на живильному середовищі МС/2 з додаванням 0,1 мг/л НОК та 1 мг/л Кін.

Figure 4. Micropropagation of *C. cirsioides*, *C. acaulis* and *C. onopordifolia* on Murashige and Skoog medium with decreased macro- and microsals concentrations (MS/2) supplemented with 0.1 mg/l of 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and 1 mg/l kinetin (Kin).

На середовищі МС/2 з додаванням 0,1 мг/л НОК та 3 мг/л Кін середня кількість мікроклонів для досліджуваних видів за перший місяць культивування становила 2,5–2,6 у розрахунку на висаджену розетку. Через 6 місяців культивування ці показники були наступними: для *C. acaulis* — 5,0, для *C. cirsioides* — 6,6 для *C. onopordifolia* — 5,2 (рис. 5). Серед досліджених видів ефективність мікроклонування на цих середовищах була найвищою для рослин *C. cirsioides*.

Мікроклональне розмноження *in vitro* *C. acaulis* досліджували польські вчені (Trejgell et al., 2009). У ході експериментів з'ясовано, що на живильному середовищі МС з додаванням 0,1 мг/л НОК та 1 мг/л Кін через один місяць культивування кількість пагонів становила 2,6, ще через 5 місяців — 4,3 пагони на живець. На живильному середовищі МС з додаванням 0,1 мг/л НОК та 3 мг/л Кін кількість пагонів на кінець першого місяця культивування складала 3,6, через 5 субкультивувань — 3,9 пагона на живець (Trejgell et al., 2009).

Слід зазначити, що у нашому випадку у рослин, які культивували на живильному середовищі МС/2, доповненому 0,1 мг/л НОК і 1–3 мг/л Кін,

коренева система майже не формувалася. Розетки рослин, сформовані у такий спосіб, замочували у розчині ІМК та висаджували на агаризоване або рідке (на поролонові підкладки) живильне середовище МС/2 без регуляторів росту. Після того, як у рослин сформувалися невеликі корені, їх або продовжували культивувати на цьому ж живильному середовищі, або переносили у стерильну воду. Через 1 місяць вирощування у воді кількість сформованих коренів та їх довжина значно збільшувалися, однак за таких умов ріст рослин відбувався лише упродовж 1,5–2,5 місяців, після чого їх листки починали жовтіти. Рослини переносили на живильне середовище МС/2 без регуляторів росту, на якому продовжували подальше культивування.

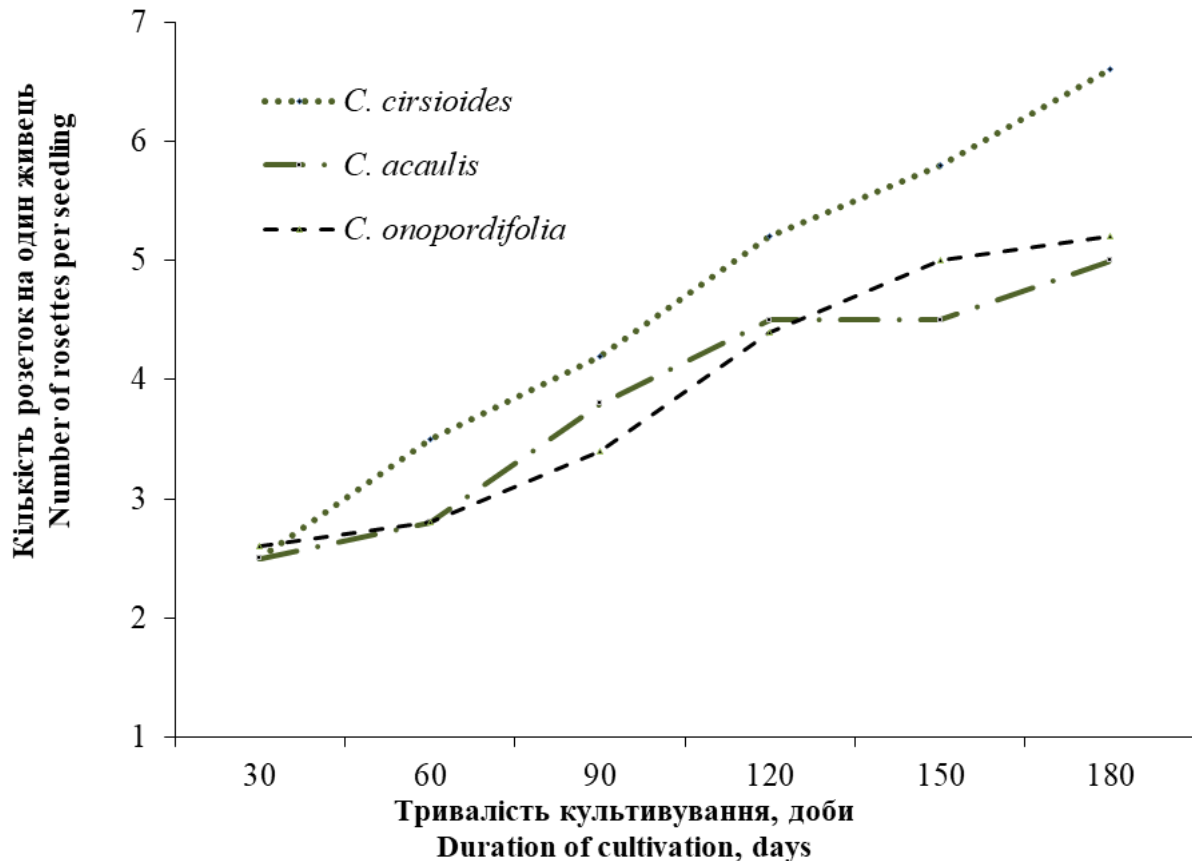


Рисунок 5. Мікроклональне розмноження видів *C. cirsioides*, *C. acaulis* та *C. onopordifolia* на живильному середовищі МС/2 з додаванням 0,1 мг/л НОК та 3 мг/л Кін.

Figure 5. Microclonal propagation of *C. cirsioides*, *C. acaulis* and *C. onopordifolia* on Murashige and Skoog medium with decreased macro- and microsalts concentrations (MS/2) supplemented with 0.1 mg/l of 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and 3 mg/l kinetin (Kin).

Отримані нами результати підтверджуються літературними даними. Зокрема, ефективність вкорінення рослин *C. onopordifolia* зростає і складає 52,7–84,8 % за умови їх замочування у розчині ІМК різних концентрацій (10 мг/л, 100 мг/л або 1000 мг/л) (Trejgell et al., 2009). Розроблені нами схеми

покращують вкорінення відкасників, однак, зважаючи на сповільнений ріст надземної частини рослин, потребують подальших досліджень.

Висновки/Conclusions. Проаналізовано проблеми збереження видів роду *Carlina* L. *in situ* та *ex situ*. Показано, що основними причинами регресу популяцій та фрагментації ареалу видів є сільватизація, задерніння ґрунту та антропогенне навантаження. У більшості локалітетів природне самопідтримання ускладнене. Вирішення цієї проблеми потребує розроблення технологій отримання садивного матеріалу для стабілізації чисельного складу популяцій, а також для реалізації репатріаційних проєктів. З'ясовано, що, незважаючи на складну біологію, у низці ботанічних садів створено живі колекції видів роду *Carlina*. Проте застосування технологій збереження *ex situ* не позбавлене певних ризиків. Застосування біотехнологічних методів дає змогу уникати інбредної депресії та небажаної спонтанної гібридизації з іншими видами.

У культурі *in vitro* внаслідок пророщування асептичного насіння отримано та досліджено особливості вкорінення рослин *Carlina acaulis* L., *Carlina cirsioides* Klok та *Carlina onopordifolia* Besser ex Szafer, Kulcz. et Pawl. З'ясовано, що насіння *C. cirsioides* та *C. onopordifolia* проростало без обробки регуляторами росту, його схожість становила 100 % у всіх протестованих варіантах дослідження. Найвищі показники схожості насіння *C. acaulis* — 83,3 % виявлено за його попередньої обробки розчином ІМК. З'ясовано, що для вкорінення рослин відкасників ефективним було живильне середовище МС/2, доповнене 0,2 мг/л ІОК, 0,5 мг/л ГК₃ та 0,1 мг/л НОК. Інтенсивність ризогенезу для *C. onopordifolia* становила 60 %, для *C. cirsioides* — 62,5 %, однак корені за 6–10 місяців культивування досягали лише до 8–10 мм. Ефективнішим виявилось замочування стерильних проростків у розчині ІМК концентрацією 1000 мг/л протягом 1 хв з наступним висаджуванням на агаризоване живильне середовище без регуляторів росту. Відсоток укорінення для *C. onopordifolia* та *C. cirsioides* за таких умов досягав 76,2 % і 74,3 % відповідно. Проте, проростки під час замочування травмувались та інфікувались внаслідок багаторазового використання розчину ІМК. Найефективнішим для формування кореневої системи у рослин *C. acaulis*, *C. cirsioides* та *C. onopordifolia* виявилось замочування насіння цих видів у розчині ІМК концентрацією 1000 мг/л протягом 2–4 год. При цьому вдалося підвищити показники вкорінення рослин *C. cirsioides* та *C. onopordifolia* до 100 %, а *C. acaulis* — до 80 %, а також уникнути травмування проростків і змін концентрації розчину ІМК, що можуть виникати під час стерилізації за високих температур, унаслідок використання нестерильного розчину цього регулятора росту.

Підібрано умови для мікроклонального розмноження рослин *C. acaulis*, *C. cirsioides* і *C. onopordifolia*. З'ясовано, що протестовані агаризовані живильні середовища МС/2, доповнені регуляторами росту НОК та Кін, найбільше забезпечували формування мікроклонів у рослин *C. cirsioides*, у яких цей показник за 6 місяців культивування становив 6,6–6,8 розеток на живець, а для

C. acaulis та *C. onopordifolia* — 4,2–5,0 та 4,8–5,2 відповідно. Розроблено схеми оптимізації вкорінення рослин відкасників *in vitro*.

Список посилань/References

Aguilar, R., Quesada, M., Ashworth, L., Herrerias-Diego, Y., & Lobo, J. (2008). Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology*. Vol. 17. Is. 24. P. 5177–5188. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2008.03971.x.

Belokurova, V. B. (2010). Methods of biotechnology in system of efforts aimed at plant biodiversity preservation. *Cytology and Genetics*. Vol. 44. No 3. P. 58–72. DOI: [10.3103/S0095452710030096](https://doi.org/10.3103/S0095452710030096). (in Ukrainian with English abstract).

Red data book of Ukraine. Vegetable Kingdom. (2009). [Ed.: Ya. P. Didukh]. Kyiv: Hlobalkonsaltnh. 900 p. (in Ukrainian).

Grigoriadou, K., Sarropoulou, V., Krigas, N., Maloupa, E., & Tsoktouridis, G. (2020). GIS-facilitated effective propagation protocols of the endangered local endemic of Crete *Carlina diae* (Rech. f.) Meusel and A. Kästner (Asteraceae): Serving *ex situ* conservation needs and its future sustainable utilization as an ornamental. *Plants*. Vol. 9(11). P. 1465 (1–17). DOI: 10.3390/plants9111465.

Havrylenko, N. O., & Slepchenko, L. O. (2010). Introduction of *Carlina onopordifolia* Bess. ex Szaf., Kulcz. et Pawl. in the dendrological park "Askania Nova". *News Biosphere Reserve "Askania Nova"*. Vol. 12. P. 100–106. (in Ukrainian).

Hrytsak, L., Herts, A., Nuzhyna, N., Cryk, M., Shevchenko, V., & Drobyk, N. (2018). The influence of light regime on the growth data and pigment composition of the plant *Gentiana lutea* cultured *in vitro*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 9. P. 258–266. DOI: 10.15421/021838.

Hrytsak, L. R., & Drobyk, N. M. (2019). The development of technology for conservation of highland species of *Gentiana* L. genus using the strategy of «Quasi» *in situ* and biotechnology methods. *Ekolohichni nauky*. No 25. P. 169–176. DOI: 10.32846/2306-9716-2019-2-25-28. (in Ukrainian).

Maunder, M., Hughes, C., Hawkins, J.A., & Culham, A. (2004). Hybridization in *ex situ* plant collections: conservation concerns, liabilities, and opportunities. *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild* [Eds.: Guerrant E.O.J., Havens K., Maunder M.]. Washington: Island Press. P. 325–364.

Melnik, V. I., Skoroplyas, I. O., & Vakoluk V. D. (2014). *Carlina onopordifolia* (Asteraceae) in eastern Podillya. *Ukrainian Botanical Journal*. Vol. 71 (3). P. 324–329. DOI: [10.15407/ukrbotj71.03.324](https://doi.org/10.15407/ukrbotj71.03.324). (in Ukrainian).

Melnyk, V. I., Kovalchuk, I. O., Dovhopola, L. I., & Shapran, Y. P. (2021). Geographical distribution, habitats and modern state of *Carlina cirsioides* (Asteraceae) populations. *Biosystems Diversity*. 29 (1). P. 17–27. DOI: 10.15421/012103.

Meusel, H., & Kästner, A. (1994). *Lebensgeschichte der Gold- and Silberdisteln. Monographie der Mediterran – Mitteleuropäischen Compositen –*

Gattung Carlina. Band II: Artenvielfalt und Stammesgeschichte der Gattung. Wien: Springer-Verlag. 692 s. DOI: [10.1007/978-3-7091-3069-8](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-3069-8). (in German).

Murashige, T. A., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. Vol. 15. No. 13. P. 473–497.

Ofitsiyeni pereliky rehional'no ridkisnykh roslyn administratyvnykh terytoriy Ukrainy (dovidkove vydannia) (2012). [Ukladachi: T. L. Andriienko, M. M. Perehrym]. Kyiv: Al'terpres. 148 s. (in Ukrainian)

Petrina, R. O., Konechna, R. T., Pobihushka, O. R., Matviykyv, S. O. (2013). Vvedennia v kul'turu *in vitro* vidkasnyka bezsteblevoho. *Bulletin of the National University "Lviv Polytechnic" series: "Chemistry, technology of substances and their applications"*. Vol. 761. P. 169–172. (in Ukrainian).

Skoroplias, I.O. (2014a). Heohrafichne poshyrennia *Carlina onopordifolia* Besser ex Szafer, Kulcz. et Pawl (*Asteraceae*) v Ukraini. *Biologichni doslidzhennia – 2014: Zbirnyk naukovykh prats' V Vseukrains'koi naukovy-praktychnoi konferentsii molodykh uchenykh i studentiv*. Zhytomyr: Vyd-vo ZhDU im. I. Franka. P. 430–434. (in Ukrainian).

Skoroplas, I. (2014b). Cash price botanical monument mountain nature. *News of Dnipropetrovsk State Agrarian and Economic University. Special issue of "Biological Sciences"*. No 1. P. 143–145. (in Ukrainian).

Trejgell, A., Bednarek, M., Tretyn, A. (2009). Micropropagation of *Carlina acaulis* L. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*. Vol. 51. No 1. P. 97–103.

Trejgell, A., Tretyn, A. (2011). Shoot multiplication and *in vitro* rooting of *Carlina onopordifolia* Basser. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*. Vol. 53. No 2. P. 68–72. DOI: [10.2478/v10182-011-0026-z](https://doi.org/10.2478/v10182-011-0026-z).

Yefremova, O. O., Skybitska, M. I., Meleshko, I. G., Han, T. V. (2009). Biological features of growth and development of *Carlina* L. species *ex situ*. *Forestry & Forest Melioration*. Iss. 115. P. 245–249. (in Ukrainian).