

БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 576.5: 582.923.1

Н.Б. КРАВЕЦЬ¹, М.З. МОСУЛА¹, А.І. ГЕРЦ¹, О.Т. ТУСИК², Н.М. ДРОБИК¹

¹Тернопільський національний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027

²Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського
майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001

ПРЯМИЙ І НЕПРЯМИЙ ОРГАНОГЕНЕЗ IN VITRO ВИДІВ GENTIANA ASCLEPIADEA L. ТА GENTIANA PNEUMONANTHE L.

Досліджено здатність до прямого і непрямого органогенезу двох видів роду *Gentiana L.* – *G. pneumonanthe* та *G. asclepiadea*. Показано залежність морфогенного потенціалу від різних чинників – складу живильного середовища, видової та популяційної приналежності рослини-донора, а у випадку непрямої регенерації – і від тривалості вирощування калюсів. Підібрано оптимальні живильні середовища для прямої регенерації з корневих і стеблових експлантів *G. pneumonanthe* та стеблових експлантів *G. asclepiadea*, а також для непрямої регенерації калюсу кореневого походження *G. pneumonanthe*.

Ключові слова: прями́й і непрямий органо́генез, *G. pneumonanthe*, *G. asclepiadea*, *in vitro*

Здатність соматичних клітин рослин до регенерації цілої рослини є основою використання культури клітин і тканин у прикладних цілях. Відомо, що регенерація є одним із неспецифічних засобів захисту рослин від пошкоджень і травм, а також способом вегетативного розмноження. В її основі лежать явища диференціювання клітин і морфогенезу. Теоретично кожна соматична клітина зберігає здатність до диференціації і може дати початок цілій рослині [3, 5].

Розрізняють пряму і непряму регенерацію. Пряму регенерацію рослин застосовують для одержання популяцій рослин із однієї генетичної лінії, що сприяє збереженню генетично однорідного посадкового матеріалу. Як експланти можна використовувати пазушні бруньки, молоді листки, окремі елементи квітів, суцвіть тощо [5, 6].

При індукції непрямого органогенезу в культурі тканин розрізняють дві фази цього процесу. Перша фаза – дедиференціація, під час якої проходить перетворення спеціалізованої клітини у калюсну. Необхідною умовою для диференціації є перенесення ізольованої тканини на агаризоване або рідке середовище, що містить елементи живлення та гормональні фактори. У наступній фазі – диференціації, проходить формування зачатків органів. Як правило, спонтанний або індукований морфогенез спостерігається у недавно введених у культуру тканинах. У більшості випадків здатність до органогенезу втрачається в ході багатьох пересадок, а також прогресивно зменшується в тканинах, ізольованих від верхівки до основи стебла. Тенденція до органогенезу знижується також при багатьох пересадках калюсу, причому здатність до утворення коренів зберігається тривалий час [3, 5].

Регенерацію в культурі *in vitro* використовують для цінних рідкісних лікарських рослин, що потребують збереження та розробки заходів з отримання альтернативного джерела сировини. До таких рослин відносять види роду *Gentiana L.*, біологічні особливості росту та

розмноження яких є причинами того, що отримання їхніх культур тканин та регенерація *in vitro* є складним процесом [2, 12, 27].

Метою роботи було отримання рослин-регенерантів двох видів роду *Gentiana* – *G. pneumonanthe* і *G. asclepiadea* – шляхом прямого і непрямого органогенезу та їхнє вкорінення.

Матеріал і методи досліджень

Вихідним матеріалом для дослідження були асептичні рослини *G. pneumonanthe* (с. Вигода, Долинський район, Івано-Франківська область, 450–500 м н.р.м. та Корюківське лісництво, Корюківський район, Чернігівська область) та *G. asclepiadea* (г. Велика Мигла, 950 м н.р.м. та г. Пожижевська, 1424 м н.р.м.).

Як експланти для прямого органогенезу використовували ділянки пагонів із бруньками (стеблові експланти) та ділянки коренів 3-4 місячних рослин цих видів. Індукцію непрямой регенерації проводили з калюсних культур кореневого походження (інокулюмів) (7 пасаж), отриманих від рослин *G. pneumonanthe* та *G. asclepiadea* наведених вище популяцій. Неморфогенний калюс *G. pneumonanthe* вирощували на живильному середовищі Мурасіге, Скуга (МС) [25] з половинним вмістом макро- і мікросолей (МС/2), *G. asclepiadea* – на середовищі Гамборга і Евелейг (В₅), [17]. В обох випадках середовища доповнювали 0,1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) та 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти (2,4-Д) [9, 11]. Загальна кількість протестованих корневих і стеблових експлантів у кожному варіанті досліджу складала 90-100, інокулюмів калюсних культур – 50-60.

Для регенерації використовували живильні середовища В₅, МС та МС/2, доповнені співвідношеннями різних концентрацій фітогормонів: тїдазуруну (ТДЗ), БАП, кінетину (Кін), 1-нафтилоцтової кислоти (НОК), індолілоцтової кислоти (ІОК) та гіберелової кислоти (ГК₃).

Оцінку ефективності регенерації (ЕР) проводили через 1,5-2 місяці. Для з'ясування особливостей регенерації, крім ЕР визначали ще такі показники, як відсоток регенерації (ВР) та середню кількість регенерантів (СКР) у розрахунку на один експлант з регенерантами. Визначення цих показників проводили як описано у роботі [10].

Результати досліджень опрацьовували статистично [4].

Результати досліджень та їх обговорення

G. pneumonanthe. У результаті проведених досліджень встановлено, що **пряма регенерація** пагонів на стеблових експлантах рослин *G. pneumonanthe* вигодської популяції відбувалася на середовищах МС та МС/2, доповнених цитокинінами ТДЗ, БАП або Кін та у всіх випадках гібереловою кислотою. Найбільш ефективним цей процес був на середовищі МС з 10 мг/л ТДЗ та 1 мг/л ГК₃. Відсоток регенерації при цьому становив 60%, СКР – 1,3 пагін/експл., ЕР – 0,8.

Доволі ефективною була регенерація пагонів із стеблових експлантів рослин зазначеної вище популяції і на середовищі МС/2, доповненому у першому варіанті 0,5 мг/л БАП та 1 мг/л ГК₃, а у другому – 2 мг/л Кін та 1 мг/л ГК₃. На першому варіанті живильного середовища ВР становив 11,1%, СКР – 4,0 пагін/експл., ЕР – 0,44; на другому – показники регенерації були наступними: ВР – 16,7% СКР – 1,0 пагін/експл., ЕР – 0,16.

На середовищі МС/2 з 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л ІОК поряд із гомогенезом на стеблових експлантах спостерігали і ризогенез (рис. 1, б). Показники регенерації пагонів і коренів становили: ВР – 100%, СКР – 1,8 рег./експл., ЕР – 1,2.

З усіх протестованих варіантів живильних середовищ індукція прямої регенерації із стеблових експлантів рослин корюківської популяції була успішною на середовищі МС/2 з 0,5 мг/л БАП та 1 мг/л ГК₃. Відсоток регенерації при цьому становив 92%, СКР – 2,3 пагін/експл., ЕР – 2,1.

При тестуванні корневих експлантів встановлено їхню меншу регенераційну здатність. Зокрема, ризогенез на корневих експлантах рослин вигодської популяції спостерігали лише на живильному середовищі МС/2 з 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л ІОК (ВР – 36%, СКР – 4 корінь/експ. ЕР – 0,36) (рис. 1, а). Спроби індукувати регенерацію з експлантів кореневого походження рослин корюківської популяції виявилися невдалими.

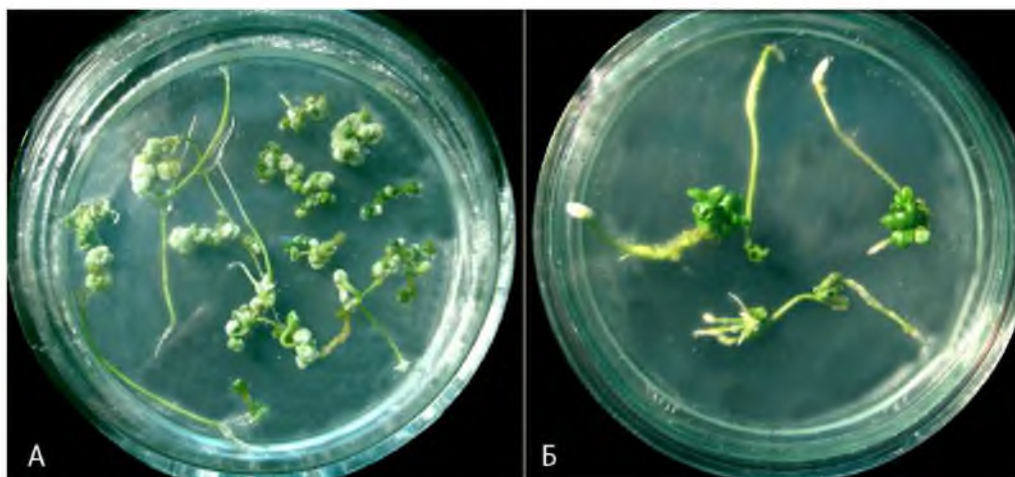


Рис. 1. Пряма регенерація з корневих (а) і стеблових (б) експлантів рослин *G. pneumonanthe* (вигодська популяція) на живильному середовищі МС/2, доповненому 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л ІОК

G. asclepiadea. При підборі умов для регенерації *G. asclepiadea* встановлено, що на середовищі МС/2 з 0,5 мг/л БАП та 1 мг/л ГК₃ із стеблових експлантів рослин великомиглівської популяції відбулася регенерація пагонів. При цьому ВР становив 100%, СКР – 5 пагін/експл., ЕР – 1. При використанні інших регуляторів росту – 10 мг/л ТДЗ та 1 мг/л ГК₃ – у живильному середовищі МС відсоток регенерації складав 40%, СКР – 1,2 пагін/експл., ЕР – 0,4. При доповненні середовища МС/2 поєднанням 2 мг/л Кін та 1 мг/л ГК₃ регенеранти не утворювалися, спостерігався лише ріст висаджених коренів у довжину. Регенерація з корневих і стеблових експлантів рослин пожижевської популяції та корневих експлантів рослин великомиглівської популяції не була успішною на жодному із вище зазначених живильних середовищ.

Вкорінення отриманих регенерантів *G. pneumonanthe* та *G. asclepiadea* проводили на середовищі МС/2, поетапно зменшуючи у ньому вміст фітогормонів, порівняно з використаними для органогенезу концентраціями. Рослини-регенеранти, отримані шляхом багатьох пересадок, були дуже слабкі; формування їхньої кореневої системи було утрудненим. Вкорінення відбувалося лише через 3-4 місяці, але при цьому його ефективність досягала 100 % (рис. 2).

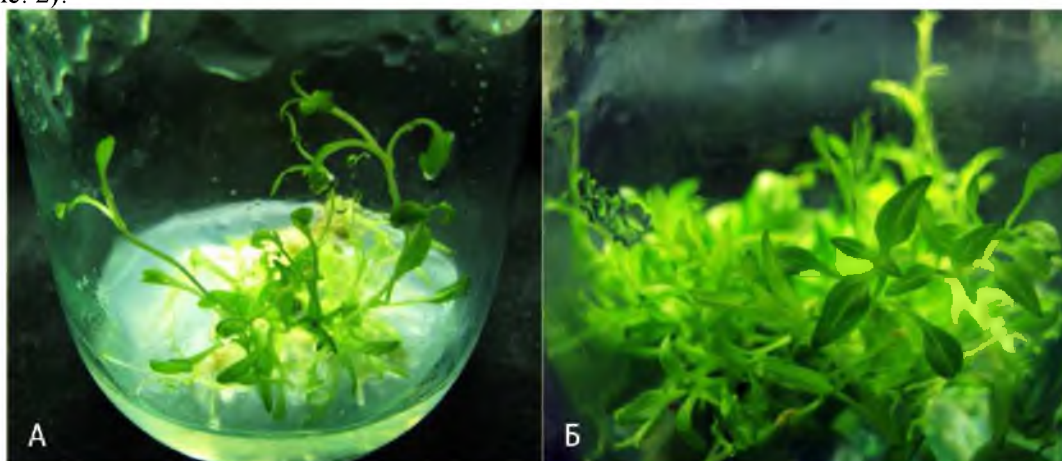


Рис. 2. Вкорінення рослин-регенерантів *G. pneumonanthe* (а) на живильному середовищі МС/2, доповненому 1 мг/л Кін і 0,5 мг/л ГК₃, та *G. asclepiadea* (б) – на МС/2 з 0,5 мг/л БАП і 1 мг/л ГК₃

Іншими дослідниками для індукції прямої регенерації тирличів були успішно використані різні типи вихідних експлантів: квіткові та кореневищні бруньки, пагонові апекси

та кінчики стеблової меристеми з листовими примордіями інтактних рослин *G. lutea* [2, 16], апікальних та аксиларних меристем у *G. pneumonanthe* [14], листові, стеблові та кореневі експланти восьми комерційних культур тирличів [13], центральні частини стебла асептичних проростків *G. acaulis*, *G. cruciata*, *G. lutea*, *G. purpurea* [23], аксиларні пагони *G. cerina* and *G. corymbifera* [24], аксиларні бруньки *G. scabra* [15], сегменти листків та верхівки стебла, бруньки у стані спокою, корені молодих проростків асептично пророщеного насіння *G. lutea*, *G. asclepiadea*, *G. punctata* [2]. При цьому у більшості наведених вище випадків спостерігали утворення адвентивних пагонів, рідше – коренів.

З метою регенерації тирличів в умовах *in vitro* експланти висаджували на живильні середовища: переважно МС, в окремих випадках – на В₅ [18] та Woody Plant Medium (WPM) [21], доповнені різними комбінаціями концентрацій фітогормонів. Як регулятори росту та органогенезу дослідники використовували поєднання цитокінінів – БАП, ТДЗ, 6-бензиладеніну (БА), зеатину, 1-(2-хлор-4-піридил)-3-фенілсечовини, N6-(2-ізопентил)аденіну в концентраціях до 10 мг/л, ауксинів – НОК, ІОК, 2,4-Д – до 1 мг/л, а також гіберелової кислоти.

Зокрема, при дослідженні регенераційної здатності *G. pneumonanthe* вченими встановлено, що органогенез на кінчиках пагонів рослин найкраще відбувався за наявності у живильному середовищі 10 мкМ БА. Отримані пагони були успішно вкорінені на середовищі, доповненому ауксинами ІОК, НОК і БА, при цьому найефективнішою регенерація була при використанні ІОК [26].

При розробці протоколу мікроклонального розмноження *G. asclepiadea* найвищий рівень мультиплікації було отримано на середовищі WPM, доповненому 8,9 мкМ БАП і 1,1 мкМ ІОК. ГК₃ у присутності 8,9 мкМ БАП і 1,1 мкМ ІОК стимулювала видовження пагонів, при цьому не впливаючи на індекс мультиплікації. Сформовані мікроклони вкорінювалися спонтанно на середовищі без фітогормонів; внесення в живильне середовище ауксинів стимулювало цей процес. Індолілмасляна кислота індукувала утворення великої кількості коренів, у той же час доповнення середовища ІОК забезпечувало ріст коренів у довжину [19].

Для індукції органогенезу використовували також **метод непрямої регенерації**. Ефективність регенерації при цьому залежала від видової і популяційної приналежності рослини-донора, фітогормонального складу живильного середовища та тривалості вирощування калюсу.

Нами встановлено, що калюси кореневого походження *G. pneumonanthe*, отримані від рослин з обох досліджених популяцій, характеризувалися морфогенною активністю [8]. Оптимальним для індукції органогенезу було живильне середовище МС, доповнене 10 мг/л ТДЗ і 1 мг/л НОК (рис. 3). Через 2 пасажі культивування калюсів на цьому середовищі за умови освітлення відбувалося формування осередків регенерації (рис. 3, а), а під кінець 3-го – регенерація коренів та пагонів (рис. 3, б).

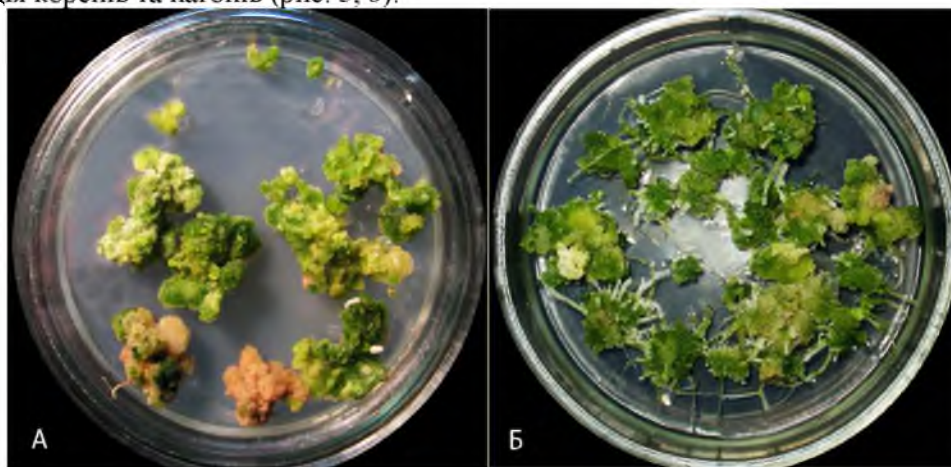


Рис. 3. Непряма регенерація (ризогенез) з калюсу кореневого походження *G. pneumonanthe* (від рослин з корюківської популяції) через 2 (а) і 3 (б) пасажі культивування на живильному середовищі МС/2, доповненому 10 мг/л ТДЗ та 1 мг/л НОК

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 1 мг/л НОК); спостерігали потемніння калюсу та його некроз (20 мг/л ТДЗ і 1 мг/л НОК) [8].

Окрім цього, інтенсивність органогенезу залежала від популяційної приналежності рослини-донора (табл.).

Таблиця

Порівняння ефективності ризогенезу та пагоноутворення культури *in vitro* *G. pneumonanthe* від рослин з різних популяцій

Вид	Локалітет	Номер пасажу	Ефективність ризогенезу		Ефективність пагоноутворення	
			ВР, %	СКР, корінь/експл.	ВР, %	СКР, пагін/експл.
<i>G. pneumonanthe</i>	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 л-во	9	100	9,3±0,8	16,7±1,4	0,4±0,04

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.).

Виявлено залежність здатності до органогенезу калюсу *G. pneumonanthe* 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. 4). Для цього виду ефективність ризогенезу була на порядок (а в одному випадку – на два порядки) вищою за пагоневий органогенез (табл.).

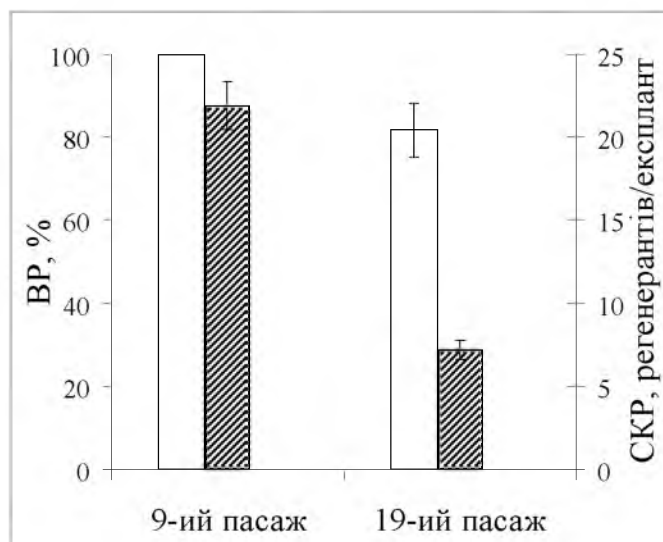


Рис. 4. Залежність органогенезу (коренів і пагонів) від тривалості вирощування калюсу *G. pneumonanthe* (с. Вигода):

- відсоток регенерації (ВР);
- середня кількість регенерантів (СКР) у розрахунку один експлант з регенерантами

У результаті подальших досліджень вдалося отримати рослини-регенеранти лише з морфогенної культури *G. pneumonanthe* корюківської популяції. Індукувати непряму регенерацію із калюсу кореневого походження *G. asclepiadea* на живильному середовищі B_5 , доповненому різними концентраціями ТДЗ і НОК, нам не вдалося: неморфогенний калюс через 3-5 тижнів темнів, а згодом некротував.

З метою вкорінення рослин-регенерантів *G. pneumonanthe* з корюківської популяції було використано живильні середовища МС і МС/2 з різними концентраціями БАП та ГК₃, та ці ж середовища без регуляторів росту, а також середовище МС/2, доповнене 0,1 мг/л НОК або 0,1 мг/л Кін. Вкорінення регенерантів відбувалося лише на середовищі МС/2 з 0,2 мг/л БАП і 1,0 мг/л ГК₃. На інших варіантах регенеранти протягом 3-5 місяців некротували. Подальше пересаджування регенерованих рослин проводили на середовища із зниженими вдвічі концентраціями фітогормонів. У результаті рослини-регенеранти характеризувалися інтенсивним ростом та добре розвинутою кореневою системою (рис. 5).



Рис. 5. Вкорінення рослин-регенерантів *G. pneumonanthe* (корюківська популяція) на живильному середовищі МС/2 з 0,1 мг/л БАП та 0,5 мг/л ГК₃

У літературі наявні повідомлення про вдалі спроби непрямої регенерації пагонів тирличів, які стосуються здебільшого азійських видів: *G. macrophylla*, *G. kurroo*, *G. crassicaulis*, *G. tibetica*, *G. scabra*, *G. triflora*, *G. dahurica* [20, 22]. З метою отримання регенерантів шляхом непрямого органогенезу дослідники використовували калюси, індуковані з листових експлантів (*G. scabra*, *G. triflora*), сегментів гіпокотилля (*G. crassicaulis*, *G. macrophylla*) [1, 20, 22]. Для калюсоутворення різні автори використовували переважно агаризоване середовище МС, доповнене різними концентраціями ауксинів (2,4-Д, Кін, ІОК, НОК) та цитокінінів (ТДЗ, Кін, БАП) [1, 20, 22]. Для ініціювання регенерації тирличів тестували живильне середовище МС, з різними концентраціями ауксинів (2,4-Д, НОК) та цитокінінів (ТДЗ, кінетин, БАП).

Зокрема, показано, що індукція калюсу листового походження *G. scabra* відбувалася на живильному середовищі МС з додаванням у різних комбінаціях регуляторів росту 2,4-Д і БАП. При цьому виявлено, що критичним фактором для калюсогенезу цього виду була наявність ауксину 2,4-Д. Інтенсивність регенерації пагонів залежала від впливу цитокінінів у середовищі. Для індукції непрямого органогенезу найефективнішим було середовище МС, доповнене 0,5-1 мг/л ТДЗ (ВР пагонів при цьому у *G. scabra* становив 80-100 %), у той час як лише 2,0-5,6 % пагонів регенерувало з калюсу на середовищі з 1-5 мг/л БАП. Регенеранти були вкорінені на безгормональному середовищі [20].

Для індукції калюсу з листків та сегментів гіпокотилля *G. macrophylla* найоптимальнішим виявилось середовище МС, доповнене 2 мг/л 2,4-Д і 0,5 мг/л БА, відсоток калюсогенезу при цьому складав 100%. З метою подальшого вирощування культуру тканин переносили на МС,

доповнене 2 мг/л 2,4-Д і 0,5 мг/л Кін. Для диференціації *G. macrophylla* використовували середовище МС, доповнене 0,1 мг/л 2,4-Д і 0,5 мг/л БА. При цьому відсоток регенерації становив 86,7%. Для отримання рослин-регенерантів диференційовані зародки переносили на безгормональне середовище МС [22].

У дослідженнях інших авторів [1] встановлено, що для утворення калюсу *G. macrophylla*, високої швидкості його наростання і здатності до органогенезу в живильному середовищі необхідні такі регулятори росту, як Кін, 2,4-Д, ІОК, НОК. Найоптимальнішим було середовище МС/2 з 1 мг/л Кін, 1 мг/л 2,4-Д, 2 мг/л ІОК та 1 мг/л НОК. Виявлено, що підвищення концентрації 2,4-Д негативно впливає на органогенез. Дослідникам вдалося ініціювати регенерацію пагонів із калюсу, проте корені при цьому не формувалися. Утворення коренів спостерігали після відокремлення пагонів-регенерантів від калюсу і перенесення їх на середовища з низькими концентраціями ІОК або НОК (0,01-0,07мг/л). Поодинокі випадки вкорінення спостерігали і на безгормональному середовищі [1].

З літературних джерел також відомо, що з ембріогенного калюсу *G. cruciata* і *G. lutea* на середовищі МС з 2 мг/л БАП на світлі утворювалися регенеранти, які потім найкраще росли на безгормональному середовищі зі зменшеним удвічі вмістом елементів [7].

Висновки

Підібрано умови для прямої регенерації з корневих і стеблових експлантів *G. pneumonanthe* та стеблових експлантів *G. asclepiadea*. Найбільш ефективним для регенерації пагонів із стеблових експлантів рослин *G. pneumonanthe* вигодської популяції було середовище МС з 10 мг/л ТДЗ та 1 мг/л ГК₃, корюківської – МС/2 з 0,5 мг/л БАП та 1 мг/л ГК₃. Морфогенний потенціал корневих експлантів *G. pneumonanthe* був нижчим, ніж стеблових. Лише у рослин вигодської популяції на корневих експлантах спостерігали ризогенез. Встановлено, що у випадку *G. asclepiadea* до регенерації здатні лише стеблові експланти рослин великомиглівської популяції, а оптимальним середовищем для цього було МС/2 з 0,5 мг/л БАП та 1 мг/л ГК₃.

Підібрано умови для непрямой регенерації калюсу кореневого походження *G. pneumonanthe*. Оптимальним для цього було живильне середовище МС, доповнене 10 мг/л ТДЗ і 1 мг/л НОК. Регенераційна здатність 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. Підібрати умови для непрямой органогенезу *G. asclepiadea* не вдалося.

1. Голубенко А.В. Морфогенез та особливості вегетативного розмноження видів роду *Gentiana* L. *in vitro*: дис... канд. біол. наук: спец. 03.00.12 / Анастасія Володимирівна Голубенко. – К., 2005. – 193 с.
2. Демків Л.О. Вегетативне розмноження *in vitro* видів роду *Gentiana* L. (*Gentianaceae*) / Л.О. Демків // Укр. ботан. журн. – 1993. – Т.50, №1. – С. 146–149.
3. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / Віктор Анатолійович Кунах. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
4. Кучеренко М. Є. Сучасні методи біохімічних досліджень: навч. посібн. / Кучеренко М. Є., Бабенко Ю.Д., Войціцький В.М. – К.: Фітосоціоцентр. 2001. – 424 с.
5. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. – К.: Наук. думка, 2005. – 270 с.
6. Мікроклональне розмноження унгернії Віктора (*Ungernia victoris*) / В.А. Кунах, Л.М. Можилевська, О.М. Бублик [та ін.] // Біотехнологія. – 2008. – Т.1, №4. – С. 57–63.
7. Онтогенез рослин в природному та трансформованому середовищі: матеріали міжнародної конференції. – Львів, 1998. – С. 37–38.
8. Органогенез у культурі тканин видів роду Тирлич (*Gentiana* L.) / Н.М. Страшнюк, Н.Б. Кравець, І.І. Конвалюк [та ін.] // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2009. – Т. 7. – С. 184–189.
9. Особливості введення в культуру *in vitro* тирличу ваточниковидного *Gentiana asclepiadea* L. / Н.М. Страшнюк, Л.Р. Грицак, В.Я. Бияк [та ін.] // «Наукові записки» Тернопільського державного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: біологія. – 2002. – №1(16). – С. 91–96.
10. Прямий органогенез *in vitro* тирличу жовтого (*Gentiana lutea* L.) / І.І. Конвалюк, Н.Б.Кравець, Н.М. Дробик [та ін.] // Біотехнологія. – 2010. – Т.3, №5. – С. 66–73.

11. *Страшнюк Н.М.* Введення в культуру **in vitro** видів тирличу хрепцатого (*Gentiana cruciata* L.) та тирличу звичайного (*Gentiana pneumonanthe* L.) / Н.М. Страшнюк, М.О. Твардовська, В.М. Мельник // «Наукові записки» Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. – 2006. – №3-4 (26). – С. 100–107.
12. *Тезисы докладов* Второй республиканской конференции по медицинской ботанике. – Киев, 1988. – 445 с.
13. **Adventitious** shoot regeneration from leaf, stem and root explants of commercial cultivars of *Gentiana* / K. Hosokawa, M. Nakano, Y. Oikawa [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 1996 – Vol.15. – P. 578–581.
14. **Bach A.** Somatic embryogenesis in *Gentiana pneumonanthe* L. / Anna Bach, Bozena Pawlowska // *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* – 2003. – Vol.45, №2. – P. 79–86.
15. **Clonal** micropropagation of *Gentiana scabra* Bunge var. **buengeri** Maxim. and examination of the homogeneity concerning the gentiopicroside content / Y. Yamada, Y. Shoyama, I. Nishioka [et al.] // *Chem. Pharm. Bull.* – 1991. – Vol.39. – P. 204–206.
16. **Feijoo M.C.** Multiplication of an endangered plant: *Gentiana lutea* L. subsp. **Aurantiaca** Lainz, using **in vitro** culture / Mariael Carmen Feijoo, Isabel Iglesias // *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* – 1998. – Vol. 4, №2. – P. 87–94.
17. **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.
18. **Hosokawa K.** Mass propagation of ornamental gentian in liquid medium / K. Hosokawa, Y. Oikawa, S. Yamamura // *Plant Cell Rep.* – 1998. – Vol.17. – P. 747–751.
19. **In vitro** multiplication of willow gentian (*Gentiana asclepiadea* L.) and the production of gentiopierine and mangiferin / M. Devic, I. Momcilovic, D. Krstic [et al.] // *Phyton.* – 2006. – Vol.46, №1. – P. 45–54.
20. **Jomori H.** Plant regeneration from leaf-derived calli of gentians and their protoplast culture / H. Jomori, Y. Takahata, N. Kaizuma // *Acta Hort.* – 1995. – Vol.392. – P. 81–86.
21. **Lloyd G., McCown B.** Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip cultures / G. Lloyd, B. McCown // *Comb Proc Intl Soc.* – 1980. – Vol. 30. – P. 421–427.
22. **Meng Y.L.** Plant regeneration from protoplasts isolated from callus of *Gentiana crassicaulis* / Y.L. Meng, Y.P. Gao, J.F. Jia // *Plant Cell Reports.* – 1996. – Vol.16, №1/2. – P. 88–91.
23. **Momcilovic I.** Micropropagation of four *Gentiana* species (*G. lutea*, *G. cruciata*, *G. purpurea* and *G. acaulis*) / I. Momcilovic, D. Grubisic, M. Neskovic // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1997. – Vol.49, №2. – P. 141–144.
24. **Morgan E.R.** **In vitro** propagation of *Gentiana cerina* and *Gentiana corymbifera* / E.R. Morgan, R.M. Butler, R.A. Bicknell // *New Zealand J. of Crop and Hort. Sci.* – 1997. – Vol.25, №1. – P. 1–8.
25. **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.
26. **Pawlowska B.** **In vitro** propagation of protected species *Gentiana pneumonanthe* L. for ornamental horticultural use / Bozena Pawlowska, Anna Bach // *Folia Horticulturae.* – 2003. – Vol. 15, №1. – P. 113–122.
27. **Sykorova Z.** Establishment of mycorrhizal symbiosis in *Gentiana verna* / Z. Sykorova, J. Rydlova, M. Vosatka // *Folia Geobotanica.* – 2003. – Vol.38. – P. 177–190.

Н.Б. Кравец, М.З. Мосула, А.И. Герц, О.Т. Тусык, Н.М. Дробык

Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка, Украина

Тернопольский государственный медицинский университет им. И.Я. Горбачевского, Украина

ПРЯМОЙ И НЕПРЯМОЙ ОРГАНОГЕНЕЗ IN VITRO ВИДОВ *GENTIANA ASCLEPIADEA* L. И *GENTIANA PNEUMONANTHE* L.

Исследована способность к прямому и непрямому органогенезу двух видов рода *Gentiana* L. – *G. pneumonanthe* и *G. asclepiadea*. Показана зависимость морфогенного потенциала от разных факторов – состава питательной среды, видовой и популяционной принадлежности растения-донора, а в случае непрямого регенерации – и от длительности выращивания каллусов. Подобраны оптимальные питательные среды для прямой регенерации с корневых и стеблевых эксплантов *G. pneumonanthe* и стеблевых эксплантов *G. asclepiadea*, а также для непрямого регенерации каллуса корневого происхождения *G. pneumonanthe*.

Ключевые слова: прямой и непрямо органогенез, *G. pneumonanthe*, *G. asclepiadea*, in vitro.

N.B. Kravets, M.Z. Mosula, A.I. Hertz, O.T. Tusyк, N. M. Drobyk
Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine
I.Ya. Horbachevskyi Ternopil State Medical University, Ukraine

DIRECT AND INDIRECT ORGANOGENESIS IN VITRO OF GENTIANA ASCLEPIADEA L. AND GENTIANA PNEUMONANTHE L. SPECIES

There has been investigated the capacity of direct and indirect organogenesis of two *Gentiana* L. species: *G. pneumonanthe* and *G. asclepiadea*. There has been shown the dependence of morphogenic potential on different factors such as the composition of nutrient medium, species and population belonging of the plant-donor, and in case of indirect regeneration – on the continuance of callus growing. There have been chosen optimal nutrient mediums for direct regeneration from *G. pneumonanthe* root and stem explants and *G. asclepiadea* stem explants as well as for indirect regeneration of *G. pneumonanthe* callus of root origin.

Key words: direct and indirect organogenesis, *G. pneumonanthe*, *G. asclepiadea*, in vitro.

Рекомендує до друку
В.В. Грубінко

Надійшла 23.12.2010