

Міністерство освіти і науки України
Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка
Хіміко-біологічний факультет
Кафедра ботаніки та зоології

Кваліфікаційна (бакалаврська) робота
«ІНТРОДУКЦІЯ ТА МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ
РІДКІСНИХ І ЗНИКАЮЧИХ ВИДІВ ДЛЯ ЗБЕРЕЖЕННЯ
ФІТОРІЗНОМАНІТТЯ»

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
ОПП «Екологічна біотехнологія»

Здобувачки вищої освіти рівня першого
(бакалаврського)
Марії ГОНЧАРСЬКОЇ

НАУКОВИЙ КЕРІВНИК:
доктор біологічних наук, професор
Людмила ГРИЦАК

РЕЦЕЗЕНТ:
кандидат біологічних наук, провідний
науковий співробітник відділу генетики
клітинних популяцій Інституту молекулярної
біології і генетики НАН України
Ігор АНДРЕЄВ

АНОТАЦІЯ

Гончарська М.С. Інтродукція та мікроклональне розмноження рідкісних і зникаючих видів для збереження фіторізноманіття. Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня «бакалавр» зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія. ТНПУ ім. В. Гнатюка. Тернопіль, 2026. 58 с.

Охорона реліктових видів рослин є важливим напрямом збереження біорізноманіття України. До рідкісних високогірних видів Українських Карпат належать первоцвіт Галлера (*Primula halleri* J.F.Gmel.) та первоцвіт дрібний (*Primula minima* L.), занесені до Червоної книги України. Перспективним методом їх збереження є культура *in vitro*, що забезпечує отримання життєздатного рослинного матеріалу та ефективне розмноження за умов низької схожості насіння.

Встановлено вплив еколого-географічних умов на вікову структуру та самопідтримання популяцій *P. minima* і *P. halleri*. Оптимізовано умови стерилізації насіння, ефективність якої становила 97–99%. Підібрано умови вегетативного розмноження *in vitro*: для *P. minima* – середовище МС/2 з 0,5 мг/л ОК, 0,5 мг/л ГК₃ та 0,05 мг/л Кін, для *P. halleri* – безгормональне середовище МС/2. Для мікроклонального розмноження оптимальними були середовища МС/2 з 0,2 мг/л ІОК, 0,7 мг/л ГК₃, 0,03 мг/л Кін і 0,01 мг/л БАП для *P. minima* та з 0,1 мг/л Кін і 0,05 мг/л ГК₃ для *P. halleri*. Розроблено схему адаптації рослин до умов *in vivo* та підтверджено можливість їх успішного вирощування у високогір'ї Українських Карпат, де приживання рослин становило 17 % для *P. minima* та 55 % для *P. halleri*.

Ключові слова: рослини *in vitro*, види роду *Primula* L., мікроклональне розмноження, популяційна структура, адаптація *in vivo*.

ABSTRACT

Honcharska M.S. Introduction and microclonal propagation of rare and endangered species for the conservation of phytodiversity 162 Biotechnology and Bioengineering. Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University. Ternopil, 2026. 58 p.

The protection of relict plant species is an important direction in the preservation of Ukraine's biodiversity. Rare high-altitude species of the Ukrainian Carpathians include Haller's primrose (*Primula halleri* J.F.Gmel.) and small primrose (*Primula minima* L.), listed in the Red Book of Ukraine. A promising method for their preservation is *in vitro* culture, which ensures the receipt of viable plant material and effective propagation under conditions of low seed germination.

The influence of ecological and geographical conditions on the age structure and self-maintenance of *P. minima* and *P. halleri* populations was established. The conditions for seed sterilization were optimized, the efficiency of which was 97–99%. The conditions for vegetative propagation *in vitro* were selected: for *P. minima* – MS/2 medium with 0.5 mg/l OK, 0.5 mg/l GK₃ and 0.05 mg/l Kyn, for *P. halleri* – hormone-free MS/2 medium. For microclonal propagation, the optimal media were MS/2 with 0.2 mg/l IOK, 0.7 mg/l GK₃, 0.03 mg/l Kyn and 0.01 mg/l BAP for *P. minima* and with 0.1 mg/l Kyn and 0.05 mg/l GK₃ for *P. halleri*. A scheme for adapting plants to *in vivo* conditions was developed and the possibility of their successful cultivation in the highlands of the Ukrainian Carpathians was confirmed, where plant survival was 17% for *P. minima* and 55% for *P. halleri*.

Key words: *in vitro* plants, species of the genus *Primula* L., microclonal propagation, population structure, *in vivo* adaptation.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	6
ВСТУП	7
РОЗДІЛ I ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ З ПРОБЛЕМИ ДОСЛІДЖЕННЯ	11
1.1. Особливості географічного поширення досліджуваних видів роду <i>Primula</i>	11
1.2. Біологічні особливості досліджуваних видів роду <i>Primula</i>	11
1.3. Мікроклональне розмноження рослин як напрям збереження фіторізноманіття.....	13
1.4. Проблеми та перспективи введення в культуру <i>in vitro</i> представників роду <i>Primula</i>	17
РОЗДІЛ II ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	24
2.1. Характеристика об'єкту дослідження	24
2.2. Дослідження вікової структури популяцій видів	24
2.3. Асептичні умови культивування рослинних об'єктів <i>in vitro</i>	25
2.4. Введення в культуру <i>in vitro</i> <i>P. minima</i> та <i>P. halleri</i>	26
2.5. Підбір умов для проростання <i>in vitro</i> насіння <i>P. minima</i> та <i>P. halleri</i>	26
2.6. Дослідження схожості насіння та підбір умов для вегетативного розмноження та росту <i>in vitro</i> <i>P. minima</i> та <i>P. halleri</i>	27
2.7. Підбір умов мікроклонального розмноження та адаптації рослин <i>P. minima</i> і <i>P. halleri</i> до умов <i>in vivo</i> та природного середовища.....	27
2.8. Статистична обробка результатів експериментів	28
РОЗДІЛ III РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	30
3.1. Особливості популяційної структури <i>P. minima</i> залежно від еколого-географічних умов зростання та впливу антропогенного фактору	30
3.2. Особливості структури <i>P. halleri</i> залежно від еколого-географічних умов зростання та впливу антропогенного фактору	34
3.3. Підходи до отримання та вкорінення <i>in vitro</i> рослин досліджуваних видів	36

3.4. Підбір умов для вегетативного розмноження і росту рослин <i>P. minima</i> та <i>P. halleri in vitro</i>	43
3.5. Підбір умов для мікроклонального розмноження <i>P. minima</i> та <i>P. halleri</i>	44
3.6. Підбір умов для перенесення отриманих <i>in vitro</i> рослин видів <i>P. minima</i> та <i>P. halleri</i> у ґрунт	45
3.7. Реінтродукція природних популяцій видів <i>Primula</i>	48
ВИСНОВКИ	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	51

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БАП – 6-бензиламінопурин

г. – гора

ГК₃ – гіберелова кислота

ІОК – індоліл-3-оцтова кислота;

Кін – кінетин

н. р. м. – висота місцевості над рівнем моря

МС – живильне середовище Мурасіге–Скуга

МС/2 – живильне середовище Мурасіге–Скуга з половинним вмістом макро- та мікроелементів

НОК – 1-нафтилоцтова кислота

g –генеративні особини

im – особини іматурного стану

v– особини віргінільного стану

in vitro – в асептичних, контрольованих умовах культивування

ex vitro –у нестерильних, штучних умовах культивування

in vivo – в умовах відкритого ґрунту

in situ – в умовах природи

ВСТУП

Актуальність теми. Збереження реліктових видів рослин, які формують цінну складову флористичного різноманіття західного регіону України, є одним із важливих завдань сьогодення. Посилення антропогенного впливу на природні екосистеми, зміна кліматичних умов і деградація місцезростань призводять до скорочення чисельності багатьох рідкісних видів та втрати окремих локальних популяцій. Особливо вразливими до таких змін є реліктові види та види, поширення яких обмежене певними природними регіонами. Зменшення їх чисельності може спричиняти порушення структури рослинних угруповань і зниження стійкості природних екосистем [4, 35, 36].

Серед рідкісних декоративних рослин особливе місце посідають представники роду *Primula* L., окремі види якого потребують охорони та включені до Червоної книги України. До них належать первоцвіт Галлера (*Primula halleri* J.F.Gmel.) та первоцвіт дрібний (*Primula minima* L.) – рідкісні високогірні рослини Українських Карпат. Їхні популяції приурочені переважно до субальпійського та альпійського поясів Чорногірського, Свидовецького та Мармароського масивів, де вони зростають на гірських луках, кам'янистих схилах, осипищах і скельних відслоненнях [4, 14, 25, 69].

Основними загрозами для цих видів є розвиток високогірного туризму, випас худоби та неконтрольоване збирання рослин. Рекреаційне навантаження спричиняє деградацію ґрунтів, руйнування мікробіотопів і пошкодження рослин, а випасання худоби посилює антропогенний вплив і ускладнює відновлення популяцій. Через низьку чисельність популяцій *P. minima* та *P. halleri* навіть незначне збирання рослин є небезпечним для їхнього існування [4, 14, 25, 69].

Перспективним методом збереження рідкісних рослин є введення їх у культуру *in vitro*. Такий підхід дає змогу зберігати природні популяції, отримувати життєздатні експланти та забезпечувати стабільне розмноження рослин із низькою схожістю насіння або слабкою здатністю до вегетативного

відтворення [44, 70]. Представники роду *Primula* характеризуються низькою природною схожістю насіння без стратифікації та застосування стимуляторів проростання, що значно ускладнює природне відновлення популяцій [31, 67, 72].

Мета роботи – дослідити зміни популяційної структури *P. minima* та *P. halleri* у різних еколого-географічних умовах, а також розробити ефективні підходи до їх культивування *in vitro* для одержання посадкового матеріалу з метою подальшого використання у програмах відновлення знищених популяцій у високогір'ї Карпат.

Для досягнення мети вирішували такі **завдання**:

- провести оцінку сучасного стану природних популяцій досліджуваних видів роду *Primula* в межах різних еколого-географічних умов та визначити особливості їх функціонування в умовах антропогенного навантаження;
- розробити схему стерилізації насіння *P. minima* та *P. halleri* та отримати їх стерильні проростки як вихідний матеріал для культивування *in vitro*;
- підібрати умови для вегетативного та мікроклонального розмноження видів *P. minima* та *P. halleri in vitro*;
- розробити підходи до адаптації рослин, отриманих біотехнологічними методами, до умов *ex vitro* та *in vivo* для подальшої стабілізації чисельності їх порушених популяції та реінтродукції вже знищених на території Українських Карпат

Об'єкт дослідження – біотехнологічні підходи до збереження, відновлення та реінтродукції видів *P. minima* та *P. halleri*.

Предмет дослідження – популяційна структура, введення в культуру *in vitro*, мікроклональне розмноження та адаптація рослин *P. minima* і *P. halleri*.

Методи дослідження: у роботі використано теоретичні (аналіз, синтез, узагальнення, систематизація), популяційні, біометричні, методи культивування рослинних об'єктів *in vitro*, а також статистичні методи для визначення достовірності результатів. Дослідження проводились у польових умовах та в лабораторії екології та біотехнології ТНПУ.

Наукова новизна.

- проведено комплексне дослідження популяцій *P. minima* у високогір'ї Українських Карпат з урахуванням особливостей їх вікової та просторової структури в різних еколого-географічних умовах;
- удосконалено методичні підходи до введення *P. minima* та *P. halleri* в культуру *in vitro*, підібрано оптимальні умови стерилізації насіння, одержання асептичних проростків і мікроклонального розмноження рослин;
- розроблено підходи до адаптації рослин *in vitro* до умов *ex vitro* та *in vivo* з метою їх реінтродукції та відновлення природних популяцій у високогір'ї Українських Карпат.

Практичне значення одержаних результатів. Результати досліджень можуть бути використані для оцінки стану та розроблення заходів зі збереження природних популяцій *P. minima* та *P. halleri* у високогір'ї Українських Карпат. Розроблені підходи до культивування рослин *in vitro*, мікроклонального розмноження та адаптації до умов *ex vitro* і *in vivo* дають змогу отримувати посадковий матеріал для реінтродукції видів і відновлення порушених популяцій. Отримані результати можуть бути використані у практиці природоохоронних установ, ботанічних садів та наукових закладів.

Особистий внесок здобувача. Автором разом з науковим керівником сформовано план дослідження, визначено завдання, проаналізовано огляд літературних джерел, здійснено обговорення отриманих результатів, сформульовано висновки, написано кваліфікаційну (бакалаврську) роботу. Автором самостійно виконано експериментальні дослідження, а наведені в роботі результати отримано особисто або за безпосередньої участі під час проведення польових і лабораторних досліджень. Здобуті дані статистично опрацьовано, узагальнено та інтерпретовано автором.

Апробація результатів дисертації. Результати дослідження представлені й опубліковані у матеріалах Міжнародої науково-практичної конференції «Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2026», (27–28 травня 2026 р., Тернопіль, Україна).

Обсяг і структура роботи. Кваліфікаційна робота складається із вступу, огляду літератури, результатів дослідження і їх обговорення, висновків, списку літератури, який включає 74 найменування. Робота містить 2 таблиці та 9 рисунків.

РОЗДІЛ І

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ З ПРОБЛЕМИ ДОСЛІДЖЕННЯ

1.1. Особливості географічного поширення досліджуваних видів роду *Primula*

P. minima є типовим представником середньоєвропейської альпійської флори. Вид поширений у межах альпійського висотного поясу на висотах 1850–1950 м н. р. м., де заселяє тріщини та скельні виступи з достатнім зволоженням. Найчастіше трапляється на холодних схилах і в оселищах із тривалим сніголежанням. Екологічно характеризується як кальцефоб і мезофіт, пристосований до кислих субстратів та помірно вологих умов середовища [7].

Ареал *P. minima* має диз'юнктивний гірський характер і охоплює низку високогірних масивів Центральної та Південно-Східної Європи. Вид трапляється у Східних Альпах, Судетах, Карпатах, Роднейських і Трансільванських Альпах, а також у гірських системах Центрального та Східного Балканського півострова. Поширення виду підтверджене для Нижньої Австрії, Штирії, Сербії, Болгарії та Іллірійських країн. Західна та південна межі його ареалу проходять територією Німеччини [4].

За результатами огляду літературних джерел встановлено, що *P. minima* в Україні поширений виключно у високогірних районах Карпат. Основні осередки його зростання зосереджені в межах Чорногірського масиву та Мармароських Альп. На Чорногорі вид трапляється від гори Піп Іван, де зареєстровано найвище відоме місцезростання на висоті 2026 м над рівнем моря [49], до гори Ребра.

За сучасними даними, *P. minima* в Україні зберігається лише у високогірних районах Українських Карпат. Вид відомий із Чорногірського масиву (гори Петрос, Ребра, Шпиці, Туркул, Гутин-Томнатик, Піп Іван) та

Мармароського масиву (гора Піп Іван Мармароський). Популяції переважно невеликі за площею, часто мають фрагментовану структуру, а їхні вікові спектри здебільшого є неповночленими через відсутність ювенільних та іматурних особин. Водночас у деяких локалітетах поблизу гір Шпиці та на ділянці між вершинами Ребра і Кізі Улоги виявлено повночленні популяції з усіма онтогенетичними групами. Щільність рослин у більшості ценопопуляцій становить близько 100–300 парціальних кущів на 1 м². Основними факторами, що обмежують поширення виду, є вузька екологічна спеціалізація та обмежена кількість придатних високогірних екотопів. Вид охороняється на території Карпатського біосферного заповідника та природоохоронних об'єктів Українських Карпат [6].

За результатами сучасних досліджень популяції *P. minima*, раніше відомі з гір Мунчел, Шпиці, Пожижевська, Гутин-Томнатик і Смотрич, наразі не виявлені. З огляду на втрату окремих локалітетів, для відновлення чисельності виду рекомендовано проведення реінтродукційних заходів у межах історичних місцезростань [14]. Вразливий стан популяцій та обмежене поширення виду зумовили його внесення до Червоної книги України.

Ще одним представником роду *Primula*, який був об'єктом дослідження, є *P. halleri* (первоцвіт Галлері). Цей вид належить до групи середньоєвропейських високогірних рослин і є характерним компонентом флори субальпійського поясу [49]. Вид має локальне поширення в межах субальпійського та альпійського поясів, де трапляється на висотах 1600–1850 м над рівнем моря. Його місцезростання приурочені переважно до кам'янистих вапнякових схилів та осипищ зі свіжими гумусними ґрунтами. За екологічними особливостями *P. halleri* належить до кальцефільних мезофітів [38]. У природних популяціях вид зазвичай представлений незначною кількістю особин [38]. Загальний ареал *P. halleri* охоплює високогірні райони Центральної та Південно-Східної Європи. Вид має диз'юнктивне поширення в Альпах, Карпатах і на Балканському півострові, де приурочений переважно до субальпійського та альпійського поясів. Ареал виду охоплює території Австрії,

Швейцарії, Франції, Італії, Румунії, України, Польщі, Словаччини, Албанії, Болгарії та окремих країн північно-західної частини Балканського регіону. Вид є характерним компонентом високогірної флори вапнякових масивів Центральної та Південно-Східної Європи. У межах свого ареалу зростає переважно на висотах від 1500 до 2700 м над рівнем моря, хоча локально може траплятися і за межами цього діапазону [39].

P. halleri (первоцвіт Галлера) занесений до Червоної книги України та належить до категорії рідкісних видів. Це реліктовий середньоєвропейський високогірний вид із диз'юнктивним ареалом, поширеним у Карпатах, Альпах і на Балканах. В Україні трапляється лише у високогірних районах Чорногори, Свидовця та Мармароського масиву. Незначна кількість локалітетів, обмеженість придатних місцезростань і вузька еколого-ценотична приуроченість зумовлюють необхідність постійного моніторингу та охорони його природних популяцій [4].

1.2. Біологічні особливості досліджуваних видів роду *Primula*

Primula (Примула) – найбільший рід родини *Primulaceae*, що налічує приблизно 500 видів. Вперше рід був описаний Карлом Ліннеєм у 1753 році, який назвав рід *Primula*, що походить від латинського слова «перший», що стосується раннього цвітіння навесні [47]. Види *Primula* здебільшого походять з Північної півкулі та природно вирощуються в Європі, Південній Америці, Азії, помірних зонах Північної Африки [2]. Більшість місцевих рослин потребують вологого та прохолодного клімату і ростуть у лісосмузі, на рівнинних луках, альпійських газонах та лучних тундрах [63].

Для більшості видів роду *Primula* характерне багаторічне косо-кореневище, зазвичай нерозгалужене, без вторинного потовщення та частково виступаюче над поверхнею ґрунту. Воно складається з кількох вузлів, від яких відходять додаткові шнуроподібні корені. У деяких генеративних особин і в *P. minima* кореневище здатне до симподіального галуження. Для *P. minima*

також характерне товсте кореневище, вкрите залишками відмерлих листків, що відрізняє цей вид від інших представників роду у флорі України.

Стебло. Види роду *Primula* у флорі України є багаторічними розетковими рослинами із симподіальним типом галуження. Після завершення вегетаційного циклу надземна частина відмирає, а бруньки відновлення формують нові розетки листків. Для більшості видів характерний безлистий генеративний пагін із зонтикоподібним суцвіттям. Наявність короткого кореневища, прикореневої розетки та генеративного пагона є важливими діагностичними ознаками роду, а його відсутність або наявність має таксономічне значення для розмежування окремих таксонів [63].

Листок. Листки більшості представників роду прості, цілісні, зібрані в прикореневу розетку. Морфологічні особливості листка широко використовують у систематиці *Primula*. На надвидовому рівні важливими є напрямок згортання молодих листків у бруньці, наявність черешка та ступінь розчленованості пластинки. Для видового та внутрішньовидового рівнів діагностичне значення мають форма листової пластинки, її основа, край, опушення та співвідношення довжини пластинки й черешка [63].

Опушення. Вегетативні та генеративні органи більшості видів роду *Primula* вкриті простими нерозгалуженими волосками, які відрізняються довжиною, густотою та характером розміщення. За цими ознаками добре розмежовуються окремі види та внутрішньовидові таксони. Наявність або відсутність опушення та борошнистого нальоту є важливими таксономічними ознаками роду *Primula*. Для розмежування таксонів надвидового рівня використовують наявність простих трихом і нальоту, тоді як на видовому рівні важливими є характер опушення, його густота, довжина волосків, а також колір і поширення борошнистого нальоту.

Чашечка. Квітки видів роду *Primula* характеризуються загалом подібною будовою. Чашечка п'ятизубчаста, різноманітна за формою, ступенем надрізаності та розмірами. У різних видів вона може бути трубчастою, дзвоникоподібною, глечикоподібною або келихоподібною, з вираженими

ребрами або без них. Важливими таксономічними ознаками є форма чашечки, характер її розширення та ступінь здуття під час цвітіння і плодоношення [63].

Віночок. Для всіх представників роду характерний зрослопелюстковий п'ятилопатевий віночок із довгою трубкою. Таксономічне значення мають його забарвлення, діаметр, співвідношення довжини трубки та відгину, а також форма лопатей. Види секції *Primula* зазвичай мають жовті квітки, тоді як представники секції *Aleuritia* та підроду *Auriculastrum* – рожеві або фіолетові.

Андроцей. Андроцей складається з п'яти тичинок із короткими нитками, прикріпленими до трубки віночка навпроти його лопатей. Пиляки овальної форми. Через одноманітність будови цей орган має обмежене значення для внутрішньородової систематики *Primula*.

Гінецей. Гінецей у видів роду *Primula* лізикарпний і складається з маточки з ниткоподібним стовпчиком та голівчастою приймочкою. Для більшості видів характерна гетеростилія – явище, за якого в популяціях трапляються дві морфологічні форми квіток: довгостовпчикові (pin) та короткостовпчикові (thrum). У квіток типу pin приймочка розташована біля зіву віночка, а тичинки прикріплені нижче; у квіток типу thrum спостерігається зворотне співвідношення. Крім того, ці форми відрізняються будовою приймочки та розмірами пилкових зерен.

Ступінь прояву гетеростилії варіює між видами. У більшості представників різниця між положенням приймочки та тичинок є добре вираженою. На відміну від інших видів флори України, *P. halleri* характеризується гомостилією, за якої тичинки та приймочка розміщені на одному рівні. Наявність або відсутність гетеростилії розглядається як важлива систематична ознака. Її використовують для характеристики окремих груп видів та розмежування таксонів у межах роду *Primula*, зокрема представників секції *Aleuritia*.

Зав'язь і суцвіття. У представників роду *Primula* зав'язь верхня, одногнізда, з колончастою плацентацією та численними насінними зачатками. Більшості видів властиве просте зонтикоподібне суцвіття.

Запилення. Більшість видів *Primula* належать до ранньоквітучих рослин і запилюються переважно комахами. Для представників роду характерне поєднання чоловічих і жіночих генеративних структур в одній квітці, проте завдяки гетеростилії переважає перехресне запилення. Основними запилювачами є джмелі, бджоли, метелики та інші комахи, склад яких може змінюватися залежно від екологічних умов.

У гетеростильних видів найефективнішим є запилення між різними морфами квіток, тоді як запилення між однаковими морфами зазвичай обмежується самонесумісністю. Ці механізми сприяють перехресному запиленню, хоча рівень самосумісності може залежати від умов середовища. На відміну від більшості видів роду, *P. halleri* переважно самозапилюється. Особливості запилення мають важливе біологічне й еволюційне значення, проте їх таксономічна цінність у роді *Primula* є обмеженою [54].

Плід і насіння. Плід у видів роду *Primula* – багатонасінна коробочка різної форми (циліндрична, яйцеподібна або куляста), що розкривається зубцями на верхівці. Форма та розміри коробочки мають діагностичне значення переважно на видовому й внутрішньовидовому рівнях. Насіння представників роду різняться за формою, розмірами та особливостями поверхні, однак ці ознаки не вважаються достатньо надійними для розмежування таксонів через їх значну подібність у різних систематичних групах [38].

Поширення насіння. Більшість видів *Primula* є анемохорними баллістами, у яких насіння висипається з прямостоячих коробочок під дією вітру.

Узагальнення аналітичного огляду літературних джерел показало, що таксономічна цінність ознак залежить від рівня систематичної диференціації. Для внутрішньовидових таксонів найбільш інформативними є співвідношення довжини черешка і листкової пластинки, особливості опушення, форма чашечки та розміри коробочки. На видовому рівні важливими є форма листків, чашечки й віночка, характер опушення, положення квіток у суцвітті та особливості плодів.

1.3. Мікроклональне розмноження рослин як напрям збереження фіторізноманіття

Альтернативою традиційним способам вегетативного та насіннєвого розмноження рослин є використання сучасних біотехнологічних підходів, серед яких ключове місце посідає мікроклональне розмноження [8, 20]. Мікроклональне розмноження – сучасний біотехнологічний метод відтворення рослин із використанням клітин, тканин або органів в умовах *in vitro*. Порівняно з насіннєвим і традиційним вегетативним розмноженням, воно забезпечує швидке отримання генетично однорідного та безвірусного посадкового матеріалу [11, 19].

Мікроклональне розмноження здійснюється в умовах повної стерильності, що істотно зменшує ризик перенесення патогенів і шкідників від материнських рослин до отриманого потомства. Завдяки цьому забезпечується формування здорового та життєздатного рослинного матеріалу, що сприяє підвищенню продуктивності та зменшенню витрат на захист рослин [53].

Перевагами мікроклонального розмноження є висока генетична однорідність регенерантів, збереження цінних господарських ознак та можливість швидкого отримання великої кількості рослин із мінімальної кількості вихідного матеріалу. Метод не залежить від сезонності й забезпечує цілорічне виробництво посадкового матеріалу [2].

Мікроклональне розмноження забезпечує можливість отримання значної кількості рослинного матеріалу при мінімальному використанні насіння. Додатковою перевагою є зменшення витрат на засоби захисту рослин, що сприяє загальній економії ресурсів (рис. 1.1.). Застосування методу клонального мікророзмноження *in vitro* дозволяє істотно підвищити коефіцієнти розмноження та прискорити селекційний процес завдяки швидкому відтворенню цінних генотипів [5].

Процес культивування ізолюваних рослинних експлантів передбачає дотримання низки технологічних етапів, які умовно поділяють на чотири

послідовні стадії. Перший етап включає відбір експланта, введення його в культуру *in vitro* та ініціацію росту, що передбачає добір вихідного рослинного матеріалу, вибір типу експлантів і оптимізацію умов їх стерилізації. Другий етап – етап мікророзмноження, який полягає у підборі оптимального складу живильного середовища для забезпечення росту та розвитку експлантів у культурі *in vitro*.

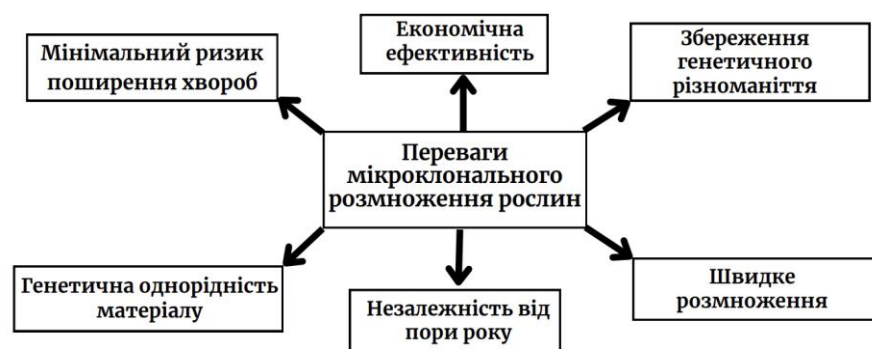


Рис. 1.1. Переваги мікроклонального розмноження рослин

Завершальними етапами мікроклонального розмноження є індукція розвитку меристем, укорінення регенерантів та їх адаптація до умов *in vivo*. Ефективність методу значною мірою залежить від генетичних особливостей вихідного матеріалу, правильного добору материнських рослин і типу експланта. Визначальним чинником успішного розмноження є також якість первинного матеріалу, використаного для ізоляції експлантів [23, 24, 55].

Для стерилізації рослинного матеріалу застосовують різні агенти, зокрема гіпохлорит натрію (NaClO), гіпохлорит кальцію ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$), хлорамін, етиловий спирт ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), бром та фенол [13].

Склад живильного середовища підбирають індивідуально для кожного виду рослин, оскільки він є одним із ключових чинників ефективності мікроклонального розмноження. Важливу роль відіграє баланс фітогормонів, вітамінів, вуглеводів, а також макро- і мікроелементів. Для активації розвитку апікальної меристеми необхідно забезпечити оптимальні фізико-хімічні умови культивування, адаптовані до конкретного виду [15–18]. У культурі *in vitro*

найчастіше використовують середовища Мурасіге-Скуга, Лінсмейєра і Скуга, Шенка і Гільдебрандта, Ніча, Гамборга та Хеллера. Найбільш поширеними є модифікації середовища Мурасіге-Скуга, яке містить неорганічний азот і сприяє органогенезу та соматичному ембріогенезу, хоча потреби різних видів у мінеральному живленні є індивідуальними. Як джерело вуглеводів зазвичай використовують сахарозу, рідше – глюкозу або фруктозу, причому їх концентрація залежить від типу культури та етапу мікроклонального розмноження [1, 9].

Формування оптимального співвідношення регуляторів росту в складі живильного середовища є одним із ключових чинників ефективності культивування, що враховує особливості біологічного матеріалу [1]. Під час введення меристем у культуру *in vitro* концентрацію регуляторів росту у живильних середовищах підвищують приблизно на 15 % порівняно з базовими середовищами для розмноження, що сприяє активації початкових етапів росту ізольованих експлантів. Культивування рослин можливе як на агаризованих, так і на рідких середовищах [3]. Індукція ризогенезу у регенерантів потребує підвищеного вмісту ауксинів у живильному середовищі. Домінування ауксинів над цитокінінами, як правило, стимулює прояв апікального домінування. Найпоширенішим природним ауксином є індолілоцтова кислота (ІОК), синтез якої відбувається, зокрема, через перетворення амінокислоти триптофану [16].

Температура, освітлення та вологість є важливими чинниками успішного росту рослин *in vitro*. Оптимальна температура становить 22–26 °C у світлу фазу та 18–22 °C у темну, а відносна вологість підтримується на рівні 70–80 %. Узгодження спектрального складу світла з гормональним складом середовища сприяє підвищенню коефіцієнта розмноження триптофану [10].

Після отримання необхідної кількості клонів їх переносять на середовище для укорінення, де під дією ауксинів протягом 15–25 діб формується коренева система. Наступним етапом є адаптація регенерантів до умов *in vivo*, що зменшує втрати рослин і підвищує ефективність технології. Успішність мікроклонального розмноження залежить від добору донорних рослин, типу

експланта, режимів стерилізації та складу живильних середовищ. Метод широко застосовують для розмноження культур із низькою насіннєвою продуктивністю, безнасінневих і стерильних форм, а також декоративних рослин [22]. На сучасному етапі для більшості культур розроблено стандартизовані біотехнологічні протоколи мікроклонального розмноження, які охоплюють усі етапи культивування *in vitro* [17, 59]. Їх практичне застосування дозволяє суттєво скоротити витрати часу та ресурсів на отримання якісного посадкового матеріалу.

Метод мікроклонального розмноження рослин є високоефективним біотехнологічним підходом, що дозволяє у значних обсягах залучати та відтворювати цінні генотипи, а також сприяє збереженню і масовому розмноженню різноманітних видів рослин.

1.4. Проблеми та перспективи введення в культуру *in vitro* представників роду *Primula*

Сучасні біотехнологічні підходи відіграють важливу роль у збереженні та відтворенні рідкісних, ендемічних і господарсько цінних видів рослин. Одним із найбільш перспективних методів є культивування рослин *in vitro*, яке забезпечує отримання генетично однорідного посадкового матеріалу, прискорене розмноження рослин та збереження цінного генофонду незалежно від сезонних і екологічних чинників. Особливого значення такі методи набувають для видів із низькою насіннєвою продуктивністю, обмеженим природним поновленням або вузькою екологічною амплітудою.

У зв'язку з цим дедалі більшого значення набувають сучасні біотехнологічні підходи, зокрема методи культури рослинних тканин *in vitro*, які широко використовуються для збереження генетичних ресурсів, прискореного розмноження цінних генотипів, отримання вихідного матеріалу для селекції та створення нових сортів [15-18]. Біотехнологічні методи дають

змогу ефективно долати окремі репродуктивні обмеження та забезпечувати збереження рідкісних і зникаючих видів.

За останні десятиліття для низки представників роду *Primula* успішно розроблено протоколи культивування *in vitro*. Результати досліджень свідчать про високу регенераційну здатність багатьох видів та можливість їх ефективного мікроклонального розмноження за використання відповідних типів експлантатів, оптимізованих живильних середовищ і регуляторів росту рослин. Водночас встановлено, що ефективність морфогенезу значною мірою залежить від біологічних особливостей конкретного виду, тому склад поживного середовища, тип експлантата та концентрації фітогормонів потребують індивідуального підбору для кожного таксона. Саме оптимізація цих чинників є необхідною передумовою успішного застосування методів культури *in vitro* у дослідженнях представників роду *Primula* [40, 46].

Дослідження культивування представників роду *Primula in vitro* спрямовані насамперед на розроблення ефективних методів масового розмноження рослин. Незважаючи на те, що на сьогодні для низки видів *Primula* успішно розроблено протоколи мікроклонального розмноження, обсяг досліджень у цьому напрямі залишається порівняно обмеженим. Одним із ключових етапів створення ефективної системи культивування *in vitro* є підбір оптимального типу експлантата, складу живильного середовища та концентрацій регуляторів росту рослин.

Для представників роду *Primula* характерні складні механізми репродукції та часто низька схожість насіння. Дослідження, проведені на *P. veris* та інших споріднених видах, свідчать про високу ефективність використання біотехнологічних методів для їхнього розмноження та збереження. Встановлено, що за відсутності передпосівної обробки насіння рівень його проростання зазвичай не перевищує 10 %, що істотно обмежує можливості природного відновлення популяцій. Разом з цим, застосування регуляторів росту, зокрема гіберелової кислоти (GA_3), дозволяє підвищити

схожість насіння до 50 % і більше, створюючи передумови для успішного введення рослин у культуру *in vitro* [56].

Для *P. vulgaris* ефективну систему мікроклонального розмноження запропонували Морозовська та співавтори [57], які використовували як первинні експлантати верхівки пагонів. Найкращі показники регенерації були отримані на середовищі MS з додаванням 4,44 мкМ бензиладеніну (БА) та 1,13 мкМ 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-D). Результати дослідження підтвердили перспективність застосування даного поєднання фітогормонів для індукції морфогенезу та подальшого мікророзмноження представників роду *Primula*.

У численних дослідженнях, присвячених мікроклональному розмноженню представників роду *Primula*, показано можливість ефективної індукції адвентивних пагонів із різних типів експлантатів за використання живильних середовищ, доповнених ауксинами та цитокінінами у різних співвідношеннях. Отримані результати свідчать про високу морфогенетичну пластичність представників роду та перспективність застосування біотехнологічних методів для їх масового розмноження.

Важливим етапом мікроклонального розмноження є індукція та проліферація пагонів. Для представників роду *Primula* найкращі результати отримано на живильному середовищі MS, доповненому 6-бензиламінопурином (БА) у концентрації 4,4–6,6 мкМ у поєднанні з індолілмасляною кислотою (ІВА) та GA_3 . За таких умов формувалося в середньому 3–4 пагони на один експлантат, що свідчить про високий регенераційний потенціал досліджуваних рослин.

Не менш важливим етапом є ризогенез і подальша акліматизація регенерантів. Використання ІВА у концентрації 2,5–5,0 мкМ забезпечувало майже стовідсоткове укорінення мікропагонів. Незважаючи на деяке зменшення довжини коренів порівняно з контролем, сформовані рослини характеризувалися високою життєздатністю та успішно переносили пересаджування в нестерильні умови.

Особливо перспективними є результати досліджень, спрямованих на оптимізацію умов пророщування насіння. Так, болгарськими вченими було встановлено, що поєднання синього спектра світла з обробкою гібереловою кислотою забезпечує проростання насіння *P.veris* на рівні до 95 %. Отримані рослини характеризувалися високою приживлюваністю після висаджування у відкритий ґрунт, що дозволило створити польові колекції та використати їх у програмах охорони виду.

Аналітичний огляд літературних джерел [27, 40, 64, 71] свідчить про значний потенціал біотехнологічних методів для збереження представників роду *Primula*. Зокрема, розроблені для споріднених видів протоколи можуть слугувати методичною основою для введення в культуру *in vitro* *P. minima* – рідкісного високогірного виду Карпат. Застосування методів мікроклонального розмноження дає змогу подолати природні обмеження, пов'язані з низькою схожістю насіння та фрагментацією популяцій, забезпечити створення колекцій і сформувати наукове підґрунтя для довготривалого збереження виду в умовах *ex situ* та його подальшої реінтродукції в природні екосистеми.

РОЗДІЛ II

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Характеристика об'єкту дослідження

Об'єктами дослідження слугували популяції двох видів (*P. minima* та *P. halleri*), а також насінневий матеріал і асептичні рослини *P. minima* та *P. halleri*.

Для аналізу популяційної структури *P. minima* було обрано популяцію, що зростає на південно-східному схилі гори Ребра Чорногірського хребта поблизу с. Ворохта Надвірнянського району Івано-Франківської області на висоті 1900 м н. р. м. Особливості популяційної структури *P. halleri* оцінювали на основі опрацювання та аналізу літературних джерел.

Під час виконання роботи застосовували біометричні та популяційні методи дослідження, а для аналізу поширення *P. minima* і *P. halleri* використовували сітковий метод картування ареалів.

2.2. Дослідження вікової структури популяцій видів

Особливості популяційної організації досліджуваних видів вивчали у 2023–2024 рр. під час польових експедиційних досліджень. Аналіз ценопопуляцій здійснювали на основі еколого-демографічного підходу, який передбачає детальне дослідження їхньої вікової структури.

Для дослідження чисельності та популяційного складу використовували 20 пробних площадок площею 0,25 м² (50 × 50 см), розміщених на обліковій території 10 × 10 м за регулярним принципом або методом випадкової вибірки [30]. У межах кожної площадки проводили облік особин, які надалі викопували

для визначення їхньої вікової належності, фактичного віку та накопиченої біомаси.

Вікову структуру особин оцінювали за двома показниками – біологічним і календарним віком. Для визначення календарного віку використовували підрахунок кількості вузлів на кореневищі. Водночас цей підхід забезпечує найбільшу точність під час встановлення віку молодих рослин. Для особин, які перебували на пізніх етапах онтогенетичного розвитку, додатково враховували наявність рубців від генеративних пагонів або їхніх залишків на кореневищі, що дозволяло підвищити точність вікової оцінки [30].

Для вивчення популяційної організації *P. minima* було закладено серію пробних площ, розташованих у місцях з різними екологічними умовами та ступенем антропогенного навантаження. Оцінку впливу антропогенних чинників здійснювали на ділянках, де особини виду формували суцільне фітогенне поле. Зважаючи на природоохоронний статус *P. minima* та необхідність забезпечення її збереження, більшість популяційних показників визначали безпосередньо в природних умовах без вилучення рослин. Для проведення біометричного аналізу відбирали мінімальну кількість матеріалу – не більше десяти особин з кожної досліджуваної популяції.

2.3. Асептичні умови культивування рослинних об'єктів *in vitro*

Для проведення експериментальних досліджень використовували асептичні проростки, а всі маніпуляції здійснювали в ламінарному боксі зі стерильним потоком повітря. Перед початком роботи внутрішні поверхні ламінарного боксу знезаражували за допомогою ультрафіолетового випромінювання. Лабораторний посуд та інструменти стерилізували шляхом автоклавування при тиску 2 атм протягом 60 хв або обробляли сухим жаром за температури 140–160 °C упродовж 150 хв. Живильні середовища піддавали стерилізації в автоклаві при тиску 0,7–0,8 атм і температурі 115 °C протягом 15 хвилин.

Під час приготування живильних середовищ враховували фізико-хімічні властивості компонентів, що входили до їх складу. Ауксини (2,4-Д та НОК) попередньо розчиняли в етиловому спирті з розрахунку 100 мг речовини на 0,5–2 мл розчинника, після чого суміш підігрівали та доводили дистильованою водою до об'єму 100 мл. Цитокініни – кінетин і 6-бензиламінопурин (БАП) – розчиняли в невеликому об'ємі 0,5 М розчину HCl, підігрівали до повного розчинення та доводили водою до необхідного об'єму. Вітаміни готували у вигляді водних розчинів концентрацією 1 мг/мл. Гіберелову кислоту (ГК₃) розчиняли в невеликій кількості 50 %-го метанолу з подальшим доведенням об'єму водою.

Методологічною основою культури клітин і тканин *in vitro* є три базові положення: вилучення експланта з материнського організму, його культивування в контрольованому штучному середовищі та підтримання асептичних умов під час усього процесу вирощування [42].

2.4. Введення в культуру *in vitro* *P. minima* та *P. halleri*

Введення *P. minima* та *P. halleri* в культуру *in vitro* здійснювали поетапно. На першому етапі досліджували особливості проростання насіння та отримували асептичні проростки обох видів. Другий етап передбачав оптимізацію умов вегетативного й мікроклонального розмноження, а також росту рослин у культурі *in vitro*. Надалі отримані регенеранти адаптували до нестерильних умов шляхом перенесення в умови *ex vitro*. Завершальним етапом було введення акліматизованих рослин у природні місцезростання з метою їх подальшого росту та розвитку.

2.5. Підбір умов для проростання *in vitro* насіння *P. minima* та *P. halleri*

Отримання асептичних проростків *P. minima* та *P. halleri* здійснювали шляхом поетапної стерилізації насіння. Насіннєвий матеріал спочатку

обробляли розчином детергенту (30 хв), після чого промивали проточною водою (30 хв) і 2–3 рази дистильованою водою. Далі насіння замочували у розчинах гіберелової кислоти (100 і 1000 мг/л) протягом 18–20 год, промивали стерильною водою (15 хв), обробляли 96% етанолом (10 с) та витримували у 5% розчині перексиду водню протягом 1 год. Завершальним етапом було 2–3-разове промивання стерильною дистильованою водою.

Після стерилізації насіння висаджували у чашки Петрі на агаризоване живильне середовище МС [58] без додавання регуляторів росту. Пророщування насіння здійснювали за температури +18...+20 °С, вологості 80 % та освітлення інтенсивністю 460 мкмоль/(м²·с).

2.6. Дослідження схожості насіння та підбір умов для вегетативного розмноження та росту *in vitro* *P. minima* та *P. halleri*

Для дослідження схожості насіння видів роду *Primula* насіння в динаміці упродовж року (від серпня (збір насіння) до червня місяця) за його збереження за кімнатної температури. А також за впливу холодової стратифікації і ГК₃. Для цього було сформовано такі варіанти: Контроль – холодова стратифікація; Варіант 1 – розчин ГК₃ у концентрації 100 мг/л; Варіант 2 – розчин ГК₃ у концентрації 1000 мг/л.

Для підбору умов вегетативного розмноження використовували асептичні рослини *P. minima* та *P. halleri* віком 1,5–2 місяці, отримані з насіння. Рослини піддавали живцюванню, при цьому середня довжина живців становила 15–20 мм, після чого їх переносили на рідкі живильні середовища для подальшого культивування.

Базовим живильним середовищем слугувало рідке середовище МС із половинною концентрацією мікро- та макроелементів (МС/2), яке доповнювали кінетином у концентрації 0,1 мг/л.

З метою прискорення інтеркалярного росту одержаних *in vitro* рослин *P. minima* та *P. halleri* використовували обробку гібереловою кислотою (ГК₃).

2.7. Підбір умов мікроклонального розмноження та адаптації рослин *P. minima* і *P. halleri* до умов *in vivo* та природного середовища

З метою оптимізації умов мікроклонального розмноження використовували живці 2–3-місячних рослин. У кожному варіанті дослідів випробовували по 11–12 експлантів. Для визначення оптимального складу поживного середовища МС/2 досліджували вплив різних комбінацій бензиламінопурину (БАП), α -нафтилоцтової кислоти (НОК), індолілоцтової кислоти (ІОК), гіберелової кислоти (ГК₃) та кінетину (Кін) на здатність живців *P. minima* формувати мікроклони. Ефективність мікроклонального розмноження оцінювали через 1–2 місяці культивування шляхом визначення частки рослин, здатних до утворення мікроклонів, а також середньої кількості мікроклонів на одну особину. Для підбору умов перенесення рослин *P. minima* та *P. halleri* з культури *in vitro* в умови *in vivo* було апробовано дві схеми: (1) перенесення отриманих пагонів у ґрунт із використанням перліту як проміжного субстрату; (2) безпосереднє перенесення укорінених *in vitro* рослин у нестерильні умови. У першому варіанті використовували живці довжиною 16–25 мм та 1,5–2-місячні укорінені рослини. Ефективність адаптації оцінювали за змінами морфометричних параметрів надземної частини рослин. Акліматизовані особини надалі переносили у природні місцезростання виду.

2.8. Статистична обробка результатів експериментів

З метою забезпечення достовірності результатів усі експерименти виконували у 3–5 повторностях. Статистичну обробку експериментальних даних проводили із застосуванням загальноприйнятих методів біостатистики [43, 61, 73] з використанням програмного забезпечення SigmaPlot for Windows.

Оцінювали наступні характеристики емпіричних розподілів:

Визначали середнє арифметичне за формулою:

$$M = \frac{\sum x}{n} \quad (1)$$

де $\sum x$ – сума варіантів досліджуваної сукупності,

n – їх кількість, об'єм сукупності,

M – середнє арифметичне.

Для кількісної оцінки мінливості у сукупностях вимірювань визначали середнє квадратичне відхилення за формулою:

$$\sqrt{\frac{\sum (x-M)^2}{n-1}} \quad (2)$$

де S – середнє квадратичне відхилення,

$\sum (x - M)^2$ – сума квадратів відхилень від середнього арифметичного,

$(n - 1)$ – зменшений на одиницю об'єм сукупності.

РОЗДІЛ III

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Особливості популяційної структури *P. minima* залежно від еколого-географічних умов зростання та впливу антропогенного фактору

Під час проведених досліджень було проаналізовано особливості популяційної організації *P. minima* в умовах заповідного режиму та на ділянках із різним ступенем витоптування (регулярним упродовж усього вегетаційного періоду та нерегулярним). У заповідних умовах спостереження здійснювали на чотирьох ділянках, де *P. minima* формує суцільні фітогенні поля та співіснує з такими видами, як *Carex sempervirens*, *Hieracium alpinum* і *Festuca supina*. Основну увагу приділяли аналізу особливостей онтогенезу рослин, щільності популяцій, вікової структури, механізмів самопідтримання, життєвості та інших популяційних характеристик, сукупність яких дозволяє оцінити сучасний стан популяції та її перспективи розвитку. Результати досліджень засвідчили, що характер онтогенетичного розвитку особин істотно залежить від умов існування популяції та інтенсивності впливу зовнішнього (збурювального) фактора.

У разі формування особинами *P. minima* суцільного рослинного покриву переважає типовий (магістральний) шлях онтогенезу – від проростків до сенільних стадій. Проте на етапі зрілих генеративних рослин (g_2) нерідко відбувається дезінтеграція особин, унаслідок чого вони набувають ознак поліцентричної біоморфи. Подібна особливість також характерна для старих генеративних екземплярів. Натомість у віргінільних (v), молодих генеративних (g_1) та постгенеративних (s , ss) рослин явища дезінтеграції не виявлено. За умов регулярного витоптування у *P. minima* формується виражена морфологічна мінливість, яка проявляється у партикуляції віргінільних і генеративних особин з утворенням дочірніх структур, подібних до

материнських, але зниженої життєздатності. Крім того, спостерігається часткове омолодження генеративних рослин через появу віргінільних елементів. Унаслідок інтенсивної партикуляції в структурі популяції переважають особини моноцентричного типу біоморф.

За умов нерегулярного витоптування, а також при тісному сусідстві *P. minima* з *H. alpinum*, *C. sempervirens* та *F. supina* перебіг онтогенезу загалом подібний до такого при регулярному витоптуванні, однак співвідношення між моноцентричними та виражено поліцентричними особинами в популяції є іншим. Зокрема, при регулярному витоптуванні, а також у ценозах із переважанням *F. supina* у структурі популяції *P. minima* домінують моноцентричні особини. Щільність досліджуваної популяції *P. minima* істотно варіює залежно від умов зростання. Так, на ділянці із суцільним фітогенним полем у заповідному режимі вона досягає 3000 екз./м², на території з регулярним витоптуванням – 3600 екз./м², у місцях співіснування з *H. alpinum* – 3400 екз./м², з *C. sempervirens* – 4600 екз./м², а з *F. supina* – 4100 екз./м².

Залежно від умов зростання змінюється й характер вікової структури популяції. У разі формування суцільного фітогенного поля максимум чисельності припадає на зрілі генеративні особини. За умов близького сусідства з *H. alpinum* та *F. supina* пік вікового спектра зміщується до молодих генеративних рослин. При співіснуванні з *C. sempervirens* спостерігається бімодальний розподіл із двома максимумами – у віргінільній та старшій генеративній фракціях. Регулярне витоптування зумовлює ускладнення вікової структури, внаслідок чого у спектрі з'являються три виразні піки чисельності: у віргінільній, зрілій генеративній та сенільній групах.

При нерегулярному витоптуванні у віковій структурі *P. minima* домінують віргінільні та сенільні особини (рис. 3.1). Переважання віргінільної фракції пояснюється, головним чином, партикуляцією генеративних рослин. Висока чисельність особин генеративної групи зумовлена, з одного боку, уповільненням проходження онтогенезу на генеративній стадії, а з іншого – здатністю генеративних рослин до партикуляції з утворенням дочірніх особин.

Збільшення частки сенільних рослин пов'язане як із прискореним старінням генеративних особин, так і з поповненням постгенеративної фракції за рахунок віргінільних рослин, які минають генеративний етап розвитку. Виявлені вікові спектри *P. minima* мають спільну ознаку – вони є повночленими, що свідчить про нормальний тип популяцій. Водночас різне співвідношення вікових груп відображає особливості переходу особин між онтогенетичними станами залежно від умов середовища та інтенсивності витоптування (рис. 3.1) [50, 62].

Самопідтримання чорногірської популяції *P. minima* здійснюється комбінованим шляхом – за рахунок генеративного та вегетативного розмноження. Висока чисельність генеративного потомства (до 16 ювенільних та іматурних особин на 100 см²) відмічена в умовах нерегулярного витоптування. У місцях близького сусідства з іншими видами цей показник є дещо нижчим, а в умовах регулярного витоптування – мінімальним. Низька щільність підросту також спостерігається на ділянках із суцільним покривом *P. minima*, де окремі особини концентруються переважно по периферії популяційних локусів. Підвищена смертність рослин характерна для умов регулярного витоптування, тоді як в інших випадках вона приблизно врівноважується появою нових генеративних і вегетативних особин. Вегетативне розмноження відбувається шляхом нормальної партикуляції, яка супроводжується неглибоким омолодженням дочірніх особин і слабким вегетативним розростанням. Найбільш інтенсивний ріст і розширення особин спостерігаються саме на ділянках із регулярним витоптуванням.

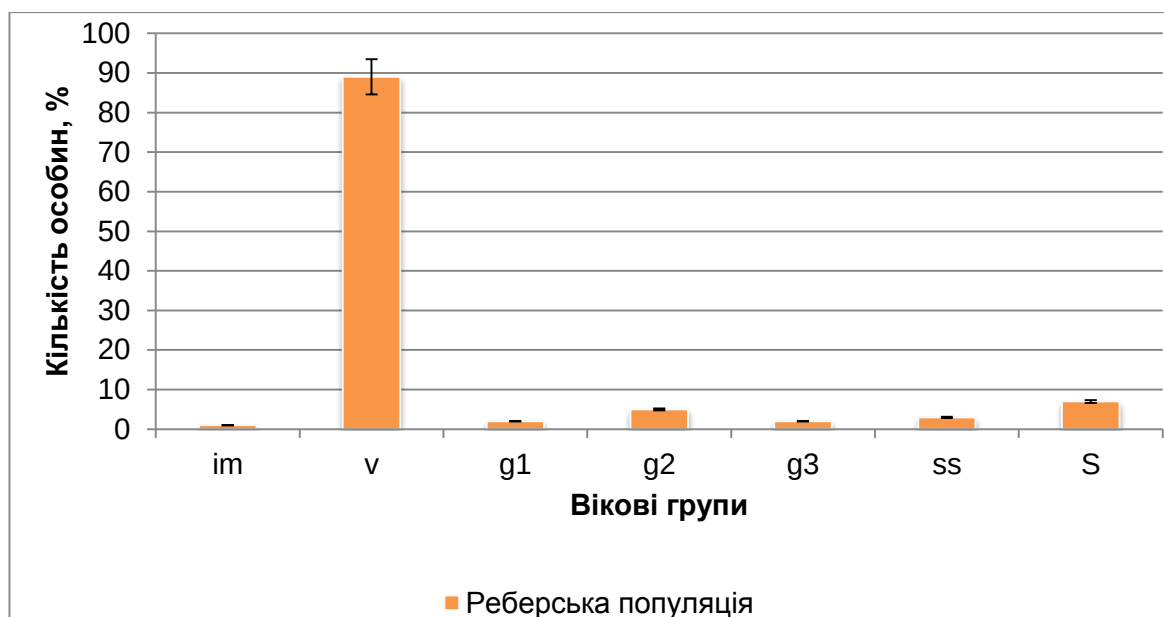


Рис. 3.1. Вікова структура *P. minima* (при нерегулярному вигоптуванні)

Кількість насінин на одному пагоні варіює у значних межах – від 0 до 28. Найвищі середні значення зафіксовані в умовах суцільного покриття *P. minima* ($22,4 \pm 3,0$ екз.), тоді як найнижчі показники характерні для ділянок із регулярним вигоптуванням (4–12 екз.). Водночас саме за умов інтенсивного вигоптування відмічено підвищену інтенсивність проростання насіння. Крім того, залежно від характеру сусідства *P. minima* з іншими видами спостерігається істотна варіабельність кількості насінин на пагін. У середньому 10–22% насіння у всіх варіантах є недорозвиненим.

Зміни диференціальних ознак чорногірської популяції *P. minima* під впливом сусідства з різними видами свідчать про часткове перекривання їх екологічних ніш. Такий процес можна розглядати як один із механізмів коекзистенції, що забезпечує сумісне існування видів та більш повне використання доступних ресурсів середовища. Водночас варіабельність параметрів популяції відображає її екологічну стійкість, яку визначають як здатність системи зберігати основні структурно-функціональні характеристики під впливом природних і антропогенних факторів та відносно швидко відновлювати їх у разі порушень [30, 66].

Основою стійкості популяцій є гетерогенність їх елементарного складу, яка проявляється у варіабельності тривалості життя особин, їх розмірів, функціональної ролі та здатності до морфологічних і онтогенетичних змін. Саме це забезпечує збереження цілісності популяційної системи навіть за часткової втрати окремих її компонентів. Найбільш виражені перебудови структури популяції *P. minima* відмічено в умовах регулярного витоптування. Такий вплив здатний порушувати цілісність популяційної системи та знижувати її стійкість, що свідчить про високу чутливість виду до інтенсивного антропогенного навантаження. Водночас конкурентні взаємодії між *P. minima* та іншими видами не становлять критичної загрози для існування популяції. У цілому результати досліджень дозволяють зробити висновок, що за умови усунення або істотного зменшення антропогенного впливу стан популяції *P. minima* в районі Чорногори є стабільним і не викликає занепокоєння щодо її подальшого існування.

3.2. Особливості структури *P. halleri* залежно від еколого-географічних умов зростання та впливу антропогенного фактору

Як зазначалося раніше, популяції цього виду нині збереглися лише на окремих масивах – Драгобраті, Герашесці, Петросі, Говерлі та Ненесці. Поодинокі екземпляри також фіксуються на вапнякових виходах у межах Свидовця, Чорногори та Мармароських гір, однак у таких випадках вони не формують стійких популяційних угруповань. Згідно з літературними даними [49, 74] та результатами власних досліджень, чисельність говерлянської та ненеської популяцій становить відповідно 150 і 700 особин. Щільність *P. halleri* у говерлянській популяції сягає $10,1 \pm 0,6$ особин/м², тоді як у ненеській – $2,8 \pm 0,1$ особин/м². Обидві популяції перебувають під охороною в умовах заповідного режиму. Відповідно до класифікації біоморф О. В. Смірної (1987), *P. halleri* належить до явнополіцентричних форм.

Самопідтримання популяцій *P. halleri* відбувається переважно за рахунок вегетативного розмноження, тоді як насіннєве відновлення має обмежене значення. Водночас репродуктивна ефективність цього виду значною мірою визначається рівнем антропогенного впливу та умовами мікросередовища. Подібні закономірності щодо чутливості репродуктивних процесів альпійських рослин до порушень середовища та рекреаційного навантаження відзначаються й у сучасних дослідженнях високогірних екосистем [33].

Зокрема, у говерлянській популяції, розташованій у важкодоступній для туристів зоні, показники плодоношення на генеративних пагонах та кількість насіння в плоді є вищими порівняно з ненеською популяцією, через яку проходять туристичні маршрути. Це узгоджується з даними про негативний вплив витоптування та рекреаційного навантаження на репродуктивні характеристики альпійських рослин [33].

Для *P. halleri* також встановлено, що популяційна структура, успішність розмноження та генетична різноманітність значною мірою залежать від фрагментації середовища та умов запилення, що додатково впливає на рівень насіннєвої продуктивності (табл. 3.1.) [33].

Таблиця 3.1

Насіннєва продуктивність *P. halleri* залежно від місцезростання

Місцезростання та режим використання	Плодів генеративному пагоні, к-ть	Насіння плодів, к-ть	Насіння особині, к-ть	Генеративні особини, шт	
				на 100 м ²	В угрупованні
г. Говерляна, важкодоступні для туристів	4	128	556	—	20
г. Ненєска, витоптування	—	—	—	—	240

Відомо, що малочисельні високогірні популяції Карпат можуть зберігати ознаки вікової структури нормальних повночленних популяцій навіть за низької загальної чисельності. У зв'язку з цим вікову структуру як диференціальний показник популяційних стратегій доцільно застосовувати не в усіх випадках. Водночас вважається, що поява відхилень від типового стану

повночленної популяції, особливо за умови домінування віргінільної фракції, може свідчити про дію екзогенних факторів, переважно антропогенного походження [33]. Досліджені говерлянська та ненеська популяції *P. halleri* віднесені до нормальних неповночленних популяцій із переважанням віргінільних особин (рис. 16). Оскільки обидві популяції знаходяться в межах заповідних територій, зафіксовані особливості їх вікової структури, ймовірно, зумовлені впливом природних факторів. Додатковим підтвердженням цього є загальна рідкісність виду в Українських Карпатах, обмежена кількість локалітетів та низька чисельність особин у кожній із популяцій.

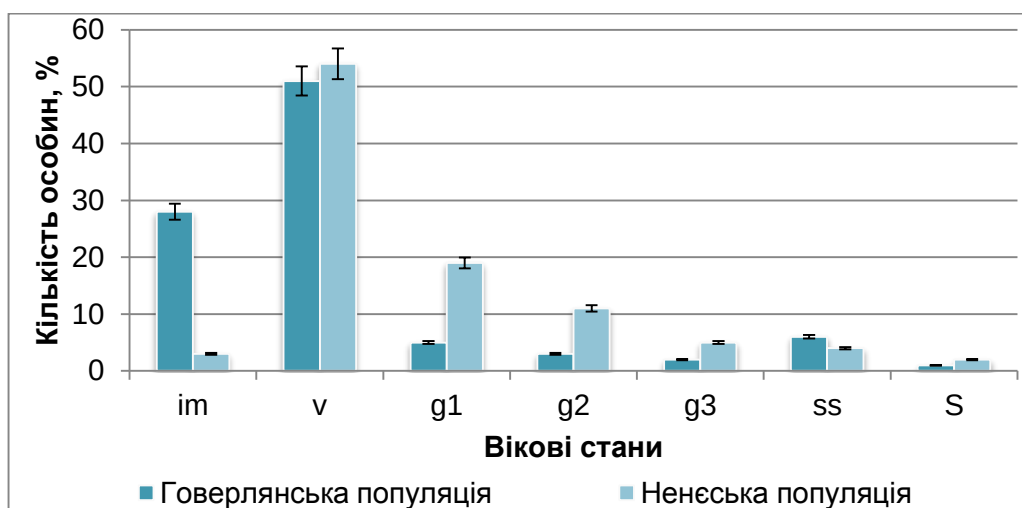


Рис. 3.2. Вікова структура говерлянської та ненеської популяцій *P. halleri*

3.3. Підходи до отримання та вкорінення *in vitro* рослин досліджуваних видів

Узагальнення літературних відомостей та результатів проведених досліджень стану популяцій досліджуваних видів засвідчує нагальну потребу у вжитті заходів щодо стабілізації чисельності деградованих популяцій *P. minima*, а також відновлення втрачених місцезростань шляхом реінтродукції. Водночас за умов зростаючого антропогенного впливу важливим завданням є забезпечення достатнього обсягу посадкового матеріалу *P. halleri*. Практика свідчить, що традиційні способи розмноження не завжди є достатньо

результативними для досягнення цієї мети. Зокрема, *P. minima* належить до видів, які характеризуються низькою стійкістю в культурі та можуть успішно підтримуватися лише за створення специфічних екологічних умов, зокрема відповідного субстрату та оптимального режиму зволоження, при цьому майже не утворюючи насіння [70]. У зв'язку з цим перспективним напрямом є використання сучасних біотехнологічних підходів, насамперед методів культури *in vitro* [70], що дають можливість отримати необхідну кількість рослин *P. minima* та *P. halleri* для подальшого збереження й відновлення їхніх природних популяцій [65].

Для одержання асептичного рослинного матеріалу насіння *P. minima* та *P. halleri*, зібране в природних місцезростаннях, піддавали поверхневій стерилізації. У результаті проведених досліджень встановлено, що найефективнішим способом стерилізації є обробка насіння 5%-м розчином перексиду водню (H_2O_2) протягом 60 хв із подальшим ретельним промиванням у стерильній дистильованій воді. За таких умов ефективність стерилізації становила 97–99 %. Дослідження особливостей проростання показали, що насіння обох видів здатне до проростання безпосередньо після досягання та збору. У *P. minima* поява перших проростків спостерігалась на 10-ту добу після висівання. Протягом вересня–жовтня проросло $32,7 \pm 1,6$ % насіння. Надалі, у листопаді, схожість повністю припинялася, а її повторне підвищення відзначалося лише у квітні, коли було зафіксовано максимальний показник проростання – $28,3 \pm 1,0$ %. У травні рівень схожості знову знижувався, тоді як у вересні спостерігалось незначне його зростання до $4,7 \pm 1,0$ %.

Для *P. halleri* встановлено дещо іншу динаміку проростання. Перші сходи з'являлися через 12 діб після посіву, а через 25–30 діб лабораторна схожість насіння досягала 85–90 % (рис. 3.3). Найвищі показники проростання реєстрували у травні–червні, тоді як упродовж листопада–січня насіння залишалося у стані спокою і не проростало.

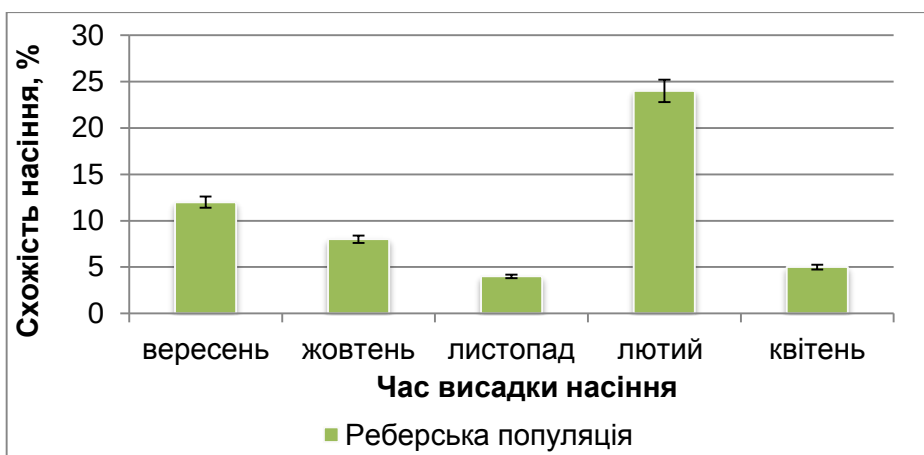


Рис. 3.3. Динаміка проростання 3-х річного насіння *P. minima* (реберська популяція)

Згідно з даними літературних джерел [28], насінню більшості представників роду *Primula* притаманний неглибокий простий або складний морфофізіологічний спокій, тоді як для окремих видів характерний глибокий морфофізіологічний спокій, що пов'язаний із недостатнім розвитком зародка [60, 72]. Одним із ефективних способів подолання фізіологічного спокою насіння є застосування гіберелової кислоти (ГК₃), ефективність якої залежить від виду [60, 72]. Результати проведених досліджень показали, що передпосівна обробка свіжозібраного насіння *P. minima* розчином ГК₃ у концентрації 1000 мг/л суттєво стимулює процес проростання, забезпечуючи підвищення схожості до 95 % (рис. 3.4). Водночас аналогічна обробка насіння *P. halleri* не сприяла покращенню показників проростання, що свідчить про видоспецифічні особливості регуляції стану спокою та механізмів його подолання (рис. 3.5).

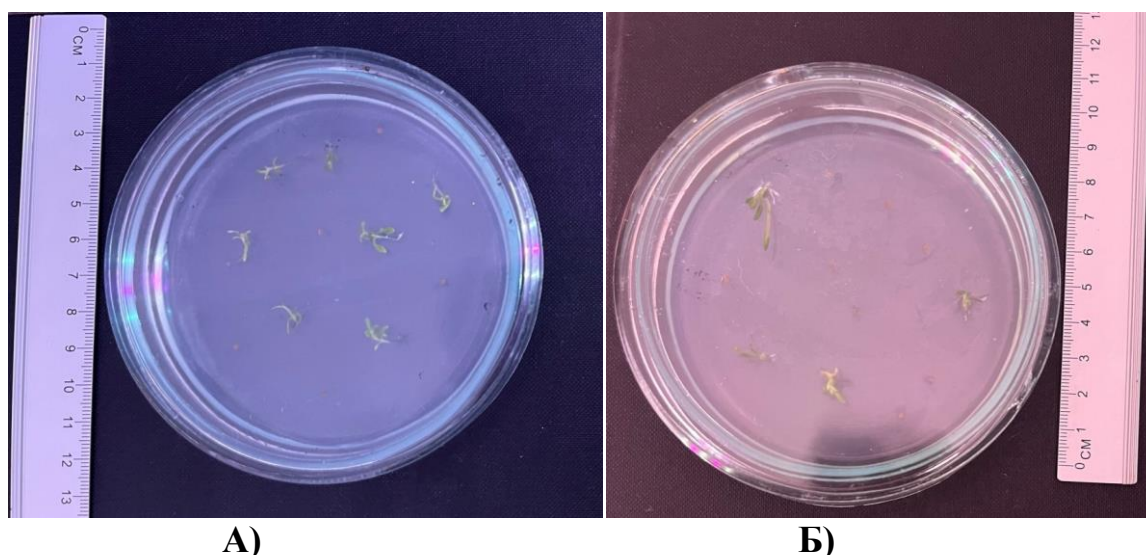


Рис. 3.4. Проростання насіння *P. minima* (А) та *P. halleri* (Б) на середовищі МС/2 без фітогормонів

Отримані результати вказують на відмінності у фізіологічних механізмах контролю спокою насіння досліджуваних видів та різну чутливість до екзогенного застосування гіберелової кислоти.

Насіння *P. minima* характеризувалося порівняно низькими показниками схожості. Ймовірно, у частини насінин на момент збору вже завершився період спокою, що забезпечувало їхню здатність до проростання. Однак за подальшого висівання насіння після 30 та 60 діб зберігання його схожість суттєво знижувалася (табл. 3.2).

Відомо, що стратифікація насіння за низьких позитивних температур (близько +4 °C) сприяє прискоренню процесів післязбирального дозрівання. Під впливом таких умов відбувається подальший розвиток зародка, супроводжуваний структурними та фізіолого-біохімічними змінами, які позитивно впливають на перебіг ростових процесів і, як наслідок, сприяють підвищенню схожості насіння [68].

Результати досліджень свідчать, що насіння виду *P. minima* характеризується потребою у тривалій сухій холодній стратифікації. Після одного місяця перебування в умовах стратифікації рівень схожості становив

лише $1,9 \pm 0,3\%$. Подовження цього періоду до шести місяців сприяло зростанню схожості до $27,7 \pm 0,7\%$. Водночас у періоди, несприятливі для проростання, показники схожості суттєво знижувалися або насіння взагалі не давало проростків (табл. 3.2).

Відомо, що під час стратифікації відбуваються зміни у гормональному статусі насіння, зокрема підвищується вміст гіберелової кислоти ($ГК_3$) у його тканинах [52]. Передпосівна обробка насіння, для якого характерний період післязбирального дозрівання, розчинами $ГК_3$ у концентраціях 100 та 1000 мг/л сприяє підвищенню показників схожості та енергії проростання. При цьому стимулювальний вплив фітогормона посилюється зі збільшенням його концентрації.

У ході досліджень встановлено, що передпосівна обробка насіння розчином $ГК_3$ після одного місяця холодної стратифікації лише незначною мірою впливає на загальну схожість. Водночас спостерігалось істотне підвищення енергії проростання: протягом перших 30 діб кількість пророслих насінин була у 1,5–2 рази більшою порівняно з контролем (табл. 3.2). Для насіння, яке перебувало в умовах холодної стратифікації два місяці, замочування в розчині $ГК_3$ виявилось більш ефективним, оскільки сприяло зростанню як енергії проростання, так і загальної схожості насіння.

Таблиця 3.2

Період висадки	Умови досліджу	Нормальні проростки	Аномальні проростки
Вересень	Контроль	$17,0 \pm 1,4$	-
	Варіант 1	$22,5 \pm 0,7$	-
	Варіант 2	$77,0 \pm 0,6$	-
Листопад <i>Стратифікація 2 місяці</i>	Контроль	$6,5 \pm 0,3$	-
	Варіант 1	$58,7 \pm 1,4$	-
	Варіант 2	$88,9 \pm 0,3$	-
Січень <i>Стратифікація 4 місяці</i>	Контроль	-	-
	Варіант 1	$31,2 \pm 1,6$	$64,4 \pm 1,4$
	Варіант 2	$6,2 \pm 0,7$	$84,5 \pm 1,5$
Квітень <i>Стратифікація</i>	Контроль	$36,9 \pm 0,9$	-
	Варіант 1	$46,6 \pm 1,7$	$18,8 \pm 1,0$

7 місяців	Варіант 2	10,1 $\pm$ 1,0	32,1 $\pm$ 0,8
Серпень Стратифікація 11 місяців	Контроль	3,5 $\pm$ 1,1	-
	Варіант 1	40,3 $\pm$ 0,7	-
	Варіант 2	69,0 $\pm$ 1,7	-

Після тримісячної холодної стратифікації (грудень) відзначено суттєве зниження схожості насіння. Крім того, для виду *P. minima* характерне формування значної кількості аномальних проростків, серед яких траплялися хлоротичні форми, проростки з потовщеним гіпокотилем, деформованими сім'ядолями та відсутнім первинним коренем. Встановлено пряму залежність між часткою аномальних проростків і концентрацією ГК₃ : зі збільшенням концентрації фітогормона їх кількість зростала. Водночас найбільший відсоток аномальних проростків спостерігався в періоди, несприятливі для проростання насіння. Навесні, коли насіння характеризувалося найвищою схожістю, частка таких проростків зменшувалася (табл. 3.2).

Зокрема, при висіванні насіння у січні після чотирьох місяців стратифікації та його попередньому замочуванні в розчині ГК₃ концентрацією 100 мг/л частка аномальних проростків становила 64,4 $\pm$ 1,4%, тоді як нормальних – 31,2 $\pm$ 1,6%. За підвищення концентрації ГК₃ до 1000 мг/л ці показники складали 84,5 $\pm$ 1,5% та 6,2 $\pm$ 0,7% відповідно. Після семимісячної стратифікації (квітень) і передпосівної обробки насіння розчином ГК₃ концентрацією 100 мг/л частка аномальних проростків знизилася до 18,8 $\pm$ 1,0%, а нормальних зросла до 46,6 $\pm$ 1,7%. При застосуванні розчину ГК₃ концентрацією 1000 мг/л кількість аномальних та нормальних проростків становила 32,1 $\pm$ 0,8% і 10,1 $\pm$ 1,0% відповідно. Отримані результати свідчать про те, що ефективність дії ГК₃ та характер проростання насіння *P. minima* значною мірою залежать як від концентрації регулятора росту, так і від тривалості стратифікації та сезонних особливостей прояву фізіологічного стану насіння.

Отже, результати проведених досліджень свідчать, що для підвищення схожості насіння *P. minima* у більшості випадків доцільним є його передпосівне

замочування в розчині ГК₃ концентрацією 100 мг/л. Водночас для стимулювання енергії проростання та підвищення схожості свіжозібраного насіння ефективнішою виявилася обробка розчином ГК₃ концентрацією 1000 мг/л.

За даними літератури, одним із ключових чинників, що визначають успішність проростання насіння, є температурний режим [29], а також умови освітлення. Проведені дослідження показали, що насіння *P. minima* проростає лише за температури +17...+22 °С. За низьких позитивних температур (+4...+7 °С) проростання не спостерігалось навіть після передпосівної обробки насіння розчинами ГК₃ (табл. 3.2).

Встановлено також суттєву залежність проростання від освітлення. Більшість насінин проростала лише за наявності світла при температурі від +16...+17 °С до +20...+22 °С. У темряві при температурі +22 °С проростання також відбувалося, однак показники схожості були дуже низькими і протягом перших трьох місяців після посіву становили лише $1,45 \pm 0,13\%$. Для порівняння, за аналогічний період на світлі схожість насіння досягала $33,7 \pm 1,6\%$.

Отримані результати узгоджуються з даними інших дослідників. Зокрема, за спостереженнями *Gustav Hegi*, протягом трирічного періоду на світлі проросло 99% насіння *P. minima*, тоді як у темряві проростання не відбувалося зовсім [62]. Як показали дослідження, насіння *P. minima* зберігає здатність до проростання протягом 3-х років. Динаміку проростання трьохрічного насіння *P. minima* представлено в табл. 3.2 та на рис. 3.3.

Таким чином, нами з'ясовано особливості протікання латентного періоду *P. minima* (г. Ребра). Встановлено, що умови, у яких відбувається формування і дозрівання насіння, істотно впливають на протікання латентного періоду досліджуваних видів.

3.4. Підбір умов для вегетативного розмноження і росту рослин *P. minima* та *P. halleri in vitro*

Під час дослідження особливостей вегетативного розмноження рослин *P. minima* було випробувано поживні середовища МС/2 без сахарози, до складу яких входили 0,5 мг/л індолілоцтової кислоти (ІОК), ГК₃ у концентраціях 0,2 та 0,5 мг/л, а також кінетин у межах 0,05–0,4 мг/л. Отримані результати показали, що найбільш ефективне вегетативне розмноження забезпечувало середовище МС/2, збагачене 0,5 мг/л ІОК, 0,5 мг/л ГК₃ та 0,05 мг/л кінетину (рис. 3.6).

Підвищення концентрації ГК₃ до 1,0 мг/л, а також додавання до середовища α -нафтилоцтової кислоти (НОК) у концентраціях 0,3–0,5 мг/л негативно впливало на ріст і розвиток рослин, спричиняючи пригнічення ростових процесів та появу морфологічних відхилень.

Встановлено, що для виду *P. halleri* вегетативне розмноження успішно відбувається на середовищі МС/2 без додавання регуляторів росту рослин, що свідчить про достатній рівень ендогенної гормональної регуляції цього процесу.



Рис. 3.6. Вегетативне розмноження *P. minima* на середовищі МС/2 без сахарози, доповненому 0,5 мг/л ІОК, 0,5 мг/л ГК₃, 0,05 мг/л Кін

3.5. Підбір умов для мікроклонального розмноження *P. minima* та *P. halleri*

Клональне мікророзмноження є методом масового вегетативного відтворення рослин у культурі тканин і клітин *in vitro*, який ґрунтується на тотипотентності рослинних клітин – їхній здатності регенерувати цілісний організм, зберігаючи генетичні та фенотипові характеристики материнської рослини. У результаті такого способу розмноження формуються клони, генетично ідентичні вихідному екземпляру. Метод мікроклонального розмноження має низку суттєвих переваг порівняно з традиційними способами вегетативного розмноження. Зокрема, він забезпечує значно вищий коефіцієнт розмноження, дозволяє отримувати велику кількість рослинного матеріалу на обмеженій лабораторній площі та є економічно ефективним. Крім того, під час культивування *in vitro* часто відбувається оздоровлення рослин від вірусних інфекцій та інших патогенів. Важливою перевагою є також можливість розмноження видів, які важко або практично неможливо відтворити традиційними вегетативними методами [32].

Інтенсивність мікроклонального розмноження залежить від біологічних особливостей виду, однак за сприятливих умов із однієї бруньки протягом року можна отримати від кількох тисяч до кількох мільйонів рослин-регенерантів [41]. Використання методу мікроклонального розмноження для видів *P. minima* та *P. halleri* забезпечило одержання значної кількості якісного посадкового матеріалу, необхідного для проведення заходів із реінтродукції та відновлення втрачених природних популяцій цих видів.

За даними літератури, ефективність мікроклонального розмноження визначається низкою чинників, серед яких найважливішими є тип експланта, склад поживного середовища та умови культивування [32]. Особливу роль у регуляції процесів морфогенезу та проліферації пагонів відіграють

фітогормони, концентрація та співвідношення яких значною мірою визначають успішність розмноження *in vitro*.

Використання методу мікроклонального розмноження для виду *P. minima* дало змогу отримати достатню кількість посадкового матеріалу, необхідного для проведення заходів із реінтродукції та відновлення природних популяцій. Для оптимізації умов культивування як експланти використовували живці завдовжки 10–17 мм. У всіх варіантах досліду їх висаджували на агаризовані або рідкі модифіковані середовища МС/2. Вибір цього середовища обумовлений його широким застосуванням у практиці мікроклонального розмноження рослин та високою ефективністю для культивування різних видів [32].

Для визначення оптимального складу поживного середовища досліджували вплив різних комбінацій БАП, НОК, ІОК, ГК₃ та Кін на здатність живців *P. minima* формувати мікроклони. Найкращі результати були отримані на середовищі МС/2, що містило 0,2 мг/л ІОК, 0,7 мг/л ГК₃, 0,03 мг/л Кін і 0,01 мг/л БАП (рис. 3.7). За таких умов середня кількість сформованих мікроклонів становила 2,3 на один експлант. Для виду *P. halleri* найвищу ефективність мікроклонального розмноження забезпечувало середовище МС/2, доповнене 0,1 мг/л кінетину та 0,05 мг/л ГК₃, що сприяло активному росту й утворенню нових пагонів.

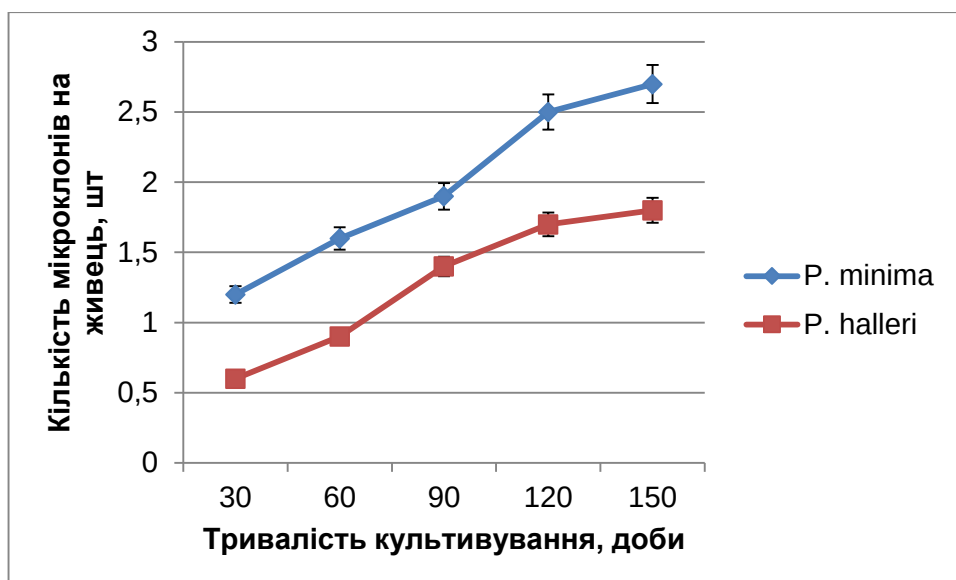


Рис. 3.7. Мікроклональне розмноження *P. minima* на середовищі МС/2, доповненому 0,2 мг/л ІОК, 0,7 мг/л ГКз, 0,03 мг/л Кін, 0,01 мг/л БАП та *P. halleri* на середовищі МС/2, доповненому 0,05 мг/л ГКз, 0,1 мг/л Кін,

3.6. Підбір умов для перенесення отриманих *in vitro* рослин видів *P. minima* та *P. halleri* у ґрунт

Використання біотехнологічних підходів відкриває широкі можливості для відновлення природних ареалів видів *P. minima* та *P. halleri*. Застосування методів мікроклонального та вегетативного розмноження *in vitro* дозволило отримати значну кількість посадкового матеріалу, необхідного для реінтродукції зниклих популяцій і збільшення чисельності тих, що зазнали суттєвого скорочення.

Важливим етапом біотехнологічного збереження рослин є розроблення ефективних способів адаптації рослин-регенерантів до природних умов після культивування *in vitro*. Перенесення рослин у середовище *in vivo* супроводжується значним стресом, унаслідок чого їхня приживлюваність та життєздатність часто знижуються.

За даними літератури, для підвищення ефективності акліматизації та вкорінення рослин, отриманих у культурі *in vitro*, як проміжний субстрат широко застосовують перліт. Його використання забезпечує сприятливі водно-повітряні умови для розвитку кореневої системи та сприяє високому рівню приживлюваності рослин після пересаджування в ґрунт.

З метою визначення оптимальних умов перенесення рослин *P. minima* та *P. halleri* з культури *in vitro* в умови *in vivo* було апробовано дві схеми акліматизації: (1) перенесення отриманих пагонів у ґрунтовий субстрат через проміжний етап укорінення в перліті; (2) безпосереднє висаджування рослин, укорінених *in vitro*, у ґрунт без використання перехідного субстрату (рис. 3.8). Порівняння результатів дозволило оцінити ефективність кожного із запропонованих підходів та визначити найбільш придатний спосіб адаптації рослин до умов зовнішнього середовища.



Рис. 3.8. Рослина *P. minima* у ґрунті

Для реалізації першого варіанта акліматизації використовували живці завдовжки 16–25 мм, а також укорінені рослини віком 1,5–2 місяці. Ефективність адаптації рослин до нових умов оцінювали за змінами морфометричних показників надземної частини. Встановлено, що після 1,5 місяця культивування на середовищі МС/2 з додаванням перліту довжина

пагонів у рослин, отриманих із живців, збільшувалася приблизно в 1,5 раза, тоді як у попередньо укорінених рослин – майже вдвічі.

Отримані результати свідчать про важливу роль сформованої кореневої системи в процесах адаптації. Наявність коренів забезпечує ефективне поглинання мінеральних елементів із поживного середовища, їх транспорт по рослині та подальше використання в метаболічних процесах, пов'язаних із ростом і розвитком.

Після формування кореневої системи в перліті рослини обережно звільняли від залишків живильного середовища та висаджували в ґрунт, відібраний із природних місцезростань відповідних видів. За таких умов приживлюваність рослин становила 5% для *P. minima* та 21% для *P. halleri*.

У другому варіанті досліду укорінені *in vitro* рослини протягом 10–14 діб додатково культивували на середовищі МС/2 без сахарози та регуляторів росту. Після цього їх відмивали від залишків середовища та переносили у ґрунт аналогічно до першої схеми. Застосування такого підходу забезпечило вищі показники приживлюваності: для *P. minima* вони становили 10%, а для *P. halleri* – 47%.

Ймовірно, покращення адаптації рослин було пов'язане з відсутністю сахарози у живильному середовищі. З одного боку, це сприяло поступовому переходу рослин до автотрофного типу живлення та полегшувало їх адаптацію до ґрунтових умов. З іншого боку, відсутність легкодоступного джерела вуглецю знижувала ризик розвитку мікроорганізмів у прикореневій зоні, що позитивно позначалося на виживанні рослин після пересаджування.

3.7. Реінтродукція природних популяцій видів *Primula*

Рослини *P. minima* та *P. halleri*, отримані в культурі *in vitro*, у першій декаді червня були висаджені в розсадниках Інституту екології Карпат НАН України, розташованих на горі Пожижевська на висоті 1360–1430 м над рівнем моря. Висаджування проводили безпосередньо поблизу природних особин

відповідних видів, що забезпечувало максимально наближені до природних умови зростання.

Оцінка результатів реінтродукції наприкінці вегетаційного сезону (друга половина вересня) показала, що приживлюваність рослин становила 17% для *P. minima* та 55% для *P. halleri*. Значно нижчий рівень виживання рослин *P. minima*, ймовірно, пов'язаний із несприятливими погодними умовами на початкових етапах адаптації. Зокрема, упродовж червня спостерігався тривалий період посухи, а відсутність належного затінення в розсаднику сприяла інтенсивному впливу сонячної радіації, що могло негативно позначитися на водному балансі та життєздатності рослин.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що тривалість онтогенетичного розвитку та особливості самопідтримання популяцій залежать від еколого-географічних умов місцезростань. Найбільш суттєві зміни у структурі популяцій *P. minima* спостерігаються на ділянках, які зазнають інтенсивного антропогенного навантаження, зокрема регулярного витоптування та випасання худоби. За таких умов віковий спектр характеризується наявністю трьох максимумів чисельності, що припадають на віргінільну, зрілу генеративну та сенільну групи особин, а також підвищеним рівнем їх відпаду. Тривалий вплив зазначених чинників може спричинити порушення популяційної структури, зниження її стабільності та послаблення здатності до самовідновлення.

2. Популяційні дослідження показали, що говерлянська та ненеська популяції *P. halleri* належать до нормальних неповночлених популяцій із переважанням віргінільних особин. Оскільки обидві популяції зростають на заповідних територіях, особливості їх вікової структури, ймовірно, зумовлені впливом природних чинників.

3. З'ясовано, що насіння *P. minima* та *P. halleri* здатне проростати відразу після збору. Оптимальними умовами для стерилізації є витримування насіння *P. minima* та *P. halleri* у 5% розчині H_2O_2 протягом 1 год. з наступним відмиванням у стерильній дистильованій воді (ефективність стерилізації складала 97-99%).

4. Визначено, що найкраще процес вегетативного розмноження *P. minima* відбувається на середовищі МС/2, доповненому 0,5 мг/л ОК, 0,5 мг/л ГКз та 0,05 мг/л Кін; *P. halleri* – на середовищі МС/2 без фітогормонів.

5. Досліджено, що процес мікроклонального розмноження *P. minima* найкраще відбувається середовищі МС/2, доповненому 0,2 мг/л ІОК, 0,7 мг/л ГКз, 0,03 мг/л Кін, 0,01 мг/л БАП; *P. halleri* – на середовищі МС/2,

доповненому 0,1 мг/л Кін та 0,05 мг/л ГКз. Кількість мікроклонів у розрахунку на один живець становила 2,3 шт. та 4,5 шт., відповідно.

6. Виявлено, що найефективнішою схемою адаптації рослин *P. minima* та *P. halleri*, отриманих біотехнологічними методами, при перенесенні з умов *in vitro* в умови *in vivo* є безпосереднє висаджування у ґрунт. За такого способу приживлюваність рослин становила 10 % для *P. minima* та 47 % для *P. halleri*.

7. Результати досліджень показали, що відсоток приживання рослин *P. minima* та *P. halleri* у розсадниках Інституту екології Карпат НАНУ, розташованих на г. Пожижевська, на висотах 1360 – 1430 м н.р.м. становив 17% та 55%, відповідно.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андрієвський В. В., Врублевський А. Т., Філіпова Л. М., Мацкевич В. В., Мацкевич О. В. Проблеми мікроклонального розмноження фундука. *Агробіологія*. 2019. № 1. С. 74–84. DOI: 10.33245/2310-9270-2019-146-1-74-84.
2. Войтовська В. І., Заболотна А. В., Кецкало В. В., Ковтунюк З. І. Клональне мікророзмноження. *Новітні агротехнології*. 2023. Т. 11, № 1. DOI: 10.47414/па.11.1.2023.277429.
3. Денчиля-Сакаль Г. М., Ніколайчук В. І., Терек В. О. Мікроклональне розмноження рослин *Trifolium pratense* L. *Науковий вісник Ужгородського університету*. Серія: Біологія. 2010. Вип. 28. С. 1–4.
4. Дідух Я. П. (ред.). Червона книга України. Рослинний світ. Київ : Глобалконсалтинг, 2009. 912 с.
5. Івченко Т. В., Мозговська Г. В., Віценя Т. І., Баштан Н. О., Мірошніченко Т. М. Методичні підходи щодо селекції та сучасних технологій розмноження і вирощування батату (*Ipomoea batatas* L.) : методичні рекомендації. Селекційне : ІОБ НААН, 2018. 36 с.
6. Кияк В. Г. Зміни структури популяцій рідкісних та ендемічних видів рослин високогір'я Карпат під впливом антропогенних чинників. *Наукові основи збереження біотичної різноманітності*. 2013. Т. 4 (11), № 1. С. 111–122.
7. Кобів Ю. Й. Популяційна структура рідкісних видів рослин Українських Карпат. Львів : Інститут екології Карпат НАН України, 2009. 400 с.
8. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ, 2005. 730 с.
9. Кушнір Г. П. Стан і перспективи клонального мікророзмноження рослин в Україні. *Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть*. 2001. Т. 1. С. 484–500.
10. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. Київ : Наукова думка, 2005. 270 с.

11. Лавриненко Ю. О., Балашова Г. С., Базалій В. В. Формування мікробульб картоплі в культурі *in vitro* залежно від температури та інтенсивності освітленості. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017. Т. 21. С. 57–61.
12. Лавриненко Ю. О., Балашова Г. С., Котова О. І. Культивування рослин картоплі *in vitro* за мікроклонального розмноження. *Вісник аграрної науки*. 2016. № 11. С. 43–47.
13. Лісовий М. М. Особливості отримання асептичної культури *Thuja occidentalis* L. в умовах *in vitro*. *Науковий вісник НЛТУ України*. 2017. Вип. 27 (9). С. 27–29. DOI: 10.15421/40270905.
14. Малиновський К. А., Царик Й. В. Збереження біорізноманіття Українських Карпат. Львів : Ліга-Прес, 2002. 248 с.
15. Мацкевич О. В., Кімейчук І. В., Мацкевич В. В., Карпук Л. М. Мікроклональне розмноження фундука. *Вісник Уманського національного університету*. 2022. № 1. С. 106–115. DOI: <https://doi.org/10.31395/2310-0478-2022-1-106-115>.
16. Мацкевич В. В., Подгаєцький А. А., Філіпова Л. М. Мікроклональне розмноження окремих видів рослин (протоколи технологій) : науково-практичний посібник. Біла Церква : БНАУ, 2019. 85 с.
17. Мацкевич В. В., Філіпова Л. М., Олешко О. Г. Фізіологія та біотехнологія рослин : підручник. Біла Церква : БНАУ, 2022. 427 с.
18. Мацкевич О. В., Кімейчук І. В., Мацкевич В. В., Павліченко А. А. Трофічні та фітогормональні детермінанти онтогенезу *in vitro*. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. Серія: Агрономія і біологія. 2022. Вип. 2 (48). С. 111–123. DOI: 10.32845/agrobio.2022.2.16.
19. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин : підручник. Київ : Поліграфконсалтинг, 2003. 520 с.
20. Олійник О. О., Клюваденко А. А., Мельничук М. Д. Покращення складу середовищ для підвищення росту і розвитку троянди ефіроолійної в культурі *in vitro*. *Науковий вісник НЛТУ України*. 2016. Вип. 26 (7). С. 134–139.

21. Подгаєцький А. А., Мацкевич В. В., Подгаєцький А. Ан. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин : монографія. Біла Церква : БНАУ, 2018. 208 с. Рудишин С. Д. Основи біотехнології рослин : навчальний посібник. Вінниця : МП «Запал», 1998. 224 с.
22. Сатарова Т. М., Абраїмова О. Є., Вінніков А. І., Черенков А. В. Біотехнологія рослин : навчальний посібник. Дніпропетровськ : Адверта, 2016. 136 с.
23. Стадник А. П., Мацкевич В. В., Філіпова Л. М., Пасічник Т. В. Деконтамінація та первинне культивування експлантів *Agapanthus sp.* *Агроекологічний журнал*. 2015. № 2. С. 106–111.
24. Субін О. В. Мікроклональне розмноження суниці садової (*Fragaria × ananassa* Duch.) сорту Аліна в культурі *in vitro*. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України*. Серія: Біологія, біотехнологія, екологія. 2015. Вип. 214. С. 281–288.
25. Тасенкевич Л. О. Флора Карпат: сучасний стан, проблеми охорони та збереження. Львів : Інститут екології Карпат НАН України, 2014. 520 с.
26. Чопик В. І., Федорончук М. М. Флора Українських Карпат. Тернопіль : Навчальна книга – Богдан, 2015. 712 с.
27. Bunn E., Turner S. R. Plant conservation biotechnology. In: Plant Conservation Science and Practice. Cambridge : *Cambridge University Press*, 2012. P. 320–343.
28. Baskin J. M., Baskin C. C. The great diversity in kinds of seed dormancy: a revision of the Nikolaeva-Baskin classification system for primary seed dormancy. *Seed Science Research*. 2021. Vol. 31, № 4. P. 249–277. DOI: 10.1017/S096025852100026X.
29. Batlla D., Benech-Arnold R. L. A framework for the interpretation of temperature effects on dormancy and germination in seed populations showing dormancy. *Seed Science Research*. 2015. Vol. 25, № 2. P. 147–158. DOI: 10.1017/S0960258514000452.

30. Begon M., Townsend C. R., Harper J. L. Ecology: From Individuals to Ecosystems. 4th ed. *Oxford* : Blackwell Publishing, 2006. 738 p.
31. Bernareggi G., Cerabolini B., Piotti A., Raimondi B. Seed germination and conservation of endangered species from the Italian Alps: *Physoplexis comosa* and *Primula glaucescens*. *Biological Conservation*. 2004. Vol. 117, № 3. P. 351–356. DOI: 10.1016/j.biocon.2003.12.011.
32. Cardoso J. C., Gerald L. T. S., Teixeira da Silva J. A. Micropropagation in the twenty-first century. *Methods in Molecular Biology*. 2018. Vol. 1815. P. 17–46. DOI: 10.1007/978-1-4939-8594-4_2.
33. Chardon N. I., Stone P., Hilbert C., Maclachlan T., Ragsdale B., Zhao A., Goodwin K., Collins C. G., Hewitt N., Elphinstone C. Species-specific responses to human trampling indicate alpine plant size is more sensitive than reproduction to disturbance. *Plants*. 2023. Vol. 12, № 17. Art. 3040. DOI: 10.3390/plants12173040.
34. Chardon N. I., Wipf S., Rixen C., Beilstein A., Doak D. F. Local trampling disturbance effects on alpine plant populations and communities: negative implications for climate change vulnerability. *Global Change Biology*. 2018. Vol. 24, № 3. P. 1274–1287. DOI: 10.1111/gcb.13952.
35. Cherepanyn R. M. Changes in vitality of populations of rare arctic-alpine plant species in high mountain part of the Ukrainian Carpathians under the influence of climatic factors. *Studia Biologica*. 2019. Vol. 13, № 1. P. 71–84. DOI: 10.30970/sbi.1301.582.
36. Cherepanyn R. M. Effect of climate changes on the habitat of rare arctic-alpine plant species in the high mountain part of the Ukrainian Carpathians. *Studia Biologica*. 2018. Vol. 12, № 1. P. 55–66. DOI: 10.30970/sbi.1201.544.
37. Chytrý M. (Ed.). Vegetation Survey: A New Focus for Applied Vegetation Science. Cham : Springer, 2020. 469 p.
38. de Vos J. M., Keller B., Isham S. T., Kelso S., Conti E. Reproductive implications of herkogamy in homostylous primroses: variation during anthesis and reproductive assurance in alpine environments. *Functional Ecology*. 2012. Vol. 26, № 4. P. 854–865. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2012.02016.x.

39. Elzinga C. L., Salzer D. W., Willoughby J. W. Measuring and Monitoring Plant Populations. Denver : Bureau of Land Management, 1998. 477 p.
40. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2011. Vol. 47. P. 5–16. DOI: 10.1007/s11627-010-9327-2.
41. Fehér A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10. Art. 536. DOI: 10.3389/fpls.2019.00536.
42. George E. F., Hall M. A., De Klerk G.-J. Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd ed. *Dordrecht : Springer*, 2008. Vol. 1. 501 p.
43. Gotelli N. J., Ellison A. M. A Primer of Ecological Statistics. 2nd ed. Sunderland : *Sinauer Associates*, 2013. 614 p.
44. Holobiuc I., Blindu R. *In vitro* culture introduction for ex situ conservation of some rare plant species. *Contribuții Botanice*. 2007. Vol. 42. P. 129–138.
45. Hu C. M., Kelso S. Primulaceae. Flora of China. Vol. 15. Beijing : Science Press ; St. Louis : *Missouri Botanical Garden Press*, 1996. P. 99–185.
46. Jędrzejczyk I., Morozowska M., Nowińska R., Jagodziński A. *Primula veris* plants derived from in vitro cultures and from seeds: genetic stability, morphology, and seed characteristics. *Turkish Journal of Botany*. 2018. Vol. 42, № 4. P. 412–422. DOI: 10.3906/bot-1802-7.
47. Kelso S. *Primula*. Flora of North America. Vol. 8. New York ; Oxford : Oxford University Press, 2009. URL: <https://floranorthamerica.org/Primula> (дата звернення: 20.06.2026).
48. Kent M. Vegetation Description and Data Analysis: A Practical Approach. 2nd ed. Chichester : Wiley-Blackwell, 2012. 428 p.
49. Kobiv Y. Ecological characteristics of rare plant species in the Ukrainian Carpathians. *Український ботанічний журнал*. 2010. Т. 67. С. 832–844.
50. Körner C. Alpine Plant Life: Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems. 2nd ed. Berlin ; Heidelberg : Springer, 2003. 344 p.

51. Konečná V., Nowak M. D., Kolář F. Parallel colonization of subalpine habitats in the central European mountains by *Primula elatior*. *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9. Art. 3294. DOI: 10.1038/s41598-019-39876-5.
52. Lewak S. Metabolic control of embryonic dormancy in apple seed: seven decades of research. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2011. Vol. 33. P. 1–24. DOI: 10.1007/s11738-010-0524-8.
53. Lohar P. S. Textbook of Biotechnology. Hawthorne, CA : MJP Publisher, 2019. 774 p.
54. Mast A. R., Kelso S., Conti E. Are any primroses (*Primula*) primitively monomorphic? New insights from the evolution of distyly. *Evolution*. 2006. Vol. 60, № 4. P. 926–942.
55. Mohamed A. E. Somaclonal variation in micro-propagated strawberry detected at the molecular level. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2007. Vol. 9, № 5. P. 721–725.
56. Miller E., Holcomb E. Effect of GA₃ on germination of *Primula vulgaris* Huds. and *Primula* × *polyantha* Hort. *HortScience*. 1982. Vol. 17, № 5. P. 814–815. DOI: 10.21273/HORTSCI.17.5.814.
57. Morozowska M., Cieszkowski A., Polskiego W. In vitro clonal propagation of *Primula veris* L. and preliminary phytochemical analysis. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*. 2004. Vol. 46. P. 169–175.
58. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
59. Phillips G. C., Garda M. Plant tissue culture media and practices: an overview. In *Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*. 2019. Vol. 55, № 3. P. 242–257. DOI: 10.1007/s11627-019-09983-5.
60. Qin Y., Geng B., Yang L.-E., Peng D. Non-deep physiological dormancy and germination characteristics of *Primula florindae* (*Primulaceae*), a rare alpine

plant in the Hengduan Mountains of southwest China. *PeerJ*. 2023. Vol. 11. Article e15234. DOI: 10.7717/peerj.15234.

61. Quinn G. P., Keough M. J. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge : Cambridge University Press, 2002. 537 p.

62. Reisch C., Kellermeier J. Microscale variation in alpine grasslands: AFLPs reveal a high level of genotypic diversity in *Primula minima*. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2007. Vol. 155, № 4. P. 549–556. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2007.00699.x.

63. Richards A. J. *Primula*. 2nd ed. London : B. T. Batsford Ltd., 2003. 346 p.

64. Sarasan V. et al. Conservation in vitro of threatened plants — progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2006. Vol. 42. P. 206–214. DOI: 10.1079/IVP2006769.

65. Sitek E., Nowak B., Fecowicz M., Gajewski Z., Dańda P., Kapala K., Kozik-Dąbek B. Application of horticultural and tissue culture methods for ex situ conservation of endangered *Primula farinosa* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2020. Vol. 89. Article 8913. DOI: 10.5586/asbp.8913.

66. Silvertown J., Charlesworth D. *Introduction to Plant Population Biology*. 4th ed. Oxford : Blackwell Science, 2001. 347 p.

67. Stanilova M., Petrova M., Grigorova I., Traykova B., Yankova-Tsvetkova E. The establishment of an ex situ collection of *Primula veris* in Bulgaria. *Plants*. 2022. Vol. 11, № 22. Art. 3018. DOI: 10.3390/plants11223018.

68. Suteesh V., Jijeesh C., Divya T. et al. Seeds: ecological, biogeography, and evolution of dormancy and germination. In: *Seed Biology*. Singapore : Springer, 2023. P. 31–34.

69. Tasenkevich L. *Vegetation of the Ukrainian Carpathians and Problems of Biodiversity Conservation*. Lviv : Institute of Ecology of the Carpathians NAS of Ukraine, 2012. 384 p.

70. Tütüncü M. *In vitro* culture of *Primula*: a review. *International Journal of Agricultural and Natural Sciences*. 2020. Vol. 13, № 2. P. 118–125.

71. Tyagi R. K., Agrawal A. Plant Tissue Culture Techniques and Applications. New Delhi : IK International Publishing House, 2010. 461 p.
72. Yang Y., Baskin C. C., Baskin J. M., Huang L., Sun H., Peng D. Cold stratification, temperature, light, GA₃ and KNO₃ effects on seed germination of *Primula beesiana* from Yunnan, China. *Plant Diversity*. 2020. Vol. 42, № 3. P. 168–173. DOI: 10.1016/j.pld.2020.01.003.
73. Zar J. H. Biostatistical Analysis. 5th ed. Upper Saddle River : Prentice Hall, 2010. 944 p.
74. Zhang L.-R., Conti E., Keller B., Nowak M. D. Development of 12 polymorphic microsatellite loci in the high alpine perennial *Primula halleri* (Primulaceae). *Applications in Plant Sciences*. 2013. Vol. 1, № 12. Article e1300052. DOI: 10.3732/apps.1300052.