

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ТА ВКОРІНЕННЯ *IN VITRO* РІДКІСНОГО ВИДУ *GENTIANA ACAULIS L.*

Одним із найбільш перспективних методів, що можуть бути використані для вирішення проблеми збереження генофонду рідкісних видів рослин, є мікроклональне розмноження в культурі *in vitro*. Цей метод ґрунтується на унікальній здатності рослин до регенерації із соматичних клітин і дозволяє розмножувати рослини з ускладненим насіннєвим чи вегетативним розмноженням, проводити оздоровлення посадкового матеріалу та в декілька раз пришвидшувати його отримання [1, 2].

Використання отриманих мікроклональним розмноженням та вкорінених особин з успіхом можна використати для поновлення та стабілізації чисельності порушених популяцій рідкісних видів рослин. Застосування цього способу особливо доцільне для відновлення популяцій видів рослин із складною біологією розмноження. Саме до таких видів відноситься рідкісний високогірний вид тирлич безстебловий (*Gentiana acaulis L.*), який через складність насіннєвого поновлення, а також вплив негативних антропогенних чинників знаходиться на межі зникнення з території Українських Карпат. Тому, метою роботи було підібрати умови для мікроклонального розмноження та вкорінення *in vitro* пагонів рідкісного високогірного виду *G. acaulis*.

Матеріали і методи

Для дослідження використовували рослини, отримані шляхом пророщування *in vitro* насіння *G. acaulis*, зібраного з рослин двох популяцій в Українських Карпатах (г. Ребра, г. Туркул). Мікророзмноження *G. acaulis* проводили шляхом прямого морфогенезу, використовуючи для цього ділянки пагона з пазушними бруньками 2–3 місячних особин. Оцінку ефективності мікроклонального розмноження проводили через 1–2 місяці, визначаючи середню кількість живців з мікроклонами та середню кількість сформованих пагонів у розрахунку на один живець.

Під час підбору умов для мікроклонального розмноження використовували агаризовані і рід-

кі середовища Мурасіге, Скуга (1962) з половинним вмістом макро- та мікросолей (МС/2), а також середовище МС/2 із збільшеним вдвічі вмістом CaCl_2 (МС/2_{мод}). В усіх варіантах середовища доповнювали комбінаціями різних концентрацій 6-бензиламінопурина (БАП) (0,05–0,5 мг/л) і кінетину (Кін) (0,1 мг/л і 0,2 мг/л).

Отримані мікроклонуванням та дороще-ні протягом 1,5–3 місяців до 1,5–2,0 см висоти з 3–5 парами листків пагони використовували під час підбору умов для вкорінення *in vitro*. З цією метою було протестовано десять варіантів середовищ з різним складом макро- та мікросолей, регуляторів росту, сахарози, маніту, доповнених 1-нафтилоцтовою кислотою (НОК) (табл. 1). Зміни вмісту CaCl_2 у живильному середовищі не впливали на укорінення рослин *G. acaulis*, тому на цьому етапі досліджень середовище МС/2_{мод} нами не використовувалося.

Для кожної модифікації живильного середовища застосовували два підтримуючі субстрати: агар (8 г/л) (I, III, V); агар (4 г/л) у поєднанні з перлітом (16 г/л) (II, IV, VI, VII, VIII, IX, X). На живильних середовищах із зазначеними вище субстратами рослини культивували протягом 90 діб. Частина пагонів, які зазнали інфікування в процесі пересаджувань або ж не утворювали коренів на середовищах, висаджували у водопровідну воду.

Результати та обговорення

Мікророзмноження *G. acaulis* проводили шляхом прямого морфогенезу, використовуючи для цього ділянки пагона з пазушними бруньками, оскільки відомо, що регенеровані таким способом рослини є здебільшого генетично однорідними, ідентичними батьківській формі [1, 4]. Вид *G. acaulis* зустрічається переважно на кислих та слабкокислих гірсько-лучних, дерново-буроземних, бідних на вапно ґрунтах з рН 4,5–6,5 [5, 6]. Інші дослідники відносять його до кальцефільних видів [7, 8]. З цієї причини, при підборі оптимальних умов для мікроклонального роз-

Компонентний склад тестованих варіантів живильного середовища

Середовище МС/2 без вітамінів із зменшеною вдвічі концентрацією NH_4NO_3											
Підтримуючий субстрат		агар			агар + перліт						
Варіант		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Маніт, г/л		3	0	0	0	3	0	3	3	0	0
Сахароза, г/л		0	3	0	3	0	0	0	0	0	0
НОК, мг/л		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,1	0,2	0,1	0,2
Агар, г/л		8	8	8	4	4	4	4	4	4	4
Перліт, г/л		0	0	0	16	16	16	16	16	16	16

Примітка. * – у таблиці подано концентрації складників, за якими відрізняються варіанти живильних середовищ.

множення були протестовані середовища МС/2 із збільшеним вдвічі вмістом CaCl_2 та різними показниками рН.

Відсоток живців *G. acaulis*, на яких формувалися пагони, та кількість пагонів у розрахунку на один живець для рослин цього виду з реберської та туркульської популяцій були досить низькими. Найбільш сприятливим для мікроклонування серед протестованих було агаризоване середовище МС/2, доповнене 0,2 мг/л БАП та 0,2 мг/л Кін – у випадку рослин з реберської популяції та середовище МС/2_{мод}, доповнене 0,5 мг/л БАП та 0,1 мг/л Кін – для рослин туркульської популяції. За тих умов кількість експлантів рослин туркульської популяції, здатних формувати пагони (мікроклони), складала 83,3 %, а кількість пагонів у розрахунку на живець – 2,63. На середовищі такого ж складу, але без збільшення концентрації CaCl_2 , ці показники були наступними – 45,8 % та 0,83 (рис. 1).

Під час підбору умов для вкорінення особин *in vitro* у восьми тестованих варіантах пагони висаджували у середовище МС/2 без сахарози та вітамінів (табл. 1). У дослідях використо-

ували середовище МС/2, у якому концентрація NH_4NO_3 була зменшена вдвічі, оскільки відомо, що зменшення макро- та мікроелементів, а також зменшення в складі макросолей амонійного азоту сприяє вкоріненню живців суниць, яблунь та інших рослин [9–11]. Поряд із цим, дослідження елементного складу ґрунтів з природних місцевостей *G. acaulis* показали, що вміст у них загального азоту є порівняно невисоким [6].

У результаті проведених досліджень показано, що на вкорінення та параметри рослин *G. acaulis* (табл. 2) впливали як склад живильного середовища, так і підтримуючий субстрат.

Зокрема культивовані на I варіанті середовища пагони на 30-ту добу були життєздатними, проте не утворювали коренів. Тому, усі особини для вкорінення були висаджені у водопровідну воду, закриті ковпаками, які відкривали поступово для адаптації рослин до умов *ex vitro*. На 20-ту добу, після їх висаджування у воду в 38 % особин розпочався ризогенез і утворились корені. Відсоток вкорінення *G. acaulis* у III варіанті на 30-ту та 60-ту доби становив 25, після чого вкорінені

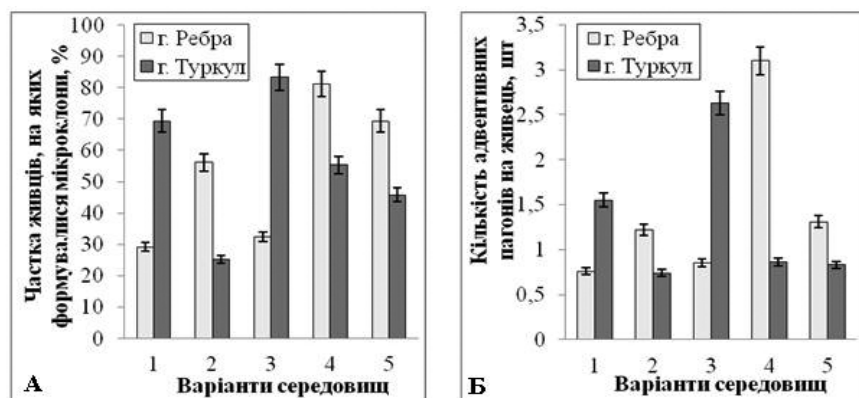


Рис. 1. Здатність рослин *G. acaulis* до мікроклонального розмноження: А – кількість живців, на яких формуються мікроклони, %, Б – кількість адвентивних пагонів/на живець; 1 – МС/2_{мод}, 0,05 мг/л БАП + 0,1 мг/л Кін; 2 – МС/2, 0,05 мг/л БАП + 0,1 мг/л Кін; 3 – МС/2_{мод}, 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л Кін; 4 – МС/2, 0,2 мг/л БАП + 0,2 мг/л Кін; 5 – МС/2, 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л Кін

Частка життєздатних пагонів тирличу безстеблового в умовах *in vitro*

Частка вкорінених пагонів <i>G. acaulis in vitro</i> , %										
Доба	Варіант	Підтримуючий субстрат								
		агар			агар + перліт					
		I	III	V	II	IV	VI	VII	VIII	IX
30	0	25	50	25	25	50	100	67	33,3	100
60	0	25	50	25	25	50	100	67	33,3	67
90	0	0	50	0	0	50	100	33,3	33,3	67

Примітка. Компонентний склад живильних середовищ див. табл. 1.



Рис. 2. Укорінення рослин *G. acaulis in vitro*: рослини, культивовані у напівтвердому живильному середовищі МС/2 із зменшеною вдвічі концентрацією NH_4NO_3 , без вітамінів та сахарози, доповненому 3 г/л маніту та 0,01 мг/л НОК, підтримуючий субстрат – агар (4 г/л) у поєднанні з перлітом (16 г/л), на 60-ту (А) та 90-ту (Б) доби культивування

рослини загинули. У V варіанті частка вкорінених рослин була дещо більшою і становила 50 %.

Отже, вкорінення рослин *G. acaulis* на живильних середовищах різного складу з використанням у якості підтримуючого субстрату агару було низькорезультативним, через що ми зменшили його кількість та додали як підтримуючий субстрат перліт.

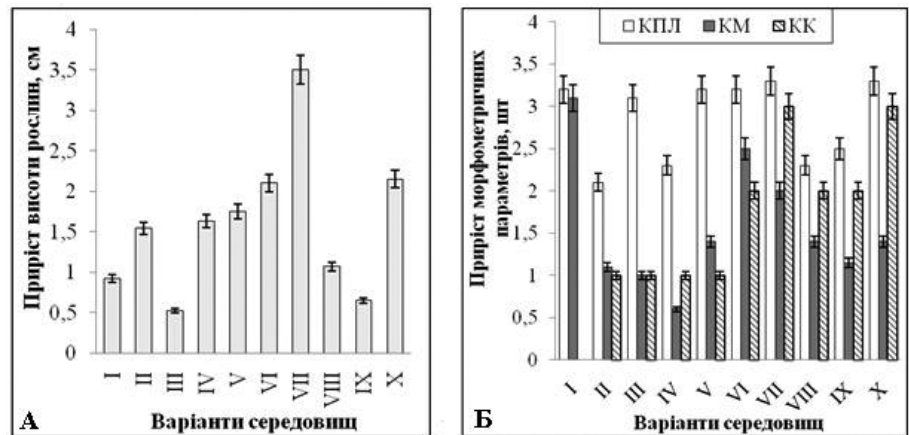
Пагони, які були висаджені у живильні середовища із зменшеною кількістю агару (до 4 г/л) у поєднанні з перлітом (16 г/л), вкорінювалися по-різному залежно від складу середовища. Зокрема, частка вкорінення *G. acaulis* у II та IV варіантах середовищ протягом 30–60-ї діб становила 25 %, після чого рослини загинули. Відсоток вкорінення у VI, VIII та IX варіантах становив 50, 67 і 33 відповідно. Найвищі показники вкорінення пагонів спостерігали у VII та X варіантах – 100 % та 67 %. Отже, можна припустити, що використання середовища МС/2 із зменшеною вдвічі концентрацією NH_4NO_3 та підтримуючого субстрату агару (4 г/л) у поєднанні з перлітом (16 г/л) позитивно впливає на вкорінення рослин

(рис. 2). Відомо, що застосування напівтвердого підтримуючого субстрату є досить ефективним, оскільки він забезпечує кращу адаптацію кореневої системи рослин до умов росту у ґрунті. Про позитивний ефект використання у якості підтримуючого субстрату агару у поєднанні з перлітом свідчать і результати інших дослідників: рослини суніць, яблунь, груш, ясена, бузку на такому підтримуючому субстраті формували добре розвинену кореневу систему [9].

Найбільші показники морфометричних параметрів культивованих *in vitro* рослин виявлено на VII та X варіантах живильних середовищ. Зокрема, приріст висоти вкорінених рослин у VII варіанті на 90 добу культивування становив 3,5 см (рис. 3, А). Найбільший приріст висоти рослин спостерігали на 30 добу, його показник становив 3,2 см. Кількість пар листків та міжвузлів рослин *G. acaulis* цього варіанту досліджувала складала 3,3 та 2,0 відповідно (рис. 3, Б).

Морфометричні параметри рослин, культивованих на X варіанті живильного середовища, були дещо нижчими і становили: висота рослин

Рис. 3. Морфометричні параметри вкоріненних рослин *G. acaulis*: компонентний склад живильних середовищ відображений в табл. 1; КПЛ – кількість пар листків на рослину, КМ – кількість міжвузлів на рослину, КК – кількість коренів на рослину



– 2,15 см, кількість пар листків – 3,3, кількість міжвузлів – 1,4. Найбільший приріст висоти рослин виявлено на VII варіанті дослідження (рис. 3, А), що, очевидно, можна пояснити наявністю у складі цього живильного середовища шестиатомного спирту маніту, який, будучи осмотично активною речовиною, забезпечує синтез ферментів антиоксидантного захисту, що сприяє виживанню рослин під час стресу [12, 13].

Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що ефективність вкорінення рослин *G. acaulis* можна забезпечити лише поєднанням оптимального за складом живильного середовища та сприятливого для вкорінення підтримуючого субстрату. Найкращим серед протестованих живильних середовищ виявилось МС/2 з половинним вмістом NH_4NO_3 , без вітамінів та сахарози, доповнене 3 г/л маніту та 0,1 мг/л НОК; у якості підтримуючого субстрату доцільно використовувати агар (4 г/л) у поєднанні з перлітом (16 г/л). Також ефективним виявилось вкорінення живців у водопровідній воді.

Висновки

Виявлено, що найбільш сприятливим для мікроклонування серед протестованих було агаризоване живильне середовище МС/2, доповнене 0,2 мг/л 6-бензилоамінопурина та 0,2 мг/л кінетину – у випадку рослин з реберської популяції та середовище МС/2 з збільшеним вдвічі вмістом CaCl_2 , доповнене 0,5 мг/л БАП та 0,1 мг/л Кін, – для рослин туркульської популяції.

Для вкорінення *in vitro* рослин *G. acaulis* оптимальним виявилось живильне середовища МС/2 з половинним вмістом NH_4NO_3 , без вітамінів та сахарози, доповнене 3 г/л маніту та 0,1 мг/л НОК; у якості підтримуючого субстрату використовували агар (4 г/л) у поєднанні з перлітом (16 г/л). За таких умов усі культивовані *in vitro* рослини були життєздатними і вкорінювалися до 30-ої доби культивування.

Робота виконана за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України в межах проекту «Оцінка еколого-генетичного потенціалу рідкісних видів роду Тирлич *Gentiana* L.) у Українських Карпатах».

ЛІТЕРАТУРА

1. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. – К.: Наук. думка, 2005. – 270 с.
2. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин. – К.: ПоліграфКонсалдинг, 2003. – 520 с.
3. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – 15, N 13. – P. 473–497.
4. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
5. Драпайло Н.М. Рід *Gentiana* s.l. флори України: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.01 «Ботаніка». – К., 1995. – 24 с.
6. Пасічник Г.І., Майорова О.Ю., Войтюк В.Б., Грицак Л.Р., Мельник В.М., Дробик Н.М. Елементний склад ґрунтів і рослин *Gentiana acaulis* L. з популяцій на горах Туркул та Ребра у Чорногорі // *Біологічні системи*. – 2011. – 3, Вип. 3. – С. 254–259.
7. Кобів Ю., Прокопів А., Борсукевич Л., Гелеш М. Поширення, стан популяцій та характеристика оселищ рідкісних і загрожених видів рослин у північній частині Свидовця (Українські Карпати) // *Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол.* – 2009. – N 49. – С. 63–82.

8. Малиновський К.А., Крчфалушій В.В. Рослинні угруповання високогір'я Українських Карпат. – Ужгород, 2002. – 244 с.
9. Деменко В.И., Шестибратов К.А., Лебедев В.Г. Укоренение – ключевой этап размножения растений *in vitro* // Известия ТСХА. – 2010. – Вып. 1. – С. 73–85.
10. Коростелева Н.И., Громова Т.В., Жукова И.Г. Биотехнология: учебное пособие. – Барнаул: изд-во АГАУ, 2006. – 127 с.
11. Красинская Т.А., Кухарчик Н.В. Влияние ионообменного субстрата Биона-112 на морфологическое развитие растений рода *Cerasus* Mill. на этапе адаптации *ex vitro* // Вести Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук. – 2006. – N 3. – С. 54–59.
12. Долгова Л.Г., Самолова М.В. Содержание пролина как показателя стойкости растений-интродуцентов рода *Amelancheir* Medic [Электронный ресурс] // Актуальные вопросы биологии, экологии и химии. – 2009. N 3. – С. 2934. – Режим доступа: <http://sites.znu.edu.ua/bio-eco-chem-sci/issues/index.php?lang=gus>
13. Петюх Г.П., Грубляк І.А. Активність ферментів антиоксидантного захисту в рослинах буряків цукрових під дією осмотичного стресу // Науковий вісник НУБіП України. Серія: Агрономія. – 2011. – Вип. 162 (2). – С. 61–66.

MAYOROVA O.YU., HRYCAK L.R., MAZUR D.S., VITROVA S.A., DROBYK N.M.

*Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University,
Ukraine, 46027, Ternopil, M. Kryvonosa str., 2, e-mail: majorova@i.ua*

MICROCLONAL PROPAGATION AND ROOTING *IN VITRO* OF RARE *GENTIANA ACAULIS* L. SPECIES

Aim. The alternative methods enabling to restore natural habitats of rare plant species, including *Gentiana acaulis* L., encompass repatriation of grown *in vitro* plants into disturbed populations. Therefore, the aim of the work was to choose conditions for microclonal propagation and *in vitro* rooting the shoots of *G. acaulis*, a rare alpine Carpathian species.

Methods. Cultivation of plant objects *in vitro*. **Results.** There were chosen conditions for microclonal propagation of *G. acaulis* plants: agarized nutrient medium MS/2 supplemented with 0.2 mg/l of 6-benzylaminopurine (BAP) and 0.2 kinetin (Kin; for plants from Rebra mountain, the Ukrainian Carpathians) and medium MS/2 with double concentration of CaCl₂, supplemented with 0.5 mg/l BAP and 0.1 mg/l Kin (for plants from Turkul mountain, the Ukrainian Carpathians). Optimal for rooting *G. acaulis* plants *in vitro* was nutrient medium MS/2 with half concentration of NH₄NO₃ without vitamins and sucrose supplemented with 3 g/l of mannite and 0.1 mg/l of 1-naphthaleneacetic acid, the maintaining substrate was agar (4 g/l) combined with perlite (16 g/l). **Conclusions.** The efficient method of microclonal propagation and rooting *G. acaulis* plants *in vitro* was found and tested. The results of the research will be used for obtaining a sufficient amount of viable rooted plants able to efficiently adapt to conditions *ex vitro* and *in situ*.

Keywords: *Gentiana acaulis* L., microclonal propagation, rooting *in vitro*.