

ПРЯМИЙ ОРГАНОГЕНЕЗ *IN VITRO* ТИРЛИЧУ ЖОВТОГО (*Gentiana lutea* L.)

І. І. Конвалюк¹
Н. Б. Кравець²
Н. М. Дробик²
В. М. Мельник¹
В. А. Кунах¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ
²Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка

E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Отримано адвентивні пагони і корені прямим органогенезом *in vitro* з експлантів стеблових та кореневого походження рослин чотирьох популяцій тирличу жовтого (*G. lutea*). Встановлено, що ефективність регенерації залежить від генотипу материнської рослини, типу експланта та вмісту і співвідношення фітогормонів у середовищі. З'ясовано, що для отримання регенерантів зі стеблових і корневих експлантів найефективнішим було поєднання 5–10 мг/л тидіазурону та 0,01 або 1 мг/л 1-нафтилоцтової кислоти у живильному середовищі Мурасіге–Скуга. На листових експлантах регенеранти не утворювались. Показники регенерації з корневих експлантів були вищими від стеблових у кілька разів.

Ключові слова: *Gentiana lutea* L., регенерація *in vitro*, ризогенез, пагоноутворення.

Види роду Тирлич (*Gentiana* L., *Gentianeaceae*) є цінними лікарськими рослинами, які характеризуються сповільненим генеративним циклом та низькою репродуктивною здатністю; більшість з них є мікоризними. Відновлення тирличів у природі відбувається дуже повільно, а масове використання призвело до загрози їх зникнення. У надземних і підземних органах занесеного до Червоної книги України тирличу жовтого (*G. lutea*) [1] синтезуються такі біологічно активні сполуки, як секоїридоїдні глікозиди, алкалоїди, ксантони, флавоноїди, фенолкарбонові кислоти тощо, які широко використовують в офіційній і народній медицині [2, 3]. Зменшення чисельності та порушення структури природних популяцій *G. lutea* обмежує його використання в лікувальних цілях. Для отримання додаткового джерела сировини, а також з метою збереження цього виду поряд із класичними природоохоронними заходами доцільним є застосування біотехнологічних методів, зокрема мікроклонального розмноження *in vitro*.

Для видів роду *Gentiana* флори України нами підібрано умови індукції калюсоутворення, отримано культуру тканин, здатну до тривалого росту [4]. Однак відомо, що під час культивування калюсів у клітинах відбуваються структурні та функціональні

зміни генома, які можуть передаватися регенованим з них органам чи рослинам. Тому для одержання генетично ідентичного матеріалу доцільніше індукувати пряму регенерацію.

Метою цієї роботи було отримання регенерантів прямим органогенезом з експлантів стеблових, листових та кореневого походження з чотирьох популяцій рослин *G. lutea*.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал. Використовували отримані з насіння рослини *G. lutea* чотирьох популяцій: трояської (гора Трояска, хребет Свидовець, Рахівський р-н, Закарпатська обл.), рогнеської (полонина Рогнеска, хр. Чорногора, Рахівський р-н, Закарпатська обл.), лемської (пол. Лемська, хр. Чорногора, Рахівський р-н, Закарпатська обл.), пожижевської (г. Пожижевська, хр. Чорногора, Надвірнянський р-н, Івано-Франківська обл.) (таблиця), які вирощували в стерильних умовах *in vitro*.

Отримання регенерантів. Для індукції регенерації листові (площею 1,0–1,5 см²), стеблові та кореневі (завдовжки близько 5 мм) експланти, отримані від асептичних

рослин, висаджували на живильне середовище Мурасіге–Скуга (МС), доповнене різними концентраціями тидіазурону (ТДЗ) (1; 5; 10; 20 мг/л) та 1-нафтилоцтової кислоти (НОК) (0,01; 1 мг/л).

Оцінювання ефективності регенерації (ЕР) проводили через 1,5–2 місяці і визначали за формулою:

$$EP = R/N,$$

де R — кількість регенерантів; N — кількість висаджених експлантів.

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.

ВР обчислювали за формулою:

$$BP = (Nr/N) \times 100\%,$$

де Nr — кількість експлантів, на яких утворилися регенеранти; N — кількість висаджених експлантів.

СКР визначали за формулою:

$$CKP = R/Nr,$$

де R — кількість регенерантів; Nr — кількість експлантів, на яких утворилися регенеранти.

Отримані дані опрацьовані статистично [5].

Результати та обговорення

Підбираючи умови для регенерації, з'ясовували залежність ефективності органогенезу *G. lutea* від таких чинників: концентрації у живильному середовищі регуляторів росту ТДЗ і НОК, генотипу вихідних рослин — донорів експлантів, а також типу експланта.

Вплив екзогенних регуляторів росту на ефективність регенерації. Встановлено, що на середовищі з 1 мг/л ТДЗ і 0,01 мг/л НОК відбувалися: ризогенез, відсоток якого з корневих експлантів рослин трояської популяції становив 76,9%, СКР — 2,3 корінь/експл.; утворення пагонів зі стеблових експлантів рослин цієї популяції (ВР — 8,3%; СКР — 2,0 пагін/експл.) (рис. 1, А, Б). Із підвищенням концентрації ТДЗ до 5 мг/л (без змін вмісту НОК — 0,01 мг/л) спостерігали збільшення ВР коренів та значення СКР: до 90,6%, 4,2 корінь/експл. — у культурі від рослин з трояської популяції та до 92,3%, 2,8 корінь/експл. — лемської (рис. 1, А; 2, А). На цьому середовищі ВР пагонів з експлантів рослин трояської популяції підвищувався більш ніж у 2 рази і ста-

новив 18,2%, а СКР зменшувався в 2 рази до 1,0 пагін/експл. Гомогенез із рослин лемської популяції не спостерігали.

Збільшення концентрації ТДЗ з 10 до 20 мг/л за концентрації НОК 0,01 мг/л призводило до погіршення ризогенезу: показник регенераційної здатності СКР зменшувався у всіх досліджених варіантах в 1,9–4,1 рази (рис. 1, А–3, А). При цьому відсоток гомогенезу зі стеблових експлантів рослин лемської та пожижевської популяцій зменшувався в 2,3–4,7 рази, показники СКР залишалися без змін (рис. 2, Б; 3, Б). На середовищі з 20 мг/л ТДЗ і 0,01 мг/л НОК відсоток пагоноутворення був найвищим у випадку стеблових експлантів трояської популяції (33,3%) зі значенням СКР 1,0 пагін/експл. (рис. 1, Б). За вмісту фітогормонів 5 мг/л ТДЗ і 1 мг/л НОК ВР пагонів з рослин цієї популяції був дещо більшим (40,0%) за того самого значення СКР.

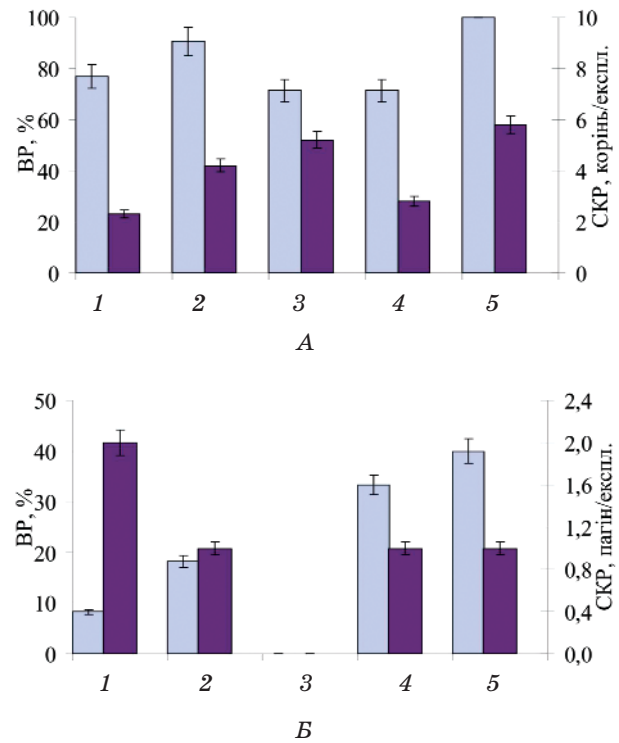


Рис. 1. Ризогенез на корневих (А) і пагоноутворення на стеблових (Б) експлантах із рослин *G. lutea* трояської популяції.

Живильне середовище МС, що містило:

1 — 1 мг/л ТДЗ і 0,01 мг/л НОК;

2 — 5 мг/л ТДЗ і 0,01 мг/л НОК;

3 — 10 мг/л ТДЗ і 0,01 мг/л НОК;

4 — 20 мг/л ТДЗ і 0,01 мг/л НОК;

5 — 5 мг/л ТДЗ і 1 мг/л НОК;

— відсоток регенерації (ВР);

— середня кількість регенерантів (СКР) у розрахунку на один експлант з регенерантами

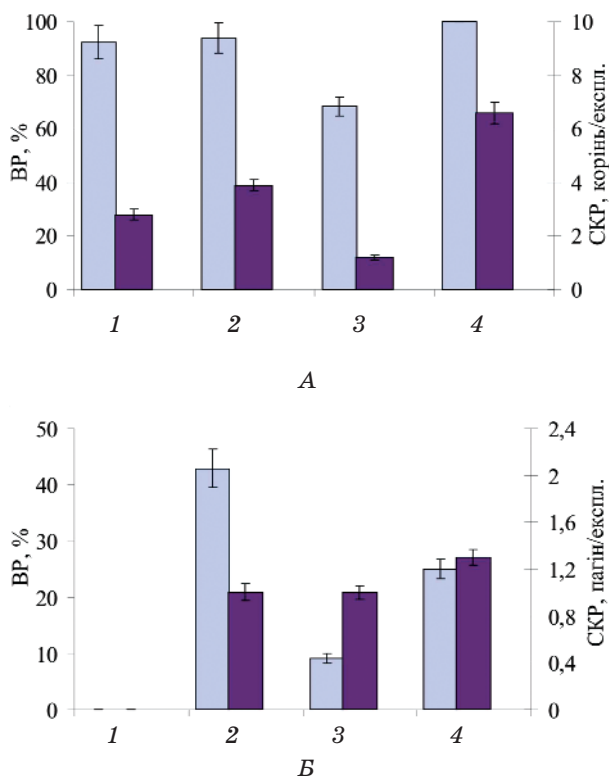


Рис. 2. Ризогенез на корневих (А) і пагоноутворення на стеблових (Б) експлантах із рослин *G. lutea* лемської популяції.

Живильне середовище МС, що містило:

- 1 — 5 мг/л ТДЗ і 0,01мг/л НОК;
- 2 — 10 мг/л ТДЗ і 0,01мг/л НОК;
- 3 — 20 мг/л ТДЗ і 1мг/л НОК;
- 4 — 10 мг/л ТДЗ і 1мг/л НОК;

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

Підвищення в живильному середовищі концентрації НОК від 0,01 до 1 мг/л сприяло збільшенню обох показників ефективності ризогенезу: ВР — до 71,4%–100% та СКР — до 1,7–6,6 корінь/експл. (рис. 1, А–З, А).

Для більшості досліджених зразків ефективність ризогенезу була найвищою у разі використання 5–10 мг/л ТДЗ і 1 мг/л НОК: відсоток регенерації із корневих експлантів становив 100%, показник СКР лежав у межах 4,1–6,6 корінь/експл. (рис. 1, А; 2, А). На середовищі, доповненому 10 мг/л ТДЗ та зменшеною у 100 разів концентрацією НОК (0,01 мг/л), ВР із корневих експлантів (у випадку рослин пожижевської популяції) був невисоким (57,1%), на відміну від показника СКР, який досягав 9,5 корінь/експл., і був найвищим у дослідженій вибірці зразків (рис. 3, А).

Живильне середовище з 10 мг/л ТДЗ і 0,01 мг/л НОК сприяло ефективному гомогенезу зі стеблових експлантів рослин лемсь-

кої (ВР — 42,9%, СКР — 1 пагін/експл.) та пожижевської (ВР — 40%, СКР — 1 пагін/експл.) популяцій (рис. 2, Б; 3, Б). Регенераційна здатність стеблових експлантів рослин трояської популяції була найвищою на середовищі зі вмістом 5 мг/л ТДЗ і 1 мг/л НОК (ВР — 40%, СКР — 1 пагін/експл.) (рис. 1, Б).

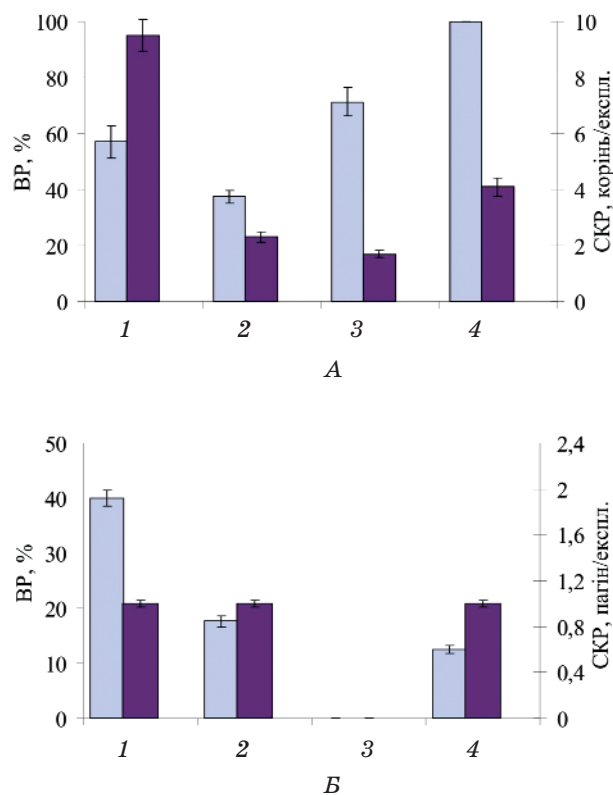


Рис. 3. Ризогенез на корневих (А) і пагоноутворення на стеблових (Б) експлантах із рослин *G. lutea* пожижевської популяції.

Живильне середовище МС, що містило:

- 1 — 10 мг/л ТДЗ і 0,01мг/л НОК;
- 2 — 20 мг/л ТДЗ і 0,01мг/л НОК;
- 3 — 5 мг/л ТДЗ і 1мг/л НОК;
- 4 — 10 мг/л ТДЗ і 1мг/л НОК;

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

Залежність регенерації від генотипу вихідної рослини. Показники ефективності органогенезу рослин чотирьох популяцій на живильному середовищі, що містило 10 мг/л ТДЗ і 0,01 мг/л НОК, суттєво відрізнялися (рис. 4).

Найкраще ризогенез відбувався із корневих експлантів рослин пожижевської популяції (ВР — 57,1%; СКР — 9,5 корінь/експл.; ЕР — 5,4 рег./експл.) (рис. 4, А). Порівняно високий показник ЕР (3,7 рег./експл.) отри-

мали у процесі регенерації з рослин трояської і лемської популяцій (ВР та СКР становили 71,4% і 5,2 корінь/експл. та 93,8% і 3,9 корінь/експл. відповідно). У дослідженій вибірці відносно низьку здатність до ризогенезу мали експланти від рослин з рогнеської популяції, ефективність регенерації яких становила 2,7 рег./експл. при ВР 73,3% і СКР 3,7 корінь/експл. (рис. 4, А; таблиця).

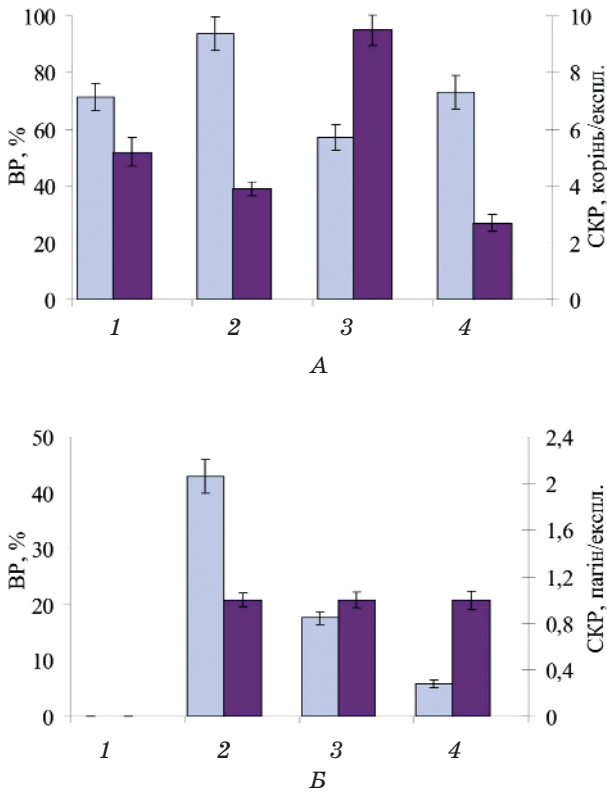


Рис. 4. Ризогенез на корневих (А) та пагоноутворення на стеблових (Б) експлантах із рослин *G. lutea* різних популяцій: 1 — трояської; 2 — лемської; 3 — пожижевської; 4 — рогнеської. Середовище МС, доповнене 10 мг/л ТДЗ і 0,01 мг/л НОК.
■ — відсоток регенерації(ВР);
■ — середня кількість регенерантів (СКР) у розрахунку на один експлант з регенерантами

Індукція гомогенезу була найбільш ефективною у випадку стеблових експлантів рослин лемської (ВР — 42,9%, СКР — 1,0 пагін/експл.) та пожижевської популяцій (ВР — 40,0%, СКР — 1,0 пагін/експл.) (рис. 4, Б). Для рослин рогнеської популяції ВР був приблизно у сім разів менший порівняно з двома попередніми популяціями. Пагоноутворення з експлантів рослин трояської популяції на цьому варіанті середовища взагалі не відбувалося.

Загалом показано, що експланти від рослин з різних місць зростання мали різну регенераційну здатність за однакових умов культивування. Поряд із цим, ефективність реалізації морфогенного потенціалу різних генотипів визначалася концентрацією і співвідношенням регуляторів росту у живильному середовищі.

Оцінка ефективності регенерації з різних типів експлантів. Здатність до регенерації *in vitro* виявили стеблові та кореневі експланти рослин усіх досліджених популяцій. Листкові експланти на протестованих варіантах середовищ темніли і з часом відбувся їх некроз.

У більшості випадків на стеблових експлантах спостерігали пагоноутворення, інколи — одночасно ризогенез та калюсоутворення або лише останнє. Так, калюсогенез відбувався на стеблових експлантах рослин пожижевської (10 мг/л ТДЗ і 0,01 мг/л НОК) та лемської (5 мг/л ТДЗ і 0,01 мг/л НОК) (рис. 5, А) популяцій. Одночасне формування калюсу і коренів спостерігали на одному експланті стеблового походження рослин лемської популяції (10 мг/л ТДЗ і 0,01 мг/л НОК) (рис. 6, А).

На корневих експлантах спостерігали переважно ризогенез (рис. 6, Б), і лише в одному випадку (лемська популяція) за концентрацій ТДЗ 5 мг/л і НОК 0,01 мг/л — утворення калюсу і коренів одночасно (рис. 5, Б).

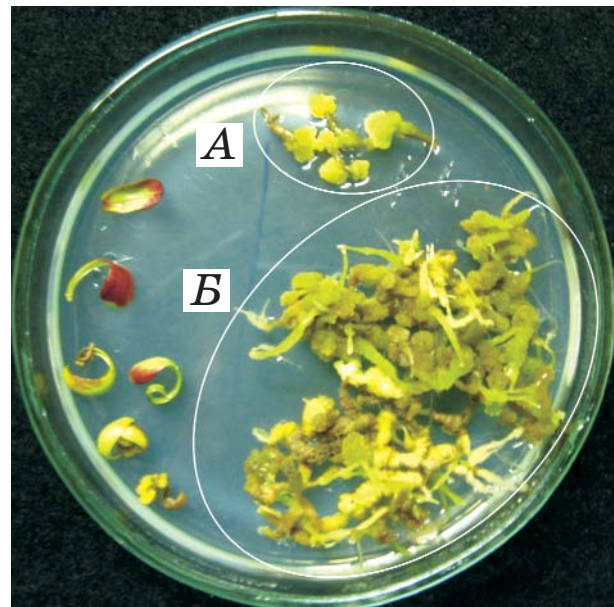


Рис. 5. Калюсоутворення на стеблових (А), ризогенез та калюсоутворення на корневих (Б) експлантах із рослини *G. lutea* лемської популяції (середовище МС з 5 мг/л ТДЗ і 0,01 мг/л НОК)

Пряма регенерація з корневих, стеблових та листкових експлантів рослин *Gentiana lutea* L. з різних популяцій Українських Карпат

Популяція	Кількість рослин-донорів експлантів	Кількість висаджених експлантів	Кількість експлантів з регенерантами	Середнє значення ВР, %	СКР, рег./експл. з рег.	ЕР, рег./експл.
<i>Кореневі експланти</i>						
Трояська	10	128	103	82,1±3,4	4,05	3,41
Лемська	6	104	88	88,6±3,1	3,64	3,43
Пожижевська	5	48	31	66,5±6,8	4,4	2,9
Рогнеська	2	15	11	73,3±11,4	3,72	2,73
Загалом для чотирьох популяцій	23	295	233	75,1±2,5	3,95	3,1
<i>Стеблові експланти</i>						
Трояська	10	40	8	20,0±6,3	1,0	0,216
Лемська	6	54	8	19,2±5,4	0,83	0,213
Пожижевська	5	32	6	17,5±6,7	0,75	0,18
Рогнеська	2	17	1	5,9±5,7	1,0	0,06
Загалом для чотирьох популяцій	23	143	23	15,6±3,0	0,9	0,17
<i>Листкові експланти</i>						
Трояська	10	11	0	–	–	–
Лемська	6	5	0	–	–	–
Пожижевська	5	5	0	–	–	–
Рогнеська	2	2	0	–	–	–
Загалом для чотирьох популяцій	23	23	0	–	–	–

Примітка: ВР = (Nr/N)×100%, де ВР — відсоток регенерації; Nr — кількість експлантів, на яких утворилися регенеранти; N — кількість висаджених експлантів;
 СКР = R/Nr, де СКР — середня кількість регенерантів на один експлант з регенерантами; R — кількість регенерантів; Nr — кількість експлантів, на яких утворилися регенеранти;
 ЕР = R/N, де ЕР — ефективність регенерації; R — кількість регенерантів; N — кількість висаджених експлантів.

Середнє значення ефективності регенерації коренів із корневих експлантів рослин чотирьох досліджених популяцій становило 3,1 рег./експл.; пагонів зі стеблових — 0,17 рег./експл. (таблиця). Інші показники регенераційної здатності (ВР та СКР) під час гомогенезу також були значно меншими порівняно з ризогенезом.

Нами виявлено відмінність регенераційної здатності різних типів експлантів *G. lutea*. Листкові експланти на протестованих варіантах середовищ нездатні до регенерації. Регенераційна здатність стеблових експлантів значно менша порівняно з корневими. На стеблових експлантах відбувалося як пагоноутворення, так і ризогенез, тоді як на

корневих — лише ризогенез. На обох типах експлантів поряд із морфогенезом в окремих випадках спостерігали калюсогенез.

Отже, ми встановили здатність тирличу жовтого до прямої регенерації *in vitro*. Виявлено особливості органогенезу з експлантів рослин з різних місць зростання. Зокрема, нами показано, що реакція рослин з чотирьох досліджених популяцій на умови культивування (вміст фітогормонів) значно відрізнялася (рис. 1–4). При цьому спостерігали відмінності як за відсотком регенерації, так і за кількістю регенерантів на експлант.

Показники регенерації були практично однаковими для рослин з лемської та трояської популяцій і найвищими у дослідженій

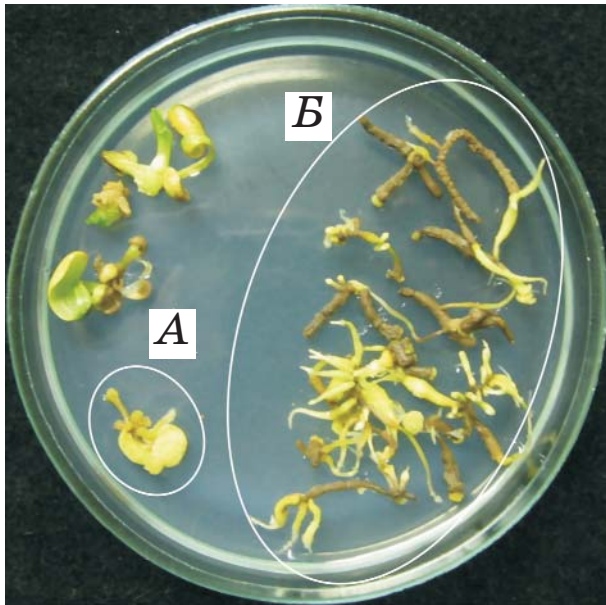


Рис. 6. Ризогенез та утворення калюсу на стебловому (А), ризогенез на корневих (Б) експлантах із рослини *G. lutea* лемської популяції (середовище МС з 10 мг/л ТДЗ і 0,01 мг/л НОК)

вибірці (таблиця). Значення ефективності ризогенезу в рослин з пожижевської і рогнеської популяцій були нижчими (2,9 і 2,7 рег./експл. відповідно). Ефективність регенерації пагонів зі стеблових експлантів рослин рогнеської популяції була найменшою у дослідженій вибірці — у 3–3,6 раза порівняно з рослинами інших популяцій (таблиця).

Відомо, що генотип материнської рослини суттєво впливає на показники регенерації. Різні генотипи за однакових умов можуть виявляти різну морфогенетичну реакцію [6, 7]. Наприклад, рис індійський *Oryza sativa* var. *indica* характеризується кращою здатністю до регенерації, ніж японський *Oryza sativa* var. *japonica* [7]. Різний морфогенетичний потенціал виявлено для шести генотипів *Primula vulgaris* [8]. Показано відмінності реакції різних цибулин унгернії Віктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko) на одні й ті самі умови культивування *in vitro* під час мікроклонального розмноження шляхом прямої регенерації [9].

Реалізація морфогенного потенціалу *G. lutea* залежала також від типу експланта. Для рослин усіх досліджених популяцій характерним було те, що з корневих експлантів формувалися лише корені, зі стеблових — переважно пагони. Лише у разі рослин лемської популяції на одному зі стеблових

експлантів відбувалося формування трьох коренів.

Кореневі експланти характеризувалися значно більшою регенераційною здатністю, ніж стеблові: середній показник ЕР з корневих експлантів у 18,2 раза був вищий порівняно зі стебловими (таблиця). Це дає підстави говорити про придатність підібраних умов культивування, зокрема концентрації та співвідношення фітогормонів, для індукування регенерації з корневих експлантів. Водночас, органогенез зі стеблових і листкових експлантів на аналогічних за складом середовищах був менш ефективним або взагалі не відбувався, що свідчить про необхідність подальшої оптимізації умов культивування для регенерації пагонів.

Отримати регенеранти із листкових експлантів рослин *G. lutea* з досліджених популяцій на жодному із варіантів середовищ нам не вдалося. Спроби інших дослідників ініціювати регенерацію додаткових пагонів з листкових експлантів як із цього виду, так і близького до нього виду *G. punctata* теж виявилися невдалими [10].

Отримані результати свідчать про залежність регенераційної здатності *G. lutea* від умов культивування, зокрема від екзогенних регуляторів росту.

Проведені нами раніше дослідження, спрямовані на підбір умов для органогенезу *G. lutea* з використанням різних комбінацій цитокінінів 6-бензиламінопурину (БАП), кінетину (Кін) та ауксинів НОК і 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д), дозволяли індукувати лише початкові етапи ризогенезу і гомогенезу, однак отримати життєздатні регенеранти не вдалося (неопубліковані дані). Разом з тим з літератури відомо, що ТДЗ має більшу, порівняно з іншими цитокінінами, здатність до індукції органогенезу у багатьох видів рослин [11], у т. ч. й тирличів [12]. Зокрема, підбираючи умови для регенерації дев'яти комерційних сортів *Gentiana*, виявили, що ТДЗ був більш ефективним цитокініном, ніж N-(2-хлоро-4-піридил)-N-фенілсечовина, 6-бензиладенін (БА) і зеатин, а НОК — ефективнішим ауксином, ніж індолілоцтова кислота (ІОК) або 2,4-Д [12].

Результати, наведені у даній роботі, свідчать, що використання ТДЗ і НОК у живильному середовищі МС індукувало регенерацію пагонів і коренів *G. lutea*. Також показано, що ефективність регенерації *G. lutea* залежала не лише від концентрацій фітогормонів, але й від їх співвідношення. Додавання до складу середовища 10 мг/л ТДЗ

і 1 мг/л НОК було оптимальним для регенерації коренів з кореневих експлантів рослин *in vitro* *G. lutea* лемської популяції. Для інших варіантів досліду найбільш ефективними виявилися дещо відмінні співвідношення цих фітогормонів, зокрема 10 мг/л ТДЗ і 0,01 мг/л НОК — для отримання регенерантів зі стеблових і кореневих експлантів рослин *in vitro* пожижевської популяції; 5 мг/л ТДЗ і 1 мг/л НОК — для стеблових і кореневих експлантів рослин з трояської популяції.

Такі самі фітогормони — ТДЗ і НОК — було використано Hosokawa K. зі співавт. для регенерації адвентивних пагонів тирличів з листкових і стеблових (5–10 мг/л ТДЗ і 0,1 мг/л НОК) та з кореневих (10 мг/л ТДЗ і 1 мг/л НОК) експлантів [12].

Отже, для розроблення системи ефективної регенерації *G. lutea* необхідно враховувати комплекс чинників: вибір вихідного генотипу, тип експланта та склад живильного середовища, зокрема ауксинів і цитокінінів, а також співвідношення їх концентрацій.

Таким чином, показано здатність тирличу жовтого (*G. lutea*) до утворення адвентивних пагонів та коренів шляхом прямої регенерації *in vitro*. Встановлено, що реалізація *in vitro* морфогенного потенціалу залежить від вихідного генотипу, типу експланта та умов культивування. Ефективність органогенезу з кореневих експлантів значно перевищувала ефективність із ділянок стебел. На листкових експлантах регенеранти не утворювалися.

ЛІТЕРАТУРА

1. Червона книга України. Рослинний світ / Ред. Я. П. Дідух. — К.: Глобалконсалтинг, 2009. — 900 с.
2. Страшнюк Н. М., Грицак Л. Р., Леськова О. М., Мельник В. М. Види роду *Gentiana* L. флори України у природі та культурі *in vitro* // Укр. бот. журн. — 2005. — Т. 62, № 3. — С. 337–348.
3. Страшнюк Н. М., Леськова О. М., Загричук Г. Я. та ін. Біологічно активні речовини видів роду *Gentiana* L. 1. Біосинтез та фізіологічна дія // Фітотерапія. — 2006. — № 1. — С. 31–41.
4. Страшнюк Н. М., Грицак Л. Р., Леськова О. М., Мельник В. М. Введення в культуру *in vitro* деяких видів роду *Gentiana* L. // Физиол. биохим. культ. раст. — 2004. — Т. 36, № 4. — С. 327–334.
5. Кучеренко М. Є., Бабенюк Ю. Д., Войцицький В. М. Сучасні методи біохімічних досліджень: навч. посібник. — К.: Фітосоціоцентр, 2001. — 424 с.
6. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. — К.: Наук. думка, 2005. — 270 с.
7. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
8. Schween G., Schwenkel H.-G. Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in the greenhouse of *Primula* ssp. // Plant Cell. Tissue Organ Cult. — 2003. — V. 72. — P. 53–61.
9. Кунах В. А., Можилевська Л. П., Бублик О. М. та ін. Мікроклональне розмноження унгернії Віктора (*Ungernia victoris*) // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 4. — С. 57–63.
10. Skrzypczak L., Wesolowska M., Skrzypczak E. *Gentiana* species: *in vitro* culture, regeneration, and production of secoiridoid glucosides // Y.P.S. Bajaj (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants IV. — 1993. — V. 21. — Springer Verlag, Berlin Heidelberg. — P. 172–186.
11. Ellis D. D., Barczynska H., McCown B. H., Nelson N. A comparison of BA, zeatin and tidiazuron for adventitious bud formation from *Picea glauca* embryos and epicotyl explant // Plant Cell. Tissue Organ Cult. — 1991. — V. 27, N 3. — P. 281–287.
12. Hosokawa K., Nakano M., Oikawa Y., Yamamura S. Adventitious shoot regeneration from leaf, stem and root explants of commercial cultivars of *Gentiana* // Plant Cell. Rep. — 1996. — V. 15. — P. 578–581.

**ПРЯМОЙ ОРГАНОГЕНЕЗ *IN VITRO*
ГОРЕЧАВКИ ЖЕЛТОЙ (*Gentiana lutea* L.)**

И. И. Конвалюк¹
Н. Б. Кравец²
Н. М. Дробык²
В. Н. Мельник¹
В. А. Кунах¹

¹Институт молекулярной биологии
и генетики НАН Украины, Киев

²Тернопольский национальный
педагогический университет
имени Владимира Гнатюка

E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Получены адвентивные побеги и корни путем прямого органогенеза *in vitro* из эксплантов стеблевого и корневого происхождения растений четырех популяций горечавки желтой (*G. lutea*). Установлено, что эффективность регенерации зависит от генотипа материнского растения, типа экспланта, содержания и соотношения в среде фитогормонов. Определено, что для получения регенерантов из стеблевых и корневых эксплантов наиболее эффективным было сочетание 5–10 мг/л тидиазурона и 0,01 или 1 мг/л 1-нафтилуксусной кислоты в питательной среде Мурасиге–Скуга. На листовых эксплантах регенеранты не образовывались. Показатели регенерации из корневых эксплантов были в несколько раз выше, чем из стеблевых.

Ключевые слова: *Gentiana lutea* L., регенерация *in vitro*, ризогенез, побегообразование.

**DIRECT ORGANOGENESIS *IN VITRO*
OF *Gentiana lutea* L.**

I. I. Konvalyuk¹
N. B. Kravets²
N. M. Drobyk²
V. M. Mel'nyk¹
V. A. Kunakh¹

¹Institute of Molecular Biology
and Genetics of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Volodymyr Hnatiuk Ternopil National
Pedagogical University

E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Adventitious shoots and roots through the direct organogenesis *in vitro* from the explants of stem and root origin have been generated for plants derived from four *G. lutea* populations. The efficiency of regeneration was found to vary with the genotype of maternal plant, kind of explants and phytohormone content and ratio in the nutrient medium. It was revealed that to generate the regenerants from the stem and root explants the most effective was combination of 5 to 10 mg/l thidiazuron with 0.01 or 1.0 mg/l 1-naphthaleneacetic acid in the Murashige-Skoog nutrient medium. The leaf explants failed to produce regenerants at all. The regeneration indices for root explants exceeded those for stem ones several times.

Key words: *Gentiana lutea* L., regeneration *in vitro*, rhizogenesis, shoot regeneration.