

РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ЗБЕРЕЖЕННЯ ВИСОКОГІРНИХ ВИДІВ РОДУ *GENTIANA* L. ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ СТРАТЕГІЇ «QUASI» *IN SITU* ТА МЕТОДІВ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Грицак Л.Р., Дробик Н.М.

Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка
вул. М. Кривоноса, 2, 47028, м. Тернопіль
hrytsak1972@gmail.com, drobyk.n@gmail.com

Морфо-анатомічні та фізіологічні особливості високогірних видів значно ускладнюють отримання їх життєздатного посадкового матеріалу в умовах *ex situ*. Запропоновано новий підхід, який передбачає проведення синекологічних, популяційних досліджень, а також детальне вивчення залежності структурно-функціонального стану рослин *Gentiana lutea* L., *Gentiana punctata* L., *Gentiana acaulis* L. від природних умов росту та умов культивування *in vitro*. За результатами досліджень розроблено багатоступінчасту технологію, яка забезпечує високий ступінь мультиплікації пагонів в умовах *in vitro* без зміни їх геному, підвищує адаптаційний потенціал рослин *in vitro* до умов *ex vitro* та *in situ*. Отримані рослини *in vitro* можуть бути використані як альтернативне джерело посадкового матеріалу для реінтродукції знищених популяцій цих видів. *Ключові слова:* *Gentiana* L., збереження, технологія, *in vitro*, *ex vitro*, *in situ*.

Разработка технологии сохранения высокогорных видов рода *Gentiana* L. с использованием стратегии «quasi» *in situ* и методов биотехнологии. Грицак Л.Р., Дробик Н.М. Морфо-анатомические и физиологические особенности высокогорных видов значительно усложняют процесс получения их жизнеспособного посадочного материала в условиях *ex situ*. Предложен новый подход, предусматривающий как проведение синэкологических, популяционных исследований, так и детальное изучение зависимости структурно-функционального состояния растений *Gentiana lutea* L., *Gentiana punctata* L., *Gentiana acaulis* L. от условий их роста в природе и культуре *in vitro*. Исходя из результатов исследований, разработана многоступенчатая технология, позволяющая увеличить показатели мультиплицирования стеблей в условия *in vitro* без геномных изменений, а также уровень адаптационного потенциала растений *in vitro* к условиям *ex vitro* и *in situ*. Полученные растения *in vitro* могут быть использованы как альтернативный источник посадочного материала для реинтродукции уничтоженных популяций этих видов. *Ключевые слова:* *Gentiana* L., сохранение, технология, *in vitro*, *ex vitro*, *in situ*.

The development of technology for conservation of highland species of *Gentiana* L. genus using the strategy of «quasi» *in situ* and biotechnology methods. Hrytsak L.R., Drobyk N.M. Morpho-anatomical and physiological features of highland species greatly complicate obtaining their viable planting material in *ex situ* conditions. A new approach, which involves conducting synecological, population surveys, as well as a detailed study of the dependence of the structural and functional plant states of *Gentiana lutea* L., *Gentiana punctata* L., *Gentiana acaulis* L. on natural growth conditions and *in vitro* cultivation conditions is proposed. Based on the results of the research, a multi-stage technology that provides a high degree of shoot multiplication *in vitro* without altering their genome, increases the adaptive potential of plants *in vitro* to *ex vitro* and *in situ* conditions has been developed. The obtaining plants *in vitro* can be used as an alternative source of planting material for the reintroduction of destroyed populations of these species. *Key words:* *Gentiana* L., preservation, technology, *in vitro*, *ex vitro*, *in situ*.

Постановка проблеми. Застосування традиційних методів збереження з використанням технологій *in situ* та *ex situ* до високогірних рідкісних видів, що входять до складу трав'янистих формацій, не завжди дозволяє отримати очікувані позитивні результати. Це пов'язано з низкою причин: вузьким діапазоном толерантності таких таксонів до кліматичних факторів, що призводить до елімінації їх популяцій зі складу угруповань в умовах глобального потепління; детермінуванням резерватогенних сукцесій на природоохоронних територіях, у ході яких відбувається заміщення трав'янистих угруповань на чагарникові та лісові формації; значною фрагментарністю їхніх ареалів, зумовленою

демутаціями автохтонних угруповань (внаслідок антропогенного втручання) та появою негативних видів-сусідів; ущільненням поверхневого шару ґрунту та зміною вектору ґрунтоутворних процесів у результаті понаднормових рекреаційного та паспорального навантажень; комплексом морфо-анатомічних і фізіологічних особливостей цих таксонів, сформованих в екстремальних умовах існування, що значно ускладнює отримання їх життєздатного посадкового матеріалу в колекціях *ex situ*, розташованих на нижчих гіпсометричних рівнях тощо. Усе це в комплексі призводить до значної втрати генофонду рідкісних високогірних рослин навіть у межах природоохоронних територій.

Актуальність досліджень. Тому необхідним є пошук нових підходів, інструментальна база яких доповнювала би традиційні форми охорони високогірного фіторізноманіття та сприяла більш ефективному його збереженню в умовах тотальної трансформації природних місць росту видів.

Зв'язок авторського доробку із важливими науковими та практичними завданнями. Представлена наукова робота є результатом багаторічних досліджень авторів, спрямованих на розробку підходів до відновлення знижених та стабілізації параметрів порушених популяцій високогірних рідкісних видів роду Тирлич (*Gentiana* L.) флори України.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. До недавнього часу основні стратегії збереження біорізноманіття, в тому числі й високогірних районів, базувалися на запровадженні режиму заповідання (*in situ*) у місцях росту рідкісних видів і створення їх живих колекцій в умовах ботанічних садів (*ex situ*). Низка вчених дотримується різних поглядів щодо результативності активних або пасивних форм заповідання [4; 6; 11]. Однак відомо, що запровадження режиму «пасивної охорони» до антропогенно трансформованих гірських ценозів Українських Карпат ініціює розвиток резерватогенних сукцесій. У поєднанні з кліматичними змінами вони вже через 30–40 років зумовлюють відновлення лісових, чагарникових і чагарничкових угруповань на місці лучних субальпійських ценозів [5; 6]. На цьому етапі демуційних сукцесій проективно покриття *Duschekia viridis* (Chaix) DC, *Juniperus communis* L. subsp. *nana* (Suter) Čelak, *Pinus mugo* Turra у субальпійському і нижній частині альпійського поясу збільшується з 3% до 30%, що й зумовлює значне зменшення чисельності популяцій рідкісних лучних видів [5; 7, с. 200; 14, с. 11]. Тому вчені схиляються до необхідності застосування на цих територіях активного (або регульованого) природоохоронного режиму, який би призупиняв хід таких сукцесій [6; 20]. Крім того, деякі дослідники притримуються поглядів, що технології *in situ* ефективними є лише у випадку видів, які представлені декількома багаточисельними популяціями [10]. Зберегти генофонд видів за значної фрагментації їх ареалу та низької чисельності особин у популяціях складно, оскільки це спричинює генетичну ерозію [21].

Метод *ex situ* належить до другого напрямку збереження генофонду рідкісних і зникаючих видів. Він передбачає вилучення видів (у вигляді насіння, цибулин або сформованих рослин) із природних місць росту та збереження їх у «живих» колекціях ботанічних садів, банків насіння, пилку, ДНК та культури *in vitro*. Технології *ex situ* дозволяють зберігати відібрані зразки впродовж тривалого часу, краще вивчити біологію видів та їх адаптивні реакції у відповідь на зміну чинників довкілля. Проте дослідники часто працюють з обмеженою кількістю

вихідних генотипів рідкісних видів, що може спричинювати в ізолюваних польових колекціях інбридну депресію та, відповідно, гальмувати еволюційні процеси [2; 10; 15]. Крім того, існує ризик спонтанної гібридизації з іншими видами або втрати матеріалу через інфікування патогенами [23]. Тому стратегія *ex vitro* потребує розроблення складних технологій, які б необмежено тривалий час забезпечували підтримання життєздатних батьківських ліній.

Пошуки уніфікованих технологій збереження генетичного різноманіття призвели до появи нових інтегрованих стратегій, до яких належить *inter-situ* [16]. Автори цієї стратегії пропонують за результатами аналізу палеоекологічних даних щодо місць та умов росту в минулому певних рідкісних або зникаючих видів рослин з'ясувати їх первинні ареали і на підставі цього здійснити реінтродукцію тих популяцій, що зазнали антропогенних навантажень [16]. При цьому пропонується відновлювати популяції навіть на земельних ділянках низької економічної цінності, наприклад, на закинутих сільськогосподарських угіддях. Очікується, що реінтродукований видовий комплекс із часом стане природною екосистемою, подібною до тої, що існувала в цьому регіоні у минулому. Необхідно зазначити, що ця стратегія не позбавлена певних недоліків. Зокрема, для відновлення популяцій автори пропонували використовувати не матеріал колекцій *ex situ*, а вилучати частину рослин із природних оселищ, що знаходяться неподалік. Однак це може спричинити інбридизацію депресію в реінтродукованих популяціях [27]. Крім того, у випадку видів, що мають низьку насінневу продуктивність або представлені малочисельними популяціями, така техніка реінтродукції може призвести до значного зниження життєвості природних популяцій-донорів [25]. Водночас є повідомлення, що пересажені рослини, особливо вегетативного походження, в популяціях-реципієнтах швидко старіють і навіть за інтенсивного догляду через 2–5 років гинуть [1, с. 64].

Виділення невіршених раніше частин загальної проблеми, котрим присвячується означена стаття. З урахуванням вищезазначених проблем, на даний час колекції *ex situ* розглядають як основне джерело посадкового матеріалу для проведення робіт з реінтродукції видів [12; 17; 19]. Однак установлено, що вирощування видів у еколого-географічних умовах, відмінних від природних місць їх росту, часто призводить до гальмування експресії одних генів та посилення ролі інших, а також до змін каріотипу. Це відображається на їхньому генотипі, фенотипі та адаптивному потенціалі [1, с. 97–98]. Тому існує ризик втрати рослин *ex situ* в разі перенесення їх у природні місця росту або ж, навпаки, використання такого реінтродукційного матеріалу може призвести до низки проблем: гібридизації з близькородинними видами у природному середовищі; популяційного вибуху та витіснення інших видів зі складу природ-

них угруповань; інвазії рослин за межі природного ареалу таксону тощо. Крім того, аналіз літературних джерел показав [9], що високогірні види досліджуваного нами роду *Gentiana* складно ввести в культуру *ex situ* за умови розташування плантацій на нижчих гіпсометричних рівнях. Створення живих колекцій *ex situ* цих таксонів та інших високогірних видів у місцях їх росту потребує значних технічних і матеріальних затрат, що не завжди є рентабельним.

Методологічне або загальнонаукове значення.

Тому мета нашої роботи полягає у розробці нового підходу до отримання посадкового матеріалу високогірних видів роду *Gentiana* (з використанням методів біотехнології) для реінтродукції знищених та стабілізації чисельного складу їх порушених популяцій, який би став альтернативним джерелом живих колекцій *ex situ*.

Концептуальною базою є положення стратегії «квазі» *in situ*, запропоновані Воліс і Блетчер (2010) та доповнені нами.

Методологічною основою нашого підходу є поєднання індуктивно-дедуктивного методу із системним. Це дозволило встановити не лише численні причинно-наслідкові зв'язки між інтенсивністю впливу певних факторів довкілля та структурно-функціональним станом окремих представників і популяцій видів *Gentiana lutea* L., *Gentiana acaulis* L., *Gentiana punctata* L. загалом, але й сприяло кращому розумінню як закономірностей підпорядкування регуляторних систем рослин, так і специфіки ієрархічної будови природних угруповань, до складу яких вони входять. Для успішної реалізації мети було проведено низку польових та інструментально-лабораторних досліджень із використанням багатьох методів, а саме:

- *популяційної екології*, які дозволили на індивідуальному рівні вивчити онтогенез рослин, мінливість їхніх морфологічних ознак і життєвість, а на груповому – особливості вікової та віталітетної структур популяцій, їх здатності до самопідтримання та самовідтворення залежно від фітоценотичного оточення, еколого-географічних умов росту та інтенсивності пасторального навантаження. За зміною диференційних ознак цих рівнів, згідно з методикою Й. Царика зі співавторами (2001), було визначено тип стратегії досліджених популяцій видів та оцінено їхні перспективи;

- *фізико-хімічного аналізу*, які дозволили визначити як гранулометричний склад ґрунтів у місцях росту досліджуваних видів, $pH_{\text{вод}}$, вміст валових, катіоннообмінних форм хімічних мікроелементів, так і загальний елементний склад рослин з умов *in situ* та *in vitro*, і, відповідно, з'ясувати видоспецифічні потреби рослин в елементах мінерального живлення;

- *культивування *in vitro**, а саме мікроклонального розмноження для швидкого отримання значної кількості рослинного матеріалу;

- *молекулярно-генетичні*, зокрема метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для вивчення генетичної стабільності/мінливості посадкового матеріалу;

- *спектрофотометричний метод* для визначення вмісту фотосинтетичних пігментів та вільного проліну в рослинах *in situ*, *in vitro*, *ex vitro*;

- *фізіологічні* – для визначення параметрів водного режиму рослин;

- *біофізичні*, а саме метод індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ), який дозволив отримати об'єктивну інформацію про стан фотосинтетичного апарату (ФА) рослин, не порушуючи їхньої цілісності, та вивчити характер впливу факторів середовища на параметри фотосинтезу;

- *біометричні* – для дослідження ростових параметрів;

- вивчення *анатомічної будови листків* рослин *in vitro*, *ex vitro*, *in situ*;

- *статистичні*, а саме: дисперсійний аналіз ANOVA з використанням критерію достовірної різниці групових середніх Тьюкі (Honestly Significant Difference), метод головних компонент (Principal component analysis), за допомогою якого були виокремлені й узагальнені як морфо-, алометричні параметри, так і ФА рослин, які було використано, як маркери функціонального стану рослин *in vitro* та *ex vitro*.

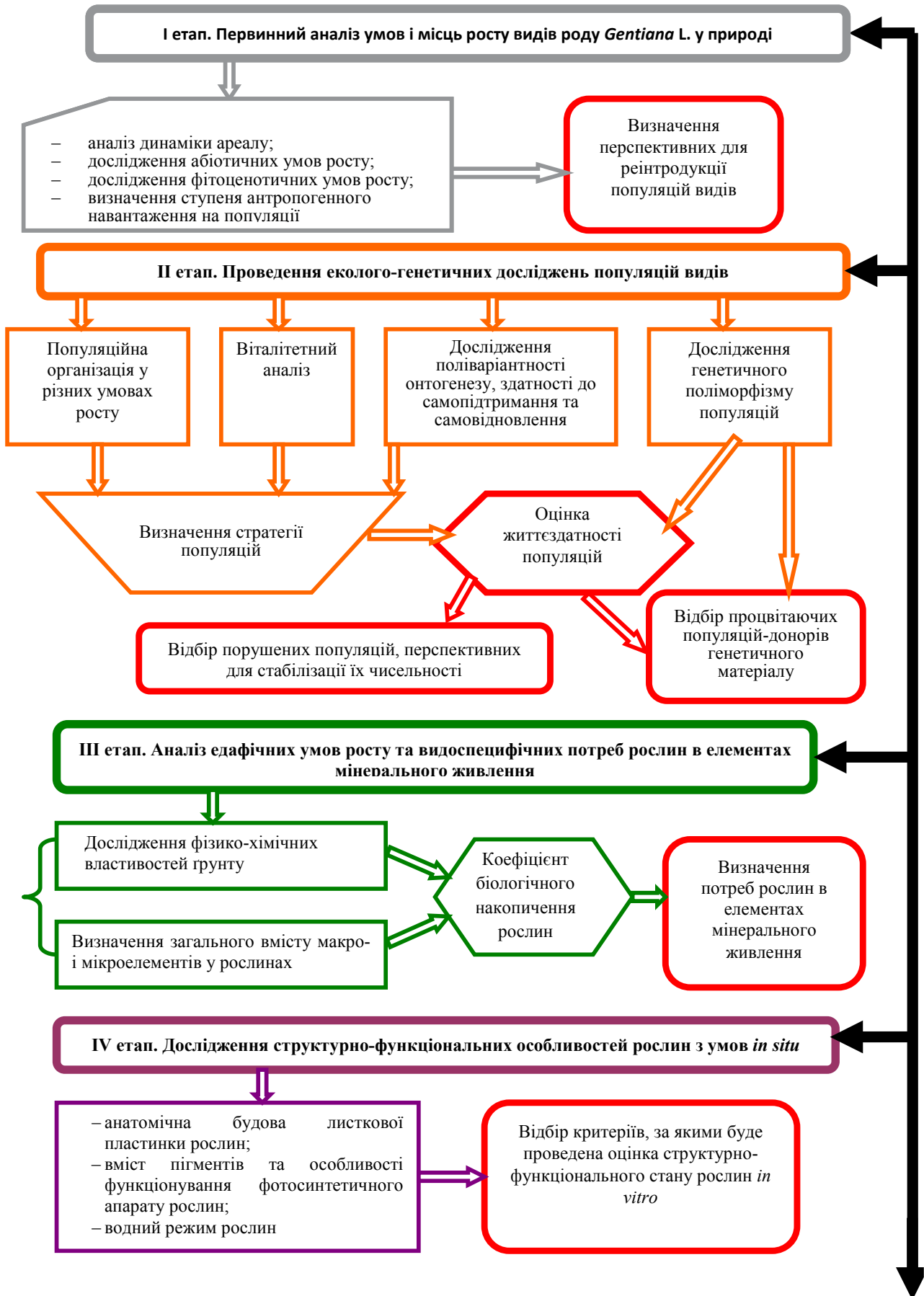
Викладення основного матеріалу. На наш погляд, запропонована С. Волісом та М. Блетчером (2010) [27] стратегія *in situ-ex situ* (або «квазі» *in situ*) є найбільш вдалою спробою поєднати елементи основних технологій *in situ* та *ex situ*. Вона містить концептуальну схему проведення робіт з реінтродукції рідкісних видів, що представлені у флорах певних регіонів нечисельними популяціями, більшість з яких знаходяться поза межами територій із природоохоронним статусом. Реінтродукція за технологією «квазі» *in situ* передбачає послідовне проведення таких етапів:

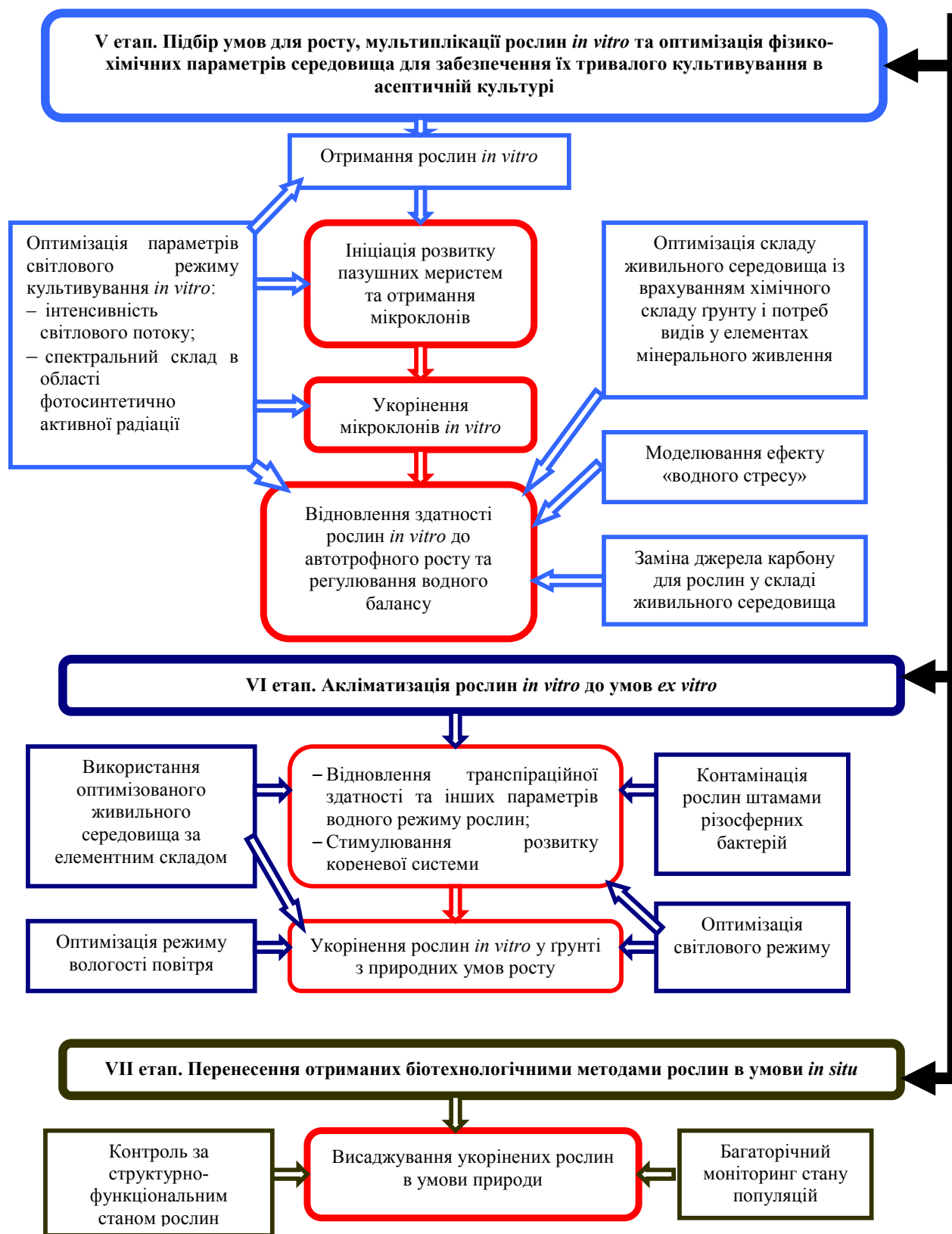
- первинний аналіз умов і місць росту рідкісних видів у природі; дослідження варіабельності їхніх морфологічних ознак, фенології, здатності до самопідтримання. Це дозволяє визначити популяції з найвищим адаптаційним потенціалом;

- відбір насінневого (або іншого посадкового) матеріалу з декількох географічно ізольованих популяцій. Передбачається, що з кожної популяції повинно бути відібрано не менше ніж 10–50 особин;

- створення живих колекцій рослин *ex situ* в умовах, які максимально відповідають їхнім еколого-географічним потребам. Це можуть бути як природні умови, так і максимально до них наближені. При цьому такі колекції *ex situ* повинні існувати тривалий період часу та зберігати високу ступінь генетичної різноманітності рослин;

- вивчення особливостей протікання онтогенезу рослин із різних популяцій залежно від абіотичних і



Рис. 1. Блок-схема розробленої технології збереження високогірних видів роду *Gentiana L.*

біотичних факторів умов росту *ex situ*. Це дозволить отримувати колекції *ex situ*, пристосовані до природних умов існування виду. Тому використання саме такого матеріалу для реінтродукції, на думку вчених, знижує ризик невдач, пов'язаних зі складною адаптацією саджанців до спектру абіотичних і біотичних факторів, що діють на них у нових умовах росту [18; 24; 27];

перенесення саджанців на відповідні ділянки в межах природного ареалу виду та здійснення багаторічного моніторингу за їх станом. Реінтродукція вважається успішною за умови формування популяцією вікової структури, подібної до таких природних популяцій виду [24; 26–28].

Отже, автори стратегії «квазі» *in situ* дотримуються поглядів щодо необхідності використання для реінтродукції популяцій рідкісних видів посадкового матеріалу живих колекцій *ex situ*. Однак, як нами зазначалося вище, створення таких колекцій у високогірних районах є складним завданням. Тому альтернативою їм є колекції рослин *in vitro*. Методи культури *in vitro* дозволяють не лише досягнути високого рівня мультиплікації рослинного матеріалу для проведення робіт з реінтродукції популяцій рідкісних видів у природі, але й уникнути ауткросинговеру, характерного для колекцій *ex situ*, та зберегти генетичну різноманітність рослин, знизити ризик їх втрати внаслідок інфікування патогенами тощо. Проте використання рослинного матеріалу, отриманого методами біотехнології, в проектах із реінтродукції є обмеженим. Це пов'язано зі структурно-функціональними змінами рослин в умовах *in vitro*, які ускладнюють процес їх адаптації до нових умов росту та зумовлюють високу (до 75%) летальність особин [8; 22].

На даний час чимало наукових проектів скеровано на пошуки шляхів підвищення адаптаційного потенціалу рослин *in vitro*. Однак значна кількість дослідників [3; 29; 30] зосереджує свою увагу на технології перенесення посадкового матеріалу в умови *ex vitro*, який є останнім, завершальним етапом робіт із мультиплікації рослин. При цьому фактично не враховують особливості біології та екології видів у природних умовах, від яких в умовах *in vitro* залежать потреби рослин у світловому, водному та температурному режимах, елементах мінерального живлення. Невідповідність фізико-хімічних умов культури *in vitro* потребам видів зумовлює, на нашу думку, глибокі перебудови анатомічних структур особин *in vitro*, значні зміни характеру перебігу їхніх фізіологічних реакцій тощо, що й позначається на здатності рослин *in vitro* адаптуватися до умов *ex vitro* та спричинює високі показники їх летальності протягом першого року життя в природі.

Саме тому одним з аспектів розробленої нами нової технології збереження високогірних видів роду *Gentiana* є врахування їх едафічних потреб, температурного та світлового режимів росту в природі

за оптимізації абіотичних умов їх культивування *in vitro*. Це дозволило значно підвищити адаптаційний потенціал посадкового матеріалу ще на етапі *in vitro*, мінімізувати ризик геномних змін рослин, забезпечити їх 100% приживання в природних умовах, відповідно, використовувати культури *in vitro* досліджуваних високогірних видів як альтернативний варіант їх колекцій *ex situ*.

Ще одною особливістю розробленої нами технології є використання морфометричних параметрів анатомічних структур, показників функціонального стану ФА, водного режиму рослин із природи як маркерів структурно-функціонального стану рослин на етапах культивування *in vitro*, акліматизації до умов *ex vitro* та *in situ*.

Загалом, розроблена нами технологія збереження високогірних видів роду *Gentiana* передбачає послідовне проведення 7 етапів (рис. 1). На початковому етапі було здійснено інвентаризацію місцезнаходжень популяцій досліджуваних таксонів і проведено комплексний аналіз місць їх росту, який передбачав вивчення особливостей топографії; фітоценотичного оточення та пов'язаних з ним процесів задерніння та/або затінення; наявність/відсутність певних видів антропогенного впливу (пасторального, сінокісного, рекреаційного навантажень, викопування кореневищ) та інтенсивності цього впливу. За результатами досліджень було складено перелік зниклих популяцій, з'ясовано чинники, що спричинили такі зміни, та, відповідно, визначено перспективні для майбутньої реінтродукції популяції видів тирличів.

Другий етап передбачав проведення комплексу еколого-генетичних досліджень популяцій, зокрема: вивчення щільності особин у популяціях, типу їх розташування (дифузного, компактно-дифузного або компактного); поліваріантності онтогенезу та морфометричних параметрів особин у різних умовах росту; вікової, віталітетної, генетичної структур та їхньої залежності від фітоценотичного оточення та антропогенного навантаження. За результатами цих досліджень було визначено тип стратегії популяцій, оцінено їхню життєздатність, а також відібрано як популяції-донори генетичного матеріалу, так і популяції, що перебувають у депресивному стані та є перспективними для стабілізації їх чисельності.

У ході проведення досліджень на другому етапі було здійснено відбір зразків ґрунту, рослин, насіння, що послужили матеріалом для наступних трьох етапів.

Так, на третьому етапі узагальнення результатів аналізу елементного складу рослин, валового вмісту хімічних елементів у ґрунтах із локалітетів видів дозволило встановити їхні потреби в елементах мінерального живлення.

Дані щодо концентрацій рухомих і катіонообмінних форм хімічних елементів було використано

в подальшому за оптимізації мінерального складу живильного середовища для культивування рослин *in vitro*.

Комплекс досліджень структурно-функціонального стану рослин із природи, проведений на четвертому етапі, дозволив не лише з'ясувати особливості анатомічної будови листових пластинок рослин тирличів, уміст і співвідношення фотосинтетичних пігментів у рослинах різних вікових груп, особливості функціонування їх ФА за показниками кінетики ключових параметрів флуоресценції хлорофілу *a*, показники водного режиму, але й використати їх як маркери для оцінки реакцій рослин *in vitro* на зміну фізико-хімічних умов їх культивування.

На п'ятому етапі, як вже зазначалося вище, за використання інструментальної бази біотехнології було отримано колекцію рослин *in vitro*, здатних до тривалого росту в умовах асептичної культури. Оптимізація світлового режиму їх культивування дозволила, з одного боку, ініціювати в рослин без додаткового використання підвищених концентрацій регуляторів росту розвиток пазушних бруньок, тобто мікроклональне розмноження, а з іншого – врахування потреб видів у світлі та його спектральному складі у природних місцях їх росту дозволило в умовах *in vitro* одержати рослини, максимально наближені за габітусом, вмістом і співвідношенням пігментів, ефективністю роботи фотосистеми II до таких із природи. Крім того, світлові режими культивування рослин впливали й на щільність продихів, їх аперттуру та сприяли кращому диференціюванню клітин мезофілу. Заміна сахарози (10 г/л) на маніт (3 г/л) у живильному середовищі та його доповненням проліном на останніх етапах культури *in vitro* не лише стимулювала перехід рослин на фотоавтотрофний ріст, але й моделювала «ефект водного стресу», що значно покращувало показники водного режиму особин. Оптимізація елементного складу живильного середовища з урахуванням видоспецифічних потреб рослин та хімічного складу ґрунтів сприяла у свою чергу кращому розвитку кореневої системи. Усе це в комплексі дозволило отримати ще на етапі *in vitro* рослини з високим адаптаційним потенціалом як до умов *ex vitro*, так й *in situ*.

На шостому етапі відбувалося перенесення асептичних рослин в умови *ex vitro*. Для цього використовували пластикові ємності з кришками, заповнені живильним середовищем, що максимально за елементним складом наближено до хімічного складу ґрунту з локалітету майбутнього місця росту рос-

лин у природі. За ручного вентильовання ємностей, із поступовим збільшенням часу експозиції, вже на 8–9 день в особин повністю відновлювалося функціонування продигового апарату. Рослини вирощували за тих же параметрів світлового режиму, за яких відбувся ріст та укорінення пагонів *in vitro*. Крім того, здійснювали контамінацію рослин симбіотичними ризосферними штамами бактерій роду *Bacillus*, що входять до складу біопрепаратів Корбіон або Фітодоктор, що сприяло 100% захисту посадкового матеріалу від патогенної мікрофлори в умовах *ex vitro*. Через 30 діб росту в умовах *ex vitro* біомаса рослин збільшувалася у 2,0–2,5 рази. При цьому листки, утворені в період росту рослин на живильних середовищах із манітом, продовжували функціонувати, а сформовані на сахарозі – починали жовтіти та засихати. Наприкінці першого місяця росту рослини *ex vitro*, отримані біотехнологічними методами, висаджували у пластикові касети, заповнені ґрунтом із майбутніх природних місць росту. Укорінені рослини через 30 днів переносили в умови *in situ*. На завершальному, сьомому етапі, життєвість рослин оцінювали за швидкістю розвитку нових листків, перебудовою параметрів їхніх анатомічних структур тощо. Приживання рослин в умовах *in situ* наприкінці першого вегетаційного періоду становило 100%, що свідчить про високий адаптаційний потенціал рослин *in vitro* та ефективність розробленої нами технології. Проте результативність реінтродукційного процесу в цілому можна буде оцінити лише через декілька років.

Головні висновки. Отже, розроблена нами нова технологія збереження високогірних видів роду *Gentiana* L. доповнює стратегію «квазі» *in situ* новими методичними підходами, інструментальною базою біотехнології збереження рослин. Вона передбачає не лише проведення більш ґрунтовних синекологічних та популяційних досліджень, але й вивчення залежності структурно-функціонального стану рослин від умов їх росту. Інтеграція та систематизація цих знань дозволить цілеспрямовано впливати на процеси росту та розвитку рослин в умовах *in vitro* та, відповідно, на механізми підвищення їхнього адаптаційного потенціалу до умов *ex vitro* та *in situ*.

Перспективи використання результатів досліджень. Результати наших досліджень дозволять більш ефективно використовувати отриманий за допомогою біотехнологічних методів посадковий матеріал як альтернативу живим колекціям *ex situ*.

Література

1. Амельченко В.П. Редкие и исчезающие растения Томской области (анатомия, биоморфология, интродукция, реинтродукция, кариология, охрана). Томск : Изд-во Том. гос. ун-та, 2010. 238 с.
2. Белокурова В.Б. Методи біотехнології в системі заходів зі збереження біорізноманіття рослин. *Цитология и генетика*. 2010. № 3. С. 58–72.
3. Білоус С.Ю. Біотехнологічні аспекти адаптації рослин-регенерантів *Populus tremula* L. до умов закритого та відкритого ґрунту. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України*. 2015. Вип. 219. С. 198–205.
4. Борейко В.Е., Галущенко С.В., Парнікоза І.Ю. Территории строгого природоохранного режима (категории I-a, I-b МСОП/ IUCN). Международный и европейский опыт. Київ : Логос, 2018. 112 с.
5. Кияк В.Г., Білонога В.М. Сучасні структурні зміни популяцій рослин високогір'я Українських Карпат. *Наукові записки державного природознавчого музею*. 2016. Т. 32. С. 39–48.
6. Климишин О. Оптимізація, охорона і раціональне використання рослинності високогір'я та верхньої межі лісу Українських Карпат. *Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна*. 2010. Вип. 54. С. 27–40.
7. Малиновський К.А. Крічфалушій В.В. Високогірна рослинність. Київ : Фітосоціоцентр, 2000. 232 с.
8. Медведєва Т.М. Проблеми акліматизації культивованих *in vitro* рослин. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2008. Т. 40. № 1. С. 299–309.
9. Москалюк Б.І. Збереження *Gentiana lutea* L. в природі з використанням культури *ex situ*. *Промышленная ботаника*. 2013. Вып. 13. С. 80–84.
10. Новикова Т.И. Использование биотехнологических подходов для сохранения биоразнообразия растений. *Растительный мир Азиатской России*. 2013. № 2 (12). С. 119–128.
11. Парнікоза І.Ю. Основні підходи до заповідної справи в Україні у зв'язку з євроінтеграцією. *Будуємо нову Україну* : збірник конференції (26-27 листопада, 2014 р. м. Київ). Київ : Видавничий дім «Києво-Могилянська академія», 2015. С. 393–401.
12. Парубок М.І., Мамчур Т.В., Свистун О.В. Інтродукція рідкісних та зникаючих деревних і чагарникових рослин у ботанічному розсаднику Уманського національного університету садівництва та перспективи використання їх в озелененні. *Вісник Уманського національного університету садівництва*. 2014. № 1. С. 96–101.
13. Стратегія популяцій рослин у природних і антропогеннозмінених екосистемах Карпат / за ред. М. Голубця, Й. Царика. Львів : Євросвіт, 2001. 160 с.
14. Фактори загроз біорізноманіттю заповідних територій Українських Карпат, Розточчя та Західного Полісся : монографія / Й.В. Царик, І.М.Горбань, О.С. Решетило ; за заг. ред. Й.В. Царика. Львів : Сполом, 2016. 120 с.
15. Aguilar R. et al. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology*. 2008. Vol. 17. Issue 24. P. 5177–5188.
16. Burney D.A., Burney L.P. Paleocology and «inter-situ» restoration on Kauai, Hawaii. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 2007. Vol. 5. Issue 9. P. 483–490.
17. Cochrane J.A., Crawford A.D., Monks L.T. The significance of *ex situ* seed conservation to reintroduction of threatened plants. *Australian Journal of Botany*. 2007. Vol. 55. Issue 3. P. 356–361.
18. Guerrant E.O., Pavlik B.M. Reintroduction of rare plants: genetics, demography, and the role of *ex situ* conservation methods. In: Fiedler P.L., Kareiva P.M. (eds). *Conservation Biology*. Springer, Boston, MA, 1998. P. 88–108.
19. Guerrant E.O.J., Raven A. Supporting in situ conservation: the Berry Botanic Garden, an *ex situ* regional resource in an integrated conservation community. In: Smith R.D., Dickie J.B., Linington S.H., Pritchard H.W., Probert R.J. (eds). *Seed conservation: turning science into practice*. The Royal Botanic Gardens, Kew London, 2003. P. 879–896.
20. Heywood V.H., Iriondo J.M. Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation*. 2003. Vol. 113. Issue 3. P. 321–335.
21. Kramer F.T., Havens K. Plant conservation genetics in changing world. *Trends in Plant Science*. 2009. Vol. 14. Issue 11. P. 599–607.
22. Mathur A. et al. Biological hardening and genetic fidelity testing of micro-cloned progeny of *Chlorophytum borivilianum*. *African Journal of Biotechnology*. 2008. Vol. 7. Issue 8. P. 1046–1053.
23. Maunder M., Hughes C., Hawkins J.A., Culham A. Hybridization in *ex situ* plant collections: conservation concerns, liabilities, and opportunities. In: Guerrant E.O.J., Havens K., Maunder M. (eds). *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild*. Island Press, Washington, 2004. P. 325–364.
24. Menges E.S. Restoration demography and genetics of plants: when is a translocation successful? *Australian Journal of Botany*. 2008. Vol. 56. Issue 3. P. 187–196.
25. Menges E.S., Guerrant E., Hamze S. Effects of seed collection on the extinction risk of perennial plants. In: Guerrant E.O.J., Havens K., Maunder M. (eds). *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild*. Island Press, Washington, 2004. P. 305–324.
26. Pavlik B.M. Defining and measuring success. In: Falk D.A., Millar C.I., Olwell M. (eds). *Restoring diversity. Strategies for reintroduction of endangered plants*. Island Press, Washington, 1996. P. 127–155.
27. Volis S., Blecher M. Quasi *in situ*: A bridge between *ex situ* and *in situ* conservation of plants. *Biodiversity and Conservation*. 2010. Vol. 19. № 9. P. 2441–2454.
28. White P.S., Walker J.L. Approximating nature's variation: selecting and using reference information in restoration ecology. *Restoration Ecology*. 1997. Vol. 5 № 4. P. 338–349.
29. Ubalua A.O., Nsofor G.C. The role of supporting substrates in *ex vitro* acclimatization and growth of tissue cultured cassava plantlets. *Plant Knowledge Journal*. 2017. Vol. 6. № 1. P. 1–6.
30. Ubalua A.O., Okoroafor U.E. Micropropagation and postflask management of sweet potato using locally available materials as substrates for hardening. *Plant Knowledge Journal*. 2013. Vol. 2. № 2. P. 56–61.