

БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 582.782:581.143.6

Ю. В. ЖУРЖА, Л. А. КОЛДАР

Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України
вул. Київська 12а, Умань, Черкаської обл., Україна, 20300

РОЗМНОЖЕННЯ *RHAMNUS TINCTORIA* WALDST. ET KIT. В УМОВАХ *IN VITRO*

У статті наведено результати досліджень насінного розмноження *Rhamnus tinctoria* Waldst. Et Kit. *in vitro* за використанням різних концентрацій фітогормонів: 6-бензиламінопурину (БАП), β-індолілмасляної кислоти (ІМК), 1-нафтилоцтової кислоти (НОК). Досліджено етапи онтогенезу експлантів *R. tinctoria* (поява сім'ядолей, їх розгортання та ріст, поява першої пари справжніх листків, ріст кореня). З'ясовано, що за насінного розмноження рослин *R. tinctoria* насіння потребує скарифікації концентрованою сірчаною кислотою за експозиції 15 хв з подальшим використанням живильного середовища Мурасіге-Скуга, доповненого БАП у концентрації 1,0 мг/л та НОК – 1 мг/л. З'ясовано, що найшвидше (на 11–15 добу) проростало скарифіковане насіння. Висіане насіння мало високу схожість, добре проростало, формуючи вегетативну сферу та кореневу систему.

Ключові слова: *Rhamnus tinctoria* Waldst. Et Kit., насінне розмноження, скарифікація, стратифікація, фітогормони, *in vitro*

Вступ. Одним з основних напрямків дослідницької роботи ботанічних установ, у плані збереження видового різноманіття рослин, є охорона рідкісних, зникаючих або тих, що перебувають під загрозою зникнення видів флори України. Особлива увага приділяється розробці методів розмноження інтродукованих видів природної флори, що базуються на вивченні біоекологічних особливостей, з метою визначення їхньої життєздатності та перспектив збереження.

До рідкісних видів природної флори, належить жостер фарбувальний (*Rhamnus tinctoria* Waldst. Et Kit.) – балканський вид, який займає північну межу ареалу та росте в ізольованих локалітетах за його межами. Далі простягається на південний схід Середньої Європи, Південні Карпати, Балканський півострів [2], північ та схід Молдавії; південний схід Західної Європи – Трансильванія [1]. Занесений до Червоної книги України [2] та Молдови [3]. В Україні росте на північному заході Поділля, у Середньому Придністров'ї та на півдні Рівненської обл., у Причорномор'ї та на південному сході – околиця м. Святогірськ [6], у Чернівецькій області [2]. Природоохоронний статус виду: рідкісний. [2].

R. tinctoria – деревний інтродуцент, який цінується за швидкість росту, посухо- та зимостійкість, здатність закріплювати схили та попереджати водну та повітряну ерозію ґрунтів. Перспективний для паркових алей та вуличних насаджень. Крім цього плоди *R. tinctoria* мають фарбувальні властивості.

Застосовуючи класичні методи розмноження, ми отримуємо відносно обмежену кількість рослин. Насінний спосіб розмноження не завжди може забезпечити потребу у садивному

матеріалі, оскільки для насіння видів цього роду характерний стан органічного спокою, коли хід ростових процесів уповільнюється, а проростання насіння затримується.

Одним із перспективних способів збереження рідкісних і зникаючих видів рослин в умовах *ex situ* є розмноження в культурі *in vitro*, що дає змогу вирішувати важливі проблеми рослинництва, а саме: в десятки та сотні разів збільшити коефіцієнт розмноження рослин, отримати здоровий, позбавлений вірусної інфекції садивний матеріал, а також за його допомогою зберегти генофонд рідкісних і зникаючих видів природної флори [4].

Тому мета наших досліджень полягала у розробленні технології розмноження *R. tinctoria* в умовах *in vitro* для масового одержання садивного матеріалу.

Матеріал і методи досліджень

Матеріалом для досліджень слугувало насіння, зібране з рослин *R. tinctoria* у період їх плодоношення (третьа декада вересня–друга декада листопада). Експериментальні дослідження проводили у лабораторії мікроклонального розмноження рослин Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України.

Під час дослідження розмноження *R. tinctoria in vitro* використовували скарифікацію та стратифікацію насіння згідно з рекомендаціями М.Г. Ніколаєвої [5]. Модифікацію живильного середовища Мурасіге і Скуга (МС) [7] для виведення насіння зі стану спокою проводили за використання п'яти концентрацій 6-бензиламінопурина (6-БАП), трьох концентрацій НОК та трьох концентрацій ІМК з додаванням вітамінів та амінокислот (табл.).

Результати досліджень та їх обговорення

За даними М.Г. Ніколаєвої [5], насінню *R. tinctoria* властивий комбінований тип органічного спокою, який уповільнює хід ростових процесів і його проростання розтягується в часі або припиняє ріст взагалі.

Тому перед введенням у культуру *in vitro*, насіння *R. tinctoria*, для виведення зі стану спокою, піддавали скарифікації концентрованою сірчаною кислотою з експозицією 15 хвилин. Крім того, проводили стратифікацію (90 діб) введеного у пробірки необробленого насіння за дії низьких температур (+4 °С).

На 11-ту добу після сівби насіння на живильні середовища, першим спостерігали проростання скарифікованого насіння у варіанті II з додаванням 1,0 мг/л 6-БАП та 1 мг/л НОК (табл.).

Таблиця

Проростання насіння *R. tinctoria* після стратифікації і скарифікації

Варіант середовища	Концентрації фітогормонів, мг/л			Час проростання насіння, доби		
	БАП	НОК	ІМК	Контроль	Стратифікація	Скарифікація
I	0,5	0,5	–	47±2	26±3	13±3
II	1,0	1,0	–	50±2	28±5	11±4
III	1,5	–	0,5	48±4	29±4	14±2
IV	2,0	–	1,0	50±4	26±2	13±2
V	2,5	0,1	0,1	47±2	29±2	15±3

На 13-ту добу спостерігали початок проростання насіння у варіантах I (0,5 мг/л 6-БАП та 0,5 мг/л НОК) та IV (2,0 мг/л БАП та 1,0 мг/л ІМК). На 14–15 добу почало проростання насіння у III (1,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л ІМК) та V (2,5 мг/л 6-БАП; 0,1 мг/л НОК та 0,1 мг/л ІМК) варіантах.

Після 90-добової стратифікації насіння холодними температурами порівняно зі скарифікацією, строки проростання насіння збільшувалися майже вдвічі та становили 26–29

діб. Найбільш активно відбувалося проростання у варіанті I (0,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК) та IV (2,0 мг/л БАП та 1,0 мг/л ІМК).

У контрольному варіанті (без обробки) проростання насіння розтягувалось на ще довший строк, який становив 47–50 діб.



Рис. 1. Розмноження *R. tinctoria in vitro* після скарифікації

Після проростання насіння на поверхні живильного середовища відбувалася поява сім'ядолей, їх розгортання та ріст тривали 20–25 діб (рис. 1). Через 9–14 діб, після появи сім'ядолей, спостерігали появу першої пари справжніх листків. Потім тривав інтенсивний ріст експланта у висоту, сіянці досягали 3–5 см завдовжки, і одночасно відбувався ріст кореня, який упродовж 15–18 діб після появи мав чітко виражений центральний корінь 0,8–1,4 см завдовжки та 2–3 корені першого порядку. На цьому етапі сіянець був придатний до подальшого пасажування на живильні середовища для розмноження, або перенесення в нестерильні умови адаптації.

Етап адаптації характеризується тим, що мікроклони, вирощені в умовах *in vitro*, потребують пристосування до умов *ex vitro*. На цьому етапі з пробірок відбирали рослини-регенеранти, які мали центральний пагін, або кілька пагонів з листками та добре сформований корінь і промивали у розчині перманганату калію (KMnO₄). Промиті рослини висаджували у торф'яні диски для адаптації (рис. 2) та переносили у склянні контейнери, де адаптація відбувалася за температури 23±2°C, вологості 85–90% за 16-годинного фотоперіоду.



Рис. 2. Адаптація рослин *R. tinctoria* до умов *ex vitro*

Період адаптації тривав 8–12 діб. Приживання рослин становило 78 ± 3 %. Після цього рослини з дисками пересаджували у контейнери з ґрунтосумішшю та переносили у теплицю для подальшої адаптації.

Висновки

1. У результаті проведених досліджень з'ясовано, що насінне розмноження *R. tinctoria in vitro* залежить як від способу подолання органічного спокою, так і від типу та концентрації фітогормонів у живильних середовищах.
2. Найбільш ефективним для проростання виявився варіант із скарифікацією насіння концентрованою сірчаною кислотою (15 хв.) та пророщування його на живильному середовищі МС з додаванням БАП 1,0 мг/л та 1 мг/л НОК, що сприяло активному виходу насіння із стану спокою і його проростанню на 11 добу.
3. Період адаптації рослин-регенерантів відбувався за температури $23 \pm 2^\circ \text{C}$, вологості 85–90% та 16-годинному фотоперіоді і тривав 8–12 діб. Приживання рослин становило 78 ± 3 %.

1. *Деревья и кустарники СССР* / [С. Я. Соколов, З. Т. Аргюшенко, Ю. Д. Гусев, Г. Н. Зайцев и др.]. — М.: Изд-во АН СССР, 1962. — Т. 4. — 974 с.
2. *Дідух Я. П.* Червона книга України. Рослинний світ / Я. П. Дідух. — К.: Глобалконсалтинг, 2009. — 910 с.
3. Красная книга Приднестровья / М-во природных ресурсов и эколог. контроля Приднестр. Молд. Респ.; редкол.: О.А. Калякин (председатель), В.С. Рушук (гл. ред.), А.Д. Рушук [и др.]; сост.: И.Н. Жилкина, В.С. Тищенко, Т.Д. Шарапановская [и др.]. Тирасполь: Б. и., 2009. — 376 с.
4. *Кушнір Г. П.* Мікроклональне розмноження рослин, теорія і практика / Г.П. Кушнір, В. В. Сарнацька. — К.: Наукова думка, 2005. — 242 с.
5. Николаева М.Г. Справочник по проращиванию покоящихся семян / М.Г. Николаева, М.В. Разумова, В.Н. Гладкова. Л.: Наука, 1985. 384 с.
6. Чорней І.І. Сторінками Червоної книги України (рослинний світ) Чернівецька область / І.І. Чорней, В.В. Буджак, А.І. Токарюк. — Чернівці: ДрукАрт, 2010. — 452 с.
7. *Murashige T.* A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture / Т. Murashige, F. K. Skoog // *Physiol. Plant.* — 1962. — Vol. 15. — P. 473—497.

Y. V. Zhurzha, L. A. Koldar

Dendrological park Sofiivka of National Academy of Sciences of Ukraine, Uman, Ukraine

REPRODUCTION *RHAMNUS TINCTORIA* WALDST. ET KIT. UNDER THE CONDITIONS *IN VITRO*

Among the general directions of research work of botanical institutions, there is protection of rare, endangered or those that are endangered by the flora of Ukraine. Particular attention is devoted to the development of methods of reproduction.

To rare species of Ukraine's natural flora, belongs to *Rhamnus tinctoria* Waldst. Et Kit. (Dyer's Buckthorn) – Balkan's specie, in the Red Book of Ukraine.

The aim of the research was to develop the technology of reproduction of *R. tinctoria* in culture *in vitro* using scarification and stratification of seeds.

The material for research was the seeds of *R. tinctoria*. The experimental research have been carried out in the laboratory of the microclonal propagation of plants of the National dendrological park “Sofiivka” of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Seeds of genus *Rhamnus* are characterized by a state of organic rest. Therefore, before introduction into the culture *in vitro*, the seeds of *R. tinctoria* were subjected to scarification with concentrated sulfuric acid with an exposure of 15 minutes. Stratification (90 days) of untreated seeds introduced into test tubes was carried out at a temperature of $+4^\circ \text{C}$. Seeds were germinated in biological test tubes on agarized nutrient media of Murashige and Skoog (MS), using five concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP), supplemented with vitamins and amino acids.

The beginning of germination of scarified seeds was observed on days 11-15, which compared with stratification – 26-29 days and control – 47-50 days, gave the best result.

After germination of seeds, the appearance of cotyledons, their deployment and growth, the appearance of the first pair of real leaves, intensive growth in height, root growth.

It was found that the seed reproduction of *R. tinctoria in vitro* depends both on the way of overcoming organic rest, and on the quantitative content of phytohormones in nutrient media. The most effective variant was the scarification of seeds with concentrated sulfuric acid (15 min.) and a nutrient modified medium supplemented with BAP 1.0 mg/L and 1 mg/L NAA, which promoted active release of seeds from the resting state and its germination on the 11th day.

Key words: Rhamnus tinctoria Waldst. Et Kit., seed propagation, scarify, stratification, phytohormones, in vitro

Рекомендує до друку

Надійшла 27.12.2018

Н. М. Дробик

УДК 582.923.1:581.43:616 – 092.4

¹Н. Й. ЯВОРСЬКА, ¹Н. М. ВОРОБЕЦЬ, ²М. І. СКИБЦЬКА

¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
вул. Пекарська, 69, Львів, 79010

²Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005

КУЛЬТУРА КОРЕНІВ *GENTIANA CRUCIATA* L. IN VITRO

Отримання культури ізольованих коренів *Gentiana cruciata* L. є перспективним як можливе джерело біосинтезу і нагромадження вторинних метаболітів. Метою досліджень було визначення дії різних концентрацій і типів ауксинів на ініціацію ризогенезу в калюсній культурі *Gentiana cruciata* L. Отримано культуру коренів із калюсної тканини *G. cruciata* L. та оптимізовано умови для їх тривалого вирощування *in vitro*. Підібрано ефективні концентрації ауксинів для ініціації ризогенезу.

Ключові слова: Gentiana cruciata L., калюс, ризогенез *in vitro*

Рослини природної флори є цінним генофондом та джерелом біологічно активних речовин. На особливу увагу заслуговують рідкісні та зникаючі види лікарських рослин, які мають важливе значення для біологічної науки як об'єкт дослідження та для фармації як лікарська рослинна сировина (ЛРС). До групи таких рослин належать види роду Тирлич (*Gentiana* L.). У флорі України рід представлений 10 видами, дев'ять з яких ростуть, переважно, у гірських районах Карпат [8]. Види роду *Gentiana* належать до економічно-цінних, це – лікарські, декоративні, медоносні рослини. Деякі види тирличів використовують в офіційній медицині, вони також входять у фармакопеї багатьох країн світу, та у понад 100 найменувань препаратів [14]. Багаторічний досвід заготівлі видів роду *Gentiana* як лікарської сировини призвів до різкого скорочення ареалів, тож їх сировинні запаси недостатні для промислової заготівлі. В якості ЛРС найчастіше використовують корені та кореневища тирличів, які містять комплекс біологічно активних речовин (БАР): іридоїди, флавоноїди, ксантони, та ін. (понад 40) [7, 14]. *Gentiana cruciata* L. – тирлич хрещатий в Україні росте фрагментарно або розсіяно у південній частині лісових районів (зокрема у Львівській, Тернопільській, Волинській, Хмельницькій областях), у Лісостепу центральної частини та в гірських районах Криму на сухих луках і схилах, виходах вапняків, серед чагарників та по узліссях [6, 8].

Відома доволі низька здатність видів роду до генеративного та вегетативного розмноження. Одним із перспективних шляхів отримання додаткового джерела сировини, а також збереження цінних видів лікарських рослин, поряд із класичними природоохоронними