

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ПРОРОСТАННЯ *IN VITRO* НАСІННЯ РІДКІСНИХ ВИДІВ *LIGULARIA SIBIRICA* (L.) CASS. ТА *SENECIO BESSERIANUS* MINDER. (РОДИНА ASTERACEAE)

І. П. СТАШКІВ  0009-0004-3988-4509
М. З. ПРОКОП'ЯК  0000-0002-2846-4208
Л. Р. ГРИЦАК  0000-0002-2872-5201
Н. М. ДРОБИК  0000-0002-8927-8687

Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка,
вул. Максима Кривоноса, 2, м. Тернопіль, 46027, Україна
e-mail: stashkiv@chem-bio.com.ua

Мета. Підібрати ефективний протокол стерилізації та оптимізації умов проростання насіння рідкісних і вразливих видів *Ligularia sibirica* (L.) Cass. та *Senecio besserianus* Minder, занесених до Червоної книги України, для їх подальшого введення в культуру *in vitro* та мікроклонального розмноження. **Методи.** Проведено порівняння чотирьох схем стерилізації насіння і протестовано вплив п'яти варіантів його попереднього замочування (дистильована вода, індол-3-масляна кислота, бурштинова кислота, гіберелова кислота, барботування) з подальшим висаджуванням на середовище MS/2. Оцінено показники кінцевий відсоток проростання (FGP), середньодобове проростання (MDG), середній час проростання (MGT), індекс проростання (GI). Для аналізу даних визначали середнє значення та стандартну похибку ($M \pm SE$). Достовірність відмінностей між варіантами оцінювали за рівнями статистичної значущості $p < 0,05$. **Результати.** Ефективною для обох видів була схема стерилізації із застосуванням 96 % етанолу, 15 % перексиду водню та фунгіциду на основі беномілу (фунгіцид системної дії Фундазол), що забезпечила 100 % стерильність. Для *L. sibirica* найбільші показники проростання виявлено після попереднього замочування в бурштиновій та індол-3-масляній кислоті (FGP 86,67 %). Для *S. besserianus* оптимальним було замочування у дистильованій воді (FGP 40 %). Гіберелова кислота в протестованій концентрації 0,1 мг/мл не показала позитивного впливу на проростання насіння обох видів. Барботування у більшості випадків подовжувало MGT та знижувало GI. **Висновки.** Запропонована схема стерилізації з фунгіцидом на основі беномілу забезпечує надійне отримання стерильного та життєздатного насінневого матеріалу *L. sibirica* та *S. besserianus*. Для *S. besserianus* схожі дані отримані за використання схеми стерилізації на основі 15 % перексиду водню без беномілу. На основі проаналізованих чотирьох показників проростання насіння встановили, що бурштинова кислота є найбільш ефективною для стимуляції проростання *L. sibirica*, тоді як для *S. besserianus* оптимальним виявилось замочування у дистильованій воді.

Ключові слова. проростання насіння, культура *in vitro*, стерилізація, регулятори росту, стратифікація, передпосівна обробка, барботування.

Вступ. Зменшення біорізноманіття є однією з провідних глобальних екологічних проблем, що загрожує стабільності природних екосистем і збереженню генофонду рідкісних видів рослин (IUCN Red List of Threatened Species). За даними глобальної оцінки IPBES (Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services) понад мільйон видів (рослин і тварин) перебуває під загрозою зникнення внаслідок антропогенного впливу (IPBES Global Assessment Report, 2019).

Згідно IUCN Red List of Threatened Species, з описаних понад 30 000 видів рослин більше 40 % класифіковані як такі, що перебувають під загрозою зникнення. За 250 років зникло понад 600 видів рослин (Humphreys, 2019). Особливо вразливими є види з обмеженим ареалом, малими популяціями та специфічними екологічними вимогами, для яких деградація середовища призводить до стрімкого скорочення чисельності.

Сучасні підходи до збереження рідкісних рослин охоплюють поєднання *in situ* та *ex situ* стратегій, що включають охорону природних популяцій, менеджмент місць зростання, створення насіннєвих і генетичних банків, підтримання колекцій у ботанічних садах, а також розробку технологій реінтродукції. Ефективні моделі збереження біорізноманіття ґрунтуються на комплексному аналізі особливостей хорології видів, дослідженні структури та динаміки популяцій, оцінці процесів відновлення у природних умовах і використанні біотехнологічних інструментів, які дозволяють компенсувати низьку природну схожість насіння та нестабільність природного відтворення видів (Kolisnyk et al., 2023).

Біотехнологічні методи, зокрема культура *in vitro*, відіграють важливу роль у збереженні рідкісних і зникаючих рослин, оскільки забезпечують контрольовані умови розмноження незалежно від сезонності, стану природних популяцій чи екологічних обмежень. Проростання насіння — ключовий початковий етап введення рослин в культуру *in vitro*, під час якого усуваються бар'єри фізіологічного та морфологічного спокою насіння. Це забезпечує підвищення відсотка схожості та дозволяє отримувати життєздатні проростки для подальшого мікроклонального розмноження.

Використання регуляторів росту, біостимуляторів і різних схем попередньої підготовки насіння значно розширює можливості кращого його проростання і загалом відновлення рідкісних видів у контрольованих умовах. Цей етап вважається найчутливішою фазою онтогенезу рослин, на яку впливають внутрішні (фітогормони) і зовнішні (абіотичні і біотичні фактори) чинники (Linkies, Leubner-Metzger, 2012). Залежно від виду рослин і типу спокою, в якому перебуває насіння, використовують різні методи його подолання: скарифікація, стратифікація, видалення інгібіторів або обробка регуляторами росту. Встановлені Pedroza-Manrique й співавторами (2005) кореляції між рівнем фітогормонів, стадіями розвитку та метаболічною активністю свід-

чать про важливу роль цих сполук у проростанні насіння *Comparentia falcata* Poepp. & Endl.

Язичник сибірський (*Ligularia sibirica* (L.) Cass.) та жовтозілля Бессера (*Senecio besserianus* Minder.) відносяться до родини Айстрові (Asteraceae). *S. besserianus* також відомий під назвою *Tephrosieris besserianus* (Minder) Czer., *Tephrosieris aurantiaca* auct. Non (Hoppe ex Willd.) Griseb. Ex Schenk, *Tephrosieris aurantiaca* (Hoppe) Griseb. & Schenk, *Senecio aurantiacus* (Hoppe) Less., *Cineraria aurantiaca* Hoppe, *Tephrosieris integrifolia* subsp. *aurantiaca* (Hoppe) B. Nord. ex Greuter, *Senecio integrifolius* subsp. *aurantiacus* (Willd.) Briq. & Cavill. — усі вище перелічені назви прийнято вважати синонімами (*Tephrosieris...*, 2025). Варто зазначити, що, базуючись на молекулярно-генетичних даних, *Ligularia* та *Tephrosieris* належать до комплексу *Ligularia* — *Cremanthodium* — *Parasenecio* (Kadereit, Dohley, 2020). Для проведення нашого дослідження було обрано види *L. sibirica* та *S. besserianus*, що зумовлено їх охоронним статусом (Pro zatverdzenia..., 2021) та здатністю синтезувати біологічно активні речовини, а саме алкалоїди, флавоноїди, сапоніни й інші фенольні сполуки. *L. sibirica* включений до Додатків Бернської конвенції та охороняється в більшості країн Центральної та Східної Європи. У науковій літературі вітчизняними та іноземними вченими описано низку біотехнологічних досліджень *L. sibirica* щодо введення в культуру *in vitro*, які стосуються стерилізації, підготовки насіння до висаджування, вивчення морфогенезу, мікроклонального розмноження (Voicu, 2022; Shelyfist et al., 2015). Стосовно *S. besserianus* відсутні дані щодо введення в культуру *in vitro*.

Природоохоронний статус, фармакологічні властивості, особливості насіння обох видів визначають необхідність в удосконаленні протоколів *in vitro* проростання насіння для отримання життєздатних проростків, подальшого їх мікроклонального розмноження та забезпечення ефективного *ex situ* збереження рослин. Метою дослідження був підбір умов для ефективної стерилізації і проростання насіння язичника сибірського і жовтозілля Бессера.

Матеріали та методи

Насіння *L. sibirica* було люб'язно надане співробітниками Кременецького ботанічного саду (місто Кременець, Кременецький район, Тернопільська область). Насіння *S. besserianus* зібра-

Оптимізація умов проростання *in vitro* насіння рідкісних видів *Ligularia sibirica* (L.) Cass....

не з популяції, розташованої на горі Могила неподалік села Гутисько, Тернопільського району Тернопільської області. Перед початком експерименту насіння піддавали стратифікації, а саме зберігали впродовж не менше одного місяця за температури +4 °С. Після очищення насіння обох

культур від папусу, який притаманний видам родини Айстрові, проводили підбір умов його стерилізації.

Нами було перевірено різні схеми стерилізації насінневого матеріалу, зазначені у таблиці 1.

Таблиця 1. Схеми обробки насіння *L. sibirica* та *S. besserianus* різними стерилізаційними агентами

Схема 1	Схема 2	Схема 3	Схема 4
Перманганат калію (KMnO ₄) 30 хв	Перманганат калію (KMnO ₄) 30 хв	Перманганат калію (KMnO ₄) 15 хв	Перманганат калію (KMnO ₄) 15 хв
Етанол 70 % (C ₂ H ₅ OH) 1 хв	Етанол 96 % (C ₂ H ₅ OH) + Tween 80 (100:1) 3 хв	Етанол 96 % (C ₂ H ₅ OH) 15 с	Етанол 96 % (C ₂ H ₅ OH) 15 с
Дихлорізоціанурат натрію 1,5 % (C ₃ Cl ₂ N ₃ NaO ₃) + Tween 80 (100:1) 3 хв	Гіпохлорит натрію, збагачений активним хлором (NaOCl) (білизна) (розчин 1:3) 10 хв	Пероксид водню 15 % (H ₂ O ₂) 45 хв	Пероксид водню 15 % (H ₂ O ₂) 45 хв
	Пероксид водню 10 % (H ₂ O ₂) 10 хв		Фундазол (діюча речовина беноміл) (C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃) (1 мг/мл) 10 хв

Відібрані простерилізовані насінини рівномірно розміщували в стерильних чашках Петрі діаметром 9 см, що містили агаризоване середовище МС/2 (Murashige та Скуга з половинним вмістом мікро- та макросолей) (Murashige, Skoog, 1962). Кожний варіант закладали у трьох повторностях. У кожен чашку Петрі висаджували по 5 насінин. Експеримент проводили у контрольованих умовах за режиму освітлення 14 / 10 год (світло / темрява), за температури 17 °С. Процес проростання насіння відстежували впродовж 30 діб для *S. besserianus* та 45 — для *L. sibirica*. Кількість пророслого насіння фіксували щодня, починаючи з першого дня після висіву. Насіння вважали пророслим, якщо корінець досягав не менше 2 мм і був видимий неозброєним оком.

Проростання насіння є критичним етапом життєвого циклу рослини і вважається чутливим індикатором змін у навколишньому середовищі. Насіння замочували у різних речовинах. Окрім того, як один із способів стимулювання проростання насіння був використаний метод барботування. Експеримент з оптимізації проростання насіння проводили у п'ятих варіантах, а саме:

A1, B1 — дистильована вода (20–22 год);

A2, B2 — індол-3-масляна кислота (ІМК) 1 мг/мл (20–22 год);

A3, B3 — бурштинова кислота (БК) 1 мг/мл (20–22 год);

A4, B4 — гіберелова кислота (ГКЗ) 0,1 мг/мл (20–22 год);

A5, B5 — барботування (18 год).

A — *S. besserianus*; B — *L. sibirica*.

Було розраховано чотири індекси проростання насіння для оцінки впливу підібраних варіантів на проростання насіння *L. sibirica* та *S. besserianus*. Вибір показників ґрунтувався на їхній релевантності та частоті використання у подібних дослідженнях. Оцінювали такі параметри: кінцевий відсоток проростання (final germination percentage, FGP), середньодобове проростання (mean daily germination, MDG), середній час проростання (mean germination time, MGT), індекс проростання (germination index, GI) (Almaghrabi et al., 2014).

Кінцевий відсоток проростання (FGP) обчислювали за такою формулою:

$$FGP = \frac{n}{N} * 100,$$

де n — кількість пророслого насіння, N — загальна кількість насінин.

Середньодобове проростання (MDG) визначали за методом:

$$MDG = \frac{FGP}{D},$$

де FGP — кінцевий відсоток проростання, D — загальна кількість діб спостереження.

Середній час проростання (MGT) обчислювали за рівнянням:

$$MGT = \frac{\sum(n * d)}{\sum N},$$

де n — кількість насінин, що проросли на певну добу d, N — загальна кількість пророслого насіння.

Індекс проростання (GI) визначали за формулою:

$$GI = \sum \left(\frac{n_i}{D_i} \right),$$

де n_i — кількість пророслого насіння у добу i, D_i — номер відповідної доби.

Статистичну обробку виконували у програмі Microsoft Office Excel. Аналіз даних здійснювали з визначенням середнього значення та стандартної похибки ($M \pm SE$). Достовірність відмінностей між варіантами оцінювали за рівнями статистичної значущості $p < 0,05$.

Результати та обговорення

З літератури відомо, що насіння *L. sibirica* 4–6 мм брудно-білого кольору; папус довший або рівний довжині насінини. Насіння цього виду характеризується невисокою схожістю та швидкою втратою життєздатності (*Ligularia...*, n.d.). Насіння *S. besserianus* оберненояйцеподібне або циліндричне, приблизно 3 мм завдовжки, коричневе, густо чи помірно опушене короткими притиснутими волосками. Поверхня рівна або слабо борозенчаста, зі злегка вираженими поздовжніми ребрами. Папус добре розвинений 7–10 мм завдовжки, білий, складається з численних простих, м'яких, шовковистих волосків; відділяється від плоду без розшарування, забезпечує анемохорне поширення. Відоме нестабільною схожістю та схильністю до фізіологічного спокою (Kadereit et al., 2021).

Загальновідомий для більшості трав'янистих рослин спосіб стерилізації насіння передбачає такі послідовні етапи: промивання насіння детергентами та проточною водою, обробку серією стерилізуючих агентів, відмивання у стерильній дистильованій воді та висаджування

стерильного матеріалу на живильне середовище для подальшого культивування *in vitro* (Shelyfist et al., 2015).

Проведений порівняльний аналіз чотирьох випробуваних схем стерилізації показав суттєву відмінність у їх ефективності для досліджуваних видів. Для *L. sibirica* схема 4, що включала послідовну обробку перманганатом калію (15 хв), 96 % етанолом (15 с), 15 % пероксидом водню (45 хв) та фунгіцидом системної дії з діючою речовиною беноміл (10 хв), забезпечила 100 % стерильність та життєздатність насіння. Це узгоджується з результатами інших авторів, які довели ефективність беномілу у запобіганні грибковому зараженню під час введення *Rubus caesius* L. та *Paulownia tomentosa* Steud. в *in vitro* культуру (Тутаренко, Tesliuk, 2021). Натомість, інші схеми виявились не ефективними. За використання схеми 1 (перманганат калію (30 хв), етанол 70 % (1 хв), дихлорізоціанурат натрію 1,5 % + Tween 80 (100:1) (3 хв)) контамінація становила 100 %, окислення 100 %. За використання схеми 2 (перманганат калію (30 хв), етанол 96 % + Tween 80 (100:1) (3 хв), гіпохлорит натрію, збагачений активним хлором (білизна) (розчин 1:3) (10 хв), відмивання 0,025 % розчином аскорбінової кислоти (2 хв), пероксид водню 10 % (10 хв), триразове відмивання 0,025 % розчином аскорбінової кислоти (10 хв)), контамінація становила 90 %, окислення 100 %, а за застосування схеми 3 (перманганат калію (15 хв), етанол 96 % (15 с), пероксид водню 15 % (45 хв)) — контамінація 80 %, окислення не спостерігалось. Отримані дані, очевидно, свідчать про специфічні морфолого-анатомічні особливості сім'янок цих видів, які можуть утримувати мікобіоту навіть після інтенсивної хімічної обробки. Відомо, що попередня обробка 0,5 % NaClO впродовж 8 хв та 2,0 % NaClO впродовж 3 хв негативно впливала на бактеріоценоз листків і стебел *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, однак не діяла на різноманітність грибкових ендоефітів, а їхній склад майже не змінювався (Yu et al., 2022). Нами встановлено, що обробка хлорвмісними реагентами мала негативний вплив на життєздатність насіння. Для *S. besserianus* було апробовано 3 і 4 схеми стерилізації (табл.), обидві з яких виявились ефективними для отримання стерильних (100 %) та життєздатних проростків.

Після успішного підбору схеми стерилізації насіннєвого матеріалу, нами було проаналізовано вплив різних стимуляторів росту на проро-

стання насіння. Згідно з літературними даними, проростання насіння *L. sibirica* триває 30 діб (Klavina, Galite, 2004), стосовно *S. besserianus* немає відповідної інформації, проте можна припустити тривалість проростання за дослідженнями інших видів роду *Tephroses*, у яких вона становить тридцятиденний термін (Janířová et al., 2012). Отримані дані щодо оптимізації проростання демонструють виразний видовий та варіантний ефект передпосівних обробок. Для оцінки проростання насіння було підібрано низку показників, які, на нашу думку, найкраще підходять для опису впливу протестованих варіантів, а саме кінцевий відсоток проростання (FGP), середньодобове проростання (MDG), середній час проростання (MGT), індекс проростання (GI). Для *L. sibirica* найвищі показники кінцевого відсотка проростання (FGP) — 86,67 % — було зафіксовано після обробки бурштиновою кислотою у співвідношенні (1 мг/мл) (B3) і після обробки індол-3-масляною кислотою (1 мг/мл) (B2) (рис. 1).

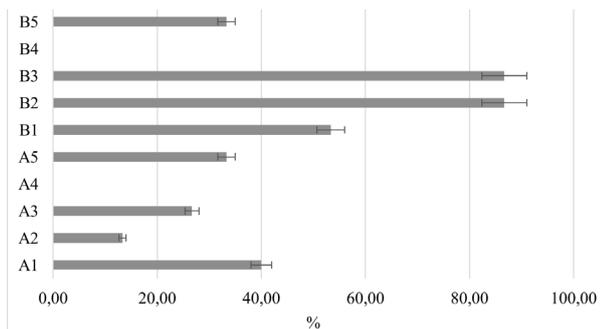


Рис. 1. Вплив передпосівної обробки насіння *L. sibirica* та *S. besserianus* на кінцевий відсоток проростання насіння (FGP). A1, B1 — дистильована вода (20–22 год); A2, B2 — індол-3-масляна кислота (ІМК) 1 мг/мл (20–22 год); A3, B3 — бурштинова кислота (БК) 1 мг/мл (20–22 год); A4, B4 — гіберелова кислота (ГКЗ) 0,1 мг/мл (20–22 год); A5, B5 — барботування (18 год). А — *S. besserianus*; В — *L. sibirica*. Результати представлені як $M \pm SE$ ($n = 3$).

Подібний позитивний вплив бурштинової кислоти підтверджено в інших дослідженнях, де її застосування стимулювало інтенсивність дихання, активність ферментів і запуск метаболічних шляхів, пов'язаних із виходом зі стану спокою насіння *Cannabis sativa* L. (Mischenko, 2018). Високі значення MDG (3,1 % / добу) та низький MGT (11,6 діб) у цьому варіанті підтверджують швидке та рівномірне проростання насіння (рис. 2, 3).

Індекс проростання *L. sibirica* після обробки насіння бурштиновою кислотою був найвищим серед усіх досліджених варіантів ($GI = 0,07$) (рис. 4).

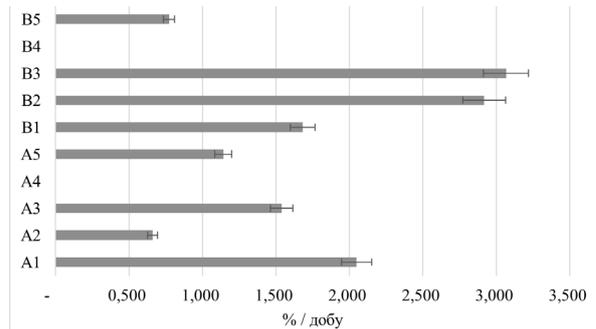


Рис. 2. Вплив передпосівної обробки насіння *L. sibirica* та *S. besserianus* на середньодобове проростання (MDG). A1, B1 — дистильована вода (20–22 год); A2, B2 — індол-3-масляна кислота (ІМК) 1 мг/мл (20–22 год); A3, B3 — бурштинова кислота (БК) 1 мг/мл (20–22 год); A4, B4 — гіберелова кислота (ГКЗ) 0,1 мг/мл (20–22 год); A5, B5 — барботування (18 год). А — *S. besserianus*; В — *L. sibirica*. Результати представлені як $M \pm SE$ ($n = 3$).

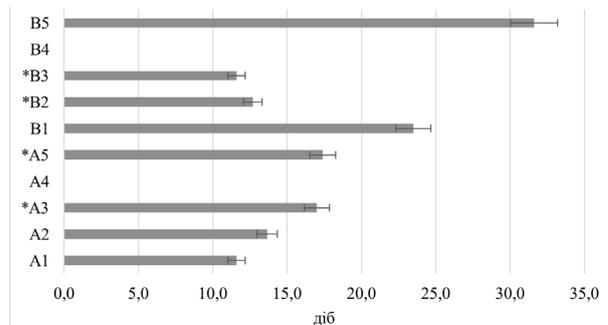


Рис. 3. Вплив передпосівної обробки насіння *L. sibirica* та *S. besserianus* на середній час проростання (MGT). A1, B1 — дистильована вода (20–22 год); A2, B2 — індол-3-масляна кислота (ІМК) 1 мг/мл (20–22 год); A3, B3 — бурштинова кислота (БК) 1 мг/мл (20–22 год); A4, B4 — гіберелова кислота (ГКЗ) 0,1 мг/мл (20–22 год); A5, B5 — барботування (18 год). А — *S. besserianus*; В — *L. sibirica*. Результати представлені як $M \pm SE$ ($n = 3$). * — $p < 0,05$.

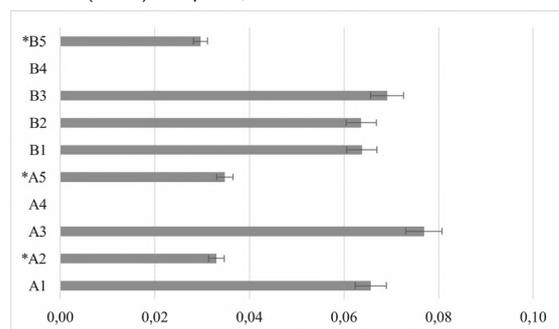


Рис. 4. Вплив передпосівної обробки насіння *L. sibirica* та *S. besserianus* на індекс проростання (GI). A1, B1 — дистильована вода (20–22 год); A2, B2 — індол-3-масляна кислота (ІМК) 1 мг/мл (20–22 год); A3, B3 — бурштинова кислота (БК) 1 мг/мл (20–22 год); A4, B4 — гіберелова кислота (ГКЗ) 0,1 мг/мл (20–22 год); A5, B5 — барботування (18 год). А — *S. besserianus*; В — *L. sibirica*. Результати представлені як $M \pm SE$ ($n = 3$). * — $p < 0,05$.

Високий показник кінцевого відсотка проростання (FGP = 86,67 %) був за застосування ІМК (B2), що узгоджується з даними про здатність ауксинів підсилювати ранні етапи росту зародкового корінця (рис. 1) (Kosakivska et al., 2019). Проте показники середньодобового проростання (MDG = 2,9 % / добу) та середній час проростання (MGT = 12,7 діб) достовірно відрізнялися, відтак індекс проростання був меншим і становив 0,6 (рис. 2, 3). Кінцевий відсоток проростання після замочування лише у дистильованій воді (B1) (FGP = 53,33 %) був меншим, порівняно з варіантами B2, B3; показники середньодобового проростання та середній час проростання становили 1,7 % / добу і 23,5 діб відповідно (рис. 1–3). Індекс проростання становив 0,06 (рис. 4).

Отримані показники кінцевого відсотка проростання насіння для *S. besserianus* були дещо меншими. Ці результати узгоджуються з даними щодо біології виду, який у природі часто відзначається низькою схожістю насіння та нерівномірним проростанням (Janířová et al., 2012). Найбільший кінцевий відсоток проростання (40 %) забезпечувало замочування у дистильованій воді (A1), найвищий показник середньодобового проростання (2 % / добу) та найнижчий показник середнього часу проростання (11,6 діб), що свідчить про швидке та рівномірне проростання; індекс проростання становив 0,07 (рис. 1–4). Ймовірно, насінню цього виду притаманний поверхневий, неглибокий фізіологічний спокій, який порушується водним насиченням тканин. Бурштинова кислота (A3) та ІМК (A2) були менш ефективними, кінцевий відсоток проростання були 26,7 % і 13,3 % відповідно, у порівнянні із замочуванням у дистильованій воді (рис. 1). Для A3 MDG становив 1,5 % / добу, а MGT — 17 діб, тоді як для A2 — 0,7 % / добу та 13,6 діб відповідно (рис. 2, 3). Індекс проростання для A3 — 0,08, а для A2 — 0,03 (рис. 4). Такі результати можуть бути пов'язані з впливом ендогенних факторів, які за певних умов уповільнюють або пригнічують проростання.

Застосування гіберелової кислоти у концентрації 1:10 (0,1 мг/мл) не показало позитивного ефекту на проростання ані *L. sibirica*, ні *S. besserianus*. Це може бути пов'язано з високою концентрацією ГКЗ, оскільки у багатьох видів Asteraceae надлишок гіберелінів спричиняє дисбаланс між ростовими сигналами та гормонами спокою (Linkies, Leubner-Metzger, 2012). Низькі показники FGP та підвищений MGT підтверджу-

ють, що використання гіберелової кислоти для стимулювання проростання насіння цих видів є недоцільним.

На спокій насіння впливає склад газового середовища. Відомо, що кисень бере участь в усіх біологічних процесах. Для початку проростання насіння він потрібний у дуже малих кількостях, а тому цей елемент необхідний не як фактор порушення спокою насіння, а для його індукції. Барботування — метод передпосівної обробки насіння, який полягає у витримуванні його у воді, що постійно насичується киснем або повітрям. Цей метод сприяє підвищенню енергії проростання та активації фізіологічних процесів, пов'язаних із переходом насіння зі стану спокою до активного росту (Madiyeva, Silantiyeva, 2024). Барботування, попри очікування, виявилось малоефективним методом для обох видів рослин. Зокрема, кінцевий відсоток проростання для *L. sibirica* FGP 33,33 %, показник середнього часу проростання (MGT) становив 31,6 діб, середньодобове проростання було 0,8 % / добу — проростання відбувалося повільніше, індекс GI був низьким (0,03) (рис. 1–4). Для *S. besserianus* FGP — 33,33 %, був вищим, порівняно з варіантами A2 та A3, проте інші показники MDG — 1,1 % / добу, MGT — 17,4 діб, GI — 0,03 свідчать про повільне проростання (рис. 1–4). Імовірно, інтенсивна аерація спричинила надмірне вимивання інгібіторів або дисбаланс водного режиму насінини, що негативно вплинуло на метаболічну активність.

Проведене дослідження підтвердило, що обидва види мають різні фізіолого-хімічні механізми виходу зі стану спокою. *L. sibirica* демонструє високу чутливість до стимуляторів росту, зокрема бурштинової кислоти, тоді як для *S. besserianus* найефективнішим виявився варіант — замочування у дистильованій воді. Це узгоджується з даними про видоспецифічні механізми проростання у Asteraceae, де спостерігається широкий діапазон реакцій на різні регулятори росту, залежно від типу спокою, складу ефірних олій сім'янки, структури перидерми та наявності фенольних інгібіторів (Hartmann et al., 1997).

Таким чином, комбіноване застосування ефективної стерилізації та підібраних варіантів передпосівної обробки дозволило розробити надійний протокол проростання *in vitro* двох рідкісних видів, який може бути використаний у програмах збереження генофонду, мікроклонального

розмноження та подальшого культивування для отримання біомаси та цільових метаболітів.

Висновки

У ході проведеного дослідження розроблено ефективний протокол стерилізації та оптимізації проростання *in vitro* насіння двох рідкісних видів родини *Asteraceae* — *L. sibirica* та *S. besserianus*, що мають важливе природоохоронне значення та занесені до Червоної книги України (2009 р.) та переліку видів рослин та грибів, що заносяться до Червоної книги України (Рослинний світ) (2021 р.). Порівняння кількох схем стерилізації показало, що найрезультативнішою для обох видів є послідовна обробка перманганатом калію, 96 % етанолом, 15 % перексидом водню та фунгіцидом на основі беномілу, яка забезпечила 100 % стерильність та збереження життєздатності насіння.

Оптимізація проростання виявила виражений видоспецифічний характер відповіді на варіанти передпосівної обробки. Для *L. sibirica* найвищі показники FGP, MDG, найнижчий MGT та максимальний GI зафіксовано після застосування бурштинової кислоти, що підтверджує її ефективність як стимулятора виходу насіння зі стану спокою. Для *S. besserianus* найкращим виявилось замочування у дистильованій воді, тоді як використання ІМК та бурштинової кислоти спричинило нижчі показники проростання. Гіберелова кислота в застосованій концентрації не продемонструвала стимулюючого ефекту на проростання обох видів. Метод барботування, попри теоретичну перспективність, виявився малоефективним і супроводжувався зниженням швидкості проростання.

Отже, встановлені умови стерилізації та передпосівної підготовки насіння дозволяють отримати життєздатний стерильний матеріал і забезпечують успішне введення *L. sibirica* та *S. besserianus* у культуру *in vitro*. Запропонований підхід може бути використаний на першому етапі (проростання насіння) масового розмноження цих видів, створення *in vitro* колекцій, отримання біомаси та подальших біотехнологічних досліджень, спрямованих на їхнє довгострокове збереження *ex situ*.

Подяки

Автори висловлюють щирі подяки директору Кременецького ботанічного саду Антоніні

Ліснічук й її співробітникам за люб'язно надане насіння *Ligularia sibirica* (L.) Cass.

Перелік літератури

1. Pro zatverdzhennia perelikiv vydiv roslyn ta hrybiv, shcho zanosiasia do Chervonoï knyhy Ukrainy (roslynnyi svit), ta vydiv roslyn ta hrybiv, shcho vykliucheni z Chervonoï knyhy Ukrainy (roslynnyi svit): Nakaz M-va zakh. dovkillia ta pryrod. resursiv Ukrainy vid 15.02.2021 № 111. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0370-21#Text> (date of access: 23.11.2025) (in Ukrainian).
2. Almaghrabi O. A., Abdelmoneim T. S., Albishri H., Mousa T. A. A. Enhancement of Maize Growth Using Some Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Under Laboratory Conditions. *Life Science Journal*. 2014. Vol. 11 (11). P. 764–772.
3. IPBES (2019), Global assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Brondizio E. S., Settele J., Diaz S., Ngo H. T. (eds). IPBES secretariat, Bonn, Germany. 1144 p. doi: 10.5281/zenodo.3831673.
4. Humphreys A. M., Govaerts R., Ficinski S. Z., Lughadha E. N., Vorontsova M. S. Global dataset shows geography and life form predict modern plant extinction and rediscovery. *Nature Ecology & Evolution*. 2019. Vol. 3. P. 1043–1047. doi: 10.1038/s41559-019-0906-2.
5. Janišová M., Škodová I., Hegedúšová K. Reproductive biology of *Tephrosia longifolia* subsp. *moravica*, an endemic taxon of European importance. *Seed Science Research*. 2012. Vol. 22 (2). P. 113–122. doi: 10.1017/S0960258511000511.
6. Kadereit J. W., Bohley K. A note on leaf venation and the circumscription of *Tephrosia* (Asteraceae–Senecioneae). *Willdenowia*. 2020. Vol. 50. P. 113–117. doi: 10.3372/wi.50.50111.
7. Kadereit J. W., Laux P., Dillenberger M. S. A conspectus of *Tephrosia* (Asteraceae: Senecioneae) in Europe outside russia and notes on the decline of the genus. *Willdenowia*. 2021. Vol. 51 (2). P. 271–317. doi: 10.3372/wi.51.51209.
8. Klavina D., Gailite A. Tissue culture technology in conservation of threatened plant species of Latvia. *Acta Universitatis Latvienses, Biology*. 2004. Vol. 676. P. 183–188.
9. Linkies A., Leubner-Metzger G. Beyond gibberellins and abscisic acid: How ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Reports*. 2012. Vol. 31. P. 253–270. doi: 10.1007/s00299-011-1180-1.
10. Madiyeva A., Silantiyeva M. The effect of bubbling on the germination of Sudan grass seeds. *Fundamental and Experimental Biology*. 2024. Vol. 11529 (3). P. 51–57. doi: 10.31489/2024bmg3/51-57.
11. Mischenko S. Effectiveness reproduction of *Cannabis sativa* L. from seeds with low germination and viability *in vitro* conditions. *Agriculture, crop production, vegetable and melon growing*. 2018. Vol. 100 (2). P. 3–8.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant*. 1962. Vol. 15. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
13. Shelfist A., Cheban L., Budzhak V., Chorney I. The features of introduction of *Ligularia glauca* (L.) J. Hoffm. and *L. sibirica* (L.) Cass. in the culture *in vitro*. *Zapovidna sprava*. 2015. Vol. 21 (1). P. 39–42.
14. Pedroza-Manrique J., Fernandez-Lizarazo C., Suarez-Silva A. Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Comparattia falcata* seeds under *in vitro* conditions. *In Vitro Cellular and Developmental Biology — Plant*. 2005. Vol. 41. P. 838–843. doi: 10.1079/IVP2005698.
15. Kosakivska I. V., Voytenko L. V., Vasyuk V. A., Vedenichova N. P., Babenko L. M., Shcherbatyuk M. M. Phytohormonal regulation of seed germination. *Fiziol. rosl. Genet.* 2019. Vol. 51 (3). P. 187–206. doi: 10.15407/frg2019.03.187.

16. Hartmann H. T., Kester D. E., Davies F. T., Geneve R. E. Plant Propagation — Principles and Practices (6th Edn), Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, USA, 1997. pp. xi + 770.
17. *Tephrosieris integrifolia* subsp. *aurantiaca* (Hoppe) B. Nord. ex Greuter. URL: <https://www.ukrbn.com/index.php?id=379067> (date of access: 20.11.2025).
18. Kolisnyk Kh. M., Hrytsak L. R., Prokopiak M. Z., Drobik N. M. The chorology and bioecological features of species of the genus *Carlina* L. flora of Ukraine. *Scientific Issue Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University. Series: Biology*. 2023. Vol. 83 (3–4). P. 48–57. doi: 10.25128/2078-2357.23.3-4.6.
19. The IUCN Red List of Threatened Species. URL: <https://www.iucnredlist.org/> (date of access: 21.11.2025).
20. Tytarenko N., Tesliuk N. Vykorystannya preparativ funhitsydnoi dii dlya zapobihannya kontaminatsii pid chas vvedennya roslyn v kul'turu *in vitro*. *Hraal' nauky*. 2021. No. 7. P. 131–133. doi: 10.36074/grail-of-science.27.08.2021.022.
21. *Ligularia sibirica* (Linnaeus) Cassini in F. Cuvier, Dict. Sci. Nat. URL: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=200024283.
22. Voicu D. Features of *in vitro* culture initiation of *Ligularia sibirica* (L.) Cass. *AES Bioflux*. 2022. Vol. 14 (1). P. 21–27.
23. Yu Y., Chen Z., Xie H., Feng X., Wang Y., Xu P. Overhauling the effect of surface sterilization on analysis of endophytes in tea plants. *Frontiers in Plant Science*. 2022. Vol. 13 (849658). doi: 10.3389/fpls.2022.849658.

Стаття надійшла до редакції 22.09.2025
прийнята до друку 12.10.2025

OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR *IN VITRO* SEED GERMINATION OF THE RARE SPECIES *LIGULARIA SIBIRICA* (L.) CASS. AND *SENECIO BESSERIANUS* MINDER. (ASTERACEAE)

I. P. Stashkiv, M. Z. Prokopiak, L. R. Hrytsak, N. M. Drobik

Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University,
M. Kryvonosa Str., 2, Ternopil,
Ternopil Region, 46027, Ukraine

Aim. To select an effective sterilization protocol and optimize seed germination conditions for the rare and vulnerable species *Ligularia sibirica* (L.) Cass. and *Senecio besserianus* Minder., listed in the Red Data Book of Ukraine, for their subsequent introduction into *in vitro* culture and microclonal propagation.

Methods. Four seed sterilization schemes were compared, and the effects of five variants of seed pre-sowing treatment (distilled water, indole-3-butyric acid, succinic acid, gibberellic acid, and bubbling) were tested, followed by inoculation on half-strength Murashige and Skoog medium (MS/2). The following germination parameters were evaluated: final germination percentage (FGP), mean daily germination (MDG), mean germination time (MGT), and germination index (GI). Data were expressed as mean and standard error ($M \pm SE$). The significance of differences between treatments was assessed at $p < 0.05$. **Results.** For both species, an effective sterilization scheme involved the use of 96 % ethanol, 15 % hydrogen peroxide, and a benomyl-based fungicide (systemic fungicide Fundazol), ensuring 100 % sterility. In *L. sibirica*, the highest germination parameters were recorded after pre-sowing treatment with succinic acid and indole-3-butyric acid (FGP 86.67 %). For *S. besserianus*, soaking in distilled water proved optimal (FGP 40 %). Gibberellic acid at the tested concentration (0.1 mg mL^{-1}) did not have a positive effect on seed germination in either species. Bubbling generally increased MGT and reduced GI. **Conclusions.** The proposed sterilization scheme using a benomyl-based fungicide provides reliable production of sterile and viable seed material of *L. sibirica* and *S. besserianus*. For *S. besserianus*, comparable results were obtained using a sterilization scheme based on 15 % hydrogen peroxide without benomyl. Based on four germination indexes succinic acid was the most effective stimulant of *L. sibirica* seed germination, whereas soaking in distilled water was optimal for *S. besserianus*.

Keywords: seed germination, *in vitro* culture, sterilization, growth regulators, stratification, pre-sowing treatment, bubbling.