

КОЛІСНИК Х. М.<sup>1✉</sup>, ГРИЦАК Л. Р.<sup>1</sup>, ПРОКОП'ЯК М. З.<sup>1</sup>, БОЙКО Д. А.<sup>2</sup>, ДРОБИК Н. М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка,

Україна, 47027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2, ORCID: 0000-0002-2872-5201, 0000-0002-2846-4208, 0000-0002-8927-8687

<sup>2</sup> Львівський національний університет природокористування,

Україна, 80831, Львівська обл., м. Дубляни, вул. Володимира Великого, 1

✉ kolisnyk@chem-bio.com.ua, (098) 917-13-87

## ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ПРЕПАРАТУ РЕКУЛЬТИВАНТУ КОМПОЗИЦІЙНОГО “TREVITAN™” ДЛЯ ОТРИМАННЯ ТА РОСТУ КОЛЕКЦІЙ РОСЛИН *IN VITRO*

**Мета.** Оцінити вплив препарату рекультиванту композиційного “Trevitan™” на схожість насіння *Carlina cirsioides* Klok., *Carlina onopordifolia* Bess. ex Szaf., Kulcz. et Pawl., *Carlina acaulis* L., *Gentiana verna* L. та *Gentiana lutea* L. із протермінованим строком збереження та на ростові параметри рослин цих видів в культурі *in vitro*. **Методи.** Методи культивування *in vitro*, біометричні методи. **Результати.** Показано, що ефективність впливу препарату рекультиванту композиційного “Trevitan™” на схожість насіння та ростові процеси рослин *in vitro* залежить від їх видової приналежності. Використання цього препарату стимулювало проростання насіння *Gentiana lutea* L. із протермінованим на 5 років періодом його схожості. Однак, суттєво не впливало на схожість та енергію проростання свіжозібраного насіння і насіння із тривалим періодом збереження схожості видів роду *Carlina*. У поєднанні з ауксином (3-індолилцотовою кислотою) рекультивант композиційний “Trevitan™” пригнічувало ріст і розвиток кореневої системи у рослин видів *G. verna*, *C. acaulis*, *C. cirsioides*, однак стимулювало – у *C. onopordifolia*. Введення цього препарату до складу живильного середовища МС/2 без застосування інших регуляторів росту стимулювало ріст міжвузлів у рослин *in vitro* гірського виду *G. verna*, а у іншого гірського виду – *C. acaulis* – пришвидшувало розвиток нових листків та їх ріст у довжину. **Висновки.** Отримані результати вказують на необхідність проведення подальших досліджень впливу препарату рекультиванту композиційного “Trevitan™” із залученням ширшого видового різноманіття рослин.

**Ключові слова:** *Carlina* L., *Gentiana* L., рослини *in vitro*, ростові процеси, рекультивант композиційний “Trevitan™”.

В останні десятиліття посилюється тенденція щодо інтенсивнішого використання натуральної сировини лікарських видів рослин для комплексного лікування різних типів захворювань [1, 3]. Це сприяє пошуку, дослідженню та впровадженню у фармацевтичну та медичну практики нових видів лікарських рослин. Однак, заготівля їхньої лікарської сировини часто призводить до виснаження запасів, скорочення ареалів видів та їх потрапляння до регіональних, державних чи міжнародних списків рідкісних таксонів. Саме до таких цінних лікарських рослин належать види роду *Gentiana* L. та *Carlina* L., які мають статус рідкісних, зникаючих або таких, що потребують охорони не лише в Україні, але й у багатьох країнах світу [6, 8]. Застосування біотехнологічних методів дозволяє не лише зберегти генофонд лікарських видів рослин, але й забезпечити потреби фармацевтики та медицини їхньою сировиною у достатній кількості. Окрім того, створення живих колекцій рослин *in vitro* можна вважати однією із форм охорони рослин природної флори, яка є ефективним способом збереження біорізноманіття *ex situ* [2].

Ефективне культивування рослин в умовах *in vitro* передбачає забезпечення оптимального світлового, температурного режимів, а також елементного складу живильного середовища. Проте, не менш важливим є пошук препаратів, які покращують не лише ріст і розвиток рослин *in vitro*, але й дозволяють стимулювати проростання насіння з тривалим терміном зберігання та, відповідно, протермінованим строком схожості. Остання умова є вкрай важливою з огляду на складність в останні роки визрівання насіння у природних умовах через зменшення ролі генеративного розмноження у самопітриманні природних популяцій багатьох видів, кліматичні зміни та пов'язані з ними зміни омброрежиму, пошкодження шкідниками, фітопатогенами тощо [2].

© КОЛІСНИК Х. М., ГРИЦАК Л. Р., ПРОКОП'ЯК М. З., БОЙКО Д. А., ДРОБИК Н. М.

За даними літературних джерел відомо, що використання препаратів органічного походження сприяє підвищенню росту, розвитку та продуктивності сільськогосподарських культур [4]. До таких препаратів належить рекультивант композиційний “Trevitan™”. Відомо також, що вказаний препарат швидко відновлює та сприяє формуванню родючого шару ґрунту на фізичному, хімічному, біологічному та енергоінформаційному рівнях. Рекультивант композиційний виконує самоорганізуючу протекторну функцію пролонгованої дії для рослин [4]. За використання препарату ефективність фотосинтезу зростає, підвищується продуктивність рослин, запускається процес самозрошення, активується імунна система та твірні тканини [4]. Однак, у науковій літературі відсутня інформація щодо результатів використання рекультиванту композиційний “Trevitan™” для стимулювання схожості насіння та росту рослин дикорослої флори.

Виходячи із вищезазначеного, мета роботи полягала в оцінці потенціалу рекультиванту композиційного “Trevitan™” для підвищення схожості насіння *Carlina onopordifolia* Bess. ex Szaf., Kulcz. et Pawl., *Carlina acaulis* L., *Carlina cirsioides* Klok., *Gentiana lutea* L. та *Gentiana verna* L. із протермінованим строком схожості, а також для покращення росту рослин цих видів в умовах *in vitro*.

### Матеріали і методи

Для введення в культуру *in vitro* було використано насіння зібране у 2015 р. і 2022 р. із місцезростань *C. cirsioides* та *C. onopordifolia* (г. Голиця, с. Гутисько, Бережанський район, Тернопільська область, 295 м н. р. м.), а також *C. acaulis* (с. Лазещина, Рахівський район, Закарпатська область, 714 м н. р. м.). Насіння *G. verna* було зібране під час експедиційних досліджень у 2006 р. в урочищі Гереджівка (750–800 м н. р. м.) на північній околиці смт. Ясіня Рахівського району Закарпатської області. Насіння *Gentiana lutea* L. – з г. Пожижевська (хребет Чорногора, Івано-Франківська область) 2017 р. збору.

Для з'ясування впливу рекультиванту композиційного “Trevitan™” на схожість насіння була використана наступна схема: насіння замочували на 24 год у розчині “Trevitan™” концентрацією 1 мл/л або розчині гіберелової кислоти концентрацією 1000 мг/л, після чого його стерилізували у 5 % розчині  $H_2O_2$  упродовж 30 хв та висаджували на агаризоване середовища Мура-

сіге, Скуга (МС) [10] з половинним вмістом макро- та мікросолей (МС/2), до складу якого було додано препарат “Trevitan™” у концентрації 1 мл/л. Пророщували насіння за температури +16–+18°C, вологості 80 %.

З метою підбору умов для вегетативного розмноження виду *G. verna* використовували отримані з насіння асептичні 1,5–2 місячні рослини, які живцювали і висаджували на містки із фільтрувального паперу у живильне середовище МС/2, доповнене кінетином (КІН). Отримані проростки культивували на таких варіантах живильних середовищ: *Контроль* – МС/2, доповнене 0,1 мл/л КІН (висаджували у пробірки на містки з фільтрувального паперу), 1 *варіант* – МС/2, доповнене 0,1 мл/л КІН і 1 мл/л “Trevitan™” (висаджували у пробірки на містки з фільтрувального паперу), 2 *варіант* – МС/2, доповнене 0,1 мл/л КІН, 1 мл/л “Trevitan™” (висаджували у культиваційні колби об'ємом 200 мл на поролонові диски). Асептичні проростки видів роду *Carlina* культивували на таких варіантах живильного середовища: *Контроль* – МС/2 без препарату та регуляторів росту; 1 *варіант* – МС/2, доповнене 0,1 мл/л індоліл-3-оцтової кислотою (ІОК); 2 *варіант* – МС/2 без регуляторів росту, доповнене 1 мл/л “Trevitan™”; 3 *варіант* – МС/2, доповнене 0,1 мл/л ІОК, 1 мл/л “Trevitan™”. В усіх дослідних варіантах рослини висаджували на поролонові диски у культиваційні колби об'ємом 200 мл. Вимірювання морфометричних параметрів у всіх експериментальних варіантах здійснювалось кожні 2 тижні упродовж 60 діб. Отримані дані опрацьовували статистично за використання програмного забезпечення Prism 6.

### Результати та обговорення

Відомо, що насіння *G. verna* проростає лише на світлі. Перші сходи з'являються в основному на 25–27 доби, але інколи проростання починається на 55–60 доби. Проте, навіть при поєднанні двох факторів, які порушують стан спокою насіння (тривалої холодової стратифікації і обробки високими концентраціями ГКЗ), його схожість не перевищує 30 % [8]. Як показали наші дослідження застосування гіберелової кислоти, а також рекультиванту композиційного “Trevitan™” не дозволило стимулювати проростання насіння *G. verna* 2006 р. збору. Однак, нами встановлено, що використання препарату “Trevitan™” дозволяє простимулювати проростання насіння 2017 р. збору іншого виду роду

*Gentiana* – *Gentiana lutea* L. За результатами наших досліджень насіння цього виду втрачає схожість вже через один рік. За застосування препарату "Trevitan™" схожість насіння 2017 р. збору становила 19,44 %. Оброблення насіння гібереловою кислотою не мало стимулюючого ефекту.

Не менш важливим для збереження геофону рідкісних рослин є отримання колекцій рослин *in vitro*. Результати проведених раніше досліджень [8] показали, що оптимальним для вегетативного розмноження *G. verna* є рідке живильне середовище МС/2, доповнене 0,1 мг/л КІН, для вкорінення – те ж середовище з 0,1 мг/л НОК. Аналіз отриманих даних щодо впливу рекультиванту композиційного "Trevitan™" на ріст та розвиток рослин *in vitro* *G. verna* свідчить, що цей препарат має вибірковий вплив: він стимулює ріст міжвузлів, але пригнічує розвиток кореневої системи та нових листків (табл. 1). Інтенсивність приросту висоти стебла рослин 1 дослідного варіанту була у 4,09 рази вищою, порівняно з рослинами контрольної групи. Формування нових листків, навпаки, активніше відбувалося за росту рослин на живильному середовищі, доповненому КІН, без препарату (табл. 1). У рослин контрольної групи інтенсивніше розвивалася й коренева система, порівняно з дослідними варіантами. У той же час має значення й об'єм культурального посуду. Середні значення загальної довжини рослин *in vitro* *G. verna*, що культивувалися в умовах 2 дослідного варіанту, становили  $7,1 \pm 0,82$  см, у той час як у рослин 1 варіанту –  $3,05 \pm 0,93$  см). Це, очевидно, спричинене тим, що вирощування у пробірці обмежує простір для росту рослин *in vitro*.

Дослідження біології видів роду *Carlina* показало, що їх насіння не має періоду спокою, проростає на 3–8 доби, характеризується високими схожістю та енергією проростання (81,2–94,8 %). Збір насіння як в умовах природи, так і в культурі, слід проводити в грудні [5].

Результати наших досліджень показали, що схожість та енергія проростання насіння досліджених видів є доволі високими та практично не залежать від оброблення рекультивантом композиційним "Trevitan™". Так, схожість насіння виду *C. onopordifolia* з додаванням препарату становила 95,6 %, а без додавання – 97,6 %, для *C. cirsioides* – 92,7 % та 90,5 %, а *C. acaulis* – 87,7 % та 85,9 % відповідно. Проростання насіння відбувалося на 7–8 доби.

Встановлено, що насіння цих видів, оброблене гібереловою кислотою, здатне проростати

навіть через 8 років після збору, зберігаючи високий коефіцієнт схожості. Так, схожість насіння *C. onopordifolia*, зібраного у 2015 році, лише на 3,2 % менша, порівняно із насінням 2022 року збору. Для виду *C. cirsioides* різниця між схожістю насіння 2015 р. та 2022 р. становила 6,8 %, а для виду *C. acaulis* – 9,0 %.

Вплив рекультиванту композиційного "Trevitan™" на розвиток розетки листків рослин видів роду *Carlina* залежить від їхньої видової приналежності. Так, для росту листків рослин виду *C. acaulis* найкращим виявилось живильне середовище МС/2, доповнене лише препаратом "Trevitan™" (2 варіант): за досліджений період приріст довжини листків становив 2,62 см, а нових листків утворилося 3,62 шт. (рис. 1, 2). Поєднання регулятора росту ІОК із "Trevitan™" у складі живильного середовища 3 дослідного варіанта негативно позначалося на формуванні нових листків, кількість яких становила лише 2,29 шт. (рис. 2).

Введення до складу живильного середовища лише регулятора росту ІОК (1 варіант) гальмувало ріст листків у довжину (0,89 см). Оптимальним для ініціювання процесів ризогенезу у рослин цього виду виявилось живильне середовище 1 варіанту (приріст 2,66 см). Найменший приріст коренів у довжину зафіксовано на живильному середовищі 3 варіанту (1,21 см) (рис. 3). Отже, встановлено, що використання препарату "Trevitan™" для виду *C. acaulis* позитивно впливає на динаміку росту листової розетки рослин *in vitro* *C. acaulis*, проте гальмує розвиток кореневої системи. Особливо це проявляється за поєднання рекультиванту з регулятором росту ІОК. Ймовірно, це поєднання зумовлює ефекту антагонізму, що позначається на засвоєнні елементів живлення, а також на експресії генів, що відповідають за формування кореневої системи тощо.

Зовсім інші результати були отримані для виду *C. cirsioides*. Перший дослідний варіант найкраще забезпечував формування нових листків у розетці (рис. 2), але їх найбільший приріст (2,62 см) спостерігали за культивування рослин на живильному середовищі 3 дослідного варіанту (рис. 1). На відміну від виду *C. acaulis*, найслабше розетка листків рослин *C. cirsioides* розвивалася за їхнього культивування на живильному середовищі 2 дослідного варіанту. Проте, як і для рослин виду *C. acaulis*, склад живильного середовища 1 дослідного варіанту найбільше сприяв розвитку кореневої системи *C. cirsioides*.

Таблиця 1. Зміни морфометричних параметрів рослин *in vitro* виду *G. verna* залежно від складу живильного середовища та об'єму культурального посуду (через 60 діб) (n = 20, x ± SD)

Морфометричні параметри	Контроль	1 варіант	2 варіант
Довжина стебла*	$\frac{44,92}{0,15}$	$\frac{53,84}{1,43}$	$\frac{183,85}{2,37}$
Кількість листків*	$\frac{277,78}{3,26}$	$\frac{172,84}{1,76}$	$\frac{150,94}{1,50}$
Довжина кореня, см	3,57 ± 0,51	2,43 ± 0,43	3 ± 0,49

Примітки: \* числівник – зміна параметра, %; знаменник – зміна параметра, рази.

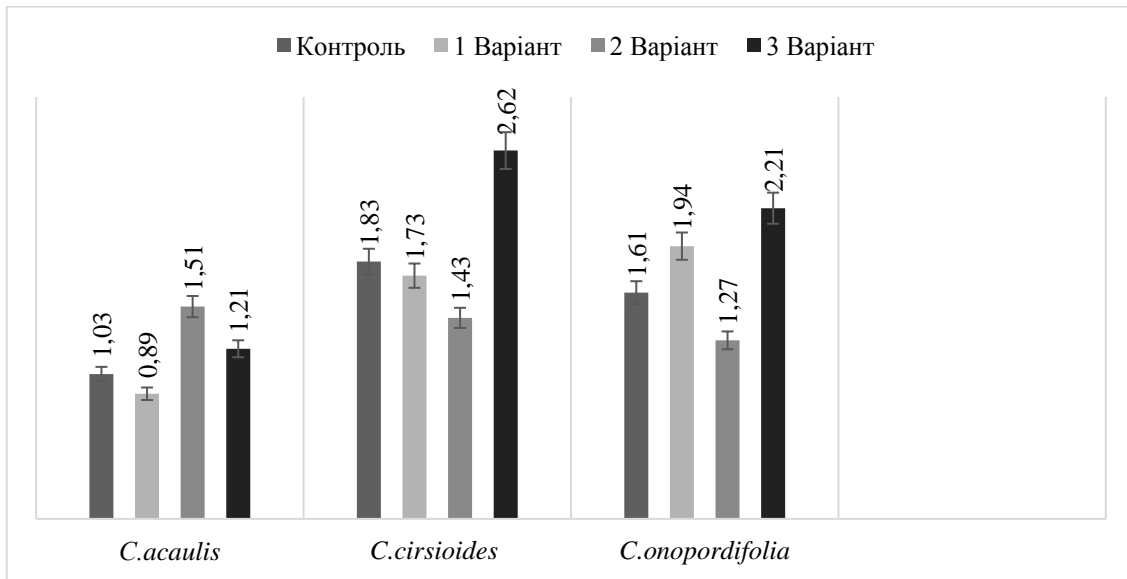


Рис. 1. Показники приросту середньої довжини листків рослин роду *Carlina* на різних варіантах живильного середовища (у см).

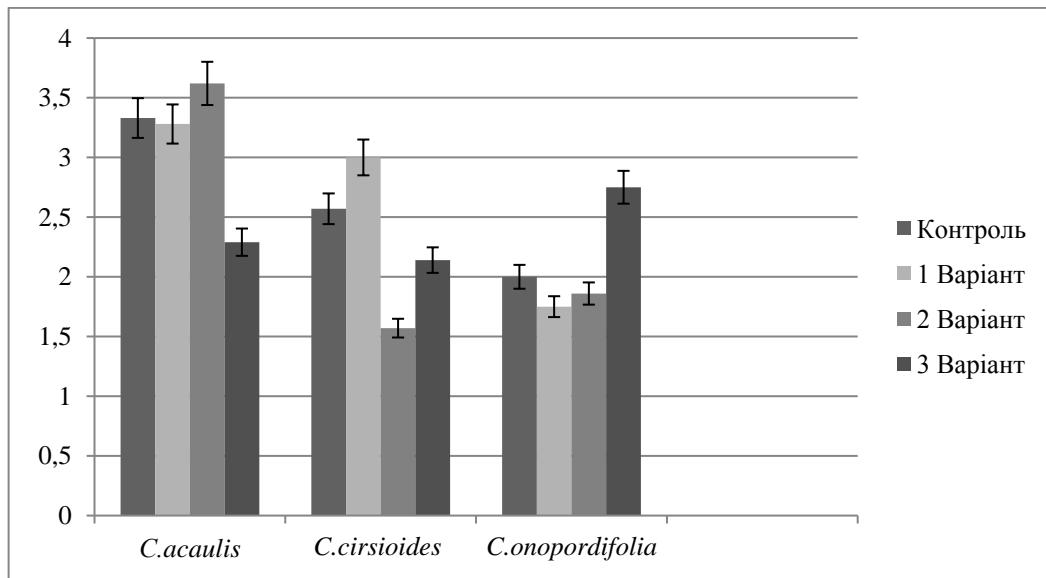


Рис. 2. Формування нових листків рослин роду *Carlina* на різних варіантах живильного середовища (шт.).

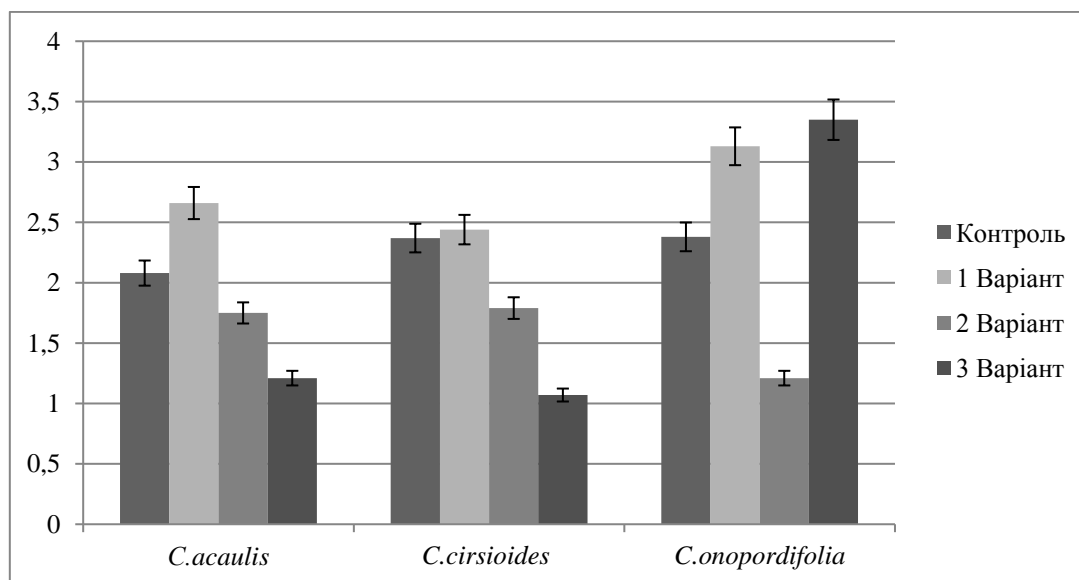


Рис. 3. Порівняння приросту довжини кореня рослин роду *Carlina* на різних модифікаціях живильного середовища (у см).

Найслабше їхні корені розвивалися за культивування на живильному середовищі 3 варіанту (рис. 3).

Однак, склад живильного середовища 3 дослідного варіанту виявився найоптимальнішим для розвитку як розетки листків, так і кореневої системи рослин виду *C. onopordifolia*. Ця дослідна група характеризувалася найвищими показниками утворення нових листків (2,75 шт.), приросту середньої довжини листків (2,21 см) (рис. 1, 2) та найінтенсивнішими процесами ризогенезу. Середня довжина коренів у рослин 3 дослідної групи становила 3,35 см (рис. 3).

Відмінності отриманих результатів зумовлені міжвидовими особливостями досліджених таксонів роду *Carlina*. Вид *C. acaulis* належить до гірських видів і росте на луках, галявинах, узліссях у межах висот 500–1500 м н. р. м. *C. onopordifolia* є світлолюбним видом, що тяжіє до степових ділянок, а *C. cirsioides* належить до тіньовитривалих видів та зростає в розріджених лісах і на сонячних узліссях. Основні місцезростання двох останніх видів зосереджені в межах Західного Поділля і в висотному напрямі їх популяції не піднімаються вище 500 м н. р. м. Незважаючи на практично однакові абіотичні умови і гіпсометричний рівень росту, еволюційно закріплені відмінності у ценотичних умовах росту видів *C. onopordifolia* та *C. cirsioides* позначилися на особливостях їх фізіології. Це й пояснює відмінності їх ростових процесів на однакових за складом живильних середовищах.

## Висновки

Отже, результати тестування препарату рекультиванту композиційного "Trevitan™" для стимулювання схожості насіння та покращення ростових процесів у рослин *in vitro* рідкісних видів *Centiana verna* L., *Carlina cirsioides* Klok. та *Carlina onopordifolia* Bess. ex Szaf., Kulcz. et Pawl., *Carlina acaulis* L. не дозволяють однозначно рекомендувати його для використання у біотехнології рослин. Так, показано його ефективність для стимулювання схожості насіння *Gentiana lutea* L. із протермінованим до 5 років періодом проростання. Проте, цей препарат суттєво не впливає на схожість та енергію проростання свіжозібраного насіння та насіння із тривалим періодом збереження схожості видів роду *Carlina*. Ефективність його впливу на ростові процеси рослин *in vitro* залежить від їх видової приналежності. У поєднанні з ауксином ІОК рекультивант композиційний "Trevitan™" пригнічував ріст і розвиток кореневої системи видів *G. verna*, *C. acaulis*, *C. cirsioides*, однак стимулював у рослин *C. onopordifolia*. Введення цього препарату до складу живильного середовища МС/2 без застосування інших регуляторів росту стимулювало ріст міжвузлів у рослин *in vitro* гірського виду *G. verna*, а у іншого гірського виду – *C. acaulis* – пришвидшувало формування нових листків та їх ріст у довжину у рослин. Усі отримані результати свідчать про необхідність проведення подальших досліджень із залученням ширшого видового різноманіття рослин.

## References

1. Strashniuk N. M., Les'kova O. M., Zahrychuk H. Ya. ta in. Biologically active substances of species of the genus *Gentiana* L. 1. *Biosyntez ta fiziologichna diia. Fitoterapiia. Chasopys.* 2006. No. 1. P. 31–41. [in Ukrainian]
2. Hrytsak L. R., Mel'nyk V. M., Konvaliuk I. I., Kravets' N. B., Mosula M. Z., Drobyk N. M. Microclonal propagation of *Gentiana* L. species from the Ukrainian flora. *Naukovi zapysky Ternopil's'koho natsional'noho pedahohichnoho universytetu imeni Volodymyra Hnatiuka. Serii : Biolohiia.* 2017. No. 1. S. 74–82. [in Ukrainian]
3. Hrytsyk A. R., Benzel' L. V., Tsveiuk N. P. The use of plants of species of the *Gentiana* genus (*Gentiana* L.) in medicine. *Zhurn.* 2003. No. 2. S. 91–97. [in Ukrainian]
4. Dzendzel' A. Yu., Pyda S. V. Recultivant composite “Trevitan™” is a new complex preparation for rapid soil regeneration. *Osvitni ta naukovi vymiry pryrodnychych nauk : zbirnyk materialiv II vseukrains'koi zaochnoi naukovoi konferentsii* (m. Sumy, 8 hrudnia 2021 r.). Sumy : SumDPU im. A. S. Makarenka, 2021. S. 51–53. [in Ukrainian]
5. Iefremova O. O., Skybits'ka M. I., Meleshko I. H. Biological features of growth and development of *Carlina* L. species *ex situ*. *Lisnytstvo i ahrolisomelioratsiia.* Kharkiv : Ukr NDIHA, 2009. Vyp. 115. S. 245–249. [in Ukrainian]
6. Zyman S. M. Some interesting and rare plants from the vicinity of the village. Yasinya, Transcarpathian region. *Ukr. botan. zhurn.* 1964. Vol. 21, No. 4. S. 102–104.
7. Prokopiv A. I. Anatomical organization of roots and structure of shoot systems of cypresses (*Gentiana* L., Gentianaceae Juss.): avtoref. dys. na zdobuttia nauk. stupenia kand. biol. nauk: spets. 03.00.01 «Botanika». Kyiv, 1997. 24 s. [in Ukrainian]
8. Strashniuk N. M., Kravets' N. B., Konvaliuk I. I., Tvardovs'ka M. O., Mel'nyk V. M., Holubenko A. V. *In vitro* culture initiation for rare species of Ukrainian Carpathians *Gentiana verna* L. *Naukovyy visnyk Uzhhorods'koho universytetu.* 2008. Ser. Biolohiia, Vyp. 22. P. 49–53. Retrieved from: <https://dspace.uzhnu.edu.ua/jspui/bitstream/lib/15496/1>. [in Ukrainian]
9. Red Book of Ukraine. The plant world. Za red. Ya. P. Didukha. Kyiv : Hlobalkonsal'tynh, 2009. 900 s. [in Ukrainian]
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15, № 13. P. 473–497.

**KOLISNYK Kh. M.<sup>1</sup>, HRYTSAK L. R.<sup>1</sup>, PROKOPIAK M. Z.<sup>1</sup>, BOIKO D. A.<sup>2</sup>, DROBYK N. M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University,  
Ukraine, 46001, Ternopil, M. Kryvonosa str., 2

<sup>2</sup> Lviv National Environmental University,  
Ukraine, 80831, Lviv oblast, Dublyany, Volodymyra Velykoho, 1

## PROSPECTS OF USING THE COMPOSITE “TREVITAN™” RECVLTIVANT PREPARATION FOR OBTAINING AND GROWING COLLECTIONS OF PLANTS *IN VITRO*

**Aim.** To evaluate the effect of the composite recultivant preparation “Trevitan™” on the germination of seeds of *Carlina cirsioides* Klok., *Carlina onopordifolia* Bess. ex Szaf., Kulcz. et Pawl., *Carlina acaulis* L., *Gentiana verna* L. and *Gentiana lutea* L. with extended shelf life and on the growth parameters of plants of these species *in vitro* cultures.

**Methods.** *In vitro* cultivation methods, biometric methods. **Results.** It is shown that the effectiveness of the recultivant composition “Trevitan™” on seed germination and plant growth *in vitro* depends on their species. The use of this drug stimulated the germination of *G. lutea* seeds with a 5-year extension of its germination period. However, it did not significantly affect the germination and germination energy of freshly collected seeds and seeds with a long period of preservation of germination of species of the genus *Carlina*. In combination with auxin (3-indoleacetic acid), the composite recultivant “Trevitan™” inhibited the growth and development of the root system in plants of the species *G. verna*, *C. acaulis* and *C. cirsioides*, but stimulated it in *C. onopordifolia*. The introduction of this drug into the MC/2 nutrient medium without the use of other growth regulators stimulated the growth of internodes *in vitro* in plants of the mountain species *G. verna*, and in another mountain species – *C. acaulis* – it accelerated the development of new leaves and their growth in length. **Conclusions.** The obtained results indicate the need for further research on the effect of the composite recultivant “Trevitan™” with the involvement of a wider species diversity of plants.

**Keywords:** *Carlina* L., *Gentiana* L., plants *in vitro*, growth processes, composite recultivant “Trevitan™”.