

ОСОБЛИВОСТІ КАЛЮСОГЕНЕЗУ ТА ПРОЛІФЕРАЦІЇ КАЛЮСУ ДЕЯКИХ ВИДІВ РОДУ *GENTIANA* L.

До видів роду Тирлич (*Gentiana* L.), які зазнають значного антропогенного пресингу, відносять *Gentiana asclepiadea* L. та *Gentiana verna* L.

Gentiana verna L. – багаторічна трав'яниста рослина висотою лише 1–3 см, яка характеризується повільним ростом. За територією поширення визначається як євразійський аркто-альпійський вид [8]. 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; 8]. Проте, на сьогоднішній день підтверджено лише одне місцезнаходження *G. verna* в Україні – на околиці смт. Ясіня Рахівського р-ну Закарпатської обл. *G. verna* – занесено до Червоної книги України (2009), а саме: категорії вразливих, які у майбутньому можуть бути віднесені до зникаючих [8].

Gentiana asclepiadea L – багаторічна трав'яниста рослина з прямостоячим, простим (30–60 см заввишки), густо вкритим листками стеблом [6]. За географічними особливостями ареалу *G. asclepiadea* належить до видів з європейсько-малоазійським поширенням та євразійським типом ареалу і відноситься до монтанного елементу флори. В Україні вид поширений виключно в західних регіонах, часто трапляється на території Прикарпаття, Карпат та Закарпаття [2; 5]. В Українських Карпатах цей вид відзначений майже в усіх рослинних угрупованнях – від середньо-гірськолісових до лучних формацій субальпійського поясу на висоті від 400 до 1800 м н.р.м. [7]. Тирлич ваточниковидний, поки що не внесений у Червону книгу, однак через значний пресинг на популяції, вид може опинитися під загрозою зникнення. Відомо також, що *G. asclepiadea* завдяки синтезу у ньому цілого комплексу біологічно активних речовин, розглядають як сировинний замітник червонокнижного виду *Gentiana lutea* L. [6].

Для охорони генофонду рослинного світу необхідне проведення заходів, спрямованих на збереження та відновлення популяцій наведених вище видів тирличів [1]. Зокрема, використання біотехнологічних методів – отримання культур клітин, тканин, органів рослин, які забезпечують збереження генофонду видів і можуть розглядатися як спосіб отримання додаткових джерел лікарської сировини.

Метою роботи було підібрати оптимальні умови для індукції та проліферації калюсу з різних типів експлантів рослин *G. asclepiadea* та *G. verna* з Українських Карпат.

Матеріали і методи

Матеріалом для нашого дослідження слугували культивовані *in vitro* рослини, отримані шляхом пророщування насіння *G. asclepiadea* з г. Пожижевська (хребет Чорногора, Надвірнянський р-н, Івано-Франківська обл., 1424 м н.р.м.) та з г. Велика Мигла (Долинський р-н, Івано-Франківська обл., 950 м н.р.м.), а також *G. verna* з урочища Гереджівка (смт. Ясіня, Рахівський р-н, Закарпатська обл.). На здатність до калюсогенезу тестували експланти кореневого, стеблових, листових походження рослин цих видів на живильних середовищах Мурасіге, Скуга (МС) [10], МС з половинним вмістом макро- і мікросолей (МС/2) і Гамборга та Евелейг (В5) [9], доповнених різними концентраціями ауксинів і цитокінінів, а саме: кінетину (Кін) і 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д) та 6-бензиламінопурину (БАП) і 2,4-Д.

Таблиця 1

Індукція калюсоутворення з корневих, стеблових та листових експлантів *G. asclepiadea* (пожижевська популяція) на живильному середовищі В5

Концентрації регуляторів росту, мг/л	Тип експланту	Кількість висаджених експлантів	Кількість експлантів, на яких утворився калюс	% калюсогенезу
0,2 мг/л БАП+ 1,0 мг/л 2,4-Д	Листкові	89	64	72±5,46
	Стеблові	51	44	86,3±6,59
	Кореневі	78	40	51,3±7,17
0,1 мг/л БАП+ 1,0 мг/л 2,4-Д	Листкові	80	35	43,7±3,12
	Стеблові	45	23	51±2,67
	Кореневі	65	40	61±4,88
0,2 мг/л Кін+ 1,0 мг/л 2,4-Д	Листкові	77	42	54,5±5,11
	Стеблові	40	33	82±6,45
	Кореневі	56	50	89,2±4,56

Результати дослідження та їх обговорення

Відомо, що на процеси калюсоутворення, потенційні можливості калюсу до подальшого субкультивування і до різних типів морфогенезу суттєво впливає видова приналежність рослини та склад живильного середовища [3].

Встановлено, що процеси дедиференціації у *G. asclepiadea* не залежать від концентрації макро- і мікросолей, ці середовища сприяють утворенню калюсу. Проте, калюс, отриманий на живильних середовищах МС і МС/2, наростав повільно і через 2-3 пасажи некротував. Визначено, що здатність до калюсоутворення не співпадала в наших експериментах зі здатністю до проліферації. Вид характеризується мінімальною активністю до утворення пасивованої тканини на середовищах МС, МС/2. З цієї причини, наші дослідження спрямувалися у напрямку підбору умов для індукції та проліферації калюсних культур різного походження *G. asclepiadea* на середовищі В5. Найбільшу підтримуючу здатність для формування калюсу на корневих експлантах рослин з пожижевської популяції мало середовище В5, доповнене 0,2 мг/л Кін і 1,0 мг/л 2,4-Д, а для листових і стеблових – те ж середовище з 0,2 мг/л БАП і 1,0 мг/л 2,4-Д (табл. 1).

Примітка. Напівжирним шрифтом виділено найвищі показники ефективності калюсоутворення.

Найбільшу ефективність калюсогенезу на всіх типах експлантів рослин великомиглівської популяції забезпечувало середовище В5, доповнене 0,2 мг/л Кін і 1,0 мг/л 2,4-Д (табл. 2).

Для дослідження проліферативної активності отриманих калюсних культур від рослин *G. asclepiadea* з обох популяцій нами тестувалося лише середовище В5, з комбінаціями різних концентрацій БАП і 2,4-Д. Встановлено, що співвідношення цитокініну БАП і ауксину 2,4-Д – 1:5 – у найбільшій мірі стимулювало проліферацію калюсів різного походження *G. asclepiadea*, які характеризувалися блідо-жовтим забарвленням, пухкою консистенцією і високою життєздатністю.

Таблиця 2

Індукція калюсоутворення з корневих, стеблових та листових експлантів G. asclepiadea (великомиглівська популяція) на живильному середовищі В5

Концентрації регуляторів росту, мг/л	Тип експланту	Кількість висаджених експлантів	Кількість експлантів, на яких утворився калюс	% Калюсогенез у
0,2 мг/л БАП+ 1,0 мг/л 2,4-Д	Листкові	36	21	58,33±4,12
	Стеблові	42	21	50±3,45
	Кореневі	30	25	83,33±6,78
0,1 мг/л БАП+ 1,0 мг/л 2,4-Д	Листкові	36	30	83,33±6,88
	Стеблові	32	20	62,5±4,55
	Кореневі	34	28	82,35±7,12
0,2 мг/л Кін+ 1,0 мг/л 2,4-Д	Листкові	41	39	95,12±8,38
	Стеблові	35	32	91,43±8,45
	Кореневі	38	36	94,74±7,66
0,3 мг/л БАП+ 1,0 мг/л 2,4-Д	Листкові	41	33	80,49±7,22
	Стеблові	32	20	62,5±4,98
	Кореневі	47	36	76,6±6,78

Примітка. Напівжирним шрифтом виділено найвищі показники ефективності калюсоутворення.

Встановлено, що найбільший індекс росту характерний для калюсу на живильному середовищі В5 з 0,2 мг/л БАП і 1,0 мг/л 2,4-Д (I варіант) (рис. 1).

Визначено, що індукція калюсогенезу у *G. verna* мало залежить від концентрації макро- і мікросолей. Оптимальним для калюсоутворення з корневих, стеблових і листових експлантів *G. verna* було живильне середовище МС/2, доповнене 0,1 мг/л БАП та 0,5 мг/л 2,4-Д, а листових – МС/2 з 0,2 мг/л БАП та 0,3 мг/л 2,4-Д. Найкраще проліферація калюсних культур *G. verna* кореневого та стеблового походження відбувалася на живильному середовищі МС та МС/2 за умови збільшення концентрації БАП у середовищі, що використовувалося для індукції калюсоутворення, до 0,25–0,3 мг/л. Калюс характеризувався блідо-жовтим забарвленням та пухкою консистенцією. Підібрати умови для проліферації калюсу листового походження *G. verna* нам не вдалося.

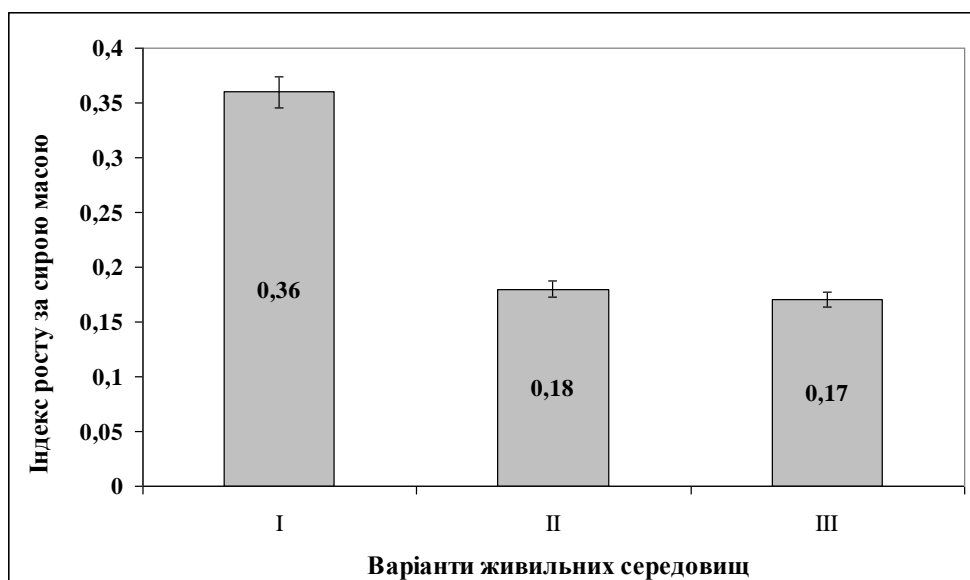


Рис. 1. Індекс росту за сирю масою (IP) калюсу кореневого походження *G. asclepiadea* (пожижевська популяція) через 2 тижні культивування на живильному середовищі B5, доповненому різними комбінаціями регуляторів росту: I – 0,2 мг/л БАП і 1,0 мг/л 2,4-Д; II – 0,1 мг/л БАП і 1,0 мг/л 2,4-Д; III – 0,3 мг/л БАП і 1,0 мг/л 2,4-Д.

Висновки. Введено в культуру *in vitro* рослини тирличу ваточниковидного (*Gentiana asclepiadea* L.) з г. Пожижевська (хребет Черногора, Надвірнянський р-н, Івано-Франківська обл.) та з г. Велика Мигла (Долинський р-н, Івано-Франківська обл.), а також тирличу весняного (*Gentiana verna* L.) з урочища Гереджівка (сmt. Ясіня, Рахівський р-н, Закарпатська обл.). Досліджено особливості індукції та проліферації калюсу *G. verna*. Встановлено, що оптимальним живильним середовищем для індукції з калюсу кореневого та стеблового походження *G. verna* є МС/2 з 0,1 мг/л БАП та 0,5 мг/л 2,4-Д, а для експлантів листового походження – МС/2, доповнене 0,2 мг/л БАП та 0,3 мг/л 2,4-Д. Встановлено, що серед протестованих варіантів живильних середовищ максимальний калюсогенез з всіх експлантів рослин *G. asclepiadea* великомиглівської популяції та корневих експлантів *G. asclepiadea* пожижевської популяції, забезпечувало B5, доповнене 0,2 мг/л Кін і 1,0 мг/л 2,4-Д, а для листових і стеблових експлантів *G. asclepiadea* з пожижевської популяції – те ж середовище, що містило 0,2 мг/л БАП і 1,0 мг/л 2,4-Д. Отримано здатні до тривалого росту *in vitro* калюсні культури тирличу весняного та тирличу ваточниковидного, які можуть використовуватись як для збереження цих видів, так і після детальних тестувань як альтернативне джерело цінної лікарської сировини (у випадку *G. asclepiadea*).

ЛІТЕРАТУРА

- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях / Ю.П. Алтухов . – 3-е изд., перераб. и дополн. – М.: ИКЦ Академкнига, 2003. – 431 с.
- Біронт Н.В. Еколого-ценотичні особливості *Gentiana asclepiadea* L. (Gentianaceae) та можливості її інтродукції / Н.В. Біронт, Б.В. Сапоженкова, Б.В. Сенчина // Укр. ботан. журн. – 1993. – 50, №1. – С. 117–119.
- Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р. Г. Бутенко // Учеб. пособ. – М.: ФБК-ПРЕСС. – 1999. – 160 с.
- Зиман С.М., Вайнагіт І.В. Еколого-географічні та фітоценотичні особливості рідкісних видів *Primula farinosa* L. і *Gentiana verna* L. // Укр. ботан. журн. – 1991. – Т.48, №5. – С. 99–101.
- Кишко К.М. Біоморфологія *Gentiana asclepiadea* L. в Закарпатті: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.05 «Ботаніка» / К.М. Кишко. – К., 2000. – 19 с.
- Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / А.П. Лебеда, Н.І. Джуренко, О.П. Ісайкіна [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.
- Малиновський К.А. Рослинність високогір'я Українських Карпат / К.А. Малиновський. – К.: Наук. думка, 1980. – 276 с.
- Червона книга України. Рослинний світ / Ю.Р. Шеляг-Сосонко та ін. (ред.) – К.: Вид-во «Укр. енциклопедія» ім. М.П. Бажана, 1996. – 608 с.
- Gamborg O.L. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley / Oluf L. Gamborg, Douglas E. Eveleigh // Can. J. Biochem. – 1968. – Vol.46, №5. – P. 417-421.
- 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.