

УДК 576.5: 582.923.1

ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* РІДКІСНОГО ВИДУ УКРАЇНСЬКИХ КАРПАТ *GENTIANA VERNA* L.

Н.М. Страшнюк¹, Н.Б. Кравець¹, І.І. Конвалюк¹, М.О. Твардовська², В.М. Мельник^{2,3}, А.В. Голубенко³

Введення в культуру *in vitro* рідкісного виду Українських Карпат *Gentiana verna* L. – Н.М. Страшнюк¹, Н.Б. Кравець¹, І.І. Конвалюк¹, М.О. Твардовська², В.М. Мельник^{2,3}, А.В. Голубенко³. - Введено в культуру *in vitro* тирлич весняний (*Gentiana verna* L.) з Українських Карпат. Підбрано умови для проростання насіння цього виду *in vitro*, вегетативного і мікроклонального розмноження рослин, індукції та проліферації калюсів кореневого та стеблового походження. Проведено порівняння умов культивування *G. verna* та інших видів тирличів флори України. Встановлено деякі особливості вирощування *in vitro* тирличу весняного, зокрема високу здатність до утворення мікроклонів.

Ключові слова: *Gentiana verna* L., культура *in vitro*, вегетативне та мікроклональне розмноження, калюсна тканина.

Адреса: 1-Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, вул. М. Кривоноса, 2, м. Тернопіль, 46027, Україна, e-mail: strashniuk@mail.ru; 2-Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Акад. Заболотного, 150, м. Київ, 03143, Україна, e-mail: v.m.melnyk@imbg.org.ua; 3-Ботанічний сад імені академіка О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка, вул. Комінтерну, 1, м. Київ, 01032, Україна.

***In vitro* culture initiation for rare species of Ukrainian Carpathians *Gentiana verna* L. – N.M. Strashniuk¹, N.B. Kravets¹, I.I. Konvaliuk¹, M.O. Twardovska², V.M. Mel'nyk^{2,3}, A.V. Holubenko³.** – There has been generated in culture *in vitro* *Gentiana verna* L from Ukrainian Carpathians. Conditions for germination of this species seeds *in vitro*, vegetative and microclonal plant propagation, induction and proliferation of the root- and stem-derived calli were specified. Conditions for culturing of *G. verna* and other *Gentiana* species from Ukrainian flora were compared. Some details of *G. verna* maintenance *in vitro*, in particular its high potential for microclones formation were found.

Key words: *Gentiana verna* L, culture *in vitro*, vegetative and microclonal propagation, callus tissue.

Address: 1-Ternopil National Volodymyr Hnatiuk Pedagogical University, 2, M. Kryvonis st., Ternopil, 46027, Ukraine, e-mail: strashniuk@mail.ru; 2-Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, 150, Acad. Zabolotnogo st., Kyiv, 03143, Ukraine, e-mail: v.m.melnyk@imbg.org.ua; 3-Fomin Botanical Garden of Taras Shevchenko Kyiv National University, 1, Komintern st., Kyiv, 01032, Ukraine.

Вступ

G. verna – євразійський аркто-альпійський вид, поширений у горах Європи від Іспанії до Норвегії й Великобританії, у Малій та Центральній Азії [14-16]. *G. verna* зростає на скелях, кам'янистих та щербенистих галявинах, високогірних луках у альпійському та субальпійському поясах, зрідка у лісовому (буковому) поясі на вологих дерново-буроземних, з поверхні оглеєних ґрунтах [3, 12], на післялісових луках Карпат [9, 14-16]; розмножується насіннєвим і вегетативним способами.

Серед дослідників не існує єдиного погляду на поширення *G. verna* у флорі України. У літературі наводяться різні місця зростання цього виду у високогірних районах Українських Карпат [4, 7, 15, 16]. Проте, на сьогоднішній день підтверджено лише одне місцезнаходження *G. verna* в Україні – на околиці смт. Ясіня Рахівського р-ну Закарпатської обл. (гербарні зразки в КВ: 7.05.1962, Зи-

ман С.М.; 29.04.1968, Чопик В.І.; 8.05.2003, Кіш Р., Данилик І.).

G. verna – рідкісний вид, віднесений до категорії вразливих, у майбутньому може бути віднесений до зникаючих [15]. Для збереження цього виду, як і інших червонокнижних видів тирличів, поряд з класичними природоохоронними заходами, доцільним є використання біотехнологічних методів. Раніше нами введено в культуру *in vitro* та досліджено види *G. lutea*, *G. punctata*, *G. acaulis*, *G. asclepiadea*, а також *G. pneumonanthe* і *G. cruciata* флори України [11, 13]. Метою представленої роботи було з'ясування особливостей культивування *in vitro* тирличу весняного.

Матеріал та методики

Вихідним матеріалом було насіння *G. verna*, зібране під час власних експедиційних досліджень

в урочищі Гереджівка (750-800 м н. р. м.) на північній околиці смт. Ясіня Рахівського району Закарпатської області.

Для отримання асептичних рослин насіння *G. verna* стерилізували 5%-им розчином перексиду водню протягом 30 хв., висаджували в чашки Петрі на агаризоване живильне середовище МС [20] з половинним вмістом макро- і мікросолей (МС/2) без фітогормонів. Насіння пророщували на світлі (3000 лк) при температурі 20-22°C, вологості 80%.

З метою підбору умов для вегетативного розмноження 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 рослини вкорінювали на цьому ж середовищі, доповненому α -нафтилоцтовою кислотою (НОК).

Для з'ясування впливу регуляторів росту на процес мікроклонального розмноження *G. verna* використовували ділянки пагонів з пазушними бруньками довжиною 7-10 мм, які поміщали на агаризовані та рідкі середовища МС/2, доповнені комбінаціями різних концентрацій 6-бензиламінопурина (БАП) і Кін. Ефективність мікроклонального розмноження визначали через 1-2 місяці, оцінюючи кількість живців з мікроклонами та середню кількість мікроклонів на живцях.

З метою індукції калюсоутворення використовували експланти кореневого, стеблового та листового походження, які висаджували на середовища МС та МС/2, а також В₅ [17] доповнені комбінаціями різних концентрацій БАП, 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д) та НОК. Частоту калюсогенезу визначали через 4 тижні культивування за відношенням кількості експлантів з калюсом до їхньої загальної кількості.

При підборі умов для проліферації, отриманий калюс відділяли від експлантів і висаджували на середовище різного складу з метою відбору варіанту середовища з найбільшою підтримуючою здатністю для проліферації калюсів. Культури інкубували в темряві при 25-26,5°C, субкультивування проводили через кожні 4 тижні.

Отримані дані опрацьовували статистично [6].

Результати та обговорення

Проростання насіння. Відомо, що насіння *G. verna* потребує холодової стратифікації. При періодичному охолодженні на світлі при +20°C проростає близько 30%, в умовах темряви насіння не проростає [8].

Для підвищення схожості насіння після збору піддавали холодовій (+3-4°C) стратифікації. Нами підтверджено, що насіння *G. verna* проростає лише на світлі. Перші сходи з'являються в основно-

му на 25-27 день, проте інколи проростання починається на 55-60 день.

Після холодової стратифікації відсоток проростання насіння *G. verna* був найвищим у жовтні (стратифікація 4 місяці) та грудні (стратифікація 6 місяців) і становив 15,3 і 17,1%, відповідно (табл. 1). У липні, серпні та листопаді схожість була мінімальною – 2,5%, а отримані проростки – нежиттєздатними. Передпосівна обробка стратифікованого холодом насіння низькою концентрацією (100 мг/л) гіберелової кислоти (ГК₃) протягом однієї доби практично не впливала на його схожість. Проте, збільшення концентрації ГК₃ до 1000 мг/л підвищувало схожість насіння до 24,7% у вересні, до 26,5% – у жовтні та до 29,5% – грудні (табл. 1).

Отже, нами показано здатність насіння т. весняного проростати в умовах *in vitro* на світлі. Проте, навіть при поєднанні двох факторів, що порушують стан спокою насіння (тривалої холодової стратифікації і обробки високими концентраціями ГК₃), схожість не перевищує 29,5%. Отриманий нами результат наближається до показника (30%), наведеного Ніколаєвою М.Г. та співавт. за умови використання ними для порушення спокою насіння *G. verna* лише холодової стратифікації [8].

Вегетативне та мікроклональне розмноження. Оптимальними умовами для вегетативного розмноження *G. verna* було рідке живильне середовище МС/2, доповнене 0,1 мг/л Кін, а для вкорінення – те ж середовище, доповнене 0,1 мг/л НОК. Аналогічні дані отримані нами при розробці умов для вегетативного розмноження *in vitro* інших видів роду *Gentiana* L. [11, 13].

G. verna – багаторічна трав'яниста рослина висотою лише 1-3 см, яка характеризується повільним ростом. Підібрані нами умови *in vitro* для вегетативного розмноження цього виду дозволяють отримувати життєздатні рослини, середній приріст яких становить 0,6 мм на добу (рис. 1, А).

Відомо, що клональне мікророзмноження має ряд переваг, порівняно із звичайним методом вегетативного розмноження: високий коефіцієнт розмноження, відбувається оздоровлення рослин від вірусів і патогенних мікроорганізмів, можливе розмноження рослин, які важко або зовсім не розмножуються вегетативно тощо [5].

Застосування мікроклонування для *G. verna* актуальне, зважаючи на рідкісність виду та складну біологію розмноження. Нами встановлено, що формування мікроклонів краще відбувалося на рідких живильних середовищах (рис. 1, Б). Найбільш оптимальним для мультиплікації *G. verna* було середовище МС/2, доповнене 1 мг/л БАП і 0,3 мг/л Кін, на якому кількість експлантів, здатних формувати адвентивні пагони (мікроклони), становила 74%, а кількість пагонів у розрахунку на один висаджений живець складала 7,48 (рис. 2).

Таблиця 1. Сезонна динаміка схожості насіння *G. verna* *in vitro*.
Table 1. Seasonal dynamics of *G. verna* seeds germination *in vitro*.

Місяці	Тривалість стратифікації, місяців	Схожість насіння, %		
		Холодова стратифікація	Холодова стратифікація + 100 мг/л ГК ₃	Холодова стратифікація + 1000 мг/л ГК ₃
Липень	1	2,5	2,5	7,4
Серпень	2	2,5	2,5	6,5
Вересень	3	3,2	6,8	24,7
Жовтень	4	15,3	16,5	26,5
Листопад	5	2,5	2,5	12,8
Грудень	6	17,1	18,2	29,5
Січень	7	4,3	5	8,3
Лютий	8	—	—	2,5
Березень	9	—	—	3,6
Квітень	10	—	4,3	10,5
Травень	11	5,2	2,8	13,5
Червень	12	3,4	3,5	11,8

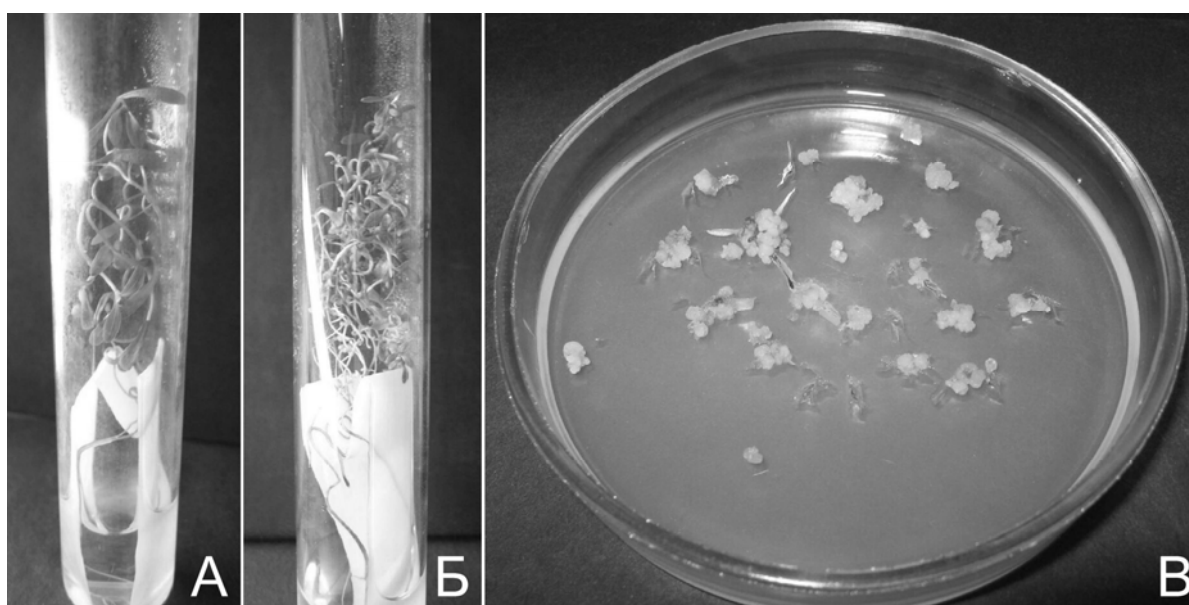


Рис. 1. *G. verna* в культурі *in vitro*: А – рослина, Б – адвентивні пагони (мікроклони), В – калусна тканина кореневого походження, 7 пасаж

Fig. 1. *G. verna* *in vitro* culture: A – plant, B – microclones, C – root-derived callus tissue, 7 passage

Порівняння результатів мікроклонального розмноження *G. verna* та інших досліджених нами раніше тирличів флори України [11, 13] дозволило встановити деякі особливості отримання життєздатних адвентивних пагонів цих видів. Зокрема, з'ясовано, що оптимальним для мультиплікації різних видів тирличів флори України є середовище МС/2. У той же час, ефективність їх мікроклонування залежить від співвідношення концен-

трацій фітогормонів у цьому середовищі, яке, в свою чергу, визначається потребами конкретного виду. Поряд з цим, для *G. verna*, як і для *G. lutea*, процес формування мікроклонів із рослин краще відбувається на рідкому середовищі МС/2, тоді як для видів *G. acaulis*, *G. asclepiadea*, *G. cruciata*, *G. pneumonanthe* та *G. punctata* – на агаризованому.

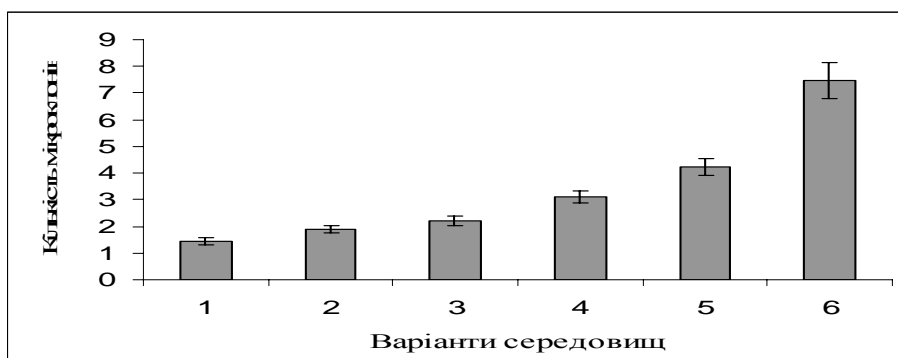


Рис. 2. Залежність кількості сформованих мікроклонів на одному живці *G. verna* від концентрації екзогенних фітогормонів БАП і Кін у живильному середовищі МС/2: 1 – 0,05 мг/л БАП і 0,1 мг/л Кін; 2 – 0,1 мг/л БАП і 0,1 мг/л Кін; 3 – 0,5 мг/л БАП і 0,1 мг/л Кін; 4 – 0,2 мг/л БАП і 0,2 мг/л Кін; 5 – 1,0 мг/л БАП і 0,1 мг/л Кін; 6 – 1,0 мг/л БАП і 0,2 мг/л Кін.

Fig 2. Variation of the formed clone numbers per *G. verna* cutting with levels of exogenous phytohormones BAP and Kin in the MC/2 nutrient medium: 1 – 0,05 mg/l BAP and 0,1 mg/l Kin; 2 – 0,1 mg/l BAP and 0,1 mg/l Kin; 3 – 0,5 mg/l BAP and 0,1 mg/l Kin; 4 – 0,2 mg/l BAP and 0,2 mg/l Kin; 5 – 1,0 mg/l BAP and 0,1 mg/l Kin; 6 – 1,0 mg/l BAP and 0,2 mg/l Kin.

Кількість утворених адвентивних пагонів на одному живці у випадку *G. verna* порівняно з іншими дослідженими нами раніше видами [11, 13] була найвищою – 7,48. Близькими до т. весняного були показники ефективності мікроклонування *G. cruciata* (с. Креничі) – 7,35, *G. lutea* (г. Пожижевська) – 6,5 та *G. pneumonanthe* (Корюківське лісництво) – 6,32. Дещо меншими були ці показники для інших популяцій цих видів та для *G. asclepiadea*, тоді як для *G. acaulis* і *G. punctata* показники ефективності мікроклонування були найменшими [11, 13]. Очевидно, така висока здатність *G. verna* до утворення мікроклонів визначається будовою пагона і структурою пагонової системи цього виду, зокрема здатністю поліциклічного пагона утворювати кілька розеток, розмежованих ділянками з видовженими міжвузлями [10].

Індукція та проліферація калюсу. Стеблові, листові та кореневі експланты *G. verna* здатні до формування калюсу на середовищах В₅, МС та МС/2, доповнених комбінаціями різних концентрацій ауксинів і цитокінінів. Проте, інтенсивність калюсогенезу залежала від типу експланту та складу живильного середовища. Так, на середовищі В₅ калюсоутворення було незначне, або висаджені експланты темніли і гинули уже через 1-2

тижні. Тестування середовищ МС і МС/2 показало, що процеси дедиференціації у досліджуваного виду мало залежать від концентрації макро- і мікророслей – обидва середовища індують калюсоутворення. Інтенсивність калюсогенезу *G. verna* у значній мірі визначалася поєднанням певних фітогормонів у різних концентраціях (табл. 2). Так, введення у середовища комбінації фітогормонів БАП+2,4-Д стимулювало формування калюсу блідо-жовтого забарвлення, пухкої консистенції, що швидко наростав (рис. 1, В). У той же час комбінація БАП+НОК була менш сприятливою для калюсоутворення: отриманий калюс наростав повільно і через один-два пасажі відмирав.

Калюсогенез на усіх типах експлантів рослин *G. verna* найкраще відбувався на середовищі МС/2, доповненому 0,1 мг/л БАП і 0,5 мг/л 2,4-Д (табл. 2). Поряд з цим, найвищою здатністю до калюсоутворення на усіх протестованих середовищах характеризувалися стеблові експланты. На листових експлантах калюс хоча й формувався, але вже на 3-4 пасажі його ріст повністю припинявся і спостерігався некроз тканин. Тому отримати життєздатний проліферативно активний калюс листового походження *G. verna* нам не вдалося.

Таблиця 2. Інтенсивність калюсогенезу *G. verna* залежно від типу експланту та складу живильного середовища, %
Table 2. *G. verna* callus genesis intensity variations with explant type and nutrient medium composition, %

Тип експланта	Живильне середовище				
	МС, 2,0 мг/л БАП + 0,4 мг/л НОК	МС/2, 2,0 мг/л БАП + 0,4 мг/л НОК	МС, 0,1 мг/л БАП + 1,0 мг/л 2,4-Д	МС/2, 0,1 мг/л БАП + 1,0 мг/л 2,4-Д	МС/2, 0,1 мг/л БАП + 0,5 мг/л 2,4-Д
Корені	6,2	9,2	58,8	65,2	71,4
Стебла	8,4	13,4	62,4	71,8	88,2
Листки	3,4	5,3	16,4	21,2	24,8

Найкраще проліферація калюсних культур кореневого та стеблового походження відбувалася за умови збільшення концентрації БАП до 0,25

мг/л. Оскільки вміст у середовищі макро- і мікророслей суттєво не впливав на проліферативну активність отриманих нами культур тканин

G. verna, то з метою здешевлення субстратів для нарощування калюсів у подальшому використували середовище МС/2.

Слід зазначити, що практично у всіх дослідженнях, що стосуються отримання культури тканин тирличів, як базове використовують живильне середовище Мурасіге-Скуга, доповнене різними комбінаціями ауксинів і цитокинінів [1, 2, 18, 19, 21]. Поєднання у середовищах МС або МС/2 фітогормонів БАП і 2,4-Д у різних концентраціях було оптимальним для індукції калюсоутворення й для всіх видів роду *Gentiana* флори України, введених нами раніше в культуру *in vitro* [11, 13]. Поряд з цим, як і у випадку *G. verna*, листкові експланти інших досліджених нами тирличів характеризувалися найменшою здатністю до формування калюсу на наведених вище середовищах.

Висновки

Підібрано умови *in vitro* для вегетативного та мікроклонального розмноження *G. verna* та отримано культуру тканин цього виду.

Оптимальним для вегетативного розмноження *G. verna* було рідке живильне середовище МС/2, доповнене 0,1 мг/л Кін, для вкорінення – те ж середовище з 0,1 мг/л НОК. Ефективність мікроклонування т. весняного була найвищою на середовищі МС/2, доповненому 1 мг/л БАП і 0,3 мг/л Кін і становила 74%, а кількість пагонів у розрахунку на один висаджений живець складала 7,48. Найкращим для калюсогенезу з кореневих і стеблових експлантів рослин *G. verna* було середовище МС/2, доповнене 0,1 мг/л БАП і 0,5 мг/л 2,4-Д.

1. Голубенко А.В. Морфогенез та особливості вегетативного розмноження видів роду *Gentiana* L. *in vitro*: Дис. ... канд. біол. наук: 03.00.12. – К., 2005. – 193 с.
2. Демків Л. О. Вегетативне розмноження *in vitro* видів роду *Gentiana* L. (*Gentianaceae*) // Укр. ботан. журн. – 1993. – Т.50, № 1. – С. 146-149.
3. Зиман С.М. Деякі цікаві та рідкісні рослини з околиць с. Ясиня Закарпатської області // Укр. ботан. журн. – 1964. – Т.21, №4. – С. 102-104.
4. Зиман С.М., Вайнагіт І.В. Еколого-географічні та фітоценологічні особливості рідкісних видів *Primula farinosa* L. і *Gentiana verna* L. // Укр. ботан. журн. – 1991. – Т.48, №5. – С. 99-101.
5. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. – К.: Наукова думка, 2005. – 272 с.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биологических специальностей вузов. – М.: Высш. школа, 1980. – 293 с.
7. Малиновський К.А., Міркін Б.М., Ішбірдин А.Р., Комендар В.І., Крічфалушій В.В. Синтаксономія прибережно-водних, болотних, лучних, чагарникових і чагарничкових угруповань високогір'я Українських Карпат // Укр. ботан. журн. – 1992. – Т.49, № 4. – С. 5-13.
8. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Л.: Наука, 1985. – 347 с.
9. Определитель высших растений Украины / Авт. кол.: Д.Н. Доброчаева и др.; Редкол.: Ю.Н. Прокудин /отв. ред./ и др. – К.: Наук. думка, 1987. – 546 с.
10. Прокопів А.І. Анатомічна організація коренів і структура пагонових систем тирличів (*Gentiana* L., *Gentianaceae* Juss.): Автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.01 / НАН України; Центральний ботанічний сад ім. М.М.Гришка. – К., 1997. – 24с.
11. Страшнюк Н.М., Грицак Л.Р., Леськова О.М., Мельник В.М. Введення в культуру *in vitro* деяких видів роду *Gentiana* L. // Физиология и биохимия культ. растений. – 2004. – Т.36, №4. – С. 327-334.
12. Страшнюк Н.М., Грицак Л.Р., Леськова О.М., Мельник В.М. Види роду *Gentiana* L. флори України у природі та культурі *in vitro* // Укр. ботан. журн. – 2005. – Т.62, №3. – С. 337-348.
13. Страшнюк Н.М., Твардовська М.О., Мельник В.М. Введення в культуру *in vitro* видів тирличу хрещатого (*Gentiana cruciata* L.) та тирличу звичайного (*Gentiana pneumonanthe* L.) // “Наукові записки” Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. – 2006. – №3-4 (26). – С. 100-107.
14. Флора УРСР / Відп. ред. Д.К. Зеров. – К.: Вид. АН УРСР, 1957. – Т.8. – С. 236-256.
15. Червона книга України. Рослинний світ / Ю.Р. Шеляг-Сосонко та ін. (ред.) – К.: Вид-во “Укр. енциклопедія” ім. М.П. Бажана, 1996. – 608 с.
16. Чопик В. І. Високогірна флора Українських Карпат. – К.: Наукова думка, 1976. – 269 с.
17. Gamburg O. L., Eveleigh D. E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – V.46, №5. – P. 417-421.
18. Mikula A., Tykarska T., Rybczynski J. J., Kuras M. Ultrastructural analysis of initial stages of dedifferentiation of root explants of *Gentiana cruciata* seedlings // Acta Societatis Botanicorum Poloniae. – 2002. – V.71, №4. – P. 287-297.
19. Mikula A., Tykarska T., Zielinska M., Kuras M., Rybczynski J. J. Ultrastructural changes in zygotic embryos of *Gentiana punctata* L. during callus formation and somatic embryogenesis // Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. – 2004. – V.46, №1-12. – P. 109-120.
20. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — V.15, №13. — P. 473-497.
21. Wesolowska M., Skrzypczak L., Dudzinska R. Rodzaj *Gentiana* L. w kulturze *in vitro* // Acta Polon. Pharm. – 1985. – V.42, №1. – P.79-83.

Отримано: 03 серпня 2007 р.

Прийнято до друку: 1 жовтня 2007 р.