

Н.М. СТРАШНЮК<sup>1</sup>, Л.Р. ГРИЦАК<sup>1</sup>,  
О.М. ЛЕСЬКОВА<sup>1</sup>, В.М. МЕЛЬНИК<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Тернопільський національний педагогічний  
університет ім. Володимира Гнатюка  
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027, Україна  
E-mail: strashniuk@ukr.net

<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна  
E-mail: vitalijm@ukr.net

## ВИДИ РОДУ *GENTIANA* L. ФЛОРИ УКРАЇНИ У ПРИРОДІ ТА КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

*Ключові слова:* *Gentiana* L., поширення, екологічні особливості, фармакологічна цінність, культури клітин і тканин.

*Gentiana* L. — найбільший рід родини *Gentianaceae* Juss., який на сьогодні налічує понад 360 видів, поширених переважно у субальпійських та альпійських зонах помірних широт північної півкулі [50]. Найбільшою є різноманітність видів роду в Азії (312), меншою — у Північній і Центральній Америці (35) та Європі (27—29 видів) [50, 62].

Дослідженням роду *Gentiana* приділяли і приділяють увагу багато вчених. На цей час досить детально охарактеризовано поширення та еколого-географічні особливості видів роду [4, 9, 18, 39, 40], з'ясовано причини скорочення чисельності популяцій деяких рідкісних видів [38, 57]. Для розв'язання суперечливих питань систематики роду, а також встановлення еволюційних зв'язків і побудови філогенетичних систем проводяться порівняльно-ембріологічні та цитологічні дослідження. Так, здійснено морфометричний аналіз пилкових зерен видів флори України [9, 45], досліджено анатомо-морфологічну будову вегетативних органів [9, 31, 32] і структуру пагонових систем [32]. Вивчено етапи онтогенезу ряду видів [18, 23], цитогенетику роду [52, 63]. Встановлено нуклеотидну послідовність та проаналізовано молекулярну еволюцію (філогенез) внутрішніх транскрибованих спейсерів рДНК [61, 62] і деяких послідовностей хлоропластної ДНК [49], а також з'ясовано варіабельність 18S-25S рибосомних генів деяких видів [22]. Значна увага приділялася особливостям накопичення у рослинах видів *Gentiana* вторинних метаболітів [2, 3, 27, 33, 47, 53], що зумовлюють їх цінні лікувальні властивості; з'ясуванню фармакологічної активності досліджуваних рослин і застосуванню їх у медицині [1, 19, 24, 26, 33, 58]. Види *Gentiana* є вдалими об'єктами для введення у культуру *in vitro* [6, 8, 35—37, 48, 54, 55, 60] з метою одержання біосинтетично активних штамів. Це є особливо актуальним в умовах зменшення природної сировинної бази та у зв'язку з можливістю отримання *in vitro* якісно та кількісно відмінних вторинних метаболітів [53].

© Н.М. СТРАШНЮК<sup>1</sup>, Л.Р. ГРИЦАК<sup>1</sup>, О.М. ЛЕСЬКОВА<sup>1</sup>, В.М. МЕЛЬНИК<sup>2</sup>, 2005

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. [9, 29] і 2 однорічними — *G. nivalis* L. [16] та *G. utriculosa* L. [12]. П'ять видів роду занесені до Червоної книги України: *G. lutea* та *G. punctata* належать до зникаючих видів, *G. acaulis*, *G. laciniata* і *G. verna* — до вразливих, які в майбутньому можуть перейти до категорії зникаючих [42]. З огляду на обмежений ареал і малу чисельність популяцій, до Червоної книги України також мають бути занесені *G. nivalis* і *G. utriculosa*.

Попри значну увагу з боку дослідників, проблема збереження видів роду *Gentiana* залишається актуальною. Лише комплексні дослідження поширення видів, факторів регуляції росту, розмноження та фізіолого-біохімічних особливостей як у природі, так і в культурі *in vitro*, дозволять призупинити тенденцію до скорочення їх ареалів та отримати додаткове джерело лікарської сировини.

#### **Види роду *Gentiana*: поширення в Україні та екологічні особливості**

*Gentiana acaulis*, *G. laciniata*, *G. lutea*, *G. punctata*, *G. verna* поширені в межах флористичних районів Українських Карпат [44]; *G. asclepiadea* має дещо більший ареал, який охоплює, крім Українських Карпат (за винятком Закарпатської рівнини та Мармароської (Хуст-Солотвинської) улоговини), ще й Розтоцько-Опільські ліси (околиці м. Львова) [9, 18, 29]. Поступово, з віддаленням від гірських районів, трапляється дедалі менше представників роду *Gentiana*. *G. pneumonanthe* зростає в межах усіх ботаніко-географічних районів України, за винятком Криму. *G. cruciata* зрідка знаходять у лісостеповій та степовій зонах України, часто — у Прикарпатті та в Криму [10, 29, 40].

*Gentiana acaulis* — середньоевропейський високогірний вид, ареал якого охоплює Альпи і гори Південної Європи. В Україні трапляється лише у Карпатах, де проходить східна межа його поширення [25]. Зростає на скелях, щербенистих ґрунтах, свіжих задернованих кам'янистих схилах та високогірних луках у межах висот 1250—1950 м над р. м. [40, 42, 43], інколи спускається у лісовий пояс до висоти 930 м над р. м. [9].

За даними В.І. Чопика [43], *G. acaulis* належить до кальцефобних видів. К.А. Малиновський та співавт. [21] наводять його у складі угруповань із затінених вапнякових скель з високим вмістом кальцію. Проведений нами порівняльний морфометричний аналіз особин *G. acaulis*, які культивували в умовах *in vitro* на живильних середовищах з різним вмістом солей кальцію [36], підтверджує наведені вище літературні дані про те, що *G. acaulis* може зростати за умов як високих, так і низьких концентрацій кальцію.

Результати наших детально-маршрутних досліджень показали, що популяції *G. acaulis* збереглися лише у важкодоступних місцях та в умовах заповідання на Чорногірському та Свидовецькому масивах. Поодинокі рослини трапляються на полонинах Менчул Квасівський і Рогнеска, горах Говерла, Брескул, Данцер. Застосування онтоморфогенетичних [28] та популяційних

[41] методів досліджень показало, що популяції *G. acaulis*, які зростають в оптимальних для виду еколого-географічних умовах на горах Шпиця (1750 м над р. м.) та Ребра (1650 м над р. м.), характеризуються нормальною повночленною структурою, а популяція з г. Туркул (1830—1900 м над р. м.), яка знаходиться в одному з найвище розташованих оселищ в межах Українських Карпат, — нормальною неповночленною. В усіх досліджуваних популяціях *G. acaulis* максимум у віковому спектрі припадає на прегенеративну групу, однак у популяціях зі Шпиці і Ребри переважають іматурні, а з Туркулу — віргінільні, здебільшого вегетативного походження особини. Так, частка особин насінневого походження у цій групі становила 56,5 % у шпицькій і 43,7 % — у реберській популяціях, а в туркульській — лише 6,9 %; на особини генеративної групи припадало, відповідно, 31,8, 27,2 та 42,88 %. Частка особин постгенеративної групи у туркульській популяції становила лише 2,72 %, а у шпицькій та реберській — 12,3 і 8,73 %, відповідно. Водночас у туркульській популяції відсутні особини сеньільної групи, випадають окремі вікові стани ( $g_1$ ), тривалість  $g_1$  стадії онтогенезу скорочується з 6-ти (характерних для рослин шпицької і реберської популяцій) до 3 років, а темпи проходження особинами  $g_2$  стадії сповільнюються, що призвело до збільшення її тривалості з 5 до 7 років. Загальна тривалість повного онтогенезу *G. acaulis* становить 17—19 років. Відмінності вікової структури популяцій *G. acaulis* і тривалості стадій онтогенезу зумовлені, на нашу думку, особливостями еколого-географічних умов зростання [7].

*Gentiana asclepiadea* — європейсько-малоазійський монтанно-субальпійський вид, ареал якого охоплює Західне Середземномор'я, Центральну, Південну та Східну Європу, Кавказ та західну частину Малої Азії [4, 18, 43]. Трапляється на вологих луках і пасовищах, на глинистих, торф'яних, нерідко й вапнякових ґрунтах, на узліссях, у лісах та серед чагарників на висотах від 400 до 1800 м над р. м. [18, 43].

За даними К.М. Кишко [18], вікова структура популяцій *G. asclepiadea* відзначається одноманітністю, оскільки всі вони мають фітоценотично повноцінні спектри з максимумом на генеративних, переважно середньовікових, або старих генеративних особинах.

*Gentiana cruciata* — європейсько-азійський вид, поширений у Середній та Атлантичній Європі, Західному Середземномор'ї, на Балканах, у Малій Азії. Зростає поодинокі або невеликими групами здебільшого на відкритих степових ділянках, у розріджених заростях чагарників, по балках, узліссях, на галявинах, сухих луках і трав'янистих схилах [10, 29].

*Gentiana laciniata* — східнокарпатський ендемічний високогірний вид. В Українських Карпатах трапляється на Боржаві, Свидовці, Чорногорі (часто по всьому хребту від г. Говерла до г. Піп Іван, а також на горах Петрос і Шешул), Чивчинських горах і Мармароському масиві на висоті 1680—2000 м над р. м. на скелях, осипах, щербенистих ґрунтах, високогірних луках субальпійського та альпійського поясів [25, 40, 42, 43].

*Gentiana lutea* — середньоєвропейський високогірний вид, поширений у горах Південної та Центральної Європи (Альпи, Південні Карпати, Балкани), у західній частині Малої Азії. В Українських Карпатах проходить північно-східна межа ареалу виду, тут *G. lutea* має широку еколого-географічну амплітуду зростання і трапляється на висоті 900—1900 м над р. м. на схилах різної експозиції та різної крутості — до 65 ° [40, 42, 43]. З літератури відомо [34], що *G. lutea* належить до кальцефільних видів, і це підтверджують результати проведених нами в умовах *in vitro* досліджень [36].

На думку К.А. Малиновського та співавт. [38], у період існування єдиного карпатського пенеплену, не перерізаного р. Тисою, зростала неінсуляризована популяція цього виду, ареал якої простягався від Горган до Чивчинських гір. Однак згодом вона розпалася спочатку на свидовецьку та чорногірську, а пізніше, внаслідок інтенсивної заготівлі сировини для потреб офіційної та народної медицини, — на ряд окремих локусів і фрагментів. На цей час збереглися лише три ізольовані популяції: трояська — у льодовиковому котлі під г. Трояска (хребет Свидовець), рогнеська — на полонині Рогнеска (хребет Чорногора) та мармароська — поміж скель на г. Піп-Іван Мармароський [38]. Серед них охороняється лише рогнеська. Співробітники відділу популяційної екології Інституту екології Карпат успішно реінтродукували популяцію *G. lutea* на г. Пожижевська (хребет Чорногора). Водночас невеликі фрагменти популяцій *G. lutea*, особини яких поновлюються насінневим шляхом, відомі й з інших місцезростань на Чорногорі, а також Чивчинських горах, Східних Бескидах та низьких полонинах (полонина Рівна).

Результати проведених нами популяційних досліджень *G. lutea* засвідчують, що рогнеська популяція належить до нормальних повночленних, з максимумом вікового спектра на генеративних особинах; самопідтримується генеративним та вегетативним шляхом. Трояська популяція належить до нормальних неповночленних. У її віковому спектрі відсутня іматурна група та переважають особини постгенеративної (до 80 %), частка рослин генеративної групи становить не більше 10 %. Це перешкоджає повноцінному насінневому поновленню популяції, внаслідок чого вона самопідтримується здебільшого вегетативним шляхом.

*Gentiana pneumonanthe* — європейсько-кавказько-сибірський вид, поширений у Скандинавії, Середній та Атлантичній Європі, на півночі Середземномор'я, Балканах. В Україні зрідка трапляється майже в усіх ботаніко-географічних районах (за винятком Криму) на вологих луках, по краях боліт, біля джерел, на узліссях, серед чагарників аж до гірського лісового поясу [29].

*Gentiana punctata* — центральноєвропейський субальпійський вид, поширений у горах Центральної і Південної Європи. В Україні трапляється лише у Карпатах — Горганах, на Свидовці, Чорногорі, у Чивчинських горах і Мармароському масиві, на кам'янистих розсипах, на потужних, кислих, багатих, часто глинистих ґрунтах у межах висот 1500—1900 м над р. м. [40, 42, 43]. Результати проведених нами детально-маршрутних досліджень протягом

1997—2004 рр. показали, що на масивах Чорногора і Свидовець залишилися лише поодинокі місцезростання та невеликі фрагменти популяцій.

*Gentiana verna* — євразійський аркто-альпійський вид, поширений у горах Європи від Іспанії до Норвегії та Великобританії, Малої та Центральної Азії [40, 42, 43]. Зростає на скелях, кам'янистих і шебенистих галявинах, високогірних луках в альпійському та субальпійському, зрідка лісовому (буковому) поясах на вологих дерново-буроземних, з поверхні оглеєних ґрунтах [13] на післялісових луках Карпат [29, 40, 42, 43].

Думка дослідників щодо поширення *G. verna* у флорі України не є однозначною. К.А. Малиновський [20] наводить його для всіх високогірних районів Українських Карпат, В.І. Чопик [43] — для Горган, Свидовця, Чорногори, Мармароських Альп, В.І. Комендар [42] — для Мармароського масиву. С.М. - Зиман [13, 14] стверджує, що *G. verna* в Українських Карпатах відомий лише з одного місцезнаходження — урочища Гереджівка (сmt Ясиня).

В останні роки підтверджено зростання в Українських Карпатах однорічників *G. nivalis* і *G. utriculosa*. Місцезростання *G. nivalis* виявлено Я.В. Кардашем у високогір'ї Свидовця [16]. *G. utriculosa* відомий з чотирьох місцезростань. Одне з них знаходиться на північно-східних відрогах хр. Чорний Діл у Чивчинських горах поблизу урочища Жупани на висоті 1145 м над р. м., де виявлено близько 100 особин виду. У другому місцезростанні, розташованому нижче за течією р. Сарати, знайдено поодинокі генеративні особини, у третьому, в межах пам'ятки природи місцевого значення Жупани, — понад 50 особин. Четверте місцезнаходження *G. utriculosa* встановлене Н.М. Шиян за гербарним зразком з с. Селятин Путильського р-ну Чернівецької обл. [12].

Аналіз літературних даних та результатів власних детально-маршрутних і популяційних досліджень свідчить про тенденцію до скорочення ареалів видів роду *Gentiana*, що насамперед зумовлене інтенсивним викопуванням рослин місцевим населенням з лікувальною метою, неконтрольованим випасанням худоби, витоптуванням та зриванням генеративних пагонів, — усе це спричинює зменшення чисельності популяцій, відсутність достатньої для існування популяції кількості підросту тощо.

#### **Фармакологічна активність і застосування в медицині**

Цінні лікарські властивості рослин роду *Gentiana* зумовлені синтезом у них комплексу біологічно активних речовин (БАР), представленого різними групами сполук: алкалоїдами [3, 17, 33], іридоїдами [2, 3, 33, 47], ксантонами [17, 27, 33], флавоноїдами [17, 51], вуглеводами [33], ароматичними та азотовмісними сполуками, пектиновими речовинами, аскорбіновою кислотою, катехінами тощо [11, 33].

Найбільше БАР синтезується у рослинах *G. lutea*. Інші види роду є близькими до нього за хімічним складом та фармакологічними властивостями. Зокрема, у підземній і надземній частинах *G. asclepiadea*, *G. cruciata*, *G. pneumonanthe*, *G. punctata* синтезуються приблизно такі самі речовини, але в менших кількостях [19].

Внаслідок фармакологічної дії рослин роду *Gentiana* поліпшується функціональна діяльність травних органів — апетит, секреція шлункових залоз базальної частини шлунка, підвищується вміст пепсину в шлунковому соку, посилюється моторика травного каналу, прискорюється регенерація слизової оболонки шлунка тощо [11, 19, 24, 26, 58].

Препарати із рослин роду *Gentiana* використовують також при інфільтра-тах печінки, селезінки, для лікування злоякісних пухлин [33], вони проявляють добре виражену холеретичну і дещо слабшу холекінетичну дію, здатні підсилювати скорочення серця, мають протизапальні, антисептичні та антигельмінтні властивості. Особливо ефективним є застосування рослин роду *Gentiana* при анемії й золотусі, лихоманці, у лікуванні пневмонії, загостреної форми бронхіту, парадонтозу, некротично-виразкового гінгівно-стоматиту [1, 19, 24, 26, 58].

Кореневища рослин *G. lutea* занесені до фармакопей багатьох країн світу, зокрема до 1—9 видань фармакопеї СРСР [33]. У зв'язку зі скороченням чисельності популяцій виду та відсутністю сировинної бази (кореневища масою 100—200 г можна отримати від рослин віком 10—12 років [30]), *G. lutea* не було включено у фармакопею України.

Зважаючи на скорочення ареалів більшості видів роду *Gentiana* та широкий спектр фармакологічної активності їх БАР, для відновлення стабільності природних популяцій видів і поповнення сировинної бази поряд з традиційними методами доцільним є використання біотехнологічних.

#### Культура клітин і тканин деяких видів роду *Gentiana*

Біологічні особливості росту та розмноження видів роду *Gentiana* (низька схожість насіння, вимогливість до складу та зволоження ґрунтів, потреба у мікоризних грибах [5, 15, 59]) є причинами того, що введення їх у культуру — досить складний процес. Проте є відомості про успішне культивування тирличів *in vitro* як з метою збереження генофонду, так і для отримання альтернативного джерела біологічно активних речовин, зокрема глікозидів, флавоноїдів, ксантонів тощо [6, 8, 35—37, 46, 48, 53—55].

Зроблено спробу підбору умов для клонального розмноження *G. asclepiadea*, *G. lutea* та *G. punctata*. Виявлено, що інфрачервоне світло стимулює поділ і диференціацію клітин, а на процеси регенерації та органогенезу впливають не лише концентрації екзогенних ауксинів і цитокінінів, а й їх співвідношення [8]. Відпрацювання умов для вегетативного розмноження *in vitro* *G. acaulis*, *G. asclepiadea*, *G. lutea* та *G. punctata* показало, що визначальними факторами при цьому є рН середовища, вміст солей кальцію та концентрації кінетину (Кін) [35, 36].

При розробці методик мікроклонального розмноження з'ясовано, що процес формування мікроклонів із рослин *G. lutea* краще відбувається на рідкому середовищі, *G. acaulis*, *G. asclepiadea* та *G. punctata* — на агаризованому. Середовище Мурасіге-Скуга [56] з удвічі меншим вмістом макро- та мікро-солей (МС/2) та удвічі підвищеною концентрацією  $\text{CaCl}_2$  є ефективнішим порівняно з іншими варіантами середовищ, сприяє мікроклональному роз-

множенню рослин рівненської популяції *G. lutea* і туркульської популяції *G. acaulis*. Рослини з інших популяцій цих видів не потребують підвищеного вмісту солей кальцію у середовищі. На одному живці утворювалося 0,46—6,5 адвентивних пагонів [35].

Про здатність тирличів до мікроклонального розмноження свідчать і результати досліджень 13 інших видів роду *Gentiana* L. Для індукції мікроклонів живці з асептичних проростків висаджували на середовище МС з Кін (0,5—2,0 мг/л). Оптимальною для мультиплікації пагонів була концентрація Кін 1,5 мг/л. Через 2—2,5 тижня з кожного експланту утворювалося 5—7 пагонів, а через 2—2,5 місяця — близько 50. Для вкорінення їх переносили на ауксинвмісне середовище (0,2—0,3 мг/л 1-нафтилоцтової або індолілоцтової (ІОК) кислот) [6].

Підібрано умови для мікроклонального розмноження *G. lutea* зі стеблової меристеми і пазушних бруньок [60], а також кінчика стебла та генеративних бруньок [48]. Найбільш сприятливим для отримання мікроклонів було середовище МС, доповнене 4,5 мМ 6-бензиладеніну та 0,6 мМ ІОК. Внесення в живильне середовище цитокініну тидіазурону (ТДЗ) у концентрації 0,6 мМ також стимулювало формування додаткових пагонів. Крім того, рослинний матеріал (стеблові апекси та генеративні бруньки), який культивувався на живильному середовищі, доповненому ТДЗ, зберігав здатність формувати пагони після 2—3 пасажів на середовищі без ТДЗ [48].

Для формування адвентивних коренів отримані в результаті мікроклонального розмноження пагони *G. acaulis*, *G. cruciata*, *G. lutea* інокулювали суспензією клітин *Agrobacterium rhizogenes* (штами ATCC15834 та A4M70GUS). Адвентивні корені з'являлися у місцях інокуляції у рослин усіх видів. Кореневі апекси культивували на живильному середовищі без фітогормонів протягом 2—6 років, вони характеризувалися значним розгалуженням та плагіотропізмом. Спонтанне формування бруньок відбувалося на коренях *G. cruciata*. Корені *G. acaulis*, *G. lutea* культивували на середовищах з високою концентрацією Кін, внаслідок чого формувалися пухкі калюсні тканини. Регенеровані пагони *G. cruciata* дали початок рослинам, які проявляли типові для трансформованих *A. rhizogenes* фенотипи: короткі міжвузля та покручені листки. За допомогою блот-гібридизації була доведена стабільність отриманих генетичних трансформантів видів роду *Gentiana* [54].

З ембріогенного калюсу *G. cruciata* і *G. lutea* на середовищі МС у присутності 2 мг/л 6-бензиламінопурина (БАП) на світлі утворювалися регенеранти, які потім найкраще росли на безгормональному середовищі зі зменшеним удвічі вмістом елементів [46].

Для одержання рослинної сировини, що має обмежену природну базу, використовують культури клітин і тканин, які зберігають притаманну вихідній рослині здатність до синтезу вторинних речовин.

З листових, стеблових та кореневих експлантів на середовищі МС з різним співвідношенням фітогормонів одержано калюсні культури

*G. asclepiadea*, *G. lutea* і *G. punctata* [8]. Однак, як зазначає автор, у *G. lutea* калюс утворювався і починав рости лише за умови п'ятикратного збільшення вмісту 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти у середовищі. Калюс цього виду швидко темнів і відмирав. Проблеми з культивуванням *in vitro* *G. lutea*, на думку автора, пов'язані з великою кількістю фенольних сполук, які містять рослини цього виду. У двох інших видів — *G. punctata* і *G. asclepiadea* — чергування безгормонального і гормонального середовищ протягом 2–3 міс. сприяло органогенезу в калюсах. Корені формувалися при перенесенні з безгормонального на гормональне середовище, бруньок — при зворотному перенесенні. Утворення коренів було масовим, а бруньок — поодиноким.

Ми одержали суспензійну культуру та культуру ізольованих коренів *G. lutea*, остання з яких здатна до інтенсивного росту на середовищі без фітогормонів. Підібрано умови для індукції калюсоутворення з різних типів експлантів і проліферації отриманих калюсних культур *G. lutea*, *G. acaulis*, *G. asclepiadea* та *G. punctata*. Встановлено, що на процеси калюсоутворення досліджуваних видів, потенційні можливості калюсу до подальшого пасажування суттєво впливають склад живильного середовища, тканинна приналежність експланта, гетерогенність генотипів вихідних рослин-донорів, зумовлена міжпопуляційним поліморфізмом, та видова приналежність рослин [35, 37].

При отриманні культур клітин і тканин *G. lutea* були зроблені спроби підбору оптимальних умов для великого виходу біомаси та високого вмісту БАР шляхом зміни складу середовища або двохетапного культивування. В екстрактах із пагонів *G. lutea*, які культивували на живильному середовищі без фітогормонів, виявлено генціопікрин і незначну кількість сверціамарину; фракція g-піронових сполук даних екстрактів містила лише ксантони, тимчасом як в екстрактах з інтактних рослин був виявлений ще ізоорієнтин. Авторами встановлено, що на якісний склад та кількісний вміст БАР культивованих *in vitro* пагонів впливають концентрації фітогормонів БАП та ІОК, а також їх співвідношення у живильному середовищі. У культивованих *in vitro* коренях *G. lutea* вміст генціопікрину був меншим від аналогічного показника у культивованих пагонах, сверціамарин відсутній [53].

Для підвищення вмісту БАР часто застосовують генетичну трансформацію. Так, у результаті трансформації коренів *G. lutea*, *A. rhizogenes* (штам ATCC15834) відібрано дев'ять клонів з добре розвинутою морфологічною структурою та високою інтенсивністю росту [53]. У двох із дев'яти клонів серед вторинних метаболітів у найбільшій кількості синтезувалися секоїридоїди, в інших — ксантони. В одному з клонів вміст генцизину був близьким до такого в коренях інтактних рослин. Автори [53] вважають, що отримані *in vitro* пагони та трансформовані корені *G. lutea* можуть бути оригінальним джерелом сировини для фармацевтичної промисловості.

На основі аналізу літературних даних та результатів власних детально-маршрутних, онтоморфогенетичних і популяційних досліджень можна дійти



висновку, що в Україні відбувається зміна вікових спектрів популяцій більшості видів роду *Gentiana* та порушення їх структури. Це, з одного боку, зумовлене негативним впливом комплексу екологічних чинників (насамперед, антропогенного походження), а з іншого — складною біологією розмноження і розвитку видів тирличів (низька схожість насіння, вимогливість до ґрунтів та їх зволоження, потреба у мікоризних грибах тощо).

Зменшення чисельності популяцій та порушення їхньої структури обмежує використання видів роду *Gentiana* як сировини з цінними фармакологічними властивостями і спричинює необхідність їх введення в культуру *in vitro*.

Складність біології досліджуваних видів зумовлює труднощі при їх введенні в культуру *in vitro*, зокрема, складним є підбір складу живильного середовища (вмісту макро- та мікросолей, фітогормонів, інших компонентів), температурного режиму та періодичності пасажування. Ми виявили не лише міжвидові, а й міжпопуляційні відмінності при розробці умов для вегетативного і мікроклонального розмноження тирличів, при отриманні та проліферації калюсних культур.

1. Ажунова Т.А., Николаев С.М., Мункоева С.М. и др. Экспериментальное обоснование лечебного применения экстракта горечавки желтой при заболеваниях гепатобилиарной системы // Химико-фармац. журн. — 1992. — 26, № 1. — С. 62—64.
2. Бакуридзе А.Д., Даргаева Т.Д., Патудин А.В. и др. Метод определения содержания суммы иридоидов у *Gentiana lutea* L. // Растит. ресурсы. — 1987. — 23, вып. 3. — С. 455—458.
3. Бакуридзе А.Д., Цагареишвили Н.Т., Даргаева Т.Д. и др. Хроматоспектрофотометрическое определение содержания g-пионовых соединений в надземной части *Gentiana lutea* L. // Растит. ресурсы. — 1991. — 27, вып. 4. — С. 115—119.
4. Біронт Н.В., Сапоженкова Т.В., Сенчина Б.В. Еколого-ценотичні особливості *Gentiana asclepiadea* L. (*Gentianaceae*) та можливості її інтродукції // Укр. ботан. журн. — 1993. — 50, № 1. — С. 117—119.
5. Вайнагій І.В., Вайнагій В.І. Насінна продуктивність деяких трав'янистих рослин Українських Карпат, занесених до Червоної книги України // Укр. ботан. журн. — 1993. — 50, № 6. — С. 23—32.
6. Голубенко А.В. Клональне мікророзмноження деяких видів роду *Gentiana* L. // Вісн. Київ. ун-ту. Інтродукція та збереження рослинного різноманіття. — 2001. — Вип. 4. — С. 61—63.
7. Грицак Л.Р., Страшнюк Н.М., Леськова О.М. Стан популяцій деяких видів роду *Gentiana* L. в Українських Карпатах // Пробл. фундамент. та прикладн. екології: Мат-ли I Міжнар. наук. конф. (Кривий Ріг, 23—26 грудня 2002 р.). — Кривий Ріг, 2002. — С. 21—28.
8. Демків Л. О. Вегетативне розмноження *in vitro* видів роду *Gentiana* L. (*Gentianaceae*) // Укр. ботан. журн. — 1993. — 50, № 1. — С. 146—149.
9. Драпайло Н.М. Рід *Gentiana* s.l. флори України: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 1995. — 24 с.
10. Драпайло Н.М. Формування морфологічної структури у *Gentiana cruciata* L. (*Gentianaceae* Juss.) // Вивчення онтогенезу рослин природних і культурних флор у ботанічних закладах і дендропарках Європи: Мат-ли XII Міжнар. наук. конф. — Полтава, 2000. — С. 108—110.
11. Журба О.В., Рабинович А.М., Терзиева А.П. и др. Лекарственные растения в СССР: культивируемые и дикорастущие. — М.: Планета, 1988. — 205 с.

12. Загульський М.М., Чорней І.І. *Gentiana utriculosa* L. (*Gentianaceae* Juss.) в Українських Карпатах // Укр. ботан. журн. — 2004. — 61, № 2. — С. 79—83.
13. Зиман С.М. Деякі цікаві та рідкісні рослини з околиць с. Ясиня Закарпатської області // Укр. ботан. журн. — 1964. — 21, № 4. — С. 102—104.
14. Зиман С.М., Вайнагії І.В. Еколого-географічні та фітоценологічні особливості рідкісних видів *Pritula farinosa* L. і *Gentiana verna* L. // Укр. ботан. журн. — 1991. — 48, № 5. — С. 99—101.
15. Израильсон В.Ф. Культура горечавки желтой в Новосибирске // Вторая республ. конф. по мед. ботанике: Тез. докл. — К., 1989. — С. 120.
16. Кардаш Я.В. Про охорону рідкісних та ендемічних видів флори високогір'я Свидівця в Українських Карпатах // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. — 1991. — Вип. 21. Біотичні ресурси Розточчя і Зовнішніх Карпат та їх антропогенні зміни. — С. 37—41.
17. Китанов Г.М., Тхе Ван Д., Асенов И. Изучение химического состава корней *Gentiana asclepiadea* // Химия природных соедин. — 1991. — № 3. — С. 425—427.
18. Кишко К.М. Біоморфологія *Gentiana asclepiadea* L. в Закарпатті: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2000. — 19 с.
19. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / За ред. А.М. Гродзінського. — К.: УРЕ ім. М.П. Бажана; Укр. ВКЦ «Олімп», 1992. — С. 430—432.
20. Малиновський К.А. Рослинність високогір'я Українських Карпат. — К.: Наук. думка, 1980. — 278 с.
21. Малиновський К.А., Міркін Б.М., Ішбірдіні А.Р. та ін. Синтаксономія прибережно-водних, болотних, лучних, чагарникових і чагарничкових угруповань високогір'я Українських Карпат // Укр. ботан. журн. — 1992. — 49, № 4. — С. 5—13.
22. Мельник В.М., Андреев І.О., Спіридонова К.В., Кунах В.А. Рестрикційне картування та варіабельність 18S-25S рибосомних генів деяких видів роду *Gentiana* L. // Цитология і генетика. — 2003. — 37, № 5. — С. 65—71.
23. Москалюк Б.І. До вивчення біоморфології *Gentiana lutea* L. в Українських Карпатах // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. Біологія. — 1999. — № 6. — С. 45—47.
24. Мункоева С.М., Ажунова Т.А., Николаев С.М. и др. Противовозвращная активность экстракта из наземной части *Gentiana lutea* L. // Растит. ресурсы. — 1992. — 28, вып. 1. — С. 100—103.
25. Нестерук Ю.Й. Рослинний світ Українських Карпат: Чорногора. Екологічні мандрівки. — Львів: БаК, 2003. — 520 с.
26. Николаев С.М., Бакуридзе А.Д., Даргаева Т.Д. О перспективах использования наземной части горечавки желтой в качестве лекарственного сырья // Изв. СО АН СССР. Сер. Биол. наук. — 1987. — Вып. 3. — С. 67—70.
27. Николаева Г.Г., Глызин В.И., Младенцева М.С. и др. Ксантоны *Gentiana lutea* // Химия природных соедин. — 1983. — № 1. — С. 107—108.
28. Онтогенез и возрастной состав популяций цветковых растений / Отв. ред. А.А. Уранов. — М.: Наука, 1967. — 154 с.
29. Определитель высших растений Украины / Отв. ред. Ю.Н. Прокудин. — К.: Наук. думка, 1987. — 546 с.
30. Перевозченко И.И., Заверуха Б.В., Андриенко Т.Л. Лекарственные растения. — Киев: Урожай, 1991. — 200 с.
31. Прокопів А.И. О путях становления системы покровных тканей корня *Gentiana* L. (*Gentianaceae*) в онтогенезе и филогенезе // Филогения и систематика растений. — М.: Наука, 1991. — С. 85—87.
32. Прокопів А.І. Анатомічна організація коренів і структура пагонових систем тирличів (*Gentiana* L., *Gentianaceae* Juss.): Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 1997. — 24 с.
33. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. — Л.: Наука, 1990. — 328 с.
34. Стойко С.М., Сайк Д.С., Татаринов К.А. Карпатський заповідник. — Ужгород: Карпати, 1982. — 128 с.

35. Страшнюк Н.М., Грицак Л.Р., Леськова О.М., Мельник В.М. Введення в культуру *in vitro* деяких видів роду *Gentiana* L. // Физиол. и биохим. культ. раст. — 2004. — 36, № 4. — С. 327—334.
36. Страшнюк Н.М., Грицак Л.Р. Особливості та перспективи введення в культуру *in vitro* видів роду *Gentiana* L. // Наук. зап. Терноп. держ. пед. ун-ту. Серія 4: Біологія. — 2000. — № 1(8). — С. 46—52.
37. Страшнюк Н.М., Ковальчук Л.Р., Трофимьяк Т.Б. Отримання *in vitro* культури ізольованих коренів і суспензійної культури тирличу жовтого (*Gentiana lutea* L.) // Наук. зап. Терноп. держ. пед. ун-ту. Серія 4: Біологія. — 1998. — № 3(4). — С. 89—94.
38. Структура популяцій рідкісних видів флори Карпат / К.А. Малиновський, Й.В. Царик, Г.Г. Жиляев та ін. — К.: Наук. думка, 1998. — 173 с.
39. Флора европейской части СССР / Отв. ред. Ан. А. Федоров. — Л.: Наука, 1978. — Т. 3. — С. 64—74.
40. Флора УРСР / Відп. ред. Д.К. Зеров. — К.: Вид. АН УРСР, 1957. — Т. 8. — С. 236—256.
41. Ценопопуляции растений (основные понятия и структура). — М.: Наука, 1976. — 217 с.
42. Червона книга України. Рослинний світ / Відп. ред. Ю.Р. Шеляг-Сосонко. — К.: УЕ ім. М.П. Бажана, 1996. — 608 с.
43. Чопик В. І. Високогірна флора Українських Карпат. — К.: Наук. думка, 1976. — 269 с.
44. Чопик В. І. Пояснювальний текст до карти флористичних районів Українських Карпат // Визначник рослин Українських Карпат. — К.: Наук. думка, 1977. — С. 5—11.
45. Шиян Н.М. Про застосування морфометричного аналізу пилкових зерен представників роду *Gentiana* s. l. флори України // Укр. ботан. журн. — 1995. — 52, № 1. — С. 62—67.
46. Яворська Н.Й., Алембець Т.М. Дослідження регенераційної здатності тирличів *in vitro* // Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі: Мат-ли Міжнар. конф. — Львів, 1998. — С. 37—38.
47. Bodart P., Poukens-Renwart P., Wauters J.-N., Angenot L. Densitometric evaluation of gentiopicroside in the roots of *Gentiana lutea* L. // Journ. of Planar Chromatography. — 1996. — 9, № 2. — P. 143—145.
48. Feijoo M.C., Iglesias I. Multiplication of an endangered plant: *Gentiana lutea* L. subsp. *Aurantiaca* Lainz, using *in vitro* culture // Plant Tissue Cult. Biotechnol. — 1998. — 4, № 2. — P. 87—94.
49. Gielly L., Taberlet P. A phylogeny of the European gentians inferred from chloroplast trnL (UAA) intron sequences // Bot. J. Linn. Soc. — 1996. — 120, № 1. — P. 57—75.
50. Ho T.-N., Liu S.-W. The infrageneric classification of *Gentiana* (*Gentianaceae*) // Bull. Br. Mus. nat. Hist. (Bot.). — 1990. — 20, № 2. — P. 169—192.
51. Hostettmann K., Bellmann G., Tabacchi R., Jacot-Guillarmod A. Phytochemistry of *Gentiana* genus: Flavonic and xanthonic compounds in the leaves of *Gentiana lutea* // Helv. Chim. Acta. — 1973. — 53, № 8. — P. 3050—3054.
52. Kupfer Ph., Yuan Y.-M. Karyological studies on *Gentiana* sect. *Chondrophyllae* (*Gentianaceae*) from China // Pl. Syst. Evol. — 1996. — 200. — P. 161—176.
53. Menkovic N., Savikin-Fodulovic K., Momcilovic I., Grubisic D. Quantitative determination of secoiridoid and gamma-pyrone compounds in *Gentiana lutea* cultured *in vitro* // Planta Med. — 2000. — 66, № 1. — P. 96—98.
54. Momcilovic I., Grubisic D., Kojic M., Neskovic M. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation and plant regeneration of four *Gentiana* species // Plant Cell Tissue Organ Cult. — 1997. — 50, № 1. — P. 1—6.
55. Momcilovic I., Grubisic D., Neskovic M. Micropropagation of four *Gentiana* species (*G. lutea*, *G. cruciata*, *G. purpurea* and *G. acaulis*) // Plant Cell Tissue Organ Cult. — 1997. — 49, № 2. — P. 141—144.
56. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — 15, № 13. — P. 473—497.

57. Oostermeijer J.G.B., van Eijck M.W., den Nijs J.C.M. Offspring fitness in relation to population size and genetic variation in the rare perennial plant species *Gentiana pneumonanthe* (*Gentianaceae*) // *Oecologia*. — 1994. — 97. — P. 289–296.
58. Schmid W. Zur Pharmakologie der Bittermittel [On the Pharmacology of *Gentian*] // *Planta Med.* — 1996. — 14. — P. 34–41.
59. Sykorova Z., Rydlova J., Vosatka M. Establishment of mycorrhizal symbiosis in *Gentiana verna* // *Folia Geobotanica*. — 2003. — 38. — P. 177–190.
60. Viola U., Franz Ch. *In vitro* propagation of *Gentiana lutea* // *Planta Med.* — 1989. — 55. — P. 690.
61. Yuan Y.-M., Kupfer Ph. The monophyly and rapid evolution of *Gentiana* sect. *Chondrophyllae* Bunge s. l. (*Gentianaceae*): evidence for nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA // *Bot. J. Linn. Soc.* — 1997. — 123. — P. 25–43.
62. Yuan Y.-M., Kupfer Ph., Doyle J.J. Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* (*Gentianaceae*) inferred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA // *Amer. J. Bot.* — 1996. — 83, № 5. — P. 641–652.
63. Yuan Y.-M., Kupfer Ph., Zeltner L. Chromosomal evolution of *Gentiana* and *Jaeschkea* (*Gentianaceae*), with further documentation for 35 species from China // *Pl. Syst. Evol.* — 1997. — 210. — P. 231–247.

Рекомендує до друку  
Є.Л. Кордюм

Надійшла 10.06.2004

*Н.М. Страшнюк<sup>1</sup>, Л.Р. Грицак<sup>1</sup>, Е.Н. Леськова<sup>1</sup>, В.Н. Мельник<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, г. Киев

#### ВИДЫ РОДА *GENTIANA* L. ФЛОРЫ УКРАИНЫ В ПРИРОДЕ И КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Проведено сравнение литературных данных и результатов собственных исследований, касающихся распространения в Украине и экологических особенностей видов рода *Gentiana* L. Охарактеризованы фармакологические свойства горечавок, обуславливающие их использование в официальной и народной медицине. Обосновывается перспективность применения биотехнологических методов с целью сохранения редких видов рода *Gentiana* во флоре Украины и для получения биосинтетически активных культур клеток и тканей как перспективного источника сырья для фармацевтической промышленности.

*N.M. Strashniuk<sup>1</sup>, L.R. Hrytsak<sup>1</sup>, O.M. Les'kova<sup>1</sup>, V.M. Mel'nyk<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

#### *GENTIANA* L. SPECIES OF UKRAINIAN FLORA IN NATURE AND IN CULTURE *IN VITRO*

Comparative analysis of the literature data and the results of our researches concerning *Gentiana* L. species spread in Ukraine and their ecological peculiarities has been done. *Gentiana* pharmacological features and their application in traditional and non-traditional medicine were characterized. Expedience of biotechnological approach for rare *Gentiana* L. species preservation in flora of Ukraine and obtaining of biosynthetically active cell and tissue cultures as a promising raw material source for the pharmaceutical industry was substantiated.