

УДК 575.22: 582.923.1 + 576.5

**АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОЇ МІНЛИВОСТІ КУЛЬТУРИ
ТКАНИН ДЕЯКИХ ВИДІВ РОДУ *GENTIANA* L.**М.О. ТВАРДОВСЬКА¹, Н.М. СТРАШНЮК², В.М. МЕЛЬНИК¹,
В.А. КУНАХ¹¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150,
e-mail: kunoah@imbo.org.ua²Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка.

Україна, 46027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2, e-mail: strashniuk@mail.tn.ua

Ботаничний сад імені акад. О.В. Фоміна, Україна, 01032, м. Київ,
вул. Комінтерну, 1, e-mail: v.m.melnyk@imbo.org.ua

Проведено цитогенетичний аналіз культури тканин, отриманої від рослин *Gentiana axseriadea*, *G. strucata*, *G. pneumonanthe*, *G. verna* з різних місць зростання та виявлено їхню міксопloidність. Встановлено залежність цитогенетичної структури клітинних популяцій *in vitro* від виду та генотипу вихідних рослин. З'ясовано, що в усіх досліджених калюсних тканинах модальним класом були диплоїдні клітини і клітини з біядиплоїдними наборами хромосом. Показано, що рівень хромосомної мінливості серед вивчених видів був найнижчим у культурі тканин *G. verna*.

Ключові слова: види *Gentiana* L., культура тканин рослин, цитогенетичний аналіз, міксопloidія, анафазні зборці

ВСТУП. Відомо, що в процесі культивування *in vitro* рослин накопичуються генетичні (геномні) зміни [1]. Так звана "сомаклональна" мінливість добре вивчена у багатьох сільськогосподарських культур, таких як пшениця, рис, кукурудза, горох, цукровий буряк, томати, часник та ін. [2, 3]. Велика увага приділяється з'ясуванню генетичних змін у культурах *in vitro* лікарських рослин – продуцентів біологічно активних речовин [2]. Останнім часом такі дослідження проведено на культурах тканин цінних лікарських видів роду Тирлич (*Gentiana* L.). Зокрема, показано незначні зміни рибосомної ДНК для калюсів *G. lutea*, *G. punctata* та *G. ascaulis* [4, 5]. У той же час, цитогенетичний аналіз цих культур тканин показав, що їх вирощування в умовах *in vitro* призводить

до значних геномних змін, які проявляються у міксоплідності клітинних популяцій [6]. Дослідження генетичної стабільності/мінливості культури тканин інших видів роду *Gentiana* L. дозволить з'ясувати особливості варіабельності геному тирличів в умовах *in vitro*.

Метою даної роботи було проведення цитогенетичного аналізу культури тканин *G. asclepiadea*, *G. pneumonanthe*, *G. cruciata* та *G. verna*.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугувала культура тканин кореневого походження, отримана від рослин із різних популяцій: тирличу ваточниковидного — *G. asclepiadea* (г. Пожижевська, хр. Чорногорта г. Велика Мигла, хр. Горгани) на 8-му та 6-му пасажах культивування, відповідно, тирличу звичайного — *G. pneumonanthe* (Корюківське лісицтво, Чернігівська обл. та с. Вигода, Івано-Франківська обл.) на 8-х пасажах, тирличу хрещатого — *G. cruciata* (с. Креничі, Київська обл. та природний заповідник "Медобори", Тернопільська обл.) на 9-му та 8-му пасажах, відповідно і тирличу весняного — *G. verna* (урочище Гереджівка, смт. Ясиня, Закарпатська обл.) на 7-му пасажі вирощування. Тривалість пасажу всіх калюсів становила 4 тижні.

Калюсні тканини *G. pneumonanthe*, *G. cruciata* та *G. verna* вирощували на агаризованому живильному середовищі Мурасіє-Скуга з половиною вмістом макро- та мікросолей (МС/2), доповненому 0,1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) і 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти (2,4-Д); *G. asclepiadea* — на середовищі Гамборга-Евелега (В5), доповненому 0,2 мг/л БАП і 1,0 мг/л 2,4-Д. Детально умови отримання та вирощування калюсів досліджуваних видів тирличів описано в роботах [7-9].

Відбір матеріалу проводили на 7-10-ту добу культивування у період найвищої мітотичної активності калюсних тканин. Зразки фіксували в суміші етанол: льодяна оцтова кислота (3:1) протягом 1 доби. Зафіксований матеріал для зберігання переносили в 70% етанол. Зразки фарбували 1%-м ацетоорсеїном. Цитогенетичні дослідження проводили за модифікованою методикою давлених препаратів [10]. Кількість хромосом підраховували у 100 метафазних пластинках. Рівень і типи анафазних аберацій вивчали на тих же препаратах.

У роботі використовували мікроскоп "NU-2E Carl Zeiss". Мікрофотографування проводили відеокамерою "SAC-410PA Samsung". Отримані дані опрацьовували статистично [11].

Результати та обговорення

Проведений нами раніше цитогенетичний аналіз апікальної меристеми корінців інтактних рослин досліджуваних видів показав, що вони мають такі хромосомні числа (2n): *G. asclepiadea* — 36, *G. pneumonanthe* — 26, *G. cruciata* — 52 та *G. verna* — 28 (неопубліковані дані).

Вивчення цитогенетичної структури культури тканин тирличів показало, що адаптація до умов ізольованого росту супроводжується значними змінами геному, що проявляються у появі анеуплоїдних клітин (рис. 1), а також анафазних аберацій.

Калюсні тканини *G. asclepiadea*, отримані від рослин з різних популяцій, характеризувалися таким розмахом мінливості за числом хромосом: 18-87 з середнім числом хромосом на мета-

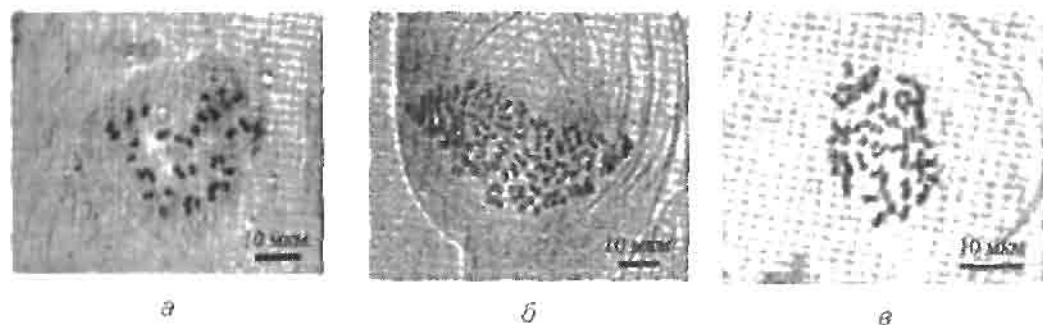
фазу 41,9 (г. Пожижевська): 18–70 з середнім числом хромосом на метафазу 34,3 (г. Велика Мигла) (рис. 2. а). Модальним класом у цих культурах були диплоїдні (33%) та гіподиплоїдні клітини (44%), відповідно. У проліферативному пулі першого калюсу відсоток поліплоїдних клітин становив 27%, тоді як в іншому — лише 2%. Частка анеуплоїдних клітин у калюсі *G. asclepiadea* (г. Велика Мигла) становила 60% і майже вдвічі перевищувала таку (36%) у культурі тканин *G. asclepiadea* (г. Пожижевська). Анафазні аберації були виявлені лише в останній, становили 7,7% від загальної кількості досліджених анафаз і були представлені мостами.

Розмах мінливості за числом хромосом у клітинних популяціях *G. pycnantha* становив: від 18 до 110 з середнім числом хромосом на метафазу 41,0 (Корюківське лісництво); та від 13 до 58 з середнім числом хромосом на метафазу 29,2 (с. Вигода) (рис. 2. б). Модальний клас у культурі тканин тирличу звичайного складала диплоїдні клітини — 33% та 64%, відповідно. У досліджених калюсах високим був відсоток поліплоїдних клітин: 50% (з яких 22% припадали на тетраплоїдні

клітини) — у першому та 12% — у другому. Анеуплоїдні клітини складала 17% проліферативного пулу *G. pycnantha* (Корюківське лісництво) та 23% — (с. Вигода). Поряд із цим, у клітинах культури тканин тирличу звичайного з обох популяцій виявлено невелику кількість (до 7,7%) аберацій у вигляді мостів та фрагментів.

Клітинні популяції *G. cruciata* також були міксоплоїдними. Розмах мінливості за числом хромосом становив 24–104 із середнім числом хромосом на метафазу 41,5 (с. Креничі), 26–128 із середнім числом хромосом на метафазу 49,6 (заповідник “Медобори”) (рис. 2. в). Модальним класом у цих культурах тканин були гіподиплоїдні клітини — 52% та 42%, відповідно. Відсоток поліплоїдних клітин був низьким — 4% (с. Креничі) та 9% (заповідник “Медобори”). Близько 2/3 обох клітинних популяцій складала анеуплоїдні клітини. Анафазні аберації, частка яких була незначною (5,3%), спостерігалися лише при дослідженні другого калюсу. Хромосомні перебудови були представлені парними мостами.

У культурі тканин *G. verna* зустрілися клітини із кількістю хромосом від 14 до 38 із середнім числом хромосом



Рисunek 1. Метафазні пластинки з різними числами хромосом у клітинах культури тканин видів роду *Gentiana* L. а — *Gentiana asclepiadea* (2n = 36) 34 хромосоми (гіподиплоїд), б — *G. pycnantha* (2n = 26) 82 хромосоми (тетраплоїд), в — *G. cruciata* (2n = 52) 46 хромосом (гіподиплоїд)

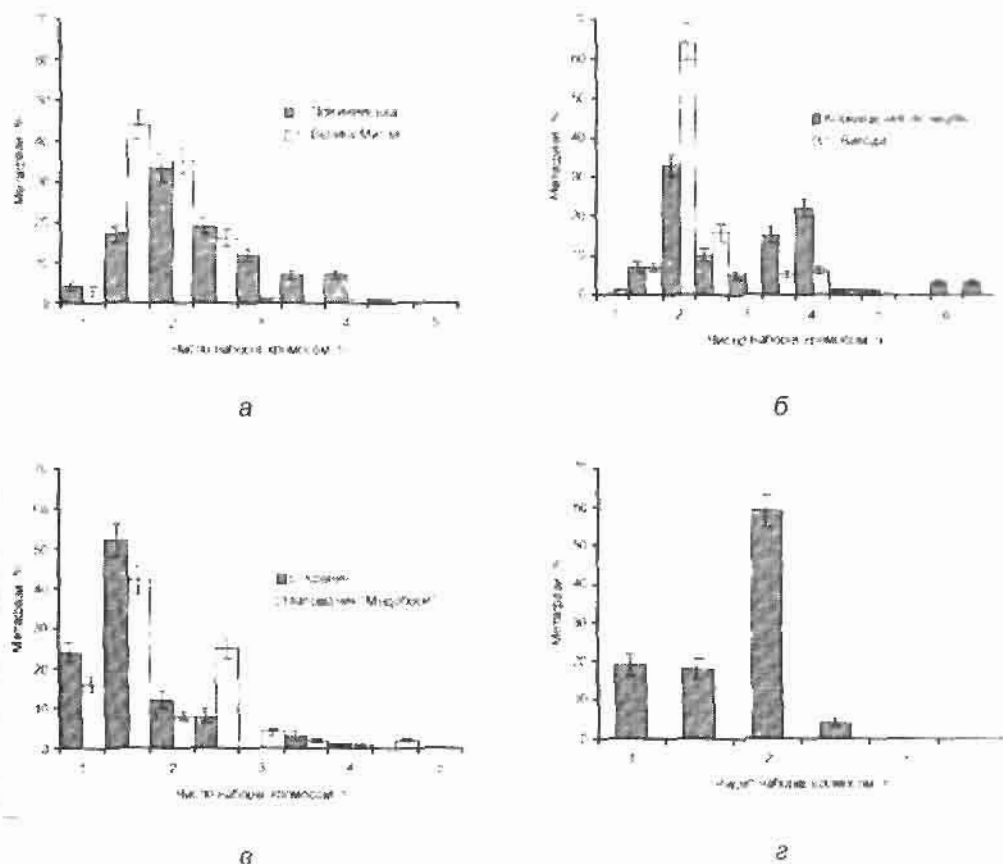


Рисунок 2. Розподіл клітин за рівнем плоидності в культурі тканин деяких видів підмаренки, отриманої від рослин з різних місць зростання: а - *Gentiana asclepiadea*, б - *G. pneumonanthe*, в - *G. cruciata*, г - *G. verna*. У кожній з досліджених клітинних популяцій вивчено по 100 метафаз.

на метафазу 24,0 (рис. 2. г). Характер розподілу клітин за числом хромосом наближався до нормального з чітко вираженим модальним класом (диплоїдні клітини — 59%). Відсоток анеуплоїдних клітин становив 22%. Значною була частка гаплоїдних клітин — 19%. Поліплоїдних клітин та анафазних аберацій у культурі тканин *G. verna* нами не виявлено.

Отже, аналіз клітинних популяцій тирличів показав їхню міксоплоїдність.

Ступінь її прояву залежав від видів приналежності рослин. Найбільші розмахи мінливості числа хромосом характерний для культури тканин *G. pneumonanthe* (Корюківське лісництво). Деяко меншим він був у клітках *G. asclepiadea* (г. Пожижівська *G. cruciata* (заповідник "Медобори") і *G. pneumonanthe* (с. Вигода). Найменшу варіабельність кількості хромосом у клітинах проявила культура тканин *G. verna*. Модальним класом у всі

ліджених калюсах були гіподипloidні та диплоїдні клітини. Найбільшу частку (50%) поліплоїдних клітин введено у калюси *G. pneumonanthe* (Корюківське лісництво), а найменше — у культурі тканин *G. asclepiadea* (Зелена Мигла) — 2% та *G. cruciata* (Креничі) — 4%. Слід зазначити, що в калюсі *G. verna* поліплоїдних клітин не знайдено. Усі вивчені клітинні популяції характеризувалися наявністю значної кількості анеуплоїдних типів. Найвищу здатність до анеуплоїдності проявляла культура тканин *G. asclepiadea*. Цікаво, що для рослин *G. cruciata*, зростають у природному заповіднику "Медобори", нами вперше виявлено міксоплоїдію: поряд із диплоїдними ($2n = 52$), у апікальних меристемах їх корінців були клітини з гаплоїдним і поліплоїдним набрами хромосом [2]. Можна припустити, що однією із причин значних хромосомних змін у калюсах цього виду є природна здатність геному *G. cruciata* до варіабельності числа хромосом. Подібні результати були отримані, наприклад, при дослідженні культури тканин *Convolvulus majalis* L., зміни структури каріотипу якої відбувалися за рахунок тих же механізмів, що й у природі [13]. Цитогенетичний аналіз клітинних ліній *in vitro* показав високий рівень анеуплоїдії. При цьому модальним числом у них були клітини з числом хромосом таким же або близьким до фактичних рослин женьшеню, для яких загальною авторами описана міксоплоїдія [14, 15]. Показано, що культури тканин різних видів ірисів, отримані з міксоплоїдних рослин, також характеризувалися широким розмахом за числом хромосом — від 6 до 96. Проте, структура клітинних популяцій в калюсах культур, в основному, залиша-

лася такою ж, як і в рослин-донорів відповідних видів [16].

Установленні цитогенетичної структури клітинної популяції суттєву роль відіграють особливості генотипу вихідних експлантів [17]. Різниця популяційної належності вихідних рослин тирличів є, очевидно, причиною відмінностей рівня та спектра хромосомних змін в однакових за тривалістю та умовами вирощування культурах. Серед досліджуваних клітинних популяцій за розмахом числа хромосом значно відрізнялися між собою лише калюси *G. pneumonanthe*, а за кількістю анеуплоїдних клітин — культура тканин *G. asclepiadea*. Найбільш суттєві відмінності між калюсами, отриманими від рослин одного виду з різних популяцій, виявлені за кількістю поліплоїдних клітин. Так, їхня частка у клітинних популяціях *G. asclepiadea* (т. Пожижевська), *G. pneumonanthe* (Корюківське лісництво) та *G. cruciata* (заповідник "Медобори") у 14, 4,2 та 2,3 рази, відповідно, перевищувала відсоток поліплоїдних клітин у калюсах рослин тих видів з інших місць зростання.

Відомо, що генетична гетерогенність клітинних популяцій, окрім вказаних чинників, може бути спричинена також і мінеральним складом живильного середовища та екзогенними регуляторами росту (зокрема, БАП і 2,4-Д). Проте, аналіз отриманих результатів дозволяє припустити відсутність суттєвого впливу мінерального складу живильних середовищ МС/2 та В5, на яких культивувалися калюси тирличів, на їхню цитогенетичну структуру. Наявність у живильних середовищах екзогенних фітогормонів, очевидно, може спричинювати зміни геному клітин калюсів тирличів. Проте, різна реакція культур тканин на

одні і ті ж фітогормони (БАП і 2,4-Д) вказує на вирішальну роль генотипу вихідної експланту у становленні цитогенетичної структури клітинних популяцій видів роду *Gentiana* L.

Отже, проведений нами цитологічний аналіз показав, що у досліджених клітинних популяціях тирличів переважали диплоїдні клітини та клітини з біядидиплоїдним набором хромосом. Такі ж модальні класи були характерні і для вивчених нами раніше культур тканин *G. ascaulis* та *G. lutea* [6]. Перевага в усіх досліджених калюсах тирличів (за винятком *G. punctata*) диплоїдних і/або біядидиплоїдних клітин та низький рівень або відсутність анафазних абераций свідчить про відносну стабільність геному видів роду *Gentiana* L. Поряд із цим, для усіх культур тканин тирличів встановлено видову специфічність мінливості геномів та вплив генотипу вихідних рослин на характер цитогенетичної варіабельності клітинних популяцій. Це дозволяє зробити припущення про подібність реакції різних видів роду *Gentiana* L. на умови культивування *in vitro*.

Висновки. Встановлено, що культивування *in vitro* *G. asclepiadea*, *G. pneumonanthe*, *G. cruciata* та *G. verna* призводить до полі та анеуплоїдії, а також до появи анафазних абераций хромосом. Показано вплив видової приналежності та генотипу вихідних рослин на характер цитогенетичної варіабельності клітинних популяцій тирличів. У досліджених калюсних культурах модальним класом були диплоїдні клітини та клітини з біядидиплоїдним набором хромосом. Виявлено підвищену здатність калюсу *G. pneumonanthe* (Корюківське лісництво) до поліплоїдизації та *G. cruciata* — до анеуплоїдії. Показано відносну стабіль-

ність цитогенетичної структури культури тканин *G. verna*, у якій характер розподілу клітин за числом хромосом наближався до нормального.

Роботу виконано за фінансової підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень при МОН України (проект № Ф25.5/009).

Перелік літератури

1. Larkin R.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell culture for plant improvement / Theor. Appl. Genet. 1981. Vol 60 № 2. — P. 197–214.
2. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин: Генетичні та фізіологічно-біохімічні основи — К.: Логос, — 2005. — 730 с.
3. Козыренко М.М., Фисенко П.П., Артюкова Е.В. Анализ генетического разнообразия сортов и соматоклональных линий культурной сои (*Glycine max* (L.) Merr.) методом маркирования межмикросателлитных последовательностей (ISSR) // Биотехнология. 2007 № 1. — С. 3–13.
4. Андреев І.О., Спридонова К.В., Мельник В.М., Кунах В.А. Міжвидовий поліморфізм та зміни в культурі *in vitro* генів 5S рРНК у представників роду Тирлич (*Gentiana* L.) // Доп. НАН України. — 2004. № 6 — С. 189–192.
5. Мельник В.М., Андреев І.О., Спридонова К.В., Страшнюк Н.М., Кунах В.А. Зміни 18S-25S рДНК у культурі тканин деяких видів тирличів *Gentiana* L. // Цитологія і генетика. 2007. Т. 41, № 2. — С. 19–23.
5. Твардовська М.О., Страшнюк Н.М., Мельник В.М., Адонін В.І., Кунах В.А. Хромосомна мінливість в культурі тканин деяких видів роду Тирлич (*Gentiana* L.) // Цитологія і генетика. — 2008 (у друці).
7. Страшнюк Н.М., Грицак П.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.

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: Біологія. — 2006. — Т. 29, № 2. — С. 100–107.

Страшнюк Н.М., Кравець Н.Б., Конвалюк І.І., Твардовська М.О., Мельник В.М., Голубенко А.В. Введення в культуру *in vitro* рідкісного виду Українських Карпат *Gentiana verna* L. // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія. — 2008. — Вип. 22. — С. 45–49.

Кунах В.А., Левченко Б.А. Модифікація метода давлення препаратів для изучения хромосом в клетках культурь тканин растений // Цитология и генетика. — 1974. Т. IX, № 1. С. 56–60.

1. Плохинский Н.А. Биометрия. Издание 2-е. — М.: Изд-во МГУ. — 1970. — 367 с.

2. Твардовська М.С., Страшнюк Н.М., Онщенко Г.М., Мельник В.М., Кунах В.А. Мінливість числа хромосом тирличу хрещатого (*Gentiana cruciata* L.) у природі та в культурі *in vitro* // Матеріали Міжнародної наукової конференції, присвяченої 200-річчю заснування Кременецького ботанічного саду "Різноманіття фітобіоти: шляхи відновлення, збагачення і збереження. Історія та сучасні проблеми". Кременець, Україна, 18–23 червня 2007. Кременець — Тернопіль. — 2007. — С. 151.

3. Аверьянова В.А., Александрова И.В., Быков В.А., Клизов С.В. Цитогенетические особенности начальной дедифференцировки культурь ткани ландыша майского (*Convallaria majalis* L.) // Генетика. — 1999. 35. № 12. С. 1674–1680.

4. Булахов В.П., Лазуве Л.С., Чернодод Г.К., Ходаковская М.В., Журавлев Ю.Н. Хромосомная варибель-

ность клетка женьшеня, трансформированных растительным онкогенем *g0iC11* // Генетика. — 2000. Т. 36, № 2. С. 209–216.

15. Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Лауве Л.С., Журавлев Ю.Н., Реунова Г.Д. Генетическая изменчивость каллусных линий женьшеня *Panax ginseng* // Биотехнология. — 2001. — № 1. С. 19–26.

16. Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Лауве Л.С., Болтецков Е.В. Анализ генетической изменчивости каллусных культур некоторых видов рода *Plis* L. // Биотехнология. — 2002. № 4. — С. 38–48.

17. Mohmand A S., Nabors M.W. Somaclonal variant plants of wheat derived from mature embryo explants of three genotypes // Plant Cell Rep. 1990. — Vol. 8. P. 558–560.

Представлено М.В. Кунаком
Надійшло 8.10.2007

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ КУЛЬТУРЫ ТКАНИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА *GENTIANA* L.

М.О. Твардовская¹, Н.М. Страшнюк²,
В.Н. Мельник³, В.А. Кунах¹

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Украина, 03143, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150, e-mail: kunakh@mbg.org.ua;

²Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка, Украина, 46027, г. Тернополь, ул. М. Кривоноса, 2, e-mail: trashnyuk@mail.ru;

³Ботанический сад им. акад. А.В. Фомича, Украина, 01032, г. Киев, ул. Коминтерна, 1, e-mail: v.m.malyuk@mbg.org.ua

Проведен цитогенетический анализ культуры тканей, полученной от растений *Gentiana asclepiadea*, *G. cruciata*, *G. pneumonanthe*, *G. verna* с разных мест произра-

тания и обнаружена их миксоплоидность. Установлена зависимость цитогенетической структуры клеточных популяций *in vitro* от вида и генотипа исходных растений. Выяснено, что во всех исследованных калусных тканях модальным классом были диплоидные клетки и клетки с околодиплоидными наборами хромосом. Показано, что наиболее низкий уровень хромосомной изменчивости среди изученных видов был в культуре тканей *G. verna*.

Ключевые слова. виды *Gentiana* L., культура тканей растений, цитогенетический анализ, миксоплоидия, анафазные абберации.

EVALUATION OF SOME *GENTIANA* L. SPECIES TISSUE CULTURE GENETIC VARIATION

M.O. Twardovska¹, N.M. Strashniuk²,
V.M. Mel'nyk³, V.A. Kunakh¹

¹Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: kunakh@imbg.org.ua;

²Volodymyr Hnatiuk Ternopil' National Pedagogical University, Ukraine, 46027, Ternopil', M. Kryvonosa str., 2, e-mail: strashniuk@mail.tj;

³O.V. Fomin Botanical Garden, Ukraine, 01032, Kyiv, Kominternu str., 1, e-mail: v.m.melnyk@imbg.org.ua

Cytogenetic analysis of tissue cultures generated from plants of *Gentiana asclepiadoa*, *G. cruciata*, *G. pneumonanthe*, *G. verna* to be derived from different places of natural habitat has been carried out to reveal their microploidy. Cytogenetic structure of cell populations *in vitro* was found to vary with species and genotype of the original plants. Each callus tissue under study was highlighted to exhibit modal class with cells bearing both diploid and near-diploid chromosome sets. Among the species involved chromosome variability level was shown to be the lowest in *G. verna* tissue culture.

Key words: *Gentiana* L. species, plant tissue culture, cytogenetic analysis, microploidy, anaphase aberrations.