

М.О. ТВАРДОВСЬКА¹, Н.М. СТРАШНЮК²,
В.М. МЕЛЬНИК¹, В.І. АДОНІН¹, В.А. КУНАХ¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
03143, Київ, вул. Акад. Заболотного, 150
E-mail: kunakh@imbg.org.ua

² Тернопільський національний педагогічний університет
ім. Володимира Гнатюка
46027, Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2
E-mail: strashniuk@mail.ru

ХРОМОСОМНА МІНЛИВІСТЬ В КУЛЬТУРІ ТКАНИН РІДКІСНИХ ВИДІВ РОДУ ТИРЛИЧ (*GENTIANA L.*)



Проведено цитогенетичний аналіз рослин та культур
тканин *Gentiana lutea*, *G. punctata*, *G. acaulis*. Виявлено,
що культивування *in vitro* призводить до змін числа
хромосом у калюсах досліджених видів. Показано видову
специфічність мінливості геномів культивованих клітин.
Встановлено залежність цитогенетичної структури
культури тканин від генотипу вихідних рослин. З'ясовано,
що в калюсних тканинах тирличів (окрім культури *in vitro*
G. punctata, отриманої від рослини брескульської по-
пуляції) модальним класом були диплоїдні клітини і клі-
тини з біядиплоїдними наборами хромосом.

© М.О. ТВАРДОВСЬКА, Н.М. СТРАШНЮК, В.М. МЕЛЬНИК,
В.І. АДОНІН, В.А. КУНАХ, 2008

Вступ. Культура тканин вищих рослин може розглядатися з трьох точок зору – як унікальна біологічна система, як модель у фізіології рослин і як інструмент для різноманітних фундаментальних і прикладних досліджень та біотехнологій. Діапазон використання культури тканин як інструмента є досить широким. Найважливіші галузі її застосування – екологія, рослинництво, промислова біотехнологія. Культура тканин – це ефективний засіб збереження генофонду рідкісних видів, а також унікальних генотипів штамів-продуцентів [1]. До рослин, які знаходяться під загрозою зникнення і потребують збереження з використанням не лише традиційних, а й біотехнологічних методів, належать цінні лікарські рідкісні види роду тирлич (*Gentiana L.*).

Однак практичне використання культури тканин рослин стримується високим рівнем генетичних змін, які у деяких рослин за масштабами прирівнюються до міжвидових та міжсортових [2–4]. Кількість і спектр геномних змін залежить від багатьох чинників – виду рослини, особливостей її генотипу, віку, умов зростання, типу тканини, рівня спеціалізації клітин та ін. У процесі дедиференціації і проліферації в культурі *in vitro* відбувається підвищення рівня геномної мінливості, що проявляється в зміні кількості та морфології хромосом, їх структурних перебудовах, точкових мутаціях, диференціальній реплікації або елімінації різних послідовностей ДНК тощо [5–7].

Аналіз накопичених даних свідчить, що часто в культурі *in vitro* зміни геному одночасно можуть спостерігатися як на молекулярному, так і на цитологічному рівнях [5]. Молекулярно-генетичний аналіз отриманих нами калюсів *G. lutea*, *G. punctata* та *G. acaulis* [8], проведений методом блот-гібридизації, показав виникнення незначних змін рибосомної ДНК [9, 10]. Для комплексної оцінки цих культур тканин з метою їх подальшого практичного використання необхідним є проведення цитологічного аналізу. Тому завданням даної роботи було з'ясування цитогенетичної структури калюсів досліджених видів тирличів.

Матеріали і методи. Матеріалом для дослідження слугували інтактні рослини таких видів: тирлич жовтий – *G. lutea* (полонина Рогнеска, хребет Чорногора та гора Трояска, хр. Свидовець), тирлич крапчастий – *G. punctata* (г. Брескул, хр. Чорногора та г. Трояска, хр. Свидо-

вень), тирлич безстебловий – *G. acaulis* (г. Туркул та г. Ребра, хр. Чорногора), а також отримані від них культури тканин кореневого походження *G. lutea* та *G. punctata* – 7-го пасажу, *G. acaulis* (г. Ребра) – 9-го та *G. acaulis* (г. Туркул) – 10-го пасажу. Тривалість пасажу усіх калюсів становила 4 тижні.

Калюсні тканини вирощували на агаризованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга з половинним вмістом макро- та мікросолей (МС/2), доповненому 0,1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) і 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д). Детально умови отримання та вирощування калюсів досліджених видів описано в роботі [8].

Для цитологічного аналізу використовували корінці проростків довжиною 0,5–0,8 см, які з метою накопичення і синхронізації мітозів перед фіксацією витримували протягом 1 доби при +3–4 °С. Поряд з цим досліджували калюсні тканини на 7-му добу росту у період найвищої мітотичної активності. Зразки фіксували в суміші етанол : льодяна оцтова кислота у співвідношенні 3 : 1 впродовж 1 доби. Зафіксований матеріал зберігали у 70° етанолі. Зразки фарбували 1%-ним ацетоорсеїном і виготовляли давлені препарати. Кількість хромосом підраховували у 100 метафазних пластинках клітин культури тканин, а також в метафазах клітин апікальної меристеми корінців інтактних рослин (таблиця).

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

Результати досліджень та їх обговорення. Для роду *Gentiana* наводиться широкий діапазон хромосомних чисел: $2n = 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 38, 40, 42, 44, 48, 52$ й 96 [12]. До секцій цього роду можуть належати види з різними основними хромосомними числами. Окрім цього, для тирличів відомо про існування рослин з різними наборами хромосом (цитологічних рас) навіть в межах ареалу одного виду [13].

Дані аналізу каріотипів видів роду *Gentiana* з Українських Карпат, у тому числі *G. lutea*, *G. punctata* і *G. acaulis*, відсутні. Тому, зважаючи на варіабельність тирличів у природі, важливим завданням перед цитогенетичними до-

слідженнями культури тканин було з'ясування числа хромосом в інтактних рослинах цих видів з різних популяцій.

Проведений нами аналіз корінців інтактних рослин показав, що диплоїдний набір для представників виду з різних популяцій не відрізнявся і становив: для *G. acaulis* – $2n = 36$, для *G. lutea* та *G. punctata* – $2n = 40$.

Цитогенетичні дослідження калюсних культур *G. lutea* та *G. punctata* проводили на 7-му, *G. acaulis* – на 9–10-му пасажах, оскільки відомо, що зазвичай до 10–12-го пасажу відбувається становлення клітинної популяції. Саме для цього періоду характерні значні зміни, внаслідок яких відбувається адаптація клітинних угруповань як біологічної системи до змінених умов існування [5].

Аналіз культури тканин показав, що кількість хромосом в метафазах варіює як між калюсами, отриманими від рослин різних видів чи від рослин одного й того ж виду з різних популяцій, так і в межах однієї калюсної культури. Спостерігали широкий розмах мінливості числа хромосом, який для різних видів був різним (рис. 1). Зокрема, для *G. lutea* (пол. Рогнеска) він становив 18–130 хромосом з середнім числом на метафазу 41,9, тоді як для *G. lutea*

Хромосомні числа вивчених видів роду *Gentiana L.* з різних місць зростання в Українських Карпатах

Вид і місце зростання	Висота над рівнем моря, м	Вивчені проростки	Проаналізовані метафази	Число хромосом, $2n$
<i>G. lutea</i>				
пол. Рогнеска, хр. Чорногора	1650	6	18	40
г. Тряска, хр. Свидовець	1695	6	13	40
<i>G. punctata</i>				
г. Брескул, хр. Чорногора	1790	4	14	40
г. Тряска, хр. Свидовець	1704	5	40	40
<i>G. acaulis</i>				
г. Туркул, хр. Чорногора	1750	4	12	36
г. Ребра, хр. Чорногора	2001	6	14	36

(г. Трояска) – 19–84 хромосом з середнім числом на метафазу 37,8 при $2n = 40$. Значно більшим був розмах мінливості для *G. punctata* (г. Брескул) – 16–240 хромосом з середнім числом на метафазу 96,1 та для *G. punctata* (г. Трояска) – 18–220 хромосом з середнім числом на метафазу 62,8 при $2n = 40$. Найменшу варіабельність кількості хромосом у клітинах проявила культура тканин *G. acaulis* (г. Ребра) – 18–72 з середнім числом на метафазу 34,3, тоді як для *G. acaulis* (г. Туркул) – 16–107 з середнім числом на метафазу 34,9 при $2n = 36$.

У калюсі *G. acaulis* (г. Ребра) модальним класом були диплоїдні клітини (53%). У чотирьох досліджених культурах тканин переважали гіподиплоїдні клітини: у *G. lutea* (пол. Рогнеска) вони становили 66%, *G. lutea* (г. Трояска) –

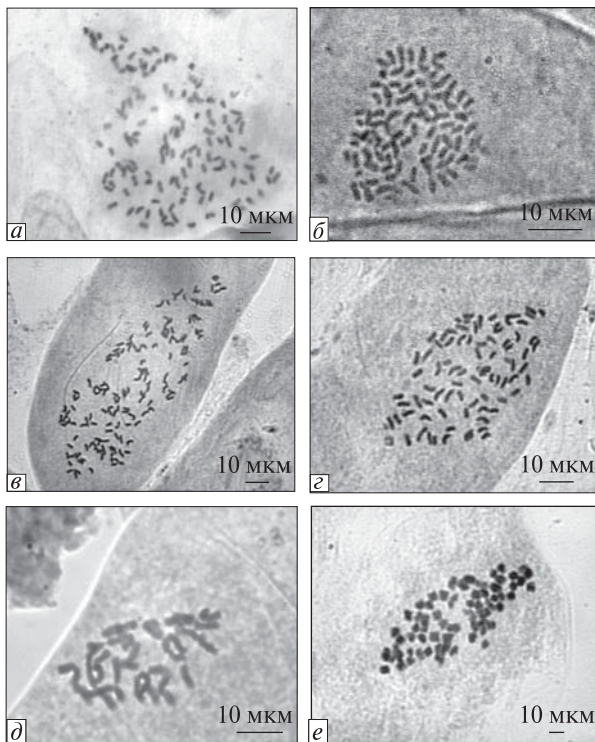


Рис. 1. Метафазні пластинки з різними числами хромосом у клітинах культури тканин видів роду *Gentiana* L.: а, б – *G. lutea* ($2n = 40$): 130 хромосом (гіпергексаплоїд) та 82 хромосоми (гіпертетраплоїд) відповідно; в, г – *G. punctata* ($2n = 40$): 108 хромосом (гіперпентаплоїд) та 80 хромосом (тетраплоїд) відповідно; д, е – *G. acaulis* ($2n = 36$): 36 хромосом (диплоїд) та 72 хромосоми (тетраплоїд) відповідно

50%, *G. punctata* (г. Трояска) – 36% та *G. acaulis* (г. Туркул) – 36%. Більшість клітинної популяції *G. punctata* (г. Брескул) склали клітини з кількістю хромосом, що перевищувала $6n$ (21%) (рис. 2).

Усі калюсні тканини характеризувалися наявністю поліплоїдних клітин. Найвищим їх відсоток був у культурі *G. punctata*, отриманій від рослини брескульської популяції, і становив 80%. Значно меншою була кількість таких клітин у калюсних тканинах *G. punctata* від рослини трояської (33%) та *G. lutea* від рослин трояської і рогнеської популяцій (15 і 12% відповідно). Найменша кількість поліплоїдних клітин виявлена нами в культурі тканин *G. acaulis* від рослин туркульської (8%) та реберської (4%) популяцій.

Поряд із поліплоїдією у досліджених клітинних популяціях спостерігали наявність значної кількості гіпо- та гіпердиплоїдних клітин. Високим їх відсоток був у культурах тканин *G. lutea* (пол. Рогнеска) – 78% та *G. lutea* (г. Трояска) – 66%; дещо нижчим – у калюсах *G. acaulis* (г. Туркул), *G. punctata* (г. Трояска) та *G. acaulis* (г. Ребра) – 54, 51 та 36% відповідно. Найменша кількість клітин з біядиплоїдним числом хромосом (14%) виявлена у культурі тканин *G. punctata* (г. Брескул).

Отже, аналіз культури тканин тирличів показав їх цитогенетичну варіабельність, що проявляється в міксоплоїдності клітинних популяцій у період становлення. Подібні результати отримані при аналізі калюсної культури іншого виду тирличів – *Gentiana scabra*, у якій поряд з диплоїдними ($2n = 26$) було виявлено анеуплоїдні та тетраплоїдні клітини [14].

Однак слід зазначити, що, незважаючи на значну міксоплоїдність клітинних популяцій досліджених видів, модальним класом у них, за винятком калюсної культури *G. punctata* (breskulska популяція), були клітини з диплоїдним або біядиплоїдним наборами хромосом. Це є свідченням порівняно незначного рівня хромосомної мінливості та збереження культурами тканин цитогенетичних особливостей вихідних видів.

У культурі тканин *G. punctata* (г. Брескул) модальним класом були клітини з кількістю хромосом, що перевищувала $6n$, а частка поліплоїдних клітин складала 80%. У калюсі цього

ж виду з трояської популяції відсоток поліплоїдних клітин також досить значний (33 %). Очевидно, висока здатність до поліплоїдизації в умовах *in vitro* є видовою особливістю *G. punctata*.

Відомо, що характер цитогенетичної варіабельності популяцій культивованих рослинних клітин істотно залежить від складу живильного середовища, на якому проходить їх ріст. Зокрема встановлено, що екзогенні фітогормони можуть бути однією з причин формування генетично гетерогенних поліплоїдних і міксоплоїдних штамів, часто з високим рівнем хромосомних аберацій. Показано, наприклад, що 2,4-Д стимулює ендополіплоїдію, політенію і амітози, викликає мейозоподібні процеси і мутації; БАП спричиняє додаткову реплікацію ДНК і мутації, а також є селективним чинником щодо поліплоїдних клітин [5]. Оскільки калюси досліджених видів тирличів культивували на живильних середовищах, доповнених БАП і 2,4-Д, то можна припустити, що однією із причин появи значної кількості поліплоїдних та анеуплоїдних клітин у культурі тканин був вплив цих регуляторів росту. Відомо також, що на одні й ті ж самі дози фітогормонів реакція різних генотипів може бути різною [5]. Тому, хоча усі досліджені нами калюси культивувалися на ідентичних за складом середовищах, доповнених однаковими концентраціями БАП і 2,4-Д, цитогенетична структура їх клітинних популяцій відрізнялася.

Ступінь прояву міксоплоїдності залежав від видової приналежності рослин. Найбільший розмах мінливості числа хромосом та відсоток поліплоїдних клітин виявлено в культурі тканин *G. punctata*, отриманих від рослин обох популяцій, тоді як для *G. acaulis* він найменший. Якщо в період становлення структури клітинних популяцій у калюсах *G. lutea* та *G. acaulis* переважали клітини з диплоїдним та біядиплоїдним наборами хромосом, то для культури тканин *G. punctata* від рослини як трояської, так і, в більшій мірі, брескульської популяції характерна поява значної кількості (17 і 21 % відповідно) клітин з високим (понад 6n) рівнем плоїдності.

Відомо, що поліплоїдія характерна для роду *Gentiana*: близько 48 % видів цього роду є природними поліплоїдами [15, 16]. Хоча усі дослід-

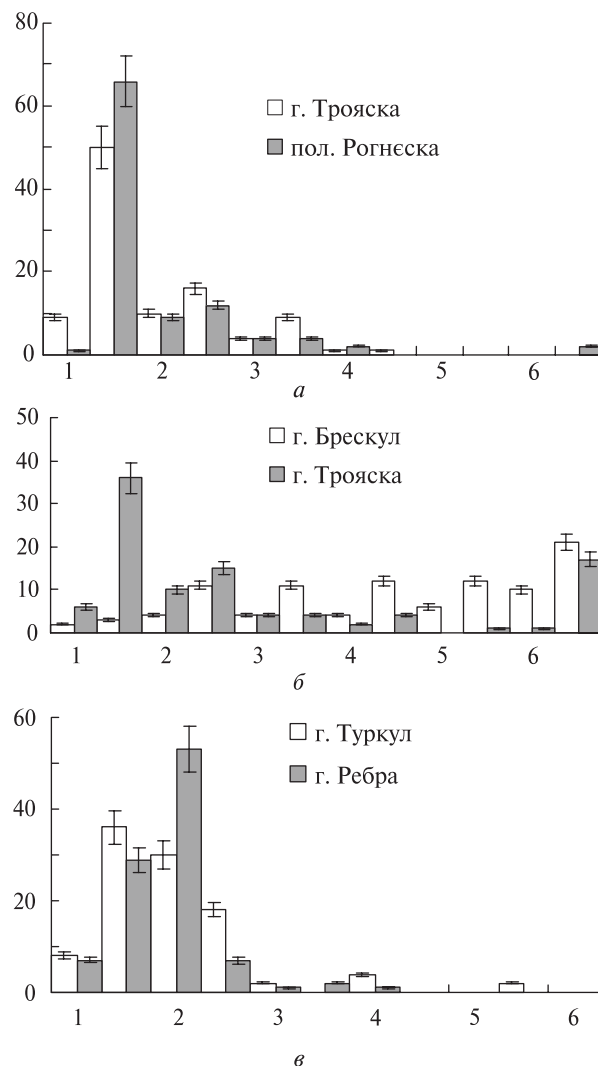


Рис. 2. Розподіл клітин за рівнем плоїдності в культурі тканин різних видів тирличів, отриманих від рослин з різних місць зростання в Українських Карпатах: а – *Gentiana lutea*, б – *G. punctata*, в – *G. acaulis*: по вертикалі – метафази, %; по горизонталі – число наборів хромосом, n. У кожній з досліджених клітинних популяцій вивчено по 100 метафаз

жені нами види є природними поліплоїдами їх адаптація до умов ізолюваного росту супроводжувалася різним рівнем поліплоїдизації.

Генетична варіабельність клітинних популяцій тирличів залежала і від генотипів вихідних рослин. Різна популяційна приналежність останніх є, очевидно, причиною різного рівня змін числа хромосом в однакових за тривалістю та умовами вирощування культурах. Калю-

си *G. punctata* відрізнялися за кількістю поліплоїдних клітин: їх відсоток у культурі тканин від рослини з брескульської популяції в 2,4 раза перевищував аналогічний показник з трояської популяції. В той же час у культурі тканин *G. punctata* (г. Трояска) виявлено більше (у 3,6 раза) анеуплоїдних клітин, ніж у калюсі іншої дослідженої популяції. Частка поліплоїдних клітин та клітин з біядиплоїдним набором хромосом у культурі тканин *G. acaulis*, отриманій від рослини з туркульської популяції, у 2 і 1,5 раза відповідно перевищувала такі показники у калюсі від рослин з реберської популяції. Культури тканин *G. lutea* від рослин з обох досліджених популяцій істотно не відрізнялися за часткою як анеу-, так і поліплоїдних клітин.

Проведений аналіз показав, що при культивуванні *in vitro* найбільші зміни (широкий розмах мінливості числа хромосом, високий відсоток поліплоїдних та анеуплоїдних клітин) відбувалися у калюсі *G. punctata*. У той же час в культурах тканин *G. lutea* і *G. acaulis* переважали клітини з диплоїдним та/або біядиплоїдним наборами хромосом.

За результатами проведеного раніше молекулярно-біологічного аналізу генів 5S та 18S–25S рРНК встановлено, що обидві повторювані послідовності ДНК характеризуються відносною стабільністю в культурі тканин досліджених видів тирличів. Індуковані культивуванням *in vitro* перебудови послідовності 18S–25S рибосомних генів виявлені лише в калюсі *G. lutea*, для генів 5S рРНК знайдено зміни тільки в характері метилювання у культивованих клітинах *G. acaulis* [9, 10].

Порівняння результатів цитогенетичних та молекулярно-біологічних досліджень свідчать про значні хромосомні зміни у культурі тканин *G. punctata*, які не відображаються на рівні варіабельності ДНК. У той же час на фоні змін генів 5S рРНК у калюсі *G. acaulis* та 18S–25S рРНК – у *G. lutea* в культурі тканин переважають клітини з диплоїдним та/або біядиплоїдним наборами хромосом. Причини та наслідки цих відмінностей потребують подальшого вивчення.

Висновки. Вирощування тканин *G. lutea*, *G. punctata* та *G. acaulis* в умовах *in vitro* призводить до цитогенетичних змін, що проявляють-

ся у міксоплоїдності клітинних популяцій. Виявлено вплив видової приналежності та генотипів вихідних рослин на варіабельність числа хромосом у досліджених калюсах. З'ясовано, що в культурах тканин тирличів (окрім калюсу *G. punctata*, отриманого від рослини брескульської популяції) модальним класом були диплоїдні клітини і клітини з біядиплоїдними наборами хромосом. Показано підвищену здатність *G. punctata* до поліплоїдизації в культурі *in vitro*, що, очевидно, можна вважати специфічною особливістю цього виду.

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

М.О. Твардовська, Н.М. Страшнюк,
В.М. Мельник, В.І. Адонін, В.А. Кунах

CHROMOSOME VARIABILITY IN THE TISSUE CULTURE OF RARE *GENTIANA* SPECIES

Cytogenetic analysis of plants and tissue culture of *Gentiana lutea*, *G. punctata*, *G. acaulis* has been carried out. Culturing *in vitro* was found to result in the changes of chromosome number in the calluses of the species involved. Species specificity for variation of the cultured cell genomes was shown. Contribution of the original plant genotypes to the cytogenetic structure of the tissue culture was established. *Gentiana* callus tissues (except for *in vitro* culture of *G. punctata*, derived from plant of Breskul'ska population) were found to exhibit modal class with the cells of diploid and nearly diploid chromosome sets.

М.О. Твардовская, Н.М. Страшнюк,
В.М. Мельник, В.И. Адонин, В.А. Кунах

ХРОМОСОМНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ РЕДКОСТНЫХ ВИДОВ РОДА ГОРЕЧАВКА (*GENTIANA* L.)

Провели цитогенетический анализ растений и культуры тканей *Gentiana lutea*, *G. punctata*, *G. acaulis*. Обнаружили, что культивирование *in vitro* приводит к изменениям числа хромосом в каллусах изученных видов. Установили видовую специфичность изменчивости геномов культивируемых клеток и зависимость цитогенетической структуры культуры тканей от генотипа исходных растений. В каллусных тканях горечавок (кроме культуры *in vitro* *G. punctata*, полученной от растения брескульской популяции) модальным классом были диплоидные клетки и клетки с околодиплоидными наборами хромосом.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиология растений. – 1999. – **46**, № 6. – С. 837–844.
2. Кунах В.А. Механізми та деякі закономірності соматоклональної мінливості рослин // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. – 2003. – № 1. – С. 101–106.
3. Андреев І.О., Спіридонова К.В., Кунах В.А. Перебудова рослинного геному в культурі тканин *in vitro* // Біополімери і клітина. – 2004. – **20**, № 1/2. – С. 42–49.
4. Linacero R., Alves E.F., Vazquez A.M. Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye // Theor. Appl. Genet. – 2000. – **100**. – P. 506–511.
5. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
6. Quiroz-Figueroa F., Mendez-Zeel M., Sanchez-Teyer F., Royas-Herrera R., Loyola-Vargas V. Differential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea arabica* // J. Plant Physiol. – 2002. – **159**. – P. 1267–1270.
7. Joachimiak A., Ilnicki T. Nuclear morphology, ploidy, and chromatin elimination in tissue culture of *Allium fistulosum* L. // Acta Soc. Bot. Pol. – 2003. – **72**, № 1. – P. 11–17.
8. Страшнюк Н.М., Грицак Л.Р., Леськова О.М., Мельник В.М. Введення в культуру *in vitro* деяких видів роду *Gentiana L.* // Физиология и биохимия культур. растений. – 2004. – **36**, № 4. – С. 327–334.
9. Андреев І.О., Спіридонова 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.
10. Мельник В.М., Андреев І.О., Спіридонова К.В., Страшнюк Н.М., Кунах В.А. Зміни 18S–25S рДНК у культурі тканин деяких видів тирличів *Gentiana L.* // Цитология и генетика. – 2007. – **41**, № 2. – С. 19–23.
11. Плохинский Н.А. Биометрия. Изд. 2-е. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – 367 с.
12. Yuan Y.-M. Karyological studies on *Gentiana section Cruciata* Gaudin (Gentianaceae) from China // Caryologia. – 1993. – **46**, № 2–3. – P. 99–114.
13. Rork C.L. Cytological studies in the *Gentianaceae* // Amer. J. Bot. – 1949. – **36**. – P. 687–701.
14. Lee M.-K., Bang J.-W., Lee H.-K. Chromosome stability in the cultured cells and the regenerated plants of *Gentiana scabra* var. *buergeri* // Chromosome Res. – 1995. – **3**, Supp. 1. – P. 116.
15. Favarger C. Contribution à l'étude caryologique et biologique des *Gentianaceae* // Bull. Soc. Bot. Suisse. – 1949. – **59**. – P. 62–86.
16. Skalinska M. Cytological studies in *Gentiana* species from the Tatra and Pieniny Mts. // Bull. Acad. Pol. Sci. Lett., Cl. Sci. Mat. Nat., ser. Sci. B Nat. – 1951. – № 1–3. – P. 119–136.

Надійшла 10.01.07