Based on the immunoassay data the methodical approach has been developed. This approach allows operating the morphogenesis pathways *in vitro* of high vacuolated microspores in isolated anthers culture of spring soft wheat.

СТРАШНЮК Н.М. [1], КРАВЕЦЬ Н.Б. [1], КОНВАЛЮК І.І. [2], МЕЛЬНИК В.М. [2]
[1]Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Україна, 46027, Тернопіль, вул. М.Кривоноса, 2, e-mail: strashniuk@mail.ru
[2]Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Україна, 03680, Київ, вул. Заболотного, 150, e-mail: v.m.melnyk@imbg.org.ua

ОРГАНОГЕНЕЗ У КУЛЬТУРІ ТКАНИН ВИДІВ РОДУ ТИРЛИЧ (*GENTIANA* L.).

Морфогенез рослин, що веде до регенерації шляхом органогенезу чи соматичного ембріогенезу, залежить від внутрішніх (видова приналежність та особливості генотипу вихідної рослини) та зовнішніх чинників. Фізіологічні, біохімічні, молекулярні процеси, які лежать в основі морфогенезу, вивчені недостатньо, що не дає можливості створити теорію морфогенезу. Детальних досліджень потребують і сигнальні системи, відповідальні за індукцію диференціації, органогенезу та їх зв'язок з регуляцією клітинного циклу. Вважається, що в ініціації органогенезу вирішальна роль належить балансу ендогенних фітогормонів, які кількісно змінюючись, можуть впливати на компетентність клітин до своєї дії, наслідками якої є індукція органогенезу [1, 2].

Зручною моделлю для дослідження фізіологічних, біохімічних та молекулярних особливостей процесів морфогенезу є культура *in vitro* рослин [1, 3]. Окрім фундаментального використання культури клітин, тканин, органів має важливе прикладне значення, особливо для збереження генофонду та відновлення популяцій цінних рідкісних та зникаючих видів. До таких рослин відносяться і досліджувані нами види роду *Gentiana* L., які є принадними об'єктами для введення в культуру *in vitro* та одержання клітинних ліній-продуцентів цінних біологічно активних речовин [4, 5]. У літературі також наявні повідомлення про вдалі спроби регенерації пагонів тирличів, які, проте, стосуються здебільшого азіатських видів: *G. macrophylla*, *G. kurroo*, *G. crassicaulis*, *G. tibetica*, *G. scabra*, *G. triflora*, *G. dahurica* [6-12].

Завданням проведеного дослідження було підібрати умови органогенезу з отриманих нами раніше культур тканин кореневого походження деяких видів роду Тирлич (*Gentiana* L.) флори України.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом слугували калюсні культури кореневого походження, отримані від рослин з різних популяцій: *G. lutea* (полонина Рогнєска, хр. Чорногора – на 11 пасажі та г. Трояска, хр. Свидовець - на 10 пасажі), *G. pneumonanthe* (Корюківське лісництво, Чернігівська обл. – на 9 пасажі та с. Вигода, Івано-Франківська обл. – на 9 і 19 пасажах), *G. acaulis* (г. Туркул та г. Ребра, хр. Чорногора – на 8 і 9 пасажах відповідно), *G. cruciata* (с. Креничі, Київська обл. та природний заповідник «Медобори», Тернопільська обл. – на 10 пасажі) та *G. verna* (урочище Гереджівка, смт. Ясиня, Закарпатська обл. – на 10 пасажі), які вирощували на агаризованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга (МС) з половинним вмістом макро- та мікросолей, доповненому 0,1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) і 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти. Тривалість пасажу становила 4 тижні [13, 14].

З метою індукції регенерації як базове використовували середовище МС, доповнене комбінаціями різних концентрацій фітогормонів: 1) тідіазурон (ТДЗ) (1, 5, 10, 20 мг/л) + 1-нафтилоцтова кислота (НОК) (0,01; 0,1; 0,2; 0,5; 1 мг/л); 2) БАП (0,1; 0,2; 0,5 мг/л) + НОК (1,0; 1,5; 2; 3; 4; 5,0 мг/л). Експеримент проводили у 3-х повторностях. Інокулюми кожної із досліджуваних калюсних тканин висаджували у

чашки Петрі по 15-20 штук у кожну. Загальна кількість протестованих інокулюмів у кожному варіанті досліду складала 50-60.

Результати та обговорення

Оптимальним для індукції органогенезу було живильне середовище МС, доповнене 10 мг/л ТДЗ і 1 мг/л НОК. Через 2 пасажі культивування калюсів *G. pneumonanthe* та *G. cruciata* на цьому середовищі за умови освітлення відбувалося формуванню осередків регенерації, а під кінець 3-го пасажу (*G. pneumonanthe* та *G. cruciata*, заповідник «Медобори») і 4-го (*G. cruciata*, с. Креничі) – регенерація коренів та пагонів. У інших досліджуваних зразків (за винятком *G. verna*) на цьому середовищі за цей же проміжок часу спостерігали лише позеленіння окремих ділянок калюсу. У випадку *G. lutea* формування осередків регенерації у культурі тканин відбувалося через 4 (пол. Рогнєска) і 5 (г. Трояска) місяців. Виявлені органогенні ділянки залишалися без змін впродовж 3-4-х наступних пасажів. У культурі тканин *G. acaulis* (г. Ребра) на 7-му пасажі вирощування на середовищі МС з 10 мг/л ТДЗ і 1 мг/л НОК відбувалося формуванню осередків регенерації, а на 8-му – ризогенез. У калюсі цього виду, отриманому від рослини з іншої популяції (г. Туркул), на 7-8-му пасажах вирощування на такому ж середовищі спостерігалося лише позеленіння усіх інокулюмів, осередки регенерації не формувалися. Культура тканин *G. verna* впродовж 2-х пасажів залишалася без змін, протягом 3-5-го – спостерігали потемніння калюсу, на 6-му – починали формуватися ділянки сірувато-зеленуватого кольору.

На варіантах живильних середовищ з іншими концентраціями ТДЗ і НОК, а також з БАП і НОК, спостерігали наступне: калюс лише проліферував, видимі ознаки регенерації були відсутні (МС з усіма концентраціями БАП і НОК); крім проліферації, відбувалося позеленіння невеликих ділянок, які впродовж подальшого культивування залишалися без змін (з 1 або 5 мг/л ТДЗ і НОК); спостерігали потемніння калюсу та його некроз (20 мг/л ТДЗ і НОК).

Регенераційна здатність залежала від видової приналежності вихідної рослини. У випадку калюсів *G. pneumonanthe* спостерігали регенерацію пагонів і коренів, тоді як у культурі тканин *G. cruciata* та *G. acaulis* – лише коренів. За відсотком ризогенезу та кількістю коренів на експлант найбільшою регенераційною здатністю характеризувалися калюси *G. pneumonanthe* від рослин з обох досліджених популяцій і найменшою – *G. acaulis* (табл.).

Табл. Порівняння ефективності ризогенезу та пагоноутворення у культурі тканин деяких видів *Gentiana*

Вид	Локалітет	Номер пасажу	Ефективність ризогенезу		Ефективність пагоноутворення	
			% регене-рації	к-сть кор./експл.	% регене-рації	к-сть паг./експл.
G. pneumo-nanthe	с. Вигода	9	100	21,7±1,7	17,4±2,1	0,2±0,02
		19	81,8±6,5	6,6±0,5	9,1±0,8	0,5±0,04
	Корюківське лісництво	9	100	9,3±0,8	16,7±1,4	0,4±0,04
G. cruciata	з-ник «Медобори»	13	25±1,9	0,38±0,04	–	–
	с. Креничі	14	36,4±3,7	0,63±0,05	–	–
G. acaulis	г. Ребра	17	16,7±1,7	0,17±0,02	–	–

Окрім цього, інтенсивність органогенезу залежала від генотипу вихідної рослини. Зокрема, при порівнянні калюсів *G. pneumonanthe* одного віку (9-ий пасаж) кількість коренів на експлант (при однаковому відсотку ризогенезу) у культурі тканин,

отриманій з рослини вигодської популяції, у 2,3 рази перевищувала цей показник у калюсі від рослини іншої популяції (Корюківське лісництво). Відсоток регенерації пагонів, як і коренів, у цих двох культурах практично не відрізнявся, проте кількість пагонів на експлант у калюсі від рослини корюківської популяції була вдвічі більшою (табл.). Більшою регенераційною здатністю серед досліджених калюсів *G. cruciata* характеризувалася культура тканин від рослини з кременчуцької популяції. Показники ефективності ризогенезу – відсоток регенерації та кількість коренів на експлант, у цій культурі в 1,5 та 1,7 рази відповідно перевищували такі у культурі з іншої популяції (табл.).

Здатність до органогенезу калюсу *G. pneumonanthe* залежала від тривалості його вирощування. Зокрема показано, що із збільшенням тривалості культивування калюсу *G. pneumonanthe* (с. Вигода) з 9 до 19 пасажу показник загальної кількості регенерантів (коренів і пагонів) на експлант зменшується втричі (рис.). Для цього виду ефективність ризогенезу була на порядок (а в одному випадку – на два порядки) вищою за пагоневий органогенез (табл.).

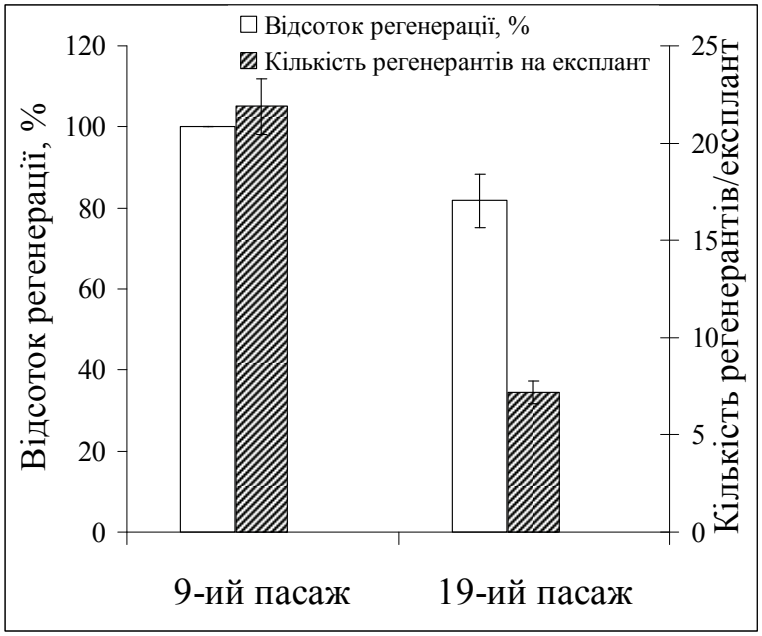

Рис. Залежність органогенезу (коренів і пагонів) від тривалості вирощування калюсу *G. pneumonanthe* (с. Вигода).

Висновки. Серед досліджених видів найбільшу здатність до регенерації виявлено у культурі тканин *G. pneumonanthe*. Оптимальним для індукції органогенезу було живильне середовище МС, доповнене 10 мг/л ТДЗ і 1 мг/л НОК. Інтенсивність органогенезу залежала як від генотипу вихідної рослини, так і від тривалості вирощування калюсів. Ефективність ризогенезу *G. pneumonanthe* була на порядок (а в одному випадку на два порядки) вищою за пагоневий органогенез.

Література

1. *Кунах В.А.* Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
2. *Кушнір Г.П., Сарнацька В.В.* Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. – К.: Наукова думка, 2005. – 270 с.
3. *Носов А.М.* Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиол. раст. – 1999. – Т.46, №6. – С. 837-844.

4. *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. – Vol. 66, № 1. – P. 96-98.
5. *Chueh F.S., Chen C.C., Sagare A.P., Tsay H.S.* Quantitative determination of secoiridoid glucosides in *in vitro* propagated plants of *Gentiana davidii* var. *formosana* by high perfomance liquid chromatography // Planta Med. – 2001. – Vol. 67, № 1. – P. 70-73.
6. *Jomori H., Takahata Y., Kaizuma N.* Plant regeneration from leaf-derived calli of gentians and their protoplast culture // Acta Hort. – 1995. – Vol. 392. – P. 81-86.
7. *Cao J-P., Liu X., Hao J-G., Zhang X-Q.* Tissue culture and plantlet regeneration of *Gentiana macrophylla* // Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica. – 2005. – Vol. 25 – P. 1101–1106.
8. *Fiuk A., Rybczyński J.J.* Genotype and plant growth regulator-dependent response of somatic embryogenesis from *Gentiana* spp. leaf explants // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2008. – Vol. 44, №2. – P. 90 – 99.
9. *Meng Y-L., Gao Y-P., Jia J-F.* Plant regeneration from protoplasts isolated from callus of *Gentiana crassicaulis* // Plant Cell Reports. – 1996. – Vol. 16. – P. 88-91.
10. *Chen L., Xu Z.* Somatic embryogenesis pathway for plant regeneration in Qinjiao (*Gentiana macrophylla* Pall.) // Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao. – 2007. – Vol. 40, №4. – P. 267-271.
11. *Nakano M., Hosokawa K., Oomiya T., Yamamura S.* Plant regeneration from protoplasts of *Gentiana* by embedding protoplasts in gellan gum // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1995. – Vol. 41. – P. 221-227.
12. *Голубенко А.В.* Морфогенез та особливості вегетативного розмноження видів роду *Gentiana* L. *in vitro*: Дис. ... канд. біол. наук: 03.00.12. – К., 2005. – 193 с.
13. *Страшнюк Н.М., Грицак Л.Р., Леськова О.М., Мельник В.М.* Введення в культуру *in vitro* деяких видів роду *Gentiana* L. // Физиология и биохимия культ. растений. – 2004. – Т.36, №4. – С. 327-334.
14. *Страшнюк Н.М., Твардовська М.О., Мельник В.М.* Введення в культуру *in vitro* видів тирличу хрещатого (*Gentiana cruciata* L.) та тирличу звичайного (*Gentiana pneumonanthe* L.) //«Наукові записки» Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія 4: Біологія, №3-4 (26). – 2006. – С. 100-107.

Резюме

Досліджено здатність до органогенезу культури тканин деяких видів роду *Gentiana* L. (*Gentianaceae*). Показано залежність регенерації від різних чинників – складу живильного середовища, генотипу рослини-донора, тривалості вирощування калюсів. Підібрано оптимальне живильне середовище для індукції органогенезу у тирличів.

Исследована способность к органогенезу культуры тканей некоторых видов рода *Gentiana* L. (*Gentianaceae*). Показана зависимость регенерации от разных факторов – состава питательной среды, генотипа растения-донора, длительности выращивания каллусов. Подобрана оптимальная питательная среда для индукции органогенеза в горечавок.

Capability of tissue cultures from some *Gentiana* L. species (*Gentianaceae*) for organogenesis has been studied. Regeneration potential was shown to vary with some stimuli: nutrient medium composition, original plant-donor genotype, duration of callus maintenance. Optimal nutrient medium composition to induce organogenesis in gentians was specified.