

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ГОЛУБЕНКО Анастасія Володимирівна



УДК 581.1:581.10:57.09 + 57.082.261

**МОРФОГЕНЕЗ ТА ОСОБЛИВОСТІ ВЕГЕТАТИВНОГО РОЗМНОЖЕННЯ
ВИДІВ РОДУ GENTIANA L. *IN VITRO***

03.00.12 -- фізіологія рослин

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2005

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано у лабораторії культури рослинних тканин сектору фізіології та біохімії рослин-інтродуцентів Ботанічного саду імені академіка О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Науковий керівник: кандидат біологічних наук, професор

Брайон Олександр Володимирович

доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент
УААН

Мусієнко Микола Миколайович,

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
професор кафедри фізіології та екології рослин

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор

Силаєва Алла Михайлівна,

Інститут садівництва УААН,

головний науковий співробітник лабораторії фізіології
рослин

кандидат біологічних наук

Поронік Оксана Олександрівна,

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

науковий співробітник відділу генетики клітинних популяцій

Провідна установа: м. Київ, Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН
України

Захист дисертації відбудеться «28» листопада 2005р. о 12⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, пр-т академіка Глушкова, 2, біологічний факультет, ауд. 434

Поштова адреса: 01033, м. Київ, вул. Володимирська, 64, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, біологічний факультет, спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58

Автореферат розіслано «25» листопада 2005 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



Т.Р. Андрійчук

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Збереження та відновлення рослинного різноманіття на сьогодні є однією з фундаментальних проблем біології. Поряд з традиційними природоохоронними заходами збереження та відновлення біологічного різноманіття поширені методи збереження і охорони різних видів за межами їх природних ареалів – *ex situ*. Колекції рослин, вирощених у штучно створених умовах, здатні не тільки стати банком їх генетичних ресурсів, але й забезпечити потреби у рослинному матеріалі наукових досліджень, лікарській сировині, посадковому матеріалі для створення плантацій, реінтродукції. Таким чином, збереження рослин *in situ* та *ex situ* – частини єдиного процесу, а інтродукція – необхідний етап реінтродукції (Евсеева, 2003).

Останнім часом помітного поширення в біологічних дослідженнях набули методи стерильної культури рослинних клітин, тканин і органів, основою яких є процеси морфогенезу в регульованих умовах *in vitro* (Мельничук, Новак, Кунах, 2003, Мусієнко, 2005). Особливо доцільне використання їх на перших етапах інтродукційного процесу, якщо для введення в культуру неможливо отримати достатньо вихідного посадкового матеріалу, забезпечити проростання насіння і розвиток паростків та ювенільних рослин.

Серед представників роду *Gentiana L.* (українською – тирличі, російською - горечавки) є цілий ряд видів, які здавна відомі як лікарські, декоративні, кормові, медоносні, інсектицидні рослини й водночас мають статус рідкісних, зникаючих або таких, що потребують охорони в багатьох країнах світу, в тому числі й в Україні. Складна біологія розмноження і розвитку тирличів робить неможливим належне відновлення їх природних запасів і ускладнює їх культивування (Прокопів, 1999). Культура рослинних тканин відкриває нові можливості для отримання первинного культивацийного матеріалу, масового мікророзмноження, оздоровлення, створення колекції різних видів тирличів *in vitro* і *ex situ*.

Підбір поживних середовищ для розмноження видів роду *Gentiana L. in vitro* передбачає вивчення фізіологічних особливостей морфогенезу тирличів і його гормональної регуляції в стерильних умовах для їх збереження у складі колекцій ботанічних садів, промислового вирощування цінних лікарських (для забезпечення необхідною кількістю сировини без залучення природних ресурсів) і декоративних видів, а також – на можливої реінтродукції *in situ*.

Культивування *in vitro*, як спосіб масової регенерації рослин, здатне забезпечити збереження й відтворення представників роду *Gentiana L.*, у тім числі й рідкісних видів, та повернення їх у природу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась відповідно плану науково-дослідних робіт Ботанічного саду ім. акад. О.В.Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка протягом 1998-2005 рр. у межах двох тем: “Охорона та збагачення рослинного різноманіття шляхом інтродукції” (№ державної реєстрації 0197U03571) і “Збереження інтродукованого та аборигенного різноманіття в умовах культури” (№ державної реєстрації 010U002470).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було з'ясувати фізіологічні особливості спокою і проростання насіння представників роду *Gentiana L.* у септичних і асептичних умовах, фізіологічні реакції та особливості морфогенезу експлантатів тирличів за різних рівнів і поєднань фітогормонів у поживних середовищах під час вегетативного розмноження *in vitro* та специфіку адаптації вирощених *in vitro* рослин до нестерильних умов. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- проаналізувати морфо-фізіологічні особливості, визначити тип, глибину та оптимальні умови для виведення із стану спокою насіння досліджуваних видів роду *Gentiana L.*;
- створити експериментальну модель для дослідження регуляції вегетативного розмноження видів роду *Gentiana L. in vitro* (стерильну культуру експлантатів тирличів);
- встановити особливості фізіологічних реакцій на вплив фітогормонів і культурального середовища на морфогенез тирличів в культурі *in vitro*;
- підібрати оптимальні поєднання концентрацій ауксин- і цитокінін-активних фітогормонів для вегетативного розмноження видів роду *Gentiana L. in vitro*;
- запропонувати стратегію адаптації вирощених *in vitro* мікроживців тирличів до септичних умов.

Об'єкт дослідження - фізіологія спокою і проростання насіння тирличів, екзогенна гормональна регуляція морфогенезу досліджуваних видів роду *Gentiana L. in vitro*.

Предмет дослідження – регуляція проростання насіння (холодова та гіберелінова стратифікація), індукція морфогенезу у листкових, стеблових та кореневих експлантатів і мікроживців представників роду *Gentiana L.* за різних гормональних факторів поживного середовища.

Методи дослідження – біометричні методи дослідження насіння, фізіологічні методи виведення насіння із стану спокою. Методи культури рослинних тканин та фізіологічні методи індукції фітогормонами морфогенетичних процесів *in vitro*. Світлова та скануюча мікроскопія, мікро- і макрофотографування.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше для восьми видів роду *Gentiana L.* встановлено, що умови *in vitro* в поєднанні з холодовою стратифікацією або обробкою гібереліном сприяють підвищенню схожості та енергії проростання насіння тирличів. Показано залежність морфогенезу тирличів *in vitro* від типу експлантата і від фітогормонального складу поживних середовищ. Вивчено випадки аномального розвитку у процесі культивування досліджуваних рослин і вперше для тирличів розроблено тактику уникнення аномалій, яка полягає в періодичному субкультивуванні на поживних середовищах без фітогормонів. Показано можливість індукції в стерильній культурі видів роду *Gentiana L.* чотирьох типів морфогенетичних реакцій, а саме: калусогенез, регенерація пагонів з калюсу, формування мікроклонів, ризогенез. Вперше відпрацьовано для дев'яти і вдосконалено для трьох видів тирличів технологію розмноження у стерильній культурі, яка включає калусогенез,

регенерацію пагонів з калюсу та мікроклональне розмноження. Розроблено детальну схему адаптації вирощених *in vitro* рослин тирличів до септичних умов.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблений спосіб передпосівної підготовки насіння дозволяє підвищити його схожість, одержати максимальну кількість генетично неоднорідного культивацийного матеріалу і використати його як для культури *in vitro*, так і для вирощування тирличів у відкритому ґрунті. Запропоновано лабораторний цикл мікроклонального розмноження 12 видів тирличів, який дозволяє одержати до ста мікроклонів за рік з однієї ініціалі. Отримані дані можна використовувати для вегетативного розмноження з метою збереження генофонду досліджуваних представників роду *Gentiana L.*, що є цінними рідкісними, декоративними і лікарськими рослинами, а також для подальших дослідницьких робіт з питань охорони тирличів, їх реінтродукції *in situ* або введення у промислову культуру й одержання цінних речовин за допомогою методів біотехнології.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто опрацьовано літературу за темою дисертації, проведено всі експерименти, обробку результатів та їх інтерпретацію, опубліковано наукові статті. Спільно з науковим керівником проведено вибір об'єкта й напрямку досліджень, обговорено результати та розроблено структуру дисертаційної роботи. Викладені в дисертації ідеї, наукові висновки та положення сформульовані автором самостійно.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, включені до дисертації, апробовано на XI з'їзді Українського ботанічного товариства (Харків, 2001), на міжнародній конференції “Сучасні проблеми інтродукції рослин та збереження біорізноманіття екосистем” (Чернівці, 2002) і на міжнародній конференції „Роль ботанічних садів в зеленому будівництві міст, курортних та рекреаційних зон” (Одеса, 2002).

Публікації. Результати дисертації опубліковані в 7 друкованих працях, з яких – 4 статті у фахових наукових журналах, 3 - тези та матеріали наукових з'їздів і конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з переліку умовних скорочень, вступу, семи розділів, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків і списку використаних джерел, що включає 221 посилання. Робота викладена на 129 сторінках, містить 17 таблиць, 64 рисунки, 4 додатки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури представлено сучасні уявлення про поширення, біоекологічні та фізіолого-біохімічні властивості й фармакологічну цінність представників роду *Gentiana L.*; розглянуто фізіологічні особливості спокою і проростання насіння, як важливий фактор при інтродукції; детально висвітлено сучасні дані стосовно культивування тирличів в умовах відкритого ґрунту та розмноження їх *in vitro*.

Матеріали та методи досліджень. У роботі використано насіння, отримане за обміном з ботанічних садів Європи і США, та одержані з нього проростки 12 видів роду *Gentiana L.*; які слугували вихідним матеріалом в експериментах. Для індукції різних типів морфогенезу *in vitro* було використано листкові, стеблові та

кореневі експлантати, отримані з асептично вирощених паростків. Поживними середовищами для стерильної культури тирличів були середовища Мурасіге-Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962), доповнені комбінаціями різних концентрацій 6-бензиламінопурину (БАП), 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д), індолилцтової кислоти (ІОК), нафтилоцтової кислоти (НОК) і кінетину.

Біометричні показники насіння тирличів визначали за методичними вказівками з насінництва інтродуцентів. Масу 1000 насінин визначали за допомогою аналітичних вагів. Для визначення розмірів насіння користувались біокулярним мікроскопом МБС-10. Насіння пророщували за методикою М.Г. Ніколаєвої (Николаева, Разумова, Гладкова, 1985) та за власними їх модифікаціями: для виведення насіння із стану спокою і визначення оптимального способу передпосівної обробки, його піддавали холодовій стратифікації протягом 30-90 діб або витримували у розчині 100 мг/л ГК₃ протягом доби, після чого поміщали у септичні чи асептичні умови.

З метою дослідження проростання насіння у стерильних умовах його стерилізували поверхнево за власною, розробленою дослідним шляхом, модифікацією загальноприйнятих методик (Мусієнко, Панюта, 2001). Для асептичного пророщування насіння, мікроклонального розмноження, культури калюсу та ініціації різних типів морфогенезу тирличів користувались методами культивування рослинних об'єктів *in vitro* (Калинин, Кушнин, Сарнацкая, 1992).

Критеріями оптимізації умов мікорозмноження і впливу гормональних і трофічних факторів середовища на морфогенез тирличів слугували: частота калюсогенезу – кількість експлантатів, на яких утворився калюс (у відсотках); частота регенерації – кількість зразків калюсу з регенерантами (у відсотках); кількість регенерантів на зразок калюсу; частота мікроклонального розмноження – кількість експлантатів з адвентивними пагонами завдовжки 1 см і більше (у відсотках); кількість адвентивних пагонів (мікроклонів) на один експлантат; частота ризогенезу – кількість укоріненних мікроживців (у відсотках); життєздатність вирощених *in vitro* тирличів при їх адаптації до септичних умов – відсоток рослин, які вижили на кожному етапі постасептичного культивування.

Послідовність адаптації до умов *ex vitro* досліджуваних видів тирличів нами було розроблено експериментально, з урахуванням необхідності максимально ефективного переведення вкоріненних живців із стерильної культури в незахищений ґрунт.

Одержаних дані було оброблено статистично на персональному комп'ютері ($p < 0,5$) згідно методики Б.О. Доспехова (Доспехов, 1985).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Морфологічні та фізіологічні особливості насіння досліджуваних видів роду *Gentiana L.* Для введення тирличів у первинну культуру і дослідження одного з раціональних шляхів їх розмноження, першим кроком було вивчення морфологічних особливостей, схожості та енергії проростання насіння представників роду *Gentiana L.* (табл. 1). Встановлено, що насіння тирличів дрібне, з короткими чи дуже малими зародками і тонкою комірчасто-сітчастою шкірочкою. Забарвлення насіння варіює від світлого піщано-жовтого до темно-коричневого кольору, блискуче. Один з досліджуваних тирличів, *G. andrewsii*

Griseb., має крилате, найдрібніше і найлегше серед інших видів насіння, що є, очевидно, пристосуванням до розповсюдження вітром.

Таблиця 1

Біометричні показники насіння досліджуваних видів роду *Gentiana L.*

Вид	Розміри насіння, мм		Маса 1000 насінин, г
	довжина	ширина	
<i>G. alba Muhl.</i>	1,69±0,02	0,75±0,01	0,455±0,004
<i>G. andrewsii Griseb.</i>	0,78±0,03	0,47±0,02	0,067±0,003
<i>G. bigelovii A. Gray</i>	0,99±0,02	0,52±0,01	0,173±0,002
<i>G. cachemirica Decne</i>	1,36±0,02	0,63±0,02	0,215±0,001
<i>G. crassicaulis Duthie</i>	1,55±0,02	0,79±0,01	0,450±0,003
<i>G. cruciata L.</i>	1,33±0,01	0,54±0,01	0,185±0,001
<i>G. dahurica Fish.</i>	1,28 ±0,02	0,53±0,01	0,171±0,002
<i>G. decumbens L.</i>	1,36 ± 0,03	0,56±0,02	0,166±0,002
<i>G. macrophylla Pall.</i>	1,61±0,02	0,60±0,01	0,383±0,001
<i>G. rockhillii Hemsl.</i>	1,16±0,01	0,55±0,01	0,124±0,002
<i>G. saponaria L.</i>	1,29±0,02	0,56±0,01	0,150±0,002
<i>G. tibetica King. ex Hook</i>	1,57±0,03	0,75±0,02	0,425±0,002

Насіння решти видів безкриле. Біометричні показники насіння тирличів відрізняються у різних видів, тому ми припускаємо можливість використання їх як додаткової систематичної ознаки поряд з іншими параметрами.

Насіння тирличів не проростало без передпосівної обробки, хоч його пророщуванню й передувало сухе зберігання протягом 5 – 6 місяців, як пропонувалось у методичних рекомендаціях для, принаймні, тих видів, насінню яких властивий неглибокий спокій – *G. cruciata L.*, *G. macrophylla Pall.*, *G. tibetica King. ex Hook* (Николаева, Разумова, Гладкова, 1985). Це свідчить про поєднання морфологічного спокою насіння, зумовленого незрілістю зародка, з фізіологічним, причиною якого є дія фізіологічного механізму гальмування (ФМГ) проростання. Насіння більшості видів, проростання яких досліджувалось, потребує довготривалої (60-90 діб) холодової стратифікації.

Насіння *G. andrewsii Griseb.* в нестерильних умовах мало нульову схожість. У насіння з найвищою схожістю була найвища енергія проростання, що свідчить про його досить високу фізіологічну однорідність, яка виявлялась у рівномірній зрілості і глибині спокою більшості насінин.

Отримані нами результати дозволяють стверджувати, що для насіння більшості досліджуваних видів роду *Gentiana L.* притаманний морфофізіологічний спокій середньої глибини.

У зв'язку з необхідністю прискорення процесу виведення насіння видів *Gentiana L.* із стану спокою нами досліджено можливість заміни холодової стратифікації обробкою розчином гіберелової кислоти (ГК₃) у концентрації 100 мг/л. Обробка гібереліном сприяла значному підвищенню схожості насіння

більшості видів. Такий результат вказує на наявність неглибокого або середньої глибини спокою цього насіння. Окрім підвищення схожості, ГК₃ виявляла синхронізуючу дію на проростання насіння, про що свідчить підвищення енергії проростання у насіння деяких видів (табл. 2).

Таблиця 2

Проростання насіння тирличів у септичних умовах під впливом холодової та гіберелінової стратифікації

Вид	Холодова стратифікація			Обробка 100 мг/л ГК ₃	
	Термін стратифікації, днів	Лабораторна схожість, %	Енергія проростання, %	Лабораторна схожість, %	Енергія проростання, %
<i>G. alba</i> Muhl.	60-70	30,8±0,7	16,0±0,4	49,9±1,5	26,9±1,4
<i>G. andrewsii</i> Griseb.	80-90	0	0	0,2±0,2	0
<i>G. bigelovii</i> A. Gray	40-50	4,4±0,2	1,6±0,1	5,8±0,2	2,8±0,1
<i>G. cachemirica</i> Decne	50-60	6,0±0,2	2,4±0,1	29,4±1,4	12,9±0,3
<i>G. crassicaulis</i> Duthie	40-50	26,4±0,3	18±0,2	21,5±0,9	8,9±0,2
<i>G. cruciata</i> L.	60-70	15,6±0,3	9,2±0,3	26,0±0,9	14,4±0,4
<i>G. dahurica</i> Fish.	60-70	3,6±0,1	0,8±0,04	15,6±0,5	8,0±0,3
<i>G. decumbens</i> L.	50-60	18,8±0,2	16,8±0,3	52,5±2,1	34,3±1,3
<i>G. macrophylla</i> Pall.	40-50	16,4±0,2	11,6±0,2	61,9±1,5	44,2±1,4
<i>G. rockhillii</i> Hemsl.	30-40	22,4±0,2	10,8±0,2	69,4±1,9	27,7±1,4
<i>G. saponaria</i> L.	40-50	19,6±0,1	12,8±0,3	79,1±1,3	40,9±1,5
<i>G. tibetica</i> King. ex Hook	60-70	48,8±0,7	41,6±1,7	79,5±2,1	56,4±0,99

Для тих видів, у яких не відбулось суттєвого підвищення показників проростання (*G. andrewsii* Griseb., *G. bigelovii* A. Gray), очевидно, властивий більш глибокий морфологічний спокій насіння, який поєднується також із несприятливою дією патогенної мікрофлори у нестерильних умовах.

Введення досліджуваних видів роду *Gentiana* L. в стерильну культуру. Для отримання максимальної кількості паростків, як джерела експлантатів для культури *in vitro*, ми поєднали традиційні методики з передпосівної підготовки і пророщування насіння з методами культури тканин. Схожість насіння всіх досліджуваних видів тирличів *in vitro* навіть при коротших термінах холодової стратифікації була значно вищою, ніж під час пророщування у септичних умовах, що, на нашу думку, було наслідком ізоляції насіння від негативних впливів зовнішнього середовища.

Аналогічно до схожості, нами виявлено загальне підвищення енергії проростання в асептичних умовах, порівняно із септичними. Єдиним винятком у цьому випадку є *G. crassicaulis* Duthie, у якої *in vitro* підвищення схожості (від 26,4±0,3% до 62,8±1,2%) супроводжувалось зниженням енергії проростання (від

18±0,2% до 13,2±0,3%). Поясненням цьому може бути або різноякісність насіння, або специфіка нестерильних умов – наявність певних грибів чи бактерій, здатних сприятливо впливати на проростання (Dalling, Hubbell, 2002) (табл. 3):

Таблиця 3

Проростання насіння тирличів в асептичних умовах під впливом холодової та гіберелінової стратифікації

Вид	Холодова стратифікація		Обробка 100 мг/л ГК ₃		
	Термін стратифікації, дб	Лабораторна схожість, %	Енергія проростання, %	Лабораторна схожість, %	Енергія проростання, %
<i>G. alba Muhl.</i>	50-70	66,4±1,98	48,4±1,8	54,4±0,9	36,8±1,2
<i>G. andrewsii Griseb.</i>	80-90	6,0±0,3	2,8±0,1	0,8±0,06	0,2±0,1
<i>G. bigelovii A. Gray</i>	40-50	32,4±1,2	19,2±0,5	23,6±1,03	12,8±0,7
<i>G. cachemirica Decne</i>	40-60	66,4±1,7	20,4±0,7	58,4±1,03	16,8±0,7
<i>G. crassicaulis Duthie</i>	30-50	62,8±1,2	13,2±0,3	32,8±0,8	12,4±0,5
<i>G. cruciata L.</i>	50-70	33,2±1,1	12,8±0,5	30,4±1,5	14,0±0,6
<i>G. dahurica Fish.</i>	60-70	31,2±1,0	20,8±0,7	31,6±0,9	18,4±0,8
<i>G. decumbens L.</i>	50-60	82,8±1,3	76,8±1,2	79,2±1,8	73,6±1,7
<i>G. macrophylla Pall.</i>	30-50	79,6±1,7	68,0±1,2	70,8±0,8	54,8±1,5
<i>G. rockhillii Hemsl.</i>	30-40	82,0±1,1	72,8±1,3	80,8±1,6	59,2±1,04
<i>G. saponaria L.</i>	30-50	83,6±0,9	51,6±2,1	85,8±1,1	49,2±1,4
<i>G. tibetica King. ex Hook</i>	50-60	95,6±0,9	85,6±1,5	98,0±0,7	69,2±1,6

Зіставивши схожість у різних умовах і біометричні характеристики досліджуваного насіння, нами встановлено деяку залежність проростання його від розмірів і маси. Так, насіння *G. andrewsii Griseb.*, *G. bigelovii A. Gray* і *G. dahurica Fish.* було найдрібнішим і мало найнижчу схожість. І навпаки, більше за розмірами і масою насіння *G. alba Muhl.*, *G. crassicaulis Duthie*, *G. tibetica King. ex Hook* та деяких інших видів мало найвищу схожість як в нестерильних, так і в стерильних умовах.

Складовою усунення спокою насіння тирличів є дозрівання зародка, який у дрібнішого насіння має менші розміри і, ймовірно, перебуває на більш ранньому етапі розвитку, а тому потребує більше часу на дозрівання. При цьому у найдрібнішого насіння ураження грибними інфекціями відбувається швидше, ніж з'являються паростки, тому відмічено низьку схожість в нестерильних умовах саме у цього насіння. Уникнути негативної дії патогенних грибів і водночас створити безпечні умови для дозрівання зародка протягом тривалого часу можна, користуючись методами стерильної культури, що підтверджують результати експерименту з пророщування насіння видів роду *Gentiana L. in vitro*.

Результати проведених експериментів з насінневого розмноження показали, що умови *in vitro* дозволяють насінню тирличів без втрат пройти завершальні

стадії дозрівання зародка і подолання фізіологічний механізм гальмування проростання, скільки б часу на ці процеси не знадобилось. Для насіння з глибоким морфофізіологічним спокоєм і сильним ФМГ проростання можливе застосування повторного циклу холодової стратифікації, оскільки стерильні умови зберігають його інтактним для патогенних мікроорганізмів.

Дослідження особливостей проростання насіння тирличів у стерильних умовах в поєднанні з обробкою розчином гібереліну (100мг/л) показали, що в більшості випадків схожість насіння досліджуваних тирличів після обробки ГК₃ майже досягає рівня схожості, одержаного під впливом холодової стратифікації. Винятком є *G. andrewsii Griseb.*, схожість якої менша одного відсотка, а також *G. tibetica King. ex Hook.*, схожість насіння якої становила 98%. Оскільки холодова стратифікація триває протягом 2-3 місяців, а гіберелінова – добу, безперечно, більш зручним є спосіб пророщування насіння тирличів за допомогою обробки ГК₃, незважаючи на трохи нижчий при цьому відсоток схожості.

Зіставлення отриманих нами даних з літературними дозволяє зробити висновок, що спокій насіння тирличів належить до морфофізіологічного типу різної глибини: від проміжного – з середнім ФМГ, до глибокого – з сильним ФМГ. У першому випадку для подолання ФМГ ефективними можуть бути як холодова стратифікація, так і, в деякій мірі, обробка ГК₃, а в другому – тільки холодова стратифікація.

Таким чином, спокій насіння досліджуваних видів *Gentiana L.*, крім *G. andrewsii Griseb.*, належить до морфофізіологічного типу середньої глибини, а *G. andrewsii Griseb.* – до глибокого з сильним ФМГ.

Запропонований нами спосіб пророщування насіння *in vitro* з застосуванням холодової або гіберелінової стратифікації дозволив отримати максимальну кількість стерильного культивційного матеріалу представників роду *Gentiana L.*, необхідну для подальших досліджень.

Культура калюсу тирличів і регенерація пагонів з калюсу. Наступним етапом було одержання і культивування калюсу досліджуваних видів роду *Gentiana L.* Культуру калюсу можна вважати універсальним банком генетичної інформації виду. Для індукції первинного калюсу в ролі експлантатів використовувались сегменти листків, пагонів і коренів з паростків, вирощених асептично. У експериментах з калюсогенезу ми вивчали вплив концентрацій чотирьох регуляторів росту (кінетину, індолилоцетової (ІОК), нафтилоцетової (НОК) та 2,4-дихлорфеноксиоцетової (2,4-Д) кислот) та їх співвідношень на ініціацію такої морфогенетичної реакції, як утворення калюсу на первинних експлантатах різного походження (табл. 4.).

Таблиця 4

Варіації концентрацій фітогормонів для ініціації калюсогенезу

Фітогормони	Варіанти концентрацій, мг/л						
	1	2	3	4	5	6	7
Кінетин	0,8	1	1,2	1,4	1,6	1,8	2
ІОК	0,8	1	1,2	1,4	1,6	1,8	2
НОК	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
2,4-Д	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6	1,8

Оптимальними ми вважали середовища, на яких у максимальній кількості експлантатів спостерігалось утворення калюсу, тобто була найвища частота калюсогенезу. Експлантати всіх типів виявились здатними до цього виду морфогенезу. Дедиференціація виявлялась для листових експлантатів у руйнуванні епідермісу, розростанні паренхімних клітин по всій поверхні листка з одночасною втратою зеленого забарвлення. Під час культивування кореневих експлантатів на середовищах для калюсогенезу відбувалось їх потовщення, особливо помітне на кінцях сегментів, з поступовим розростанням аж до повного покривання масою первинного калюсу. На стеблових експлантатах ознаки дедиференціації виявлялись значно повільніше, у багатьох видів спостерігались некротичні явища; первинний калюс, як правило, з'являвся на протилежному від кореня кінці сегмента стебла.

В результаті проведених досліджень визначено оптимальний склад поживних середовищ для калюсогенезу кожного виду (табл.5).

Після кількох серій пасажувань виявилось, що калюси всіх досліджуваних видів можуть рости на середовищі, яке максимально наближене за вмістом фітогормонів до середовищ для калюсогенезу, але містить дещо нижчі концентрації ауксинів: 1мг/л ІОК, 0,6 мг/л НОК, 1мг/л кінетину і 1 мг/л 2,4-Д. Здатність калюсу до проліферації залежить від розміру його частин, які використовуються при пасажуванні. Діаметр їх не повинен бути меншим, ніж 0,4 – 0,5 мм. Якщо вони дрібніші, проліферація відбувається повільніше і спостерігається частковий некроз материнського калюсу. Такі особливості росту калюсних культур є закономірними і залежать від виду рослин, про що свідчать літературні джерела (Калинин, Сарнацкая, Полищук, 1980; Мельничук, Новак, Кунах, 2003).

Таблиця 5

Частота калюсогенезу у різних експлантатів на поживних середовищах з оптимальним вмістом фітогормонів

Вид	Оптимальні концентрації фітогормонів для ініціації утворення калюсу, мг/л				Частота калюсогенезу, %		
	ІОК	НОК	2,4-Д	Кін	Л	С	К
<i>G. alba</i> Muhl.	1,2	0,6	1,2	1	90	75	95
<i>G. andrewsii</i> Griseb.	1	0,4-0,6	1	1,6	80	70	85
<i>G. bigelovii</i> A. Gray	1	0,4	1	1	90	80	95
<i>G. cachemirica</i> Decne	1,4	0,6	1	1	80	80	85
<i>G. crassicaulis</i> Duthie	2	0,8	1,2	1	85	75	85
<i>G. cruciata</i> L.	2	0,8	1,6	1	90	85	85
<i>G. dahurica</i> Fish.	1,4	0,4	1	1	85	80	85
<i>G. decumbens</i> L.	1,2	0,4	1	1	85	80	90
<i>G. macrophylla</i> Pall.	2	1	1	1	95	80	100
<i>G. rockhillii</i> Hemsl.	1,2	0,6	1	1	85	75	85
<i>G. saponaria</i> L.	1	0,4	1	1	95	80	95
<i>G. tibetica</i> King. ex Hook	2	0,8	1,2	1	95	75	90

Л – листові, С – стеблові, К – кореневі експлантати

Продовженням нашої роботи з культурою калюсів досліджуваних видів тирличів було випробовування їх на здатність до регенерації. Після субкультивування одержаного калюсу на безгормональному агаризованому середовищі МС протягом місяця, ми пасажували його на поживні середовища, що містили знижені концентрації ауксинів і підвищені – цитокінінів (табл.6).

Таблиця 6

Варіанти концентрацій ІОК, БАП і кінетину в поживних середовищах для стимуляції регенеративних процесів у калюсах досліджуваних видів тирличів

Фітогормони	Концентрації фітогормонів, мг/л					
	1	2	3	4	5	6
ІОК	0	0,02	0,05	0,1	0,5	1
БАП	0,5	1	1,5	2	2,5	3
Кінетин	0,5	1	1,5	2	2,5	3

Ауксинактивним фітогормоном була індолилцтова кислота, а цитокінінактивними - кінетин і 6-бензиламінопурин (БАП). Концентрації ауксину ми змінювали від 0 до 0,5 мг/л; вміст БАП (або кінетину) в поживних середовищах для регенерації варіював від 0,5 мг/л до 3 мг/л. Ми використали у поживних середовищах два типи поєднання фітогормонів: перший містив ІОК з БАП, другий – ІОК з кінетином.

Внаслідок застосування всіх можливих комбінацій ІОК – БАП та ІОК – кінетин для калюсів досліджуваних тирличів нами отримано регенерацію пагонів. Таким чином, одержаний калюс можна вважати органомним. Дія БАП і кінетину в наших дослідженнях відрізнялась мало: максимальні показники частоти регенерації та кількості пагонів-регенерантів на експлантат спостерігались при однакових концентраціях цих фітогормонів. Дослідження показали, що для ініціації регенеративних процесів у калюсах тирличів оптимальною була концентрація 0,1 мг/л ІОК, а оптимальні концентрації БАП (кінетину) варіювали від 1,5 до 2,5 мг/л для різних видів.

У всіх експериментах, присвячених процесам регенерації пагонів з калюсу, вищу здатність до диференціації виявляли калюси листового походження, що дозволяє вважати листки найкращим експлантатом як для калюсогенезу і проліферації калюсу, так і для органогенезу.

Мікроклональне розмноження тирличів. Крім здатності видів роду *Gentiana L.* до таких процесів *in vitro*, як дедиференціація (калюсогенез) і регенерація пагонів з калюсу, ми виявили також можливість ініціації проліферації адвентивних бруньок у апікальних і вузлових сегментів пагонів, що були відокремлені від паростків або регенерували з калюсу. Для цього ізольовані частини рослин висаджували на поживні середовища за МС з додаванням фітогормонів, які мали цитокінінову і ауксинову активність (табл.7). Як ауксинактивний фітогормон використовували ІОК у трьох варіантах концентрацій: 0,05, 0,1 і 0,5 мг/л.

Мінімальний вміст у середовищах ІОК і БАП (кінетину) – 0,02 мг/л і 0,05 мг/л відповідно – не викликає помітних морфогенетичних реакцій. Можна було спостерігати тільки незначні потовщення біля основи пагонів.

Таблиця 7

Варіанти концентрацій цитокинінів для стимуляції розвитку і росту адвентивних бруньок

Фітогормони	Варіанти концентрацій, мг/л				
	1	2	3	4	5
БАП	0,5	1	1,5	2	2,5
Кінетин	0,5	1	1,5	2	2,5

Підвищення концентрації цитокинінів до 1-2 мг/л в присутності 0,05-0,5 мг/л ІОК викликало активізацію розвитку пазушних меристем, а через 4 – 6 тижнів – формування мікрокущів, які склалися з п'яти-дев'яти пагонів (рис. 1, 2) завдовжки 5 – 12 мм і великої кількості дрібних додаткових (адвентивних) бруньок.

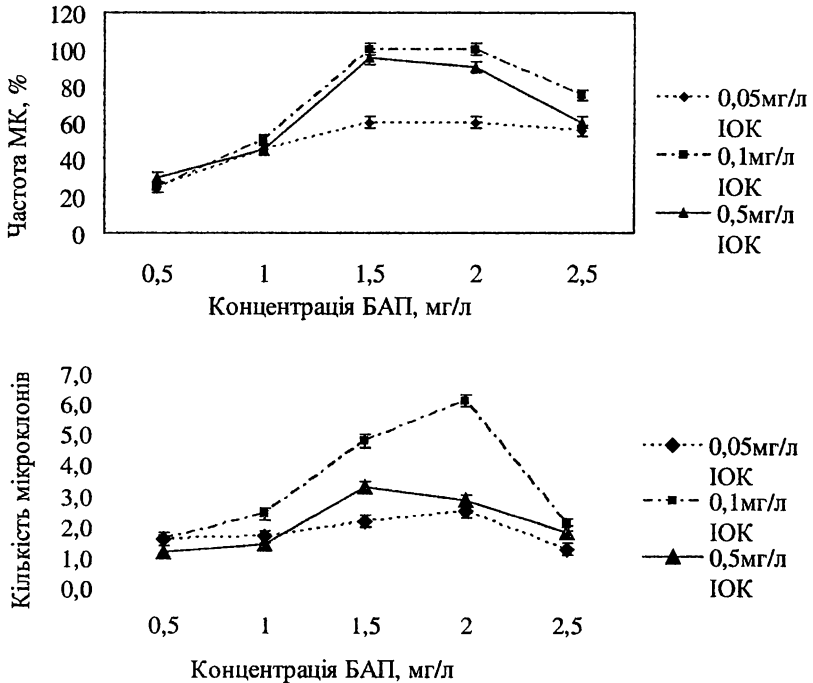


Рис. 1. Вплив поєднання концентрацій ІОК–БАП на частоту мікроклонального розмноження (МК) і кількість мікроклонів на експлантат *G. andrewsii* Griseb.

Дослідження показали, що мікроклонування тирличів можна ініціювати однаковими концентраціями кінетину або БАП, аналогічно до стимуляції утворення пагонів-регенерантів з калосу.

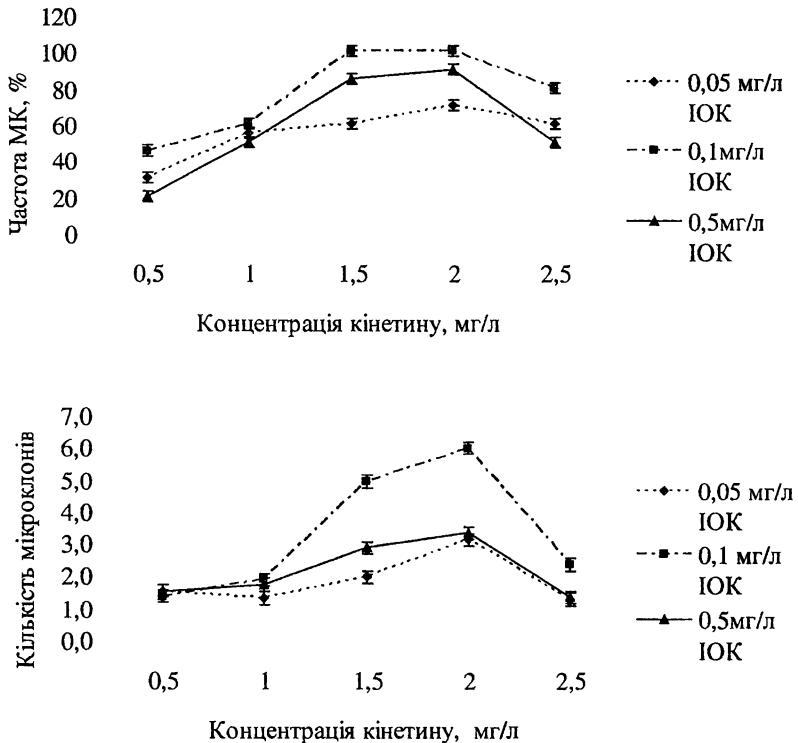


Рис. 2. Вплив поєднання концентрацій ІОК–кінетину на частоту МК і кількість мікроклонів на експлантат *G. andrewsii* Griseb.

Відпрацьований нами спосіб мікроклонального розмноження дозволяє декілька разів повторювати цикл мультиплікації (рис. 3), який включає:

- 1) відокремлення від материнських пагонів апікальних і вузлових сегментів;
- 2) стимуляція розвитку адвентивних бруньок і пагонів з них шляхом культивування на поживних середовищах з фітогормонами;
- 3) субкультивування мікрокущів на безгормональному середовищі і поділ їх на окремі пагони;
- 4) отримання нових експлантатів для мікроклонування;
- 5) вкорінення мікроживців;
- 6) повернення в цикл мікроклонального розмноження;
- 7) адаптація до септичних умов і висадка у відкритий ґрунт.

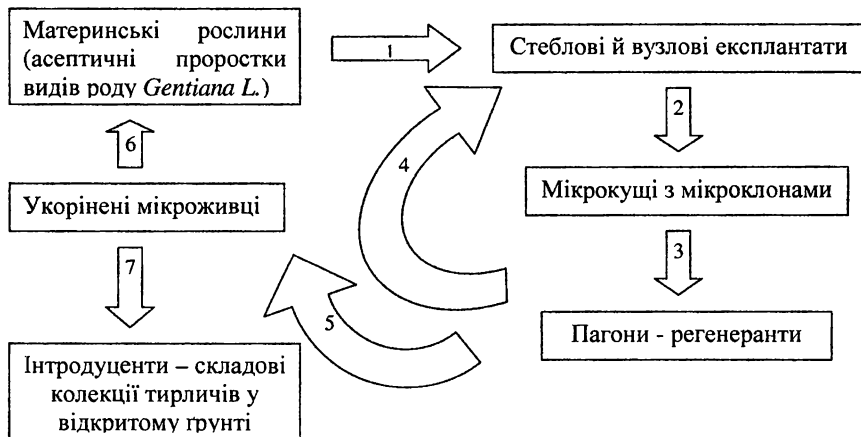


Рис. 3. Схема мікроклонального розмноження видів роду *Gentiana L.*

Така схема мікророзмноження тирличів може бути циклічною, або завершуватись вкоріненням мікроживців з метою подальшого їх перенесення у відкритий ґрунт.

Для видів тирличів, що нами досліджувались, оптимальним середовищем для мікроклонального розмноження було поживне середовище МС (табл. 8.) з розведеним удвічі вмістом макро- й мікроелементів і додаванням 0,1 мг/л ІОК та 1,5-2 мг/л БАП (кінетину).

Таблиця 8

Склад поживних середовищ МС і МС/2 для пророщування насіння і культури тирличів *in vitro*

Компоненти	МС, мг/л	МС/2, мг/л	Компоненти	МС, мг/л	МС/2, мг/л
NH_4NO_3	1650	825	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,0125
KNO_3	1900	950	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,0125
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	220	KI	0,83	0,415
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	185	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,125
KH_2PO_4	170	85	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	11,15
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	13,9	Мезоінозит	100	100
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2$	37,3	18,65	Тіамін-НСl	0,1	0,1
H_3BO_3	6,2	3,1	Піридоксин-НСl	0,5	0,5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	4,3	Нікотинова к-та	0,5	0,5

Поряд з появою і ростом адвентивних пагонів у деяких видів (*G. macrophylla* Pall., *G. andrewsii* Griseb., *G. tibetica* King. ex Hook) спостерігались аномальні зміни: вітрифікація і фасціація пагонів. Вітрифіковані пагони мали потовщені, сильно оводнені, спотворені стебла і листки, які частково втратили зелене забарвлення; фасційовані пагони – дрібні, вузькі, розсічені листки і розширені плоскі стебла. Вітрифікація була більш властивою *G. andrewsii* Griseb., а розсіченість і витонченість листків і стебел – *G. macrophylla* Pall. і *G. tibetica* King. ex Hook. Після проведення додаткових дослідів, які полягали у субкультивуванні названих видів на безгормональних середовищах і на середовищах зі зниженими і підвищеними концентраціями ІОК та цитокінінів, ми досягли максимального зниження ймовірності появи аномалій розвитку при мікроклональному розмноженні. У *G. macrophylla* Pall., *G. andrewsii* Griseb. і *G. tibetica* King. ex Hook явища вітрифікації і фасціації вдалось усунути двома шляхами: незначним зниженням вмісту цитокінінів або періодичним субкультивуванням на безгормональному середовищі (4 тижні – на середовищі з додаванням 0,1 мг/л ІОК і 1,5 мг/л кінетину чи БАП, 2 тижні – на субстраті без гормонів). Другий варіант виявився більш ефективним і був нами включений до загальної схеми мікроклонального розмноження досліджуваних видів тирличів.

Ініціація ризогенезу у пагонів-регенерантів. Пагони, що регенерували з каллосу, містились на його поверхні і не мали коренів; мікроклони, одержані шляхом клонального мікророзмноження, також потребували укорінення. Тому наступним етапом наших досліджень було вивчення здатності мікроживців до ризогенезу як морфогенетичної реакції на додавання до середовища різних концентрацій ауксину (табл. 9).

Таблиця 9

Морфогенетичні реакції пагонів-регенерантів досліджуваних видів роду *Gentiana* L. за дії різних концентрацій ІОК у поживному середовищі

Вид	Концентрація ІОК, мг/л							
	0	0,02	0,06	0,1	0,3	0,5	0,8	1
<i>G. alba</i> Muhl.	-	ПОС	Р	Р	Р,СК	СК	СК	К
<i>G. andrewsii</i> Griseb.	Р	Р	Р	Р	Р,СК	СК,АР	К, АР	К
<i>G. bigelovii</i> A. Gray	-	Р	Р	Р,АР	СК	СК	К	К
<i>G. cachemirica</i>	-	ПОС	Р	Р	Р, СК	СК	СК	СК
<i>G. crassicaulis</i>	-	Р	Р	Р,ПОС	Р,ПОС	СК	АР,СК	К
<i>G. cruciata</i> L.	-	Р	Р	Р,АР	АР,СК	СК	К	К
<i>G. dahurica</i> Fish.	-	ПОС	Р	Р	Р, СК	СК	СК	СК,АР
<i>G. decumbens</i> L.	Р	Р	Р	Р,АР	СК	СК	СК	К
<i>G. macrophylla</i> Pall.	-	Р	Р	Р,АР	АР,СК	СК	СК	К
<i>G. rockhillii</i> Hemsl.	-	ПОС	Р	Р	Р,АР	АР,СК	СК	СК
<i>G. saponaria</i> L.	-	ПОС	Р	Р	Р,СК	СК	К	К
<i>G. tibetica</i> King. ex	-	Р	Р	Р,ПОС	Р,СК	СК,АР	К	К

Р – ризогенез; ПБС – потовщення базальної частини стебла; СК – слабкий каллусогенез; АР – аномальний розвиток регенератів з появою потворних форм: покручені, надмірно оводнені (вітрифіковані) або дрібнорозсічені листки й пагони

Для індукції ризогенезу ми відокремлювали пагони-регенеранти, що досягли 1-1,5 см завдовжки, від материнського калюсу чи від мікрокуща і пересаджували їх на поживні середовища з додаванням ІОК. Високі концентрації індолилоцтової кислоти стимулювали утворення калюсу на базальних кінцях мікроживців, у той час як зниження вмісту ІОК викликало появу коренів.

Деякі види тирличів виявили здатність до спонтанного укорінення на безгормональному середовищі МС з розведеним удвічі вмістом макро- і мікросолей. Таке явище ми спостерігали у *G. andrewsii* Griseb. і *G. decumbens* L.. Крім того, ці види мають найширший діапазон концентрацій ІОК (0 - 0,1 мг/л), при яких відбувається вкорінення пагонів. Вкорінені мікроживці *G. andrewsii* Griseb. протягом 4-6 тижнів культивування на безгормональному поживному середовищі МС/2 мали розвинену кореневу систему і набували розмірів однорічних рослин.

Представників решти таксонів, ризогенез яких ми вивчали, можна поділити на умовні групи за концентраціями ІОК, що необхідні для утворення коренів. Так, 0,02 – 0,06 мг/л ІОК потрібно для ініціації укорінення мікроживців таких видів: *G. bigelovii*, *G. cruciata*, *G. macrophylla*, *G. tibetica*, *G. crassicaulis*; 0,06 – 0,1 мг/л ІОК вимагають *G. alba*, *G. cachemirica*, *G. dahurica*, *G. rockhillii*, *G. saponaria*. Середовища, що містять ІОК у концентраціях 0,1 – 0,3 мг/л, здатні викликати ризогенез без появи ознак аномального розвитку, якщо скоротити час культивування мікроживців до 10 – 14 днів.

При появі перших корінців ми пересаджували живці на безгормональне поживне середовище МС з розведеним удвічі вмістом мікро- і макросолей. Далі розвиток кореневої системи відбувався, очевидно, під впливом ендогенних фітогормонів рослин. Сформовані рослини використовувались для подальших експериментів з мікроклонального розмноження і для культивування в нестерильних умовах (після їх попередньої акліматизації).

Адаптація вирощених *in vitro* тирличів до нестерильних умов. Частину вкоріненних мікроживців тирличів після культивування їх на безгормональному середовищі МС ми повертали у цикл розмноження *in vitro* для одержання більшої їх кількості. Решту рослин з коренями перенесли до нестерильних умов. Ця фаза експерименту виявилась не менш важливою, ніж попередні, оскільки в ній поєдналися як методи культури клітин і тканин, так і методи, що застосовуються в традиційному рослинництві. Щоб уникнути втрат, ми провели поступове загартування регенованих рослин до нестачі вологи, коливань температури, впливу патогенних та інших мікроорганізмів і грибів. Крім того, під час адаптації вирощених *in vitro* рослин до нестерильних умов, нами було здійснено подвійну зміну субстрату, що сприяло переведенню їх з гетеротрофного на автотрофне живлення.

Процес адаптації тирличів, вирощених *in vitro*, до септичних умов супроводжувався деякими втратами рослин, пов'язаними з пересиханням листя і загнивання коренів. Такі явища спостерігались найчастіше у перші дні після змін середовища. Критичними моментами були: перенесення рослин на перліт; перші дні повітряних експозицій; пересадка у ґрунтовий субстрат в умовах оранжереї; перенесення у відкритий ґрунт.

У різних видів тирличів чутливість до змін протягом акліматизації була неоднаковою, як і до її окремих етапів (табл.10).

Таблиця 10

Життєздатність вирощених *in vitro* тирличів на різних етапах адаптації до нестерильних умов

Вид	Кількість живих рослин в кінці кожного етапу адаптації				
	Перенесення на перліт	Повітряні експозиції	Пересадка в ґрунт	Перенесення на ділянку	Рік культивування у відкритому ґрунті
<i>G. alba</i> Muhl.	32	26	21	17	14
<i>G. andrewsii</i> Griseb.	16	10	9	6	2
<i>G. bigelovii</i> A. Gray	18	16	16	12	10
<i>G. cachemirica</i> Decne	16	12	10	10	7
<i>G. crassicaulis</i> Duthie	18	17	16	12	10
<i>G. cruciata</i> L.	22	18	17	15	12
<i>G. dahurica</i> Fish.	34	30	27	23	21
<i>G. decumbens</i> L.	9	7	6	4	2
<i>G. macrophylla</i> Pall.	20	18	18	14	12
<i>G. rockhillii</i> Hemsl.	15	14	12	9	8
<i>G. saponaria</i> L.	22	21	21	18	17
<i>G. tibetica</i> King. ex Hook	12	12	11	9	7

Загалом після адаптації до нестерильних умов до кінця першого року культивування в незахищеному ґрунті виживало близько 40-50% рослин, одержаних шляхом мікроклонального розмноження. Найчутливішими до зміни зовнішнього середовища виявились *G. andrewsii* Griseb. і *G. decumbens* L. (рис. 9.), виживання яких на другий рік становило 12, 2% та 22,2%, відповідно, тобто збереглося по дві рослини кожного виду. Ще через два роки культивування у відкритому ґрунті ці види були втрачені для колекції тирличів.

Таким чином, адаптація до нестерильних умов асептично вирощених тирличів є важливим етапом розмноження досліджуваних рослин *in vitro*, оскільки забезпечує можливість практичного використання отриманого посадкового матеріалу для подальших робіт з інтродукції видів роду *Gentiana* L.

На цей час 10 видів тирличів з дванадцяти, що досліджувались, входять до колекції Ботанічного саду імені академіка О.В. Фоміна. Всі рослини досягли генеративної стадії розвитку, дають життєздатне насіння. З 2003 року насіння видів роду *Gentiana* L. нашої репродукції пропонується у списках для обміну в складі насіння Ботанічного саду.

ВИСНОВКИ

1. Для досліджуваних видів роду *Gentiana L.* властиві високі морфогенетичні можливості, які виявляються у насінні під впливом холодової або гіберелінової стратифікації, а у вегетативних органах та їх частинах – залежно від наявності у поживних середовищах фітогормональних факторів.

2. Насінню досліджуваних видів *Gentiana L.* притаманний глибокий і середньої глибини морфофізіологічний спокій, для подолання якого необхідна холодова стратифікація або обробка гібереліном. Умови *in vitro* в поєднанні з холодовою чи гібереліновою стратифікацією підвищують схожість і енергію проростання насіння тирличів.

3. Досліджувані види тирличів здатні до таких типів морфогенезу *in vitro*: калюсогенез і проліферація калюсу, регенерація пагонів з калюсу, ініціація адвентивних пагонів на апікальних і вузлових сегментах пагонів (мікроклонування), ризогенез (вкорінення пагонів-регенерантів і мікроживців, отриманих при мікроклональному розмноженні).

4. Частота калюсогенезу і частота регенерації пагонів з калюсу залежить як від вмісту фітогормонів у середовищах, так і від вихідного експлантата. Експлантати всіх типів здатні до калюсогенезу, але стеблові виявились менш ефективними, ніж листові й кореневі.

5. Оптимальними концентраціями фітогормонів для стимуляції регенерації пагонів з калюсу і утворення мікроклонів тирличів виявилось поєднання 0,1 мг/л ІОК з 1,5-2,5 мг/л кінетину (БАП), при чому між впливом кінетину і БАП не спостерігалось суттєвої різниці.

6. Для тирличів *in vitro* властива поява аномальних вітрифікованих або фасційованих пагонів, що спричиняє їх загибель. Це свідчить про нестабільність морфогенетичних властивостей досліджуваних видів при тривалому субкультивуванні на поживних середовищах з фітогормонами.

7. Аномального розвитку можна уникнути, чергуючи культивування тирличів на середовищах з додаванням фітогормонів і без них, що дозволяє стабілізувати морфогенез під час мікроклонального розмноження.

8. Внаслідок проведених досліджень вперше розроблено повний лабораторний цикл розмноження 12 видів роду *Gentiana L.* *in vitro* і принципову схему адаптації вирощених асептично тирличів до нестерильних умов.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Голубенко А.В. Проблеми і шляхи збереження зникаючих видів роду *Gentiana L.* // Вісник „Інтродукція та збереження рослинного різноманіття”. – 1999. – Вип. 1.– С. 13.
2. Голубенко А.В., Брайон О.В. Особливості проростання насіння деяких представників роду *Gentiana L.* // Вісник „Інтродукція та збереження рослинного різноманіття”. – 2000. – Вип. 3. – С. 32-34.
3. Голубенко А.В. Клональне мікророзмноження деяких видів роду *Gentiana L.* // Вісник „Інтродукція та збереження рослинного різноманіття”. – 2001. – Вип. 4. – С. 61 – 63.

4. *Голубенко А.В.* Дослідження морфогенезу *Gentiana macrophylla* Pall. В умовах стерильної культури // Вісник „Інтродукція та збереження рослинного різноманіття”. – 2003. – Вип. 7. – С. 52 – 54.
5. *Голубенко А.В.* Інтродукція представників роду *Gentiana* L. з застосуванням методів культури тканин // Матеріали XI з'їзду Українського Ботанічного Товариства. – Харків, 2001. – С. 93-94.
6. *Голубенко А.В.* Використання тирличів (рід *Gentiana* L.) в озелененні // Роль ботанічних садів в зеленому будівництві міст, курортних та рекреаційних зон: Матеріали міжнародної наукової конференції, присвяченої 135-річчю Ботанічного саду ОНУ ім. І.І. Мечникова. – Одеса: ЛАТСТАР, 2002. – Ч.1. – С. 97 – 100.
7. *Голубенко А.В.* Морфогенез *Gentiana andrewsii* Griseb. *in vitro* // Сучасні проблеми інтродукції рослин та збереження біорізноманіття екосистем: Матеріали міжнародної наукової конференції, присвяченої 125-річчю Ботанічного саду ЧНУ імені Юрія Федьковича. – Чернівці: Рута, 2002. – С. 41 – 42.

АНОТАЦІЯ

Голубенко А.В. Морфогенез та особливості вегетативного розмноження видів роду *Gentiana* L. *in vitro*. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.12 – фізіологія рослин. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2005.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню особливостей морфогенезу видів роду *Gentiana* L. (тирличів) *in vitro*. В результаті проведених експериментів отримано нові дані щодо фізіологічних особливостей насіння тирличів, стимуляції його проростання. Виявлено, що для насіння досліджуваних видів тирличів притаманний морфологічний спокій. Холодова стратифікація або обробка розчином гібереліну стимулюють виведення насіння із стану спокою. Показано можливість індукції різних типів морфогенезу видів роду *Gentiana* L. в умовах стерильної культури, а саме: калюсогенезу і проліферації калюсу, регенерації пагонів з калюсу, ініціації адвентивних бруньок на вузлових сегментах тирличів, ризогенезу у пагонів-регенерантів. Встановлено, що експлантати всіх типів (листкові, кореневі й стеблові) здатні до калюсогенезу. Найвищі морфогенетичні можливості у експлантатах листового походження. Розроблено лабораторну технологію мікроклонального розмноження тирличів та їх адаптації до септичних умов.

Ключові слова: види роду *Gentiana* L., проростання, спокій насіння, культура *in vitro*, калюс, проліферація, мікроклональне розмноження, регенеранти, ризогенез.

АННОТАЦІЯ

Голубенко А.В. Морфогенез і особливості вегетативного розмноження видів роду *Gentiana* L. *in vitro*. – Рукопись.

Дисертація на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.12 – физиология растений. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2005.

Диссертационная работа посвящена исследованию морфогенеза видов рода *Gentiana L.* (горечавок) *in vitro*.

Виды рода *Gentiana L.* издавна известны как, прежде всего, ценные лекарственные и декоративные растения. Изменение экологических условий в сочетании с антропогенным влиянием привели к тому, что многим видам горечавок угрожает исчезновение. Выращивание в культуре может быть одним из способов сохранения разнообразия видов в пределах изучаемого рода. Поскольку сложная биология размножения и развития горечавок значительно усложняет их самовозобновление в природе и культивирование, именно методы культуры ткани способны открыть новые возможности для получения первичного посадочного материала, массового микроразмножения, оздоровления, создания коллекции видов рода *Gentiana L. in vitro* и *ex situ*. Подбор условий размножения в стерильной культуре предусматривает изучение возможностей экзогенной регуляции морфогенетических процессов представителей рода *Gentiana L.*

В результате проведенных экспериментов получены новые данные, касающиеся физиологических особенностей семян горечавок, стимулирования их прорастания. Исследования показали, что для семян представителей рода *Gentiana L.* характерно наличие морфофизиологического покоя, для преодоления которого необходима либо холодная стратификация, либо обработка раствором гиббереллина (100 мг/л). Применение такой предпосевной обработки в сочетании с асептическими условиями повышают всхожесть и энергию прорастания семян.

Показана возможность индукции разных типов морфогенеза видов рода *Gentiana L.* в условиях стерильной культуры: каллусогенеза и пролиферации каллуса, регенерации побегов из каллуса, инициации адвентивных почек на узловых сегментах горечавок, ризогенеза у побегов-регенерантов. Подобраны оптимальные питательные среды для инициации каждого типа морфогенеза. В основе всех питательных сред использовалась среда Мурасиге-Скуга. Для индукции и пролиферации каллуса в питательную среду добавляли индолилуксусную (ИУК), нафтилуксусную (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусную (2,4-Д) кислоты и кинетин. Появление адвентивных почек и побегов (микрорклонов) стимулировали сочетанием ИУК с кинетином или бензиламинопурином (БАП). Образование корней у регенерантов происходило под влиянием низких концентраций ауксина. У некоторых видов наблюдалось спонтанное укоренение микрорклонов.

Выявлена некоторая нестабильность морфогенетических свойств исследованных видов, которая проявляется возникновением витрифицированных или фасцированных побегов. Разработан способ размножения горечавок *in vitro*, позволяющий избежать появления аномалий развития при длительном культивировании на питательных средах с фитогормонами, состоящий в чередовании гормонсодержащих и безгормональных питательных сред. Такая тактика культивирования горечавок позволяет многократно повторять цикл их микрорационального размножения.

Установлено, что эксплантаты всех типов (листовые, корневые и стеблевые) способны к каллусогенезу. Максимальные показатели частоты каллусогенеза и регенерации побегов из каллуса наблюдались у листовых сегментов, что

позволяет считать их наиболее эффективным эксплантатом для размножения горечавок *in vitro*.

Разработана лабораторная технология микроклонального размножения 12 видов горечавок и принципиальная схема их адаптации к септическим условиям, в основе которой – постепенное закаливание выращенных в асептических условиях растений с последовательной двойной сменой субстрата (перлит, почвосмесь).

Создана коллекция представителей рода *Gentiana L.* в Ботаническом саду им. акад. А.В. Фомина Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. Растения культивируются в открытом грунте, достигли генеративной стадии развития, плодоносят.

Ключевые слова: виды рода *Gentiana L.*, прорастание, покой семян, культура *in vitro*, каллус, пролиферация, микроклональное размножение, регенеранты, ризогенез.

SUMMARY

Holubenko A.V. Morphogenesis and peculiarities of the vegetative reproduction of the *Gentiana L.* genus' species *in vitro*. – Manuscript.

Ph.D. thesis in specialty 03.00.12 – plant physiology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, 2005.

Dissertation is devoted to investigation of the *Gentiana L.* genus' species morphogenesis *in vitro*. The new data about peculiarities of gentian seeds physiology and their germination were received. The phenomenon of morphophysiological dormancy of gentian's seeds was found. Cold's or gibberellin's stratification of the seeds stimulates interruption of dormancy stage.

The different morphogenesis type's possibility of *Gentiana L.* genus' species was shown, for example – formation and proliferation of callus, regeneration of shoots from callus, initiation of adventitious buds of the shoot segments of gentians, root formation of shoots' regenerants. All types of explants (leaves, roots and shoots) have a callus formation capability. The leaf-origin explants have the highest morphogenesis possibility.

The laboratorial technology of gentian's microclone multiplication and regenerant's adaptation to the septic conditions was made.

Key words: species of *Gentiana L.* genus, germination, seed dormancy, *in vitro* culture, callus, proliferation, microclone multiplication, regenerants, genesis of roots.

Підписано до друку 13.10.2005. Формат 60x84^{1/16}
Гарнітура Times. Папір офсетний.
Друк офсетний. Наклад 100. Ум. друк. арк. 0,9. Зам. № 25-2914

Надруковано у Видавничо-поліграфічному центрі "Київський університет"
01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, ☎ 234 3128
Свідоцтво виснесо до державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02.