

КРАВЕЦЬ Н.Б. ✉, **МОСУЛА М.З.**, **ТУЛАЙДАН Н.В.**, **ЧЕТИРБОК М.Б.**, **ДРОБИК Н.М.**

Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка,

Україна, 46027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2, e-mail: kravec1979@mail.ru

✉kravec1979@mail.ru, (0352) 43-61-29

ОСОБЛИВОСТІ ВКОРІНЕННЯ *IN VITRO* РОСЛИН ДЕЯКИХ ВИДІВ РОДУ *CARLINA* L.

Відомо, що збереження біорізноманіття, охорона рослинного світу і його генофонду є особливо актуальними проблемами сьогодення. Нерегламентована діяльність людини, неконтрольований збір і масова заготівля можуть призвести до повного зникнення рідкісних рослин, саме тому вони знаходяться під охороною. Наукову і практичну цінність мають ендемічні та рідкісні види рослин, які є частиною безцінного генофонду природної флори. Особливу увагу

заслуговує флора Карпатського регіону, яка представлена як офіційними, так і неофіційними представниками родини *Asteraceae*. До таких рослин належать: відкасник безстебловий (*Carlina acaulis* L.), відкасник осотоподібний (*Carlina cirsioides* Klokov) та відкасник татарниколистий (*Carlina onopordifolia* Besser ex Szafer, Kulcz. et Pawl) (рис. 1). Ці рідкісні види мають обмежені ареали зростання та важко піддаються культивуванню.

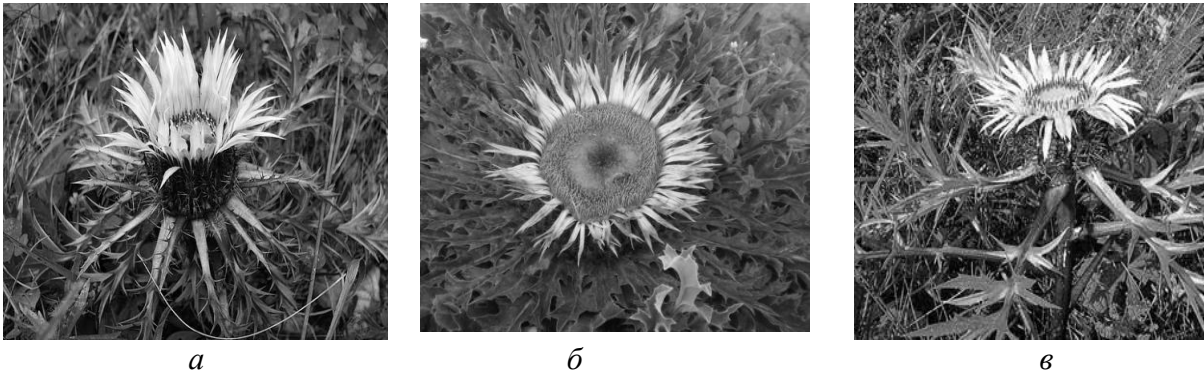


Рис. 1. Рослини роду *Carlina* L. у природі: *C. acaulis* (а), *C. onopordifolia* (б) та *C. cirsioides* (в).

C. acaulis – європейський рівнинно-субальпійський вид. Ростає у горах Середньої Європи (Піренеях, Юрі, Альпах, до висоти 2800 м н.р.м.), Апеннінах і на Балканах; трапляється від центральної Франції і центральної Іспанії на заході до Білорусії – на північному сході і Північної Греції – на південному сході. В Україні поширений у Карпатах (Бескиди, Горгани, Свидовець, Чорногора, Гринявські гори, Мармароський масив) до 1750 м н.р.м. та Прикарпатті; на Гологорох (Львівська і Хмельницька області) від лісового до альпійського поясу. Ростає на трав'янистих, сухих гірських схилах, на кам'янистих луках і галявинах, по чагарниках, узліссях біля доріг і на полянах [1, 2]. Вид запропонований до Червоної книги Українських Карпат та знаходиться під охороною у Польщі [3].

C. cirsioides – ендемік флори України, ареал якого охоплює Правобережний Лісостеп і

південь Українського Полісся [4]. Вид поширений у Середній Європі (Польщі, Україні – західній і Правобережній частинах) і охороняється у заказниках і пам'ятках природи Пн. Поділля («Лиса гора», гора Сипуха, гора Макітра та ін.) та Опілля («Голицький»), НПП («Галицький»). Вирощують рослини цього виду у ботанічному саду Львівського національного університету ім. Івана Франка [5].

Про поширення *C. cirsioides* у Волинському Поліссі раніше не згадувалося. Мельник В.І. та інші виявили його у 39-му кварталі Любомирського лісництва Рівненського лісгоспу поблизу залізничної станції Любомирськ, де регіонально рідкісний вид *C. cirsioides*, представлений лише двома особинами [6].

C. onopordifolia – реліктовий ендемічний вид, занесений до Червоних книг України, Польщі, колишнього Радянського Союзу, Європейського Червоного списку МСОП та додатку

1 Бернської конвенції [5, 7–9]. Диз'юнктивний ареал *C. onopordifolia* охоплює Подільську, Волинську (Україна), Люблінську, Малопольську (Польща) височини. У межах Польщі зафіксовано лише 5–7 локалітетів виду [4, 5, 8, 10, 11]. На карті географічного поширення виду в Червоній книзі України (2009 р.) позначено 12 місцезнаходжень, частина з яких, ймовірно, не збереглись до наших днів [5, 12]. Відбулось скорочення ареалу на його східній межі у Східному Поділлі, де зникли місцезнаходження, які наводив А. Андрицький для території сучасного Гайсинського району та околиць Брацлава та Ладжижина на Вінниччині [13]. За свідченням Б.В. Заверухи, *C. onopordifolia* зник з околиць міст Вишнівець та Кременець на Тернопільщині [14]. Отже, основна частина місцезнаходжень *C. onopordifolia* в Україні зосереджена на Подільській височині. *C. cirsioides* та *C. onopordifolia* знаходяться переважно або поза межами природоохоронних територій, або на територіях природоохоронних об'єктів з низьким статусом охорони, наприклад, заказників [15, 16]. *C. onopordifolia* охороняється на території національного природного парку «Галицький», в заказниках «Чортова гора», «Лиса гора і гора Сипуха», «Біла гора» та «Голицький». В останньому його чисельність одні автори оцінюють десятками особин, інші – у понад 2000, і відзначають, що частка генеративних рослин у ценопопуляціях не перевищує 8 % [17, 18]. Така відмінність в оцінці чисельності виду цими дослідниками, ймовірно, пояснюється обліком у першому випадку лише генеративних особин. Культивується *C. onopordifolia* у ботанічному саду Львівського національного університету імені Івана Франка та в Кременецькому обласному гуманітарно-педагогічному інституті ім. Тараса Шевченка, а також у дендропарку «Асканія-Нова» [15, 19, 20].

Враховуючи особливі умови та місцезростання відкашників, а також те, що види є реліктовими ендеміками, нами було застосовано метод культивування *in vitro*, який дозволяє регулювати ріст рослин шляхом оптимізації складу живильного середовища та умов вирощування, що відкриває перспективу цілорічного отримання рослинного матеріалу. Такий підхід дозволяє використовувати отриманий рослинний матеріал як можливе джерело біологічно активних сполук, а також є одним із початкових етапів проведення біотехнологічних робіт із збере-

ження та культивування зникаючих видів рослин.

Відомо, що процес коренеутворення і подальша адаптація до ґрунтових умов є найбільш складними етапами при культивуванні *in vitro* для будь-якого виду рослин. Тому метою наших досліджень було підібрати умови для ефективного вкорінення культивованих *in vitro* рослин відкашників.

Матеріали і методи

Для дослідження використовували насіння *C. onopordifolia*, *C. cirsioides*, зібране у жовтні 2013 р. 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 вересні 2015 р. 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 Н₂О₂.

Простерилізоване насіння висаджували у стерильні чашки Петрі на агаризоване живильне середовище Мурасіге, Скуга [21] (МС) з половиною вмістом макро- та мікросолей (МС/2) без регуляторів росту. Пророщували насіння на світлі (2000–2500 лк) за температури +20 – +22°C та вологості 80 %

Результати та обговорення

Відомо, що гіберелова кислота може впливати на проростання насіння. Цей регулятор росту може замінити температурний фактор проростання або ж мати стимулюючий ефект для проростання світлочувливих насінин різних видів. Вплив ГК₃ на біохімічні процеси є багатосторонній [22].

У ході досліджень встановлено, що схожість насіння *C. acaulis*, *C. cirsioides* та *C. onopordifolia* (липень 2016 р.) після попередньої обробки розчином ГК₃ концентрацією 1000 мг/л протягом 16–18 год становила 71 %, 100 %, 100 % відповідно. (табл.) При цьому відсоток формування коренів складав 33,3 %, 33,3 %, 22,2 % відповідно. Схожість насіння *C. acaulis*, яке не обробляли регуляторами росту (контроль), була у 1,2 рази меншою у порівнян-

ні з насінням, що піддавалось дії розчину ГК₃, а для *C. cirsioides* та *C. onopordifolia* цей показник становив по 100 %. 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 дальший розвиток кореневої системи. Отримані на-

ми 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 [19, 23].

Враховуючи вище сказане, наші подальші дослідження були спрямовані на підбір складу живильного середовища для росту та вкорінення асептичних проростків відкасників.

Таблиця. Вплив регуляторів росту на схожість насіння та вкорінення рослин деяких видів роду *Carlina* L.

Вид	Контроль, без обробки стимулятором		Обробка ГК ₃ , 1000 мг/л		Обробка ІМК, 1000 мг/л	
	% схожості насіння	% формування коренів	% схожості насіння	% формування коренів	% схожості насіння	% формування коренів
<i>C. acaulis</i>	57,0±3,4	33,3±2,2	71,0±6,2	33,3±2,3	83,3±6,8	80,0
<i>C. cirsioides</i>	100	33,3±2,3	100	33,3±3,1	85,7±7,4	100
<i>C. onopordifolia</i>	100	33,3±2,4	100	22,2±2,1	100	100

У науковій літературі представлені відомості про вивчення польськими вченими особливостей вкорінення рослин *C. acaulis* в умовах *in vitro* [2]. 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 рослин становив від 44,8 % до 90 % [2].

Використання нами цього способу вкорінення для видів *C. onopordifolia* та *C. cirsioides* не дало позитивних результатів. Максимальний відсоток вкорінення рослин цих видів за таких умов становив 33,3 % та 28,6 % відповідно. Також слід зазначити, що при довготривалому культивуванні рослин відкасників на живильних середовищах відбувалося поступове накопичення фенольних сполук та формування калюсу і, як наслідок, зменшувалась здатність рослин до укорінення. При доповненні живильного середовища МС/2, регуляторами росту 0,5 мг/л ГК₃, 0,2 мг/л ІОК та 0,1 мг/л НОК відсоток формування коренів *C. onopordifolia* і *C. cirsioides* зростав до 60 % та 62,5 % відповідно. Однак, корені росли повільно: через 10 місяців культивування рослин довжина коренів досягала лише 8–10 мм [24].

З літературних джерел відомо про двоетапний спосіб вирощування *C. onopordifolia* в умовах *in vitro* [25]. При цьому стерильні проростки *C. onopordifolia* замочували у розчині ІМК концентраціями 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 [25]. Застосування нами такого підходу, суть якого полягала в отриманні асептичних проростків шляхом 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, дозволило підвищити показники вкорінення рослин *C. onopordifolia* та *C. cirsioides* до 76,2 % і 74,3 % відповідно.

Однак, як показали наші дослідження, цей підхід має певні недоліки, 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 та за повторної стерилізації при високих температурах як термолабільна сполука розкладається; процес вкорінення рослин відкасників таким способом є трудомістким.

Щоб збільшити кількість коренів у асептичних проростків досліджуваних видів необхідно було підібрати умови, які б сприяли формуванню коренів та дозволяли 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 зростає до 80–100 %, калюс біля основи пагона не утворювався (табл., рис. 2).

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.

Отримані асептичні рослини відкасників висаджували у живильне середовище МС без регуляторів росту (рис. 3).

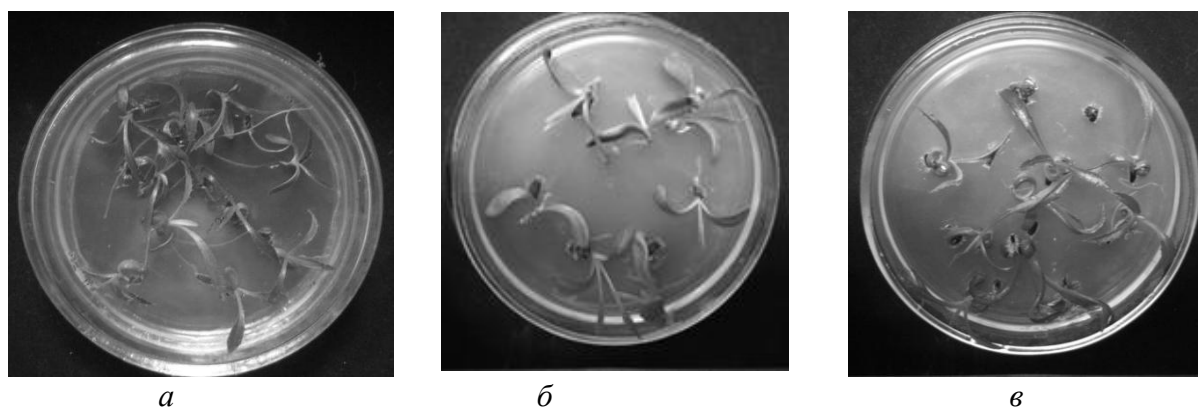


Рис. 2. Проростання замоченого у розчині ІМК насіння та вкорінення проростків *C. acaulis* (а), *C. onopordifolia* (б) та *C. cirsioides* (в) *in vitro*.

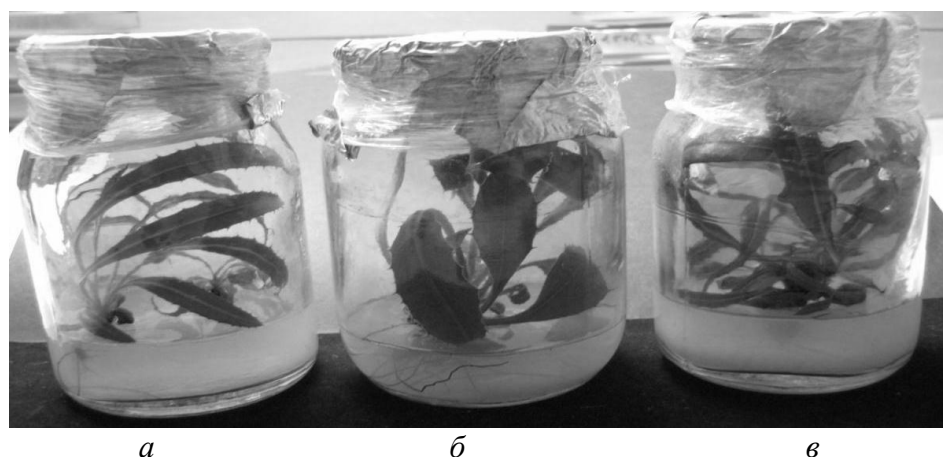


Рис. 3. Ріст рослин *C. cirsioides* (а), *C. onopordifolia* (б) та *C. acaulis* (в) у агаризованому живильному середовищі МС без регуляторів росту.

Висновки

Встановлено особливості вкорінення *in vitro* рослин видів роду *Carlina* L.: *C. cirsioides*, *C. onopordifolia* та *C. acaulis*. 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. Поряд із цим, ефективнішим виявився процес замочування стерильних проростків у розчині ІМК концентрацією 1000 мг/л протягом 1 хв. з наступним висаджуванням на агаризоване живильне середовище без регуляторів росту. Відсоток вкорінення для *C. onopordifolia* та *C. cirsioides* за таких умов досягав 76,2 % і 74,3 % відповідно. Проте, проростки під час замочування травмувались та інфікувались вна-

слідок 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 нам вдалося підвищити відсоток вкорінення рослин *C. cirsioides* та *C. onopordifolia* до 100 %, *C. acaulis* – до 80 %, а також уникнути травмування проростків і змін концентрації розчину ІМК, що можуть виникати під час стерилізації за високих температур, шляхом використання нестерильного розчину цього регулятора росту.

Література

1. Єфремова О.О., Скибіцька М.І., Мелешко І.Г. та ін. Біологічні особливості росту й розвитку видів роду *Carlina* L. *ex situ* // Лісництво і агролісомеліорація. – Харків: Укр. НДІГА, 2009. – Вип. 115. – С. 245–249.
2. Trejgell A., Bednarek M., Tretyn A. Micropropagation of *Carlina acaulis* L. // Acta biologica Cracovienska. – 2009. – V. 51, № 1. – P. 97–103.
3. Нестерук Ю. Рослинний світ Українських Карпат: Чорногора // Екологічні мандрівки. – Львів: БаК, 2003. – 520 с.
4. Клоков М.В. Рід Відкасинок – *Carlina* L. // Флора УРСР. – К.: вид-во АН Української РСР, 1962. – Т. 2. – С. 419–431.
5. Червона книга України. Рослинний світ / [відп. за ред. Я.П. Дідух.]. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 912 с.
6. Мельник В.І., Баранський О.Р., Володимирець В.О., Рак О.О., Шиндер О.І. Нові відомості про поширення рідкісних видів Волинського Полісся // Ukr. Botan. Journ. – 2010. – V. 67, № 1. – P. 62–70.
7. Красная книга СССР. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных и растений / [под ред. А.М. Бородин]. – М.: Лесная пром-сть, 1984. – Т. 2. – 480 с.
8. Polska Czerwona Ksiega roslin / [Ed. By K. Zarzycki, R. Kazmierczakowa]. – Krakow, 1993. – 310 p.
9. Bilz M., Kell S.P., Maxted N., Landsdown R.V. European Red List of Vascular Plants. – Luxemburg: Publications Office of European Union, 2011. – 230 p.
10. Вініченко Т.С. Рослини України під охороною Бернської конвенції. – К.: Хімджест, 2006. – 160 с.
11. Собко В.Г. Фітоаритети України у Світовому Червоному списку. – К.: Український фітосоціологічний центр, 2005. – 156 с.
12. Скоропляс І.О. Географічне поширення *Carlina onopordifolia* Besser ex Szafer, Kulcz. et Pawl (Asteraceae) в Україні // Збірник наукових праць V Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених і студентів «Біологічні дослідження – 2014». – Житомир: Вид-во ЖДУ ім. І. Франка, 2014. – С. 430–434.
13. Андржейовский А. Продолжение исчисления растений Подольской губернии и смежных с нею мест // Университетские известия. – К., 1862. – № 7. – С. 94–142.
14. Заверуха Б.В. Заповідні відкасинок // Рідна природа. – 1989. – № 2. – С. 16.
15. Дідух Я., Коротченко І. Ксеротермна рослинність Північно-Західного Поділля // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2003. – Вип. 34. – С. 82–91.
16. Кузьмішина І.І. Созологічний аналіз раритетної фракції флори Волинської височини // Наук. вісн. Волинського нац. ун-ту ім. Лесі Українки. – 2008. – № 3. – С. 216–223.
17. Синиця Г.Б., Черняк В.М. Рідкісні та зникаючі види флори Тернопільщини, їх охорона та введення в культуру // Бюл. Держ. Нікітського бот. саду. – 1999. – Вип. 79. – С. 153–159.
18. Шанайда Н.Д. Деякі особливості біології *Carlina onopordifolia* Bess. ex Szaf., Kulcz. et Pawl. в умовах Голицького ботаніко-ентомологічного заказника // Мат. Всеукр. наук. конф-ї «Інтродукція і акліматизація рослин на Волино-Поділлі», Тернопіль, 16–18 червня 1999 р. – Тернопіль: Вид-во Тернопільського держ. пед. ун-ту імені Володимира Гнатюка, 1999. – С. 151–156.
19. Гавриленко Н.О., Слєпченко Л.О. Інтродукція відкасинок татарникилистого *Carlina onopordifolia* Bess. ex Szaf., Kulcz. et Pawl в дендропарку «Асканія-Нова» // Вісті Біосферного заповідника «Асканія-Нова». – 2010. – Т. 12. – С. 100–106.
20. Іванюк А.С. Історія інтродукції рідкісних червонокнижних рослин в Тернопільській області [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.nbuv.gov.ua/Portal/Chem_Biol/pbte/2008_13_1/.../vaniuk.pdf.
21. Murashige T.A., Skoog F. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, N 13. – P. 473–497.
22. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Л.: Наука, 1985. – 347 с.
23. Єфремова О.О., Скибіцька М.І., Мелешко І.Г., Ган Т.В. Біологічні особливості росту й розвитку видів роду *Carlina* L. *ex situ* // Лісництво і Агролісомеліорація. – Харків: УкрНДІЛГА, 2009. – Вип. 115. – С. 245 с.

24. Кравець Н., Дробик Н. Введення в культуру *in vitro* *Carlina onopordifolia* Bess. ex Szaf., Kulcz. et Pawl та *Carlina cirsioides* Klok. // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка «Інтродукція та збереження рослинного різноманіття». – 2016. – Вип. 1 (34). – С. 61–65.
25. Trejgell A., Tretyn A. Shoot multiplication and *in vitro* rooting of *Carlina onopordifolia* Basser // Acta Biol. Cracov. – 2011. – V. 53, N 2. – P. 68–72.

KRAVETS N.B., MOSULA M.Z., TUL Aidan N.V, CHETYRBOK M.B., DROBYK N.M.

Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University,
Ukraine, 46027, Ternopil, M. Kryvonosa str., 2, e-mail: kravec1979@mail.ru

PECULIARITIES OF *IN VITRO* ROOTING OF SOME SPECIES OF *CARLINA* L. GENUS

Aim. The aim of the study was to choose conditions for rooting improvement of *in vitro* cultivated plants of some species of *Carlina* L. genus. **Methods.** For receiving and rooting of aseptic sprouts, seeds of *Carlina acaulis* L., *Carlina cirsioides* Klok and *Carlina onopordifolia* Besser ex Szafer, Kulcz. et Pawl were subjected to presowing treatment with gibberellic acid solution (GA₃) or indolebutyric acid solution (IBA). Sterilized seeds were planted in sterile Petri dishes on semi-solid Murashige, Skoog nutrient medium with half-strength concentrations of macro- and microsalts without growth regulators. **Results.** It was found that with the seed soaking of *C. acaulis*, *C. cirsioides* and *C. onopordifolia* in GA₃ solution the percentage of root formation amounted to 33.3 %, 33.3 % and 22.2 % respectively. Presowing treatment of carlina seeds in IBA solution with concentration of 1000 mg for 2–4 hours before sterilization gave a positive effect: the percentage of root formation for *C. acaulis*, *C. cirsioides* and *C. onopordifolia* was 2.4–4.5 times higher compared to the treatment with GA₃ solution. **Conclusions.** To form the root system of carlina plants it is effective to soak the seeds in the solution of IBA. Thus we were able to increase the percentage of rooting of *C. cirsioides* and *C. onopordifolia* plants to 100 %, *C. acaulis* plants – up to 80 % and avoid sprouts' injury and changes in the concentrations of the IBA, which may occur during sterilization at high temperatures by using non-sterile solution of growth regulators.

Keywords: *Carlina acaulis* L., *Carlina cirsioides* Klok, *Carlina onopordifolia* Besser ex Szafer, Kulcz. et Pawl, *in vitro*, sprouts rooting.