

УДК 58.085: 582.923.1

¹Л. Р. ГРИЦАК, ²В. М. МЕЛЬНИК, ²І. І. КОНВАЛЮК, ¹Н. Б. КРАВЕЦЬ,
¹М. З. МОСУЛА, ¹Н. М. ДРОБИК¹Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Акад. Заболотного, 150, Київ, 03143

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ВИДІВ РОДУ *GENTIANA L.* ФЛОРИ УКРАЇНИ

Підібрано умови для мікроклонального розмноження семи видів роду Тирлич (*Gentiana L.*) флори України: *G. acaulis L.*, *G. asclepiadea L.*, *G. cruciata L.*, *G. lutea L.*, *G. pneumonanthe L.*, *G. punctata L.*, *G. verna L.* Встановлено, що оптимальним для мультиплікації тирличів є середовище МС/2, доповнене різними співвідношеннями цитокинінів БАП (0,05–0,5 мг/л) та Кін (0,1–0,2 мг/л). Для кожного виду та його представників з різних місць зростання виявлено оптимальне для ефективного мікроклонування співвідношення фітогормонів. Відсоток живців з мікроклонами для більшості видів складав 70–90 %. Кількість утворених адвентивних пагонів на одному живці лежала в межах 2,62–7,35 та була найбільшою у випадку *G. verna* і найменшою – у *G. acaulis* і *G. punctata*.

Ключові слова: види роду *Gentiana L.*, флора України, мікроклональне розмноження

Тирлич (*Gentiana L.*) – найбільший рід родини *Gentianaceae Juss.*, який охоплює близько 400 видів [20, 23, 25]. В Україні рід *Gentiana* представлений 10 видами: 8 багаторічними – *G. acaulis L.*, *G. asclepiadea L.*, *G. cruciata L.*, *G. laciniata Kit. ex Kanitz.*, *G. lutea L.*, *G. pneumonanthe L.*, *G. punctata L.*, *G. verna L.*, і 2 однорічними – *G. nivalis L.* та *G. utriculosa L.* [2, 6–8, 12, 18].

В Україні види роду Тирлич поширені здебільшого у високогірних районах Карпат. П'ять видів роду занесені до Червоної книги України: *G. lutea*, *G. punctata* належать до зникаючих видів, *G. acaulis*, *G. laciniata*, *G. verna* – до вразливих, які у майбутньому можуть бути віднесені до категорії зникаючих [16].

Рослини цих видів знайшли широке застосування у світовій офіциальній та народній медицині. Лікувальні властивості рослин обумовлені синтезом у їхній підземній та надземній частинах широкого спектру біологічно активних речовин (БАР) – іридоїдів, алкалоїдів, ксантонів, флавоноїдів, фенолкарбонових кислот тощо, дія яких на організм людини проявляється у регуляції діяльності травної, дихальної, видільної систем, поліпшенні обміну речовин в організмі тощо [1, 4, 11, 14].

Зважаючи на фармакологічну цінність представників роду *Gentiana* флори України, декоративність багатьох з них, і у зв'язку з цим, зменшення їхньої чисельності, спричинене різними, у тому числі й антропогенними чинниками, а також складну біологію та фрагментарність досліджень цих рослин, актуальною є розробка технологій мікроклонального розмноження тирличів. Метод мікроклонування як один із методів біоконсервації *in vitro* можна з успіхом використовувати для масового розмноження різних груп корисних рослин, і особливо, для відновлення рідкісних, зникаючих і корисних видів у природних умовах їх зростання [10, 17].

Метою роботи був підбір умов для мікроклонального розмноження семи видів роду *Gentiana* флори України.

Матеріал і методи досліджень

Мікророзмноження тирличів ми 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 [9].

На здатність до мікроклонального розмноження досліджених нами семи видів вивчали агаризовані та рідкі середовища Мурасіге, Скуга [22] з половинним вмістом макро- та мікросолей (МС/2) та МС/2 із збільшеною вдвічі концентрацією CaCl_2 (МС/2_{мод}), доповнені комбінаціями різних концентрацій 6-бензиламінопурину (БАП) (0,05–0,5 мг/л) і кінетину (Кін) (0,1 мг/л і 0,2 мг/л) (табл. 1, табл. 2).

Результати досліджень та їх обговорення

З'ясовано, що процес формування мікроклонів із рослин *G. lutea* та *G. verna* краще відбувався у рідкому середовищі, інших досліджених видів – в агаризованому (рис. 1). Середовище МС/2 із збільшеною вдвічі концентрацією CaCl_2 найбільш ефективно порівняно з іншими варіантами середовищ сприяло росту *in vitro* рослин рівненської популяції *G. lutea* та туркульської популяції *G. acaulis*. Рослини з інших популяцій цих видів не потребували підвищеного вмісту CaCl_2 у середовищі.

Тому й при підборі умов для мікроклонального розмноження пізніше введених в культуру *in vitro* видів (*G. cruciata*, *G. pneumonanthe*, *G. verna*) середовище МС/2_{мод} не тестувалося.

G. lutea. При підборі умов для клонального мікророзмноження використані живці рослин виду із чотирьох популяцій. При цьому встановлено, що рідке живильне середовище МС/2, доповнене 0,05 мг/л БАП та 0,05 мг/л БАП у найбільшій мірі сприяло формуванню адвентивних пагонів рогнеської, трояської та пожижевської популяцій (рис. 1, б). Вісоток живців, здатних формувати пагони (74,5–91,7 %), та кількість сформованих пагонів у розрахунку на один живець (5,5–6,5) для досліджених рослин *G. lutea* із трьох популяцій на цьому середовищі були максимальними.

Таке ж співвідношення фітогормонів, але у середовищі із збільшеною вдвічі концентрацією CaCl_2 , було найбільш сприятливим для мікроклонування рослин *G. lutea* із рівненської популяції. За тих умов вирощування кількість експлантів, здатних формувати мікроклони, складала для рослин із рівненської популяції 91,7 %, а кількість пагонів у розрахунку на один живець – 4,25.

G. acaulis. Відсоток живців, 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 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 (табл. 1, рис. 2).

G. punctata. Ефективність мікроклонування т. крапчастого з трьох різних популяцій була найвищою на агаризованому середовищі МС/2, доповненому 0,5 мг/л БАП та 0,1 мг/л Кін. (рис. 1, а). Відсоток живців з мікроклонами (80,3 %) та кількість сформованих адвентивних пагонів (3,22) були найвищими для рослин з трояської популяції (табл. 1, рис. 2).

G. asclepiadea. Виявлено, що найбільш сприятливим для формування мікроклонів як пожижевської, так і великомиглівської популяції, є агаризоване живильне середовище МС/2, доповнене 0,5 мг/л БАП і 0,1 мг/л Кін. Відсоток здатних до мультиплікації живців на цьому середовищі був досить високим – 89,4 % (пожижевська популяція) та 90,1 % (великомиглівська популяція). Середня кількість мікроклонів у розрахунку на один живець становила 4–5 шт. (пожижевська популяція) та 8–9 шт. (великомиглівська популяція) (табл. 1, рис. 2).

G. pneumonanthe. Серед протестованих середовищ оптимальним для мультиплікації *G. pneumonanthe* з вигодської та корюківської популяцій було агаризоване середовище МС/2, доповнене 0,2 мг/л БАП і 0,2 мг/л Кін. За таких умов на 74,7 % експлантів рослин корюківської та 66,8 % вигодської популяцій формувалися мікроклони, кількість яких у розрахунку на один живець складала 6,32 та 7,21 відповідно (табл. 2, рис. 2).

G. cruciata. У найбільшій мірі сприяло мультиплікації рослин *G. cruciata* (с. Креничі) агаризоване середовище МС/2, доповнене 1 мг/л БАП і 0,2 мг/л Кін (рис. 1, в), на якому

кількість експлантів, здатних формувати мікроклони, становила 62,3 %, а кількість пагонів у розрахунку на один висаджений живець складала 7,35.

Для ефективного мікроклонування тирличу хрещатого з іншої популяції (заповідник “Медобори”) потрібні вдвічі менші концентрації цитокінінів БАП і Кін у живильному середовищі. При цьому на 69,4 % висаджених експлантів відбувалося формування мікроклонів, кількість яких на один живець складала 5,94 (табл. 2, рис. 2).

G. verna. Нами встановлено, що формування мікроклонів краще відбувалося на рідких живильних середовищах. Найбільш оптимальним для мультиплікації *G. verna* було середовище МС/2, доповнене 1 мг/л БАП і 0,2–0,3 мг/л Кін (рис. 1, з), на якому кількість експлантів, здатних формувати адвентивні пагони, становила 74,5 %, а кількість пагонів у розрахунку на один висаджений живець складала 7,48 (табл. 2, рис. 2).

Таблиця 1

Мікроклональне розмноження *G. lutea*, *G. acaulis*, *G. punctata* та *G. asclepiadea*

Вид	Місце зростання	Живильне середовище				
		МС/2 _{мод.} 0,05 мг/л БАП+ 0,1 мг/л Кін	МС/2, 0,05 мг/л БАП+ 0,1 мг/л Кін	МС/2 _{мод.} 0,5 мг/л БАП+ 0,1 мг/л Кін	МС/2, 0,2 мг/л БАП+ 0,2 мг/л Кін	МС/2, 0,5 мг/л БАП+ 0,1 мг/л Кін
		Кількість адвентивних пагонів/на живець				
		Кількість живців, на яких формуються мікроклони, %				
1	2	3	4	5	6	7
<i>G. lutea</i>	пол. Рогнеска	2,28±0,21	5,50±0,45	1,47±0,13	1,48±0,19	1,14±0,09
		55,2±4,88	74,5±6,56	48,3±6,94	54,7±4,66	51,5±3,65
	г. Трояска	2,95±0,23	5,88±0,55	2,04±0,18	1,66±0,21	1,32±0,08
		61,4±5,98	82,3±6,78	59,2±5,33	49,4±4,18	45,7±3,87
	пол. Рівна	4,25±0,41	1,50±0,11	1,85±0,12	1,16±0,08	0,46±0,03
		91,7±5,63	54,2±5,17	56,8±5,15	39,7±3,38	31,4±2,58
г. Пожи- жевська	1,20±0,09	6,50±0,36	0,90±0,06	1,85±0,16	1,34±0,11	
	35,4±3,18	82,7±7,34	30,1±2,58	64,1±5,11	42,4±3,48	
<i>G. acaulis</i>	г. Туркул	1,55±0,14	0,74±0,05	2,63±0,24	0,86±0,07	0,83±0,07
		69,4±5,86	25,2±2,14	83,3±7,61	55,3±4,12	45,8±4,17
	г. Ребра	0,76±0,07 29,2±2,18	1,22±0,09 56,2±4,36	0,85±0,09 32,4±2,84	3,10±0,27 81,2±6,79	1,31±0,07 69,4±5,86
<i>G. punctata</i>	г. Брескул	1,12±0,09	2,28±0,17	1,23±0,08	2,46±0,22	3,11±0,24
		49,4±3,76	68,2±4,76	44,4±3,26	58,2±4,18	69,5±5,54
	г. Трояска	0,68±0,04	2,47±0,21	1,48±0,12	2,88±0,27	3,22±0,19
		28,4±3,36	73,4±6,18	39,8±2,84	76,4±6,14	80,3±6,98
	г. Пожи- жевська	0,68±0,03	1,52±0,07	0,80±0,06	2,35±0,22	2,62±0,19

<i>Продовження таблиці 1</i>						
<i>G. asclepiadea</i>		22,8±2,16	44,5±4,12	36,7±3,24	70,2±6,98	74,9±7,11
	г. Пожи- жевська	0,85±0,07	1,44±0,03	1,10±0,07	2,82±0,21	4,60±0,31
		32,2±2,94	54,6±4,18	48,6±3,48	64,6±4,28	89,4±7,87
	г. Велика Мигла	1,08±0,09	2,31±0,11	1,52±0,09	3,45±0,22	5,95±0,18
		42,2±3,94	62,4±4,98	49,3±4,12	74,4±6,88	90,1±7,86

Примітка. Напівжирним шрифтом виділено найвищі показники ефективності мікроклонування.



a



б



в



г

Рис. 1. Мікрокломальне розмноження деяких видів роду *Gentiana*: *a* – *G. punctata*; *б* – *G. lutea*; *в* – *G. cruciata*; *г* – *G. verna*

Мікроклональне розмноження *G. pneumonanthe*, *G. cruciata* та *G. verna*

Вид	Місце зростання	Живильне середовище				
		МС/2, 0,05 мг/л БАП+ 0,1 мг/л Кін	МС/2, 0,1 мг/л БАП+ 0,1 мг/л Кін	МС/2, 0,5 мг/л БАП+ 0,1 мг/л Кін	МС/2, 0,2 мг/л БАП+ 0,2 мг/л Кін	МС/2, 1,0 мг/л БАП+ 0,2 мг/л Кін
		Кількість адвентивних пагонів/на живець				
		Кількість живців, на яких формуються мікроклони, %				
<i>G. cruciata</i>	с. Креничі	0,44±0,02	0,89±0,05	6,22±0,21	1,64±0,16	7,35±0,28
		34,4±3,16	40,2±4,18	48,2±3,34	34,8±3,36	62,3±5,78
	З-ник "Медо-бори"	0,78±0,04	1,78±0,12	5,94±0,36	3,84±0,18	5,12±0,11
		19,2±1,86	29,8±2,16	69,4±7,44	43,8±4,13	54,3±4,88
<i>G. pneumonanthe</i>	Корюківське лісництво	0,95±0,04	5,21±0,32	1,86±0,13	6,32±0,43	2,65±0,16
		24,2±2,28	52,8±5,39	38,3±2,98	74,7±6,34	42,2±3,94
	с. Вигода	1,45±0,09	6,11±0,53	2,32±0,18	7,21±0,64	3,21±0,22
		22,4±2,14	56,4±4,76	32,2±3,12	66,8±6,86	43,4±3,46
<i>G. verna</i>	урочище Героджівка	1,44±0,12	1,88±0,14	2,22±0,18	3,11±0,24	7,48±0,67
		66,4±5,76	68,2±5,88	72,2±6,44	80,2±7,34	74,5±6,12

Примітка. Напівжирним шрифтом виділено найвищі показники ефективності мікроклонування.

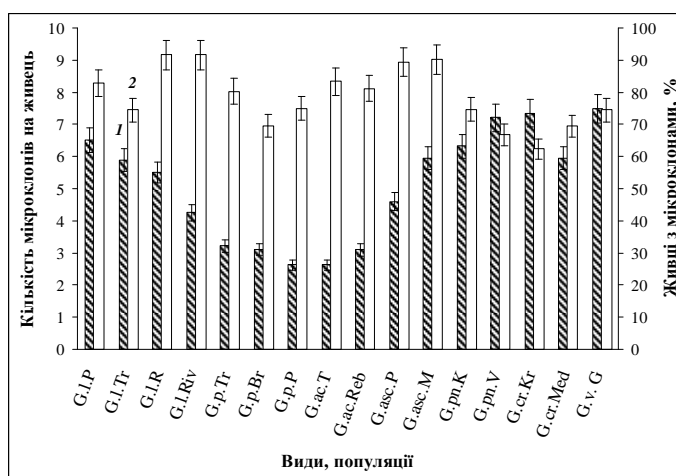


Рис. 2. Показники клонального мікророзмноження видів роду *Gentiana* на оптимальних із протестованих живильних середовищах: 1 – кількість мікроклонів на живець; 2 – живці з мікроклонами, %;

G.I.P – *G. lutea* (г. Пожижевська); G.I.Tr – *G. lutea* (г. Трояска); G.I.R – *G. lutea* (полонина Рогнеска); G.I.Riv *G. lutea* (полонина Рівна); G.p.Tr – *G. punctata* (г. Трояска); G.p.Br – *G. punctata* (г. Брескул); G.p.P – *G. punctata* (г. Пожижевська); G.ac.T – *G. acaulis* (г. Туркул); G.ac.Reb – *G. acaulis* (г. Ребра); G.asc.P – *G. asclepiadea* (г. Пожижевська); G.asc.M – *G. asclepiadea* (г. Велика Мигла); G.pn.K – *G. pneumonanthe* (Корюківське лісництво); G.pn.V – *G. pneumonanthe* (с. Вигода); G.cr.Kr – *G. cruciata* (с. Креничі); G.cr.Med – *G. cruciata* (заповідник «Медобори»); G.v.G – *G. verna* (урочище Гереджівка).

Порівняння результатів мікроклонального розмноження досліджених нами семи видів тирличів флори України дозволило встановити деякі особливості отримання життєздатних адвентивних пагонів цих видів. Зокрема, з'ясовано, що оптимальним для мультиплікації різних видів тирличів було середовище МС/2. Поряд із 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. Рослини з окремих популяцій *G. lutea* (рівненська) та *G. acaulis* (туркульська) для підвищення ефективності формування адвентивних пагонів потребували внесення у живильні середовища більших кількостей CaCl_2 . У той же час, ефективність мікроклонування тирличів залежить від співвідношення концентрацій фітогормонів у середовищі, яке, в свою чергу, визначається потребами конкретного виду та вихідного генотипу. Різні співвідношення фітогормонів у живильному середовищі були оптимальними для ефективного мікроклонування рослин *G. lutea*, *G. acaulis*, *G. cruciata* з різних місць зростання.

У той же час, популяційна приналежність *G. asclepiadea*, *G. pneumonanthe* та *G. punctata* не впливала на склад оптимального для мультиплікації рослин середовища. Кількість утворених адвентивних пагонів на одному живці у випадку *G. verna* порівняно з іншими дослідженими видами 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. Очевидно, така висока здатність *G. verna* до утворення мікроклонів визначається будовою пагона і структурою пагоневої системи цього виду, зокрема здатністю поліциклічного пагона утворювати кілька розеток, розмежованих ділянками з видовженими міжвузлями [13].

Проблемі клонального мікророзмноження тирличів приділяли увагу багато дослідників. Відомі спроби отримання пагонів тирличу жовтого з ізольованих бруньок на живильному середовищі МС з додаванням активованого вугілля та низьких концентрацій 6-бензиладеніну (БА), які не дали позитивних результатів – ізольовані бруньки поступово буріли і відмирили [5].

Підібрано умови для мікроклонального розмноження *G. lutea* з стеблової меристеми і пазушних бруньок [24]. Встановлено, що чотири види роду *Gentiana*: *G. lutea*, *G. cruciata*, *G. purpurea* і *G. acaulis* здатні до мультиплікації *in vitro* [21]. Для утворення пагонів використовували середовище МС (*G. lutea* та *G. cruciata*) та середовище з макросолями WPM (*G. purpurea* і *G. acaulis*), доповнені різними співвідношеннями концентрацій БАП та індолілоцтової кислоти (ІОК). 35–70 % пагонів рослин досліджених видів укорінювалися спонтанно, за винятком *G. lutea*, для якого формування адвентивних коренів було індуковане додаванням 1-нафтилоцтової кислоти (НОК).

Для отримання мікроклонів *G. lutea* використовували різні типи експлантів (квіткові і кореневищні бруньки, пагонові апекси та кінчики стеблової меристеми із листовими примордіями) дикорослих рослин, які поміщали на середовище МС, доповнене фітогормонами БА, ІОК, індолілмасляною кислотою (ІМК) та гібереловою кислотою (ГК₃) [19]. Однак, слід зазначити, що при застосуванні такого способу постає необхідність використання великої кількості вихідних рослин, що недоцільно, зважаючи на рідкісність тирличу жовтого. Використання експлантів з дикорослих, а не асептичних, рослин, було причиною високого відсотка інфікування і загибелі експлантів (до 89 %), а також зниження їх життєздатності через

шкідливий вплив стерилізуючого агента та утворення калюсу, що є небажаним при мультиплікації рослин.

Інші автори для індукції мікроклонування живці з асептичних проростків 13-ти видів тирличів висаджували на середовище МС з Кін (0,5–2 мг/л) [3]. Оптимальною для мультиплікації пагонів була концентрація кінетину 1,5 мг/л. Через 2–2,5 тижні з кожного експланту утворювалося 5–7 пагонів, а через 2–2,5 місяці – близько 50. Для вкорінення утворені пагони переносили на ауксинвмісне (0,2–0,3 мг/л НОК або ІОК) середовище.

При проведенні дослідження з мікроклонування *in vitro* тирличів авторами встановлено, що за потребою у цитокинінах (Кін або БАП) для мікроклонального розмноження види секції *Erythaliae* Bunge (секція *Cruciata* Gaudin. за [20]) можна поділити на 2 групи: такі, для стимулювання утворення адвентивних бруньок яких достатньо 1,5 мг/л Кін (або БАП), і ті, для яких цей процес починається лише за наявності у середовищі 2 мг/л цитокинінів. До першої групи належать: *G. cachemirica* Decne, *G. cruciata* L., *G. dahurica* Fish., *G. rockhillii* Hemsl., *G. saponaria* L., *G. walujevii* Regel et Schmalh; до другої – *G. alba* Muhl., *G. crassicaulis* Dutie, *G. macrophylla* Pall., *G. tibetica* King ex Hook. Середня кількість утворених адвентивних пагонів на одному живці для видів секції *Erythaliae* Bunge складала від 3,3 (для *G. alba* Muhl.) до 7,16 (для *G. dahurica* Fish.) [15].

Висновки

Підібрано умови для мікроклонального розмноження семи видів роду *Gentiana* L. флори України. Встановлено, що оптимальним для мультиплікації різних видів тирличів було середовище МС із зменшеним вдвічі вмістом макро- та мікросолей (МС/2). Поряд із цим, для *Gentiana verna* L., як і для *Gentiana lutea* L., процес формування мікроклонів із рослин краще відбувається у рідкому середовищі МС/2, тоді як для видів *Gentiana acaulis* L., *Gentiana asclepiadea* L., *Gentiana cruciata* L., *Gentiana pneumonanthe* L. та *Gentiana punctata* L. – в агаризованому. Рослини з окремих популяцій *G. lutea* (рівненська) та *G. acaulis* (туркульська) для підвищення ефективності формування адвентивних пагонів потребували внесення у живильні середовища більших кількостей CaCl_2 . Встановлено, що оптимальним для мультиплікації тирличів є середовище МС/2, доповнене різними співвідношеннями цитокинінів БАП (0,05–0,5 мг/л) та Кін (0,1–0,2 мг/л). Відсоток живців з мікроклонами для більшості видів лежав у межах 70–90 %. Кількість утворених адвентивних пагонів на одному живці лежала в межах 2,62–7,35, була найбільшою у випадку *G. verna* і найменшою – у *G. acaulis* і *G. punctata*.

Запропонований спосіб мікроклонального розмноження видів роду *Gentiana* дозволяє: мультиплікувати рослини рідкісних фармакологічно цінних видів з одночасним їх оздоровленням від патогенної мікрофлори; прогнозувати отримання з однієї рослини за рік до 20–100 тис. ідентичних рослин.

1. Біологічно активні речовини видів роду *Gentiana* L. 1. Біосинтез та фізіологічна дія / [Н.М. Страшнюк, О.М. Леськова, Г.Я. Загричук та ін.] // Фітотерапія. Часопис. — 2006. — № 1. — С. 31—41.
2. Види роду *Gentiana* L. флори України у природі та культурі *in vitro* / [Н.М. Страшнюк, Л.Р. Грицак, О.М. Леськова та ін.] // Укр. ботан. журн. — 2005. — Т. 62, № 3. — С. 337—348.
3. Голубенко А.В. Морфогенез та особливості вегетативного розмноження видів роду *Gentiana* L. *in vitro*: дис. ... канд. біол. наук: 03.00.12 / Анастасія Володимирівна Голубенко. — К., 2005. — 193 с.
4. Грицик А. Р. Використання рослин видів роду Тирлич (*Gentiana* L.) в медицині / А.Р. Грицик, Л.В. Бензель, Н.П. Цвеюк // Фармац. журн. — 2003. - № 2. — С. 91—97.
5. Демків Л. О. Вегетативне розмноження *in vitro* видів роду *Gentiana* L. (*Gentianaceae*) / Л.О. Демків // Укр. ботан. журн. — 1993. — Т. 50, № 1. — С. 146—149.
6. Драпайло Н. М. Рід *Gentiana* s.l. флори України: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.01 «Ботаніка» / Н.М. Драпайло. — К., 1995. — 24 с.
7. Загульський М. М. *Gentiana utriculosa* L. (*Gentianaceae* Juss.) в Українських Карпатах / Микола Миколайович Загульський, Ілля Ілліч Чорней // Укр. ботан. журн. — 2004. — Т. 61, № 2. — С. 79—83.
8. Кардаш Я. В. Про охорону рідкісних та ендемічних видів флори високогір'я Свидівця в Українських Карпатах / Я.В. Кардаш // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. — 1991. — Вип. 21: Біотичні ресурси Розточчя і Зовнішніх Карпат та їх антропогенні зміни. — С. 37—41.

9. Кушнір Г. П. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. — К.: Наук. думка, 2005. — 270 с.
10. Левенко Б. А. Генетические основы интродукции растений / Б.А. Левенко // Интродукция растений. — 2005. — № 2. — С. 10—16.
11. Лікарські рослини: енциклопедичний довідник / [Лебеда А.П., Джуренко Н.І., Ісайкіна О.П. та ін.]; відп. ред. А.М. Гродзінський. — К.: В-во «Українська Радянська Енциклопедія» ім. М.П. Бажана, Український виробничо-комерційний центр «Олімп», 1992. — С. 430—432.
12. *Определитель* высших растений Украины / [отв. ред. Ю.Н. Прокудин]. — К.: Наук. думка, 1987. — 546 с.
13. Прокопів А. І. Анатомічна організація коренів і структура пагонових систем тирличів (*Gentiana L.*, *Gentianaceae* Juss.): автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.01 «Ботаніка» / А.І. Прокопів. — К., 1997. — 24 с.
14. *Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Caprifoliaceae – Plantaginaceae.* — Л.: Наука, 1990. — 328 с.
15. Старовинні парки і ботанічні сади — наукові центри збереження біорізноманіття та охорона історико-культурної спадщини: матеріали міжнар. наук. конф., 25-28 вересня 2006 р., Умань. — Умань — Київ, 2006. — 451 с.
16. Червона книга України. Рослинний світ / [відп. ред. Ю.Р. Шеляг-Сосонко]. — К.: УЕ ім. М.П. Бажана, 1996. — 608 с.
17. Шиша Е. Сохранение *in vitro* биоразнообразия видов рода *Allium L.* / Е. Шиша, И.И. Сикура, Н.В. Кучук // Научный вестник Ужгородського університету. Серія біологія. — 2008. — Вип. 24. — С. 244—254.
18. Шиян Н. М. *Gentiana nivalis L.* (*Gentianaceae*) у флорі Українських Карпат / Наталя Миколаївна Шиян, Максим Анатолійович Джус // Укр. ботан. журн. — 2005. — Т. 62, № 1. — С.22—28.
19. Feijoo M. C. Multiplication of an endangered plant: *Gentiana lutea L.* subsp. *Aurantiaca* Lainz, using *in vitro* culture / Mariael Carmen Feijoo, Isabel Iglesias // Plant Tissue Cult. Biotechnol. — 1998. — Vol. 4, № 2. — P. 87—94.
20. Ho T.-N. The infrageneric classification of *Gentiana* (*Gentianaceae*) / Ting-Nung Ho, Shang-Wu Liu // Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.), Bot. — 1990. — Vol. 20, № 2. — P. 169—192.
21. Momcilovic I. Micropropagation of four *Gentiana* species (*G. lutea*, *G. cruciata*, *G. purpurea* and *G. acaulis*) / I. Momcilovic, D. Grubisic, M. Neskovic // Plant Cell Tissue Organ Cult. — 1997. — Vol. 49, № 2. — P. 141—144.
22. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / Toshio Murashige, Folke Skoog // Physiol. Plant. — 1962. — Vol. 15, № 13. — P. 473—497.
23. Tutin T. G. *Gentiana L.* / In T.G. Tutin, V.H. Heywood et al. (Eds) / T.G. Tutin // Flora Europea. — Cambridge: University Press. — 1972. — Vol. 3. — P. 59—63.
24. Viola U. *In vitro* propagation of *Gentiana lutea* / Umberto Viola, Charles Franz // Planta Med. — 1989. — Vol. 55. — P. 690.
25. Yuan Y.-M. Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* (*Gentianaceae*) inferred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA / Y.-M. Yuan, Ph. Kupfer, J.J. Doyle // Amer. J. Bot. — 1996. — Vol. 83, № 5. — P. 641—652.

Л. Р. Грицак, В. Н. Мельник, И. И. Конвалюк, Н. Б. Кравец, М. З. Мосула, Н. М. Дробык
 Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка
 Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ВИДОВ РОДА *GENTIANA L.* ФЛОРЫ УКРАИНЫ

Подобраны условия для микроклонального размножения семи видов рода Горечавка (*Gentiana L.*) флоры Украины: *G. acaulis L.*, *G. asclepiadea L.*, *G. cruciata L.*, *G. lutea L.*, *G. pneumonanthe L.*, *G. punctata L.*, *G. verna L.* Выяснено, что оптимальной для мультипликации горечавок является среда МС/2, дополненная различными соотношениями цитокининов БАП (0,05–0,5 мг/л) и Кин (0,1–0,2 мг/л). Для каждого вида и его представителей из разных мест произрастания установлено оптимальное для эффективного микроклонирования соотношение фитогормонов. Процент черенков с микроклонами для большинства видов составлял 70–90%. Количество образованных адвентивных побегов на одном черенке колебалось в пределах 2,62–7,35 и было наибольшим в случае *G. verna* и наименьшим – для *G. acaulis* и *G. punctata*.

Ключевые слова: виды рода *Gentiana L.*, флора Украины, микроклональное размножение

L. R. Hrytsak, V. M. Mel'nyk, I. I. Konvalyuk, N. B. Kravets, M. Z. Mosula, N. M. Drobyk
 Ternopil Volodymyr Hnatyuk National Pedagogical University, Ukraine
 Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv

MICROCLONAL PROPAGATION OF *GENTIANA* L. SPECIES FROM THE UKRAINIAN FLORA

Conditions for microclonal propagation of seven *Gentiana* L. species in Ukrainian flora were specified. Some peculiarities for generation of viable adventitious shoots in these species were detailed. In particular, optimal for reproduction of various *Gentiana* L. species was MS medium supplemented with half macro and microsals (MS/2). In addition, for both *Gentiana verna* L. and *Gentiana punctata* L. plants the process of microclone formation was found to occur better in fluid MS/2 medium while plants of *Gentiana acaulis* L., *Gentiana asclepiadea* L., *Gentiana cruciata* L., *Gentiana pneumonanthe* L. та *Gentiana punctata* L species favoured agarized one. Plants from individual *G. lutea* (Rivna mountain valley) and *G. acaulis* (Turkul mountain) populatons for more effective formation of adventitious shoots needed increased amounts of CaCl₂. Simultaneously, the efficiency of gentian micropropagation varies with density ratio of 6-benzilaminopurine and kinetin in medium wich in turn is determined by requirements of particular species and original genotype. Optimal for effective microcloning of *G. lutea*, *G. acaulis*, *G. cruciata* plants from various locations of vegetation were distinct phytohormone ratios in nutrient medium. At the same time, population belonging of *G. asclepiadea*, *G. pneumonanthe* and *G. punctata* failed to affect medium composition optimal for plant reproduction.

Number of generated adventitious buds on individual graft in case of *G. verna* as compared with other studied species was the highest, 7,48. Comparable with *G. verna* were indices of microcloning for *G. cruciata* (Village of Krenychi), 7,35, *G. lutea* (Pozhyzhevska mountain) and *G. pneumonanthe* (Koriukivka forestry), 6,32. Somewhat lesser were these indices for plants from other populations and for *G. asclepiadea*, whereas for *G. acaulis* and *G. punctata* imdices of microcloning efficiency were the least. The proportion of grafts with microclones for most species ranged within the limits from 70 to 90 %.

The proposed technique of microclonal propagation of *Gentiana* species plants allows reproducing plants of rare pharmacologically valuable species with their simultaneous sanitation from pathogenic microflora: to forecast obtaining from single plant per year up to between 20 and 100 thousand identical plants.

Keywords: Gentiana L. species, Ukrainian flora, microclonal propagation

Рекомендує до друку
 В. В. Грубінко

Надійшла 16.02.2017