

ГРИЦАК Л.Р.^{1✉}, НУЖИНА Н.В.², ДРОБИК Н.М.¹¹Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Україна, 47027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ "Інститут біології та медицини", Україна, 03022, м. Київ-022, проспект Академіка Глушкова 2

✉ hrytsak1972@gmail.com, (067) 453-94-19

ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO* ТА *EX VITRO* НА ВМІСТ ВІЛЬНОГО ПРОЛІНУ У РОСЛИНАХ ДЕЯКИХ ВИДІВ РОДУ *GENTIANA L.*

Мета. Встановлення залежності концентрацій вільного проліну у тканинах рослин *in vitro* та *ex vitro* високогірних видів *Gentiana lutea L.*, *Gentiana punctata L.*, *Gentiana acaulis L.* від світлових умов культивування та джерела карбону у живильному середовищі; аналіз доцільності використання амінокислоти пролін як біохімічного маркера формування фізіологічної адаптації біотехнологічних рослин цих видів до водного дефіциту в умовах *in vitro* та *ex vitro*.

Методи. Методи культивування рослин *in vitro* та *ex vitro*, метод визначення вільного проліну у вегетативних органах рослин за використання нінгідрину.

Результати. Показано, що в умовах *in vitro* вміст вільного проліну у рослинах залежить від світлового режиму їх культивування та джерела карбону у складі живильного середовища. Підвищення інтенсивності світлового потоку в області фотосинтетично активної радіації (ФАР) з 85 Вт/м² до 100 Вт/м² і частки хвиль червоного діапазону в 1,92 раза у спектральному складі світла 2.1 варіанту (інтенсивність світлового потоку в області ФАР 100 Вт/м², співвідношення хвиль синього (Ес) : зеленого (Ез) : червоного (Еч) діапазонів = 25 % : 27 % : 48 %) зумовлює збільшення вмісту вільного проліну на 11,5–37,1 % у рослинах *in vitro*, які культивують на живильних середовищах, доповнених сахарозою. Заміна сахарози у середовищі на маніт супроводжується зростанням концентрації проліну в рослинах досліджених видів у 1,64–1,84 раза за світлових умов 1.1 варіанту (85 Вт/м², спектральний склад Ес : Ез : Еч = 25 % : 27 % : 48 % = 33 % : 42 % : 25 %) та в 1,3–2,57 раза за 2.1 варіанту світлового режиму культивування. Аналіз параметрів водного балансу рослин *in vitro*, які культивували на маніті за світлових умов 2.1 варіанту, та рослин з природних умов росту не виявив значних відмінностей у показниках інтенсивності транспірації, водного дефіциту, загального вмісту вологи. Процес адаптації рослин *in*

vitro до умов *ex vitro* супроводжується зміною вмісту проліну у листках залежно від дефіциту води у субстраті та світлових умов вирощування.

Висновки. Отримані результати вказують на доцільність використання вмісту вільного проліну як біохімічного маркера оцінки адаптивного потенціалу рослин в умовах *in vitro* та *ex vitro*.

Ключові слова: *Gentiana L.*, рослини *in vitro*, рослини *ex vitro*, вільний пролін, світлові умови культивування.

Одним із завдань сучасної біотехнології є розроблення методології підвищення адаптивного потенціалу мікроклонально розмножених рослин до умов *ex vitro* та *in situ*. У культурі *in vitro* рослини перебувають в умовах, що відрізняються від природних за багатьма фізико-хімічними параметрами, зокрема: світловим, водним, температурним режимами, газовим складом повітря усередині культиваційних посудин, консистенцією живильного середовища тощо. Усе це в комплексі призводить до структурно-функціональних змін рослин в умовах *in vitro*, які ускладнюють процес їх адаптації до нових умов росту та зумовлюють високу (до 75 %) летальність особин [1]. Оптимізація процесу адаптації до умов *ex vitro* рослин, отриманих біотехнологічними методами, залежить від глибини розуміння механізмів їх структурно-функціональних перебудов під впливом певних чинників умов культивування *in vitro* [2] та передбачає пошук критеріїв-маркерів для контролю за морфо-фізіологічним станом мікроклонально розмножених рослин. Контролювання ознак адаптивності молекулярно-генетичними маркерами не завжди виправдано, оскільки вони відображають величину мінливості генотипу, що не залежить від зовнішніх впливів. Ефективніше використовувати фенотипові маркери (білкові, біохімічні тощо), які є продуктами дії генів

© ГРИЦАК Л.Р., НУЖИНА Н.В., ДРОБИК Н.М.

та реагують на зміну умові культивування рослин [3]. До таких маркерів належить протеогенна амінокислота пролін (піролідин- α -карбонова кислота, C₅H₉NO₂), функцією якої є стабілізація субклітинних структур (зокрема, мембран і білків), поглинання вільних радикалів і буферизація клітинного окисно-відновного потенціалу в умовах стресу. Пролін також може діяти як білок сумісний гідротроп, полегшуючи цитоплазматичний ацидоз і підтримуючи відповідний баланс NADP⁺ / NADPH [4]. За нестачі енергетичних субстратів у процесі окислення однієї молекули L-проліну може утворитися близько 30 молекул АТФ, що дозволяє підтримати енергетику клітин в умовах стресу [5]. Ця амінокислота відіграє важливу роль у рості та диференціації рослин протягом життєвого циклу. Зазначають, що в умовах абіотичного стресу, у тому числі й водного дефіциту, концентрація проліну у тканинах рослин здатна збільшитися в декілька разів [6]. Це відбувається завдяки 2 процесам: активації біосинтезу проліну та інактивації механізмів його деградації [6]. У науковій літературі пропонують використовувати вміст вільного проліну у тканинах рослин *in vitro* як маркер формування їх стійкості до сольового або водного стресу. У більшості випадків модельними об'єктами таких досліджень є сільськогосподарські культури, оскільки абіотичні стреси здатні знизити врожайність рослин на 50-70 % [7]. Значно менше уваги приділяється видам дикої флори, особливо, високогірним.

Мета нашого дослідження полягала у встановленні залежності концентрацій вільного проліну у тканинах рослин *in vitro* та *ex vitro* високогірних видів *Gentiana lutea* L., *Gentiana punctata* L., *Gentiana acaulis* L. від світлових умов культивування та джерела карбону у складі живильного середовища і, на цій основі, проведення аналізу доцільності використання амінокислоти пролін як біохімічного маркеру формування фізіологічної адаптації біотехнологічних рослин цих видів до водного дефіциту в умовах *in vitro* та *ex vitro*.

Матеріали і методи

Вихідний насінневий матеріал для отримання рослин *in vitro* *G. lutea* зібрано під час експедицій в Українських Карпатах у популяціях на горах (г.) Пожижевська (хр. Чорногора, Надвірнянський р-н, Івано-Франківська обл., 1427 м н.р.м.), г.г Шешул–Павлик (хр. Чорногора, Рахівський р-н, Закарпатська обл., 1627 м

н.р.м.); рослин *in vitro* *G. punctata* та *G. acaulis* у популяціях на г. Брескул (хр. Чорногора, Надвірнянський р-н, Івано-Франківська обл., 1770 м н.р.м. та 1850 м н.р.м., відповідно). Збір насіння проводили відповідно до дозволу, наданого Міністерством екології і природних ресурсів України №4344/11–09 від 12.05.2009 р. та №7657/19–12 від 25.07.2012 р.

Отримані *in vitro* рослини *G. lutea* та *G. punctata* субкультивували на рідкому живильному середовищі МС/2, доповненому 0,1 мг/л кінетину, рослини *G. acaulis* – на середовищі МС/2, доповненому 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти. Для експерименту було відібрано по 30 вихідних генотипів рослин з кожної популяції, які мікроклонально розмножували з метою отримання потрібної для дослідження кількості рослинного матеріалу. Концентрацію проліну визначали у генотипово однакових рослинах *in vitro*, що культивувалися за різних світлових умов: 1.1 варіант – інтенсивність світлового потоку в області фотосинтетично активної радіації (ФАР) 85 Вт/м², співвідношення хвиль синього (Ес), зеленого (Ез) та червоного (Еч) діапазонів у спектральному складі: Ес : Ез : Еч = 33 % : 42 % : 25 %; 2.1 варіант –100 Вт/м², спектральний склад Ес : Ез : Еч = 25 % : 27 % : 48 % на живильному середовищі МС/2, доповненому для видів *G. lutea* та *G. punctata* комбінаціями 0,1 мг/л Кін та 10 г/л сахарози або 0,1 мг/л Кін та 3 г/л маніту, для рослин виду *G. acaulis* – 0,1 мг/л НОК, 10 г/л сахарози або 0,1 мг/л НОК, 3 мг/л маніту, 200 мг/л проліну. Тривалість культивування становила 60 діб.

Адаптацію до умов *ex vitro* здійснювали у 2 етапи. На першому – одразу після культури *in vitro* рослини відмивали у дистильованій воді від залишків живильного середовища, після чого висаджували у пластикові контейнери з вентиляційними кришками, об'ємом 500 см³ на оптимізоване за елементним складом рідке живильне середовище. При розробці мінерального складу оптимізованого живильного середовища було враховано вміст рухомих (або катіонообмінних) форм макро- та мікроелементів у ґрунтах природних оселищ видів. Тривалість культивування на першому етапі становила 30 діб. На другому етапі рослини висаджувати у пластикові касети об'ємом 150 мл заповнені ґрунтом та нерозкладеними залишками рослинної дернини з природних місць росту видів у співвідношенні 1 : 2 відповідно. Тривалість культивування на другому етапі становила 30 діб. На

першому та другому етапах рослини адаптували до умов *ex vitro* за світлових режимів 1.1 та 2.1 варіантів.

Для визначення проліну 0,5 г рослинного матеріалу гомогенізували з 1 мл 3 % сульфасаліцилової кислоти, доводили об'єм до 10 мл і фільтрували. До 2 мл отриманого фільтрату додавали 2 мл оцтової кислоти, 2 мл нінгідрину та ставили на водяну баню на 1 год. Після цього пробірки виймали та поміщали у лід. До охолодженого екстракту додавали 4 мл толуолу та ретельно перемішували упродовж 25–30 с. Далі шар толуолу відділяли та нагрівали до кімнатної температури. Оптичну густина отриманого розчину вимірювали за довжини хвилі 520 нм. Вміст проліну в рослинному матеріалі розраховували у мкмоль/г сирої речовини [8].

Результати та обговорення

Результати досліджень показали, що незалежно від видової приналежності та світлових умов росту у рослин *in vitro*, культивованих на сахарозі, вміст проліну в листках є вищим, ніж у коренях. Концентрації відрізняються у 2 і більше рази, за винятком особин *G. acaulis* з 1.1 варіанту, у яких ця різниця становить лише 1,27 раза (рис. 1, 2). Нерівномірний розподіл проліну у підземних та надземних органах спостерігається й у інших видів рослин [9], що пов'язують із особливостями його локалізації у клітинах: ця амінокислота зна-

ходиться не лише у цитоплазматичних компартаментах, але й у хлоропластах [10]. У клітинах коренів хлоропласти відсутні, чим зумовлений нижчим вміст цієї амінокислоти.

Встановлено, що на біосинтез проліну в рослин *in vitro* досліджених видів залежить від світлових режимів їх культивування. Збільшення інтенсивності світлового потоку в області ФАР до 100 Вт/м² за одночасного підвищення частки хвиль Еч в 1,92 раза та зменшення хвиль Ес у 1,32 раза і Ез діапазонів у 1,55 раза за 2.1 варіанту світлової корекції (СК) у більшості випадків призводить до зростання концентрації проліну у вегетативних органах рослин. Однак, виявлено певні видові та генотипові відмінності в інтенсивності його накопичення. Так, у рослин *G. lutea*, що культивувалися на живильному середовищі, доповненому сахарозою, за світлових умов 2.1 варіанту, концентрація проліну у коренях зростає на 0–18,4 %, а у листках – на 11,53–12,68 %, залежно від популяційної приналежності (рис. 1). У дослідній групі рослин *in vitro* *G. acaulis*, що культивувалися за світлових умов 1.1 варіанту СК, в коренях накопичується на 17,5 % проліну більше порівняно із дослідною групою з 2.1 варіанту СК. У листках рослин *in vitro* *G. acaulis* вміст цієї амінокислоти є вищим на 22,56 % 2.1 варіанту світлових умов культивування.

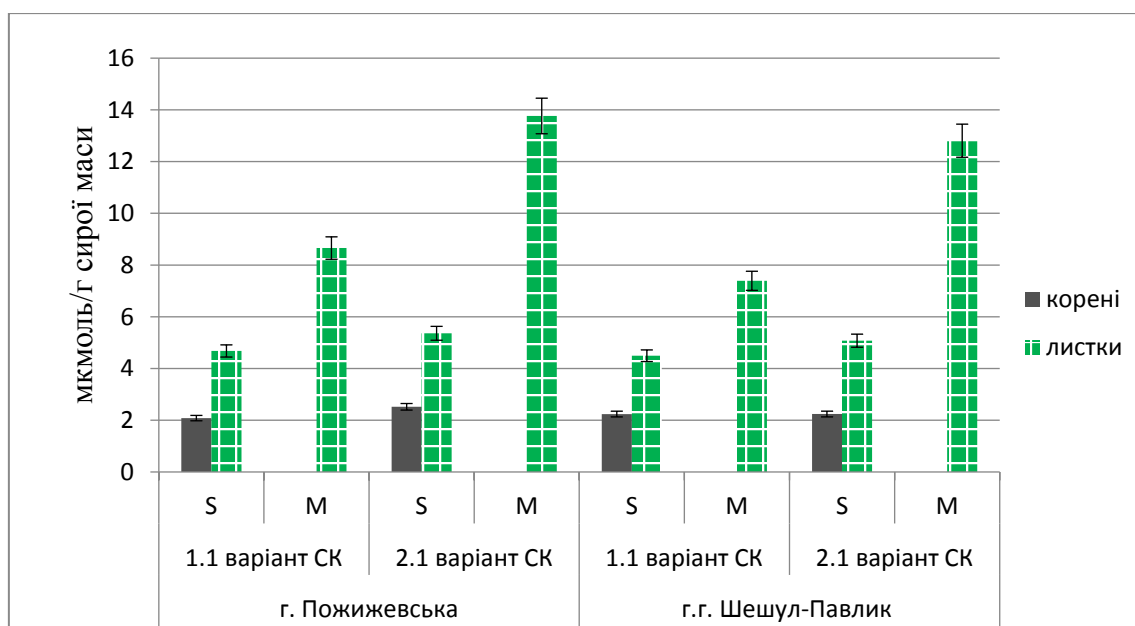


Рис. 1 – Вміст проліну у листках і коренях рослин *in vitro* *G. lutea* з г. Пожижевська та г.г. Шешул-Павлик: *S* – сахароза як джерело карбону у складі живильного середовища; *M* – маніт як джерело карбону у складі живильного середовища

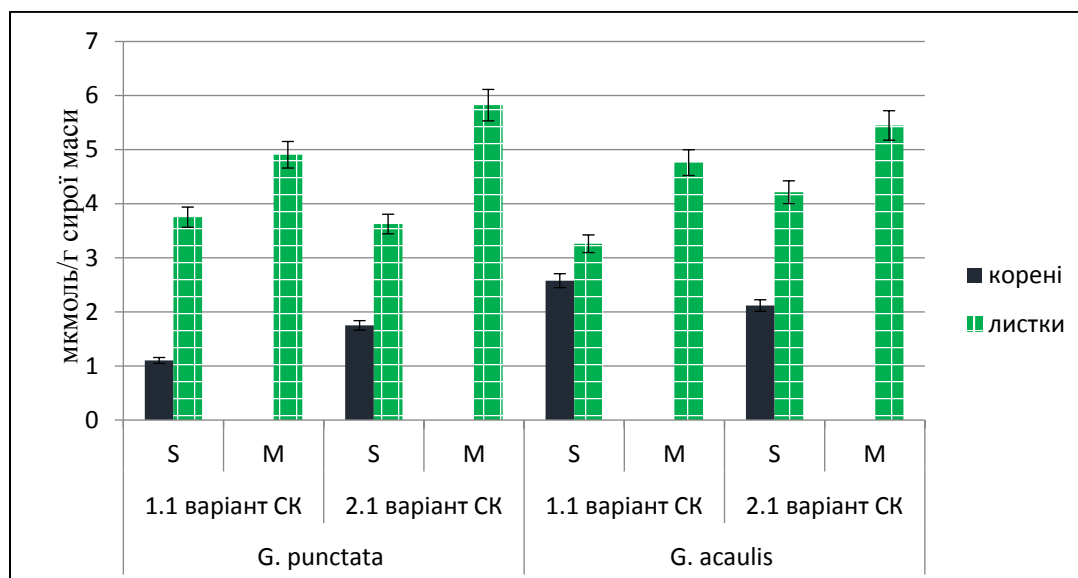


Рис. 2 – Вміст проліну у листках і коренях рослин *in vitro* *G. punctata* і *G. acaulis*: *S* – сахароза як джерело карбону у складі живильного середовища; *M* – маніт як джерело карбону у складі живильного середовища

Ще більші відмінності у накопичення вільного проліну виявлено у рослин *G. punctata*: у коренях, за світлових умов 2.1 варіанту культивування, вміст цієї сполуки збільшується на 37,14 %, порівняно із 1.1 варіантом СК, а у листках – за різних світлових режимів культивування статистично достовірної відмінності у показниках концентрації проліну не виявлено (рис. 2). Необхідно зазначити, що за культивування на сахарозі, вміст проліну у листках рослин видів *G. punctata* та *G. acaulis* у 1,5–2 рази нижчий, порівняно з їх особинами з природи, а у рослин *in vitro* та *in situ* *G. lutea* достовірно значимо не відрізняється.

Відомо, що введенням до складу живильного середовища речовини-осмоліту маніту можна досягнути одночасно двох ефектів: 1) запобігти детоксикації гідроксильних радикалів і синглетного кисню, що збільшує ефективність протікання фотохімічних реакцій та створює передумови для зменшення руйнування компонентів фотосинтетичного апарату рослин *in vitro* за перенесення їх в умови *ex vitro*; 2) імітувати у рослин *in vitro* стан водного дефіциту, за якого у тканинах рослин накопичуються вуглеводи у концентрації 200 мМ і більше. Це стабілізує мембрани клітин, білки; підтримує тургор клітин і створює градієнт водного потенціалу для більш інтенсивного поглинання води [11], що сприяє підвищенню адаптивного потенціалу рослин умов *ex vitro*.

Результати досліджень показали, що введення маніту до складу живильного середовища призводить до збільшення концентрації вільного проліну у листках рослин *in vitro* усіх досліджених видів. Однак, як й у випадку із сахарозою, важливе значення для його біосинтезу в рослинах мають світлові умови їх культивування. Встановлено, що незалежно від видової приналежності, концентрація цієї сполуки в умовах 1.1 варіанту зростає лише на 1,3–1,84 рази, порівняно із рослинами, що росли на середовищі з сахарозою. Найвищі (1,64–1,84 рази) значення властиві рослинам *G. lutea*, у рослин *G. acaulis* вони становлять 1,46 рази, а *G. punctata* – лише 1,3 рази. Культивування рослин за світлових умов 2.1 варіанту призводить до значно більшого зростання концентрації проліну у їх листках. Порівняно із рослинами *in vitro* *G. lutea*, що культивувалися на живильних середовищах, доповнених сахарозою, вміст проліну у рослинах цього виду, які вирощували на середовищах з манітом є вищим у 2,52–2,57 рази, залежно від популяційної приналежності. У рослин *G. punctata* концентрація збільшилася у 1,6 рази. Лише у особин *G. acaulis* різниця між показниками є дещо меншою – 1,29 рази. При цьому, концентрація проліну у рослин *in vitro* *G. lutea*, що культивувалися на живильних середовищах, доповнених манітом, за світлових умов 2.1 варіанту, більше ніж у 1,5 рази перевищує отримані значення у рослин з природи, а у рослин *in vitro*

видів *G. punctata* та *G. acaulis* не виходить за межі діапазону значень особин з умов *in situ*.

Збільшення вмісту проліну у рослинах *in vitro*, що культивувалися на середовищі, доповненому манітом, за світлового режиму 2.1 варіанту, свідчить про підвищення їхньої стійкості до зневоднення. Порівняльний аналіз параметрів водного балансу цієї групи рослин *in vitro* із рослинами досліджених видів з природним умов росту не виявив суттєвої різниці у таких показниках, як інтенсивність транспірації, водний дефіцит, загальний вміст вологи. Відрізнялися ці групи рослин лише за вологоутримуючою здатністю, значення якої у 2,8–5,5 рази були нижчими за значення рослин з умов *in situ*. На наш погляд, це зумовлено специфічними умовами культури *in vitro*, зокрема: високою відносною вологістю повітря та низькою часткою у ньому CO₂. Останнє, ймовірно, сповільнює накопичення речовин-осмолітів у рослин *in vitro*, порівняно із їх особинами з природи.

Отримані результати досліджень вказують, з одного боку, на можливість використання вмісту вільного проліну як біохімічного маркера оцінки адаптивного потенціалу рослин *in vitro*, а з іншого, – на доцільність культивування рослин *in vitro* *G. lutea*, *G. punctata*, *G. acaulis* етапі підготовки їх до перенесення в умови *ex vitro* на живильному середовищі, до складу якого вве-

дено маніт. Оскільки, адаптація мікроклонально розмножених рослин до умов *ex vitro* є одним із найскладніших завдань сучасної біотехнології збереження рослин, це передбачає використання критеріїв-маркерів для оцінки адаптивного потенціалу рослин *in vitro* у нових умовах росту. Тому, було досліджено зміни вмісту вільного проліну у листках рослин *in vitro* за адаптації їх до умов *ex vitro* на прикладі виду *G. lutea*.

Встановлено, що за 30 діб культивування в умовах *ex vitro* на оптимізованому середовищі концентрація амінокислоти у рослинах *G. lutea* знижується у 2,5 рази за світлових умов 1.1 варіанта та у 3,2 рази за світлових умов 2.1 варіанту, порівняно із умовами *in vitro* (рис. 3). Ймовірно, таке зниження вмісту проліну зумовлено достатнім рівнем забезпечення рослин доступною водою упродовж усього I етапу культивування *ex vitro*. На II адаптаційному етапі *ex vitro* рослини висаджували у ґрунтову суміш. Значно менший вміст вологи у ґрунті у комплексі із низькою ще поглинальною здатністю кореневої системи рослин *ex vitro* створювали умови дефіциту доступної води. Це спричинило підвищення вмісту проліну у 1,76 рази за світлових умов 1.1 варіанта та у 2,17 рази за 2.1 варіанту СК, порівняно із попереднім етапом культивування.

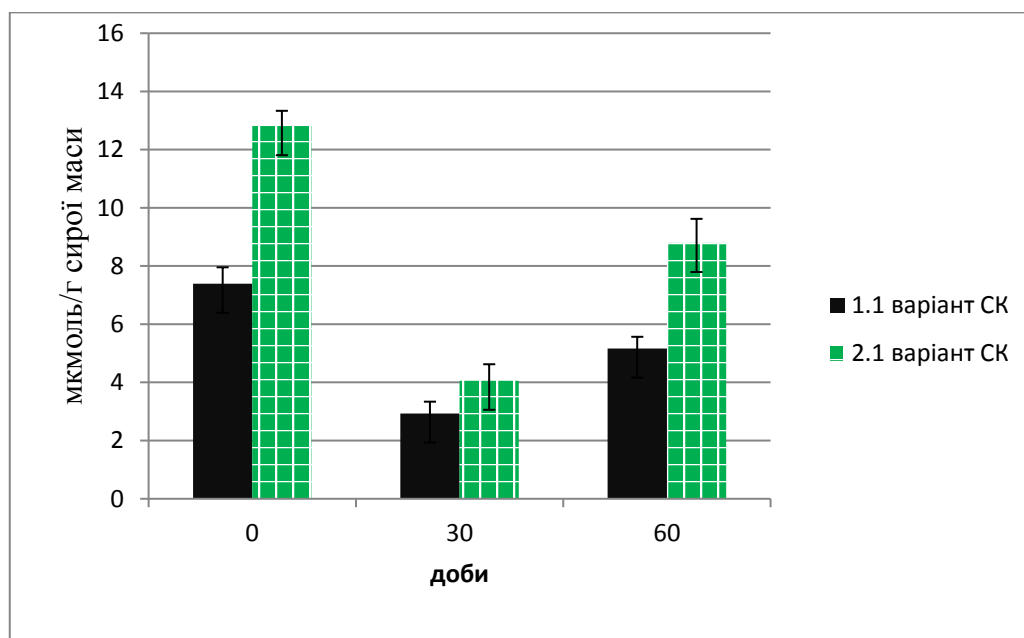


Рис. 3. Зміна концентрації проліну в листках рослин *G. lutea* (гг. Шешул-Павлик) у процесі адаптації до умов *ex vitro*

Необхідно зазначити, що на цьому етапі досліджували вміст проліну та параметри водного балансу у листках, утворених вже в умовах *ex vitro*. Відомо, що листки рослин, отриманих біотехнологічними методами, сформовані на етапі адаптації до умов *ex vitro* відрізняються за анатомічною будовою від утворених раніше [12].

Висновки

Встановлено, що концентрація проліну у вегетативних органах рослин *in vitro* видів *G. lutea*, *G. punctata*, *G. acaulis* залежить від світлових режимів їх культивування та джерела карбону у складі живильного середовища. Збільшення інтенсивності світлового потоку в області ФАР до 100 Вт/м² за одночасного підвищення

частки хвиль Еч в 1,92 раза та зменшення хвиль Ес у 1,32 раза і Ез діапазону – в 1,55 раза за 2.1 варіанту світлової корекції у більшості випадків призводить до зростання концентрації проліну у вегетативних органах рослин. Заміна сахарози на низькомолекулярну речовину маніт у складі живильного середовища для культивування рослин *in vitro* зумовлює збільшення концентрації вільного проліну у 1,29-2,57 раза, залежно від видової приналежності особин. Показано, що у процесі поетапної адаптації рослин *in vitro* до умов *ex vitro* також відбувається зміна концентрації проліну. Тому, отримані результати досліджень свідчать про можливість використання вмісту вільного проліну як біохімічного маркера оцінки адаптивного потенціалу рослин досліджених видів роду *Gentiana* як в умовах *in vitro*, так і *ex vitro*.

References

1. Mathur A., Mathur A. K., Verma P. Biological hardening and genetic fidelity testing of micro-cloned progeny of *Chlorophytum borivilianum*. *African Journal of Biotechnology*. 2008. Vol. 7 (8). P. 1046–1053. URL: <http://www.academicjournals.org/AJB>.
2. Isah T. Adjustments to *in vitro* culture conditions and associated anomalies in plants. *Acta biologica Cracoviensia. Series Botanica*. 2015. Vol. 57/2. P. 9–28. doi: 10.1515/abcsb-2015-0026.
3. Sergiyeva L. Ye., Bronnikova L. I. Transformation proline in winter wheat shoots, obtained after genetic. *Bioriznomanittâ, ekologiâ ta eksperimental'na biologîâ*. 2020. Vol. 22, №1. P. 108–116 [in Ukrainian].
4. Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M. N., Wani A. S., Pichtel J., Ahmad A. Role of proline under changing environments. *Plant Signaling & Behavior*. 2012. Vol. 7, № 11. P. 1456–1466. doi: 10.4161/psb.21949.
5. Phang J. M., Liu W., Zabirnyk O. Proline metabolism and microenvironmental stress. *Annual Review of Nutrition*. 2010. Vol. 30. P. 441–463. doi: 10.1146/annurev.nutr.012809.104638.
6. Kavi Kishor P. B., Hima Kumari P., Sunita M. S., Sreenivasulu N. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Front Plant Sci*. 2015. Vol. 6. 544. doi: 10.3389/fpls.2015.00544.
7. Hosseinifard M., Stefaniak S., Ghorbani J. M., Soltani E., Wojtyła Ł., Garnczarska M. Contribution of exogenous proline to abiotic stresses tolerance in plants: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23, № 9. 5186. doi:10.3390/ijms23095186
8. Dovgajuk-Semenuk M. V., Velychko O. I., Terek O. I. The content of free amino acids in the red clover plants under the influence of oil polluted soil. *Studia Biologica*. 2016. Vol. 10, №2. P. 115–122 [in Ukrainian].
9. Komisarenko A. G., Mykhalskaya S. I. The free proline levels in transgenic sunflower (*Helianthus annuus* L.) T3 plants with double-stranded proline dehydrogenase gene RNA-suppressor. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2017. Vol. 20. P. 211–214 [in Ukrainian].
10. Singh A., Sengar K., Sharma M. K., Sengar R.S., Garg S. K. Proline metabolism as sensors of abiotic stress in sugarcane // *Biotechnology to Enhance Sugarcane Productivity and Stress Tolerance* / ed by Sengar K. Boca Raton : CRC Press, 2018. doi: 10.1201/9781315152776.
11. Léo A. S., Moura C. R. F., Machado C. A. et al. Mannitol for coconut *ex situ* conservation by minimum growth. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2014. Vol. 49, № 2. P. 148–151. doi: 10.1590/S0100-204X2014000200010.
12. Dragolova D., Stefanova M., Dimitrova M., Koleva D., Zhiponova M., Kapchina-Toteva V. *In vitro* cultivation and *ex vitro* adaptation of *Nepeta nuda* ssp. *nuda* – correlation between regeneration potential, leaf anatomy, and plastid pigments. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2015. Vol. 21, № 5. P. 1027–1032.

HRYTSAK L. R.¹, NUZHINA N.V.², DROBYK N. M.¹

¹*Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University, Ukraine, 46027, Ternopil, M. Kryvonosa str., 2, e-mail: hrytsak1972@gmail.com*

²*Educational and Scientific Centre "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 03022, Kyiv-022, prospekt Akademika Hlushkova 2*

THE INFLUENCE OF *IN VITRO* AND *EX VITRO* CULTIVATION CONDITIONS ON FREE PROLINE CONTENT IN PLANTS OF SOME *GENTIANA L.* SPECIES

Objective. To establish the dependence of free proline concentration in plant tissues of *in vitro* та *ex vitro* alpine species of *Gentiana lutea L.*, *Gentiana punctata L.*, *Gentiana acaulis L.* on light conditions of their cultivation and the source of carbon in the nutrient medium; to analyze expediency of free proline amino acid use as a biological marker of physiological adaptation of biotechnological plants of these species to water deficit of *in vitro* and *ex vitro* conditions.

Methods. Methods of *in vitro* and *ex vitro* cultivation of plants, the method of free proline detection with the use of ninhydrin. **Results.** It is shown that under *in vitro* conditions of free proline content in plants is dependent on light regime of their cultivation and the source of carbon in the composition of nutrient medium. The increased intensity of luminous flux within the range of photosynthetically active radiation (PAR) from 85 W/m² to 100 W/m² and 1.92 times raised share of red range waves in the light spectral composition in variant 2.1 (intensity of the luminous flux in the PAR range is 100 W/m², the waves correlation of blue (Eb): green (Eg): red (Er) ranges = 25 % : 27 % : 48 %) causes 11.5–37.1 % increased amount of free proline in plants *in vitro* cultivated on nutrient media supplemented with sucrose. Substitution of sucrose in the medium for mannitol is accompanied by 1.64–1.84 times increased concentration of free proline in plants of the investigated species under the light conditions of 1.1 variant (85 W/m², spectral composition Eb : Eg : Er = 25 % : 27 % : 48 % = 33 % : 42 % : 25 %) and 1.3–2.57 times increased under light cultivation regime of 2.1 variant. The analysis of water balance of plants *in vitro* cultivated on mannitol under light conditions of 2.1 variant and the plants in conditions of natural growth doesn't show any considerable distinctions in values of transpiration intensity, water deficit, general water content. The process of adaptation of plants *in vitro* to conditions *ex vitro* is accompanied by a change of proline content in leaves with dependence on water deficit in the substrate and light conditions of growing. **Conclusions.** The obtained results point to the expediency of using free proline content as a biochemical marker for assessing adaptive potential of plants in conditions *in vitro* and *ex vitro*.

Key words: *Gentiana L.*, plants *in vitro*, plants *ex vitro*, free proline, light conditions of cultivation.