

ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ВІДКАСНИКА БЕЗСТЕБЛЕВОГО

Р.О.Петріна, Р.Т.Конечна, О.Р.Побігушка, С.О.Матвійків

Національний університет „Львівська політехніка”

Кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

Наведено результати введення в культуру *in vitro* відкасника безстеблевого (*Carlina acaulis*). Досліджено ефективність різних методів стерилізації, вибрано найефективніший, підбрано оптимальні умови для введення в культуру та культивовано відкасник безстеблевий (*Carlina acaulis*).

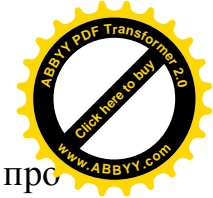
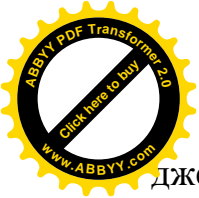
Results introduction to the culture *in vitro* *Carlina acaulis*. Investigated the efficiency of various methods of sterilization, selected the most effective, chosen optimum conditions for the introduction to the culture and cultured *Carlina acaulis*.

Ключові слова: відкасник безстеблевий, *Carlina acaulis*, калусогенез, фітогормони, калус, експлант.

Постановка проблеми.

Більше третини фармакологічних препаратів в даний час містять сполуки рослинного походження. Однак використання природних джерел лікарської сировини призводить до скорочення їх ареалу в результаті необмеженого збору або впливу антропогенних факторів. Тому альтернативним джерелом є вирощування лікарських рослин методом культури клітин і тканин. Цей метод має ряд переваг в порівнянні зі збором лікарської сировини в природі і вирощуванням рослин на полях [1,2]. Технологія *in vitro* дозволяє регулювати ріст рослинних клітин і накопичення ними біологічно активних речовин, оптимізуючи живильне середовище.

Однією з цінних лікарських культур є відкасник безстеблевий – продуцент унікального комплексу біологічно активних сполук. *Carlina acaulis* (родина складноцвіті *Asteraceae*) занесено до Європейського червоного списку. Зустрічається ця рослина в Карпатах та Прикарпатті, на Гологорах (Львівська і Хмельницька області) на трав'янистих схилах, по чагарниках, на узліссях [3,4]. Корінь відкасника містить дубильні й смолисті речовини, інулін (18-22%), барвники, ефірну олію (1,5-2,1%) та цукор. Листя містять флавоноїди: 7-глікозид апігеніна, оріентир, гомооріентин, вітексин, ізошафтозид. Препарати *Carlina acaulis* використовують як відхаркувальний, проносний, потогінний та сечогінний засіб при ниркових набряках, затримці менструацій, при простудних захворюваннях сечових органів та нирок, при катарах легень. Ефірна олія діє бактерицидно відносно *Staphylococcus*, *Enterococcus*, сальмонели та шигели. Настій порошку кореня відкасника на вині проганяє солітери. Відваром підвищеної міцності обмивають рани, які погано гояться, лікують лишай та інші хвороби шкіри. Введення *Carlina acaulis* в культуру *in vitro* відкриває перспективу цілорічного отримання рослинного матеріалу в якості можливого



джерела біологічно активних сполук. У науковій літературі відомості про введення в культуру *in vitro* представників роду *Carlina* скромні і відривчасті [5]. У зв'язку з цим застосування біотехнологічних підходів для одержання відкасника як сировини біологічно активних сполук для медичної та фармацевтичної промисловості сьогодні є одним з перспективних напрямків сучасної біотехнології.

Аналіз попередніх досліджень і публікацій.

На даний час в Україні культивовано в умовах *in vitro* багато рослин, в тому числі і лікарських. Це є перспективним напрямком для одержання БАР та для створення безвірусних сортів рослин. Дослідження по введенню рослин в культуру проводяться в Нікітському ботанічному саду, Ужгородському і Дніпропетровському університетах та в інших навчальних та науково-дослідних інститутах України [6-8].

Мета. Метою роботи було введення в культуру *Carlina acaulis*, підбір оптимального живильного середовища, стерилізуючих агентів, температури, освітлення та інших параметрів для індукції калусогенезу і вивчення регенеративної здатності рослини в умовах *in vitro*.

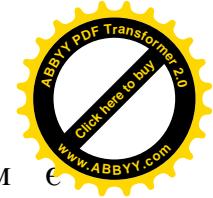
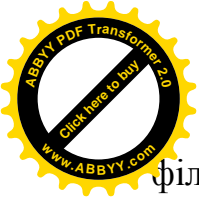
Експериментальна частина. У якості первинних експлантів використано насіння *Carlina acaulis*, зібране у липні-серпні в Українських Карпатах у с.Славське.

Вид стерилізуючої речовини, її концентрація і тривалість застосування залежать від густини і чутливості тканини, яка буде стерилізуватися. Правильний вибір стерилізуючої речовини полягає в тому, щоб вона згубно діяла на всі мікроорганізми і в той же час мінімально пошкоджувала тканини. Ще однією важливою умовою є те, що стерилізуюча речовина повинна легко видалятися із тканини промиванням дистильованою водою або розкладатися. Інакше відбувається отруєння тканин, що негативно впливає на утворення і ріст калусу.

Як стерилізуючі агенти використано перексид водню (30%), етиловий спирт (70%) та різний час експозиції. Промивали стерильною дистильованою водою три рази по 5 хв. Стерилізацію насіння проводили в стерильних хімічних склянках, накритих чашками Петрі. Культивування проведено на середовищах Мурасиге-Скуга, Гамборга та Уайта, використовуючи традиційні методи біотехнології. Умови культивування: освітлення 2000 лк, температура 23°C ($\pm 2-3$ °C), відносна вологість 60-70%, 16-годинний фотоперіод.

Результати та їх обговорення.

У даній роботі для проростання насіння використано середовища з мінеральними основами по Мурасиге-Скугу [9], Гамборгу та Уайту. На кожне середовище висаджувалось 60 насінин. Важливим етапом є також вибір стерилізуючого агента та часу експозиції, щоб одержати асептичні проростки. Тому спочатку насінини поміщали у етиловий спирт 70%-ий на 2-3 хв, а потім витримували в різних стерилізуючих агентах – перекис водню (30%), гіпохлорит Na NaClO (10%), сулема HgCl₂ (0,1%) (табл.1), промивали трьохразово у стерилізованій бідистильованій воді і переносили на стерильний



фільтрувальний папір у чашки Петрі. Найоптимальнішим варіантом є використання як стерилізуючого агента гіпохлориту Na та час експозиції 20 хв, так як у цьому випадку найвища життєздатність експлантів.

Таблиця 1

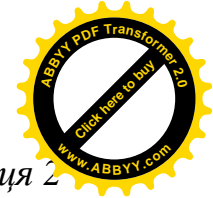
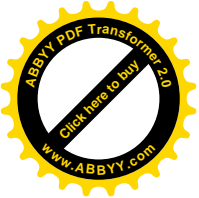
Умови стерилізації експлантів

Рослина	Кількість експлантів, шт	Стерилізуючий агент	Час експозиції, хв	Вихід життєздатних експлантів, %
Насіння <i>Carlina acaulis</i> на середовищі Мурасиге-Скуга	10	Перекис водню	10	35
	10		20	40
	10	Гіпохлорит натрію	10	45
	10		20	80
	10	Сулема	10	35
	10		20	65
Насіння <i>Carlina acaulis</i> на середовищі Гамборга	10	Перекис водню	10	15
	10		20	20
	10	Гіпохлорит натрію	10	35
	10		20	65
	10	Сулема	10	25
	10		20	50
Насіння <i>Carlina acaulis</i> на середовищі Уайта	10	Перекис водню	10	10
	10		20	20
	10	Гіпохлорит натрію	10	40
	10		20	60
	10	Сулема	10	25
	10		20	45

Найкращим для проростання насіння *Carlina acaulis* виявилось середовище по Мурасиге-Скугу. На цьому середовищі спостерігалась висока життєздатність і швидке проростання насіння – 14 діб. Найоптимальніша схема стерилізації для висаджування насіння *Carlina acaulis* на середовищі Мурасиге-Скуга така: 70% етиловий спирт (2-3хв) - гіпохлорит Na (20хв) – стерилізована бідистильована вода трічі.

Наступним етапом було подальше культивування *Carlina acaulis*. Сегменти асептично вирощених проростків служили експлантами для ініціації калусогенезу, а саме корінці, меристематичні верхівки і гіпокотиль. Культивування проводили на середовищі Мурасиге-Скуга з додаванням фітогормонів. Велике значення мають концентрація і співвідношення фітогормонів у середовищі. В якості фітогормонів використовували індолілоцтову кислоту (ІОК), α -нафтил-1-оцтову кислоту (НОК), 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д), бензиламінопуридин (БАП) та кінетин. Використано три варіанти живильного середовища МС. Перший варіант – з БАП 0,5 мг/л, НОК 0,1 мг/л; другий варіант – з 2,4-Д 1,0 мг/л, ІОК 2,0 мг/л; третій варіант – з НОК 0,5 мг/л, ІОК 3,0 мг/л, кінетин 0,5 мг/л. Результати наведені в таблиці 2.

Одночасно на кожному з трьох варіантів модифікованого середовища МС проводився дослід в 6 чашках Петрі, в кожній з яких було по 12 експлантів (72 експланти – 24 сегменти корінців, 24 сегменти меристематичних верхівок і 24 сегментів гіпокотилію).



Таблиця 2

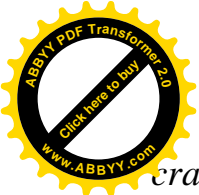
Вплив фітогормонів на ріст калусу *Carlina acaulis* L. протягом 5 тижнів

Середовище МС	Фітогормони	Конц. фітогормонів, мг/л	К-сть життєздатних експлантів, шт					Відсоток життєздатних експлантів, %
			1-й тиждень	2-й тиждень	3-й тиждень	4-й тиждень	5-й тиждень	
перший варіант	БАП НОК	0,5 0,1	68	62	57	51	45	62,5
другий варіант	2,4-Д ІОК	1,0 2,0	55	46	36	30	28	38,9
третій варіант	НОК ІОК кінетин	0,5 3,0 0,5	65	58	55	55	55	76,4

Максимальний відсоток життєздатних експлантів (76,4%) спостерігалась на середовищі з вмістом гормонів ІОК, НОК та кінетину в концентрації 3,0 мг/л; 0,5 мг/л; 0,5 мг/л відповідно. Особливо життєздатними виявилися експланти із сегментів гіпокотилію, спостерігалась вища частота калусогенезу та збільшення наростання калусної біомаси на 15%. З часом культивування на середовищі першого і другого варіанту кількість життєздатних експлантів зменшувалась, багато відмирало. А після 40 діб на другому варіанті середовища експланти загинули. Введення *Garlina acaulis* в культуру проводили в умовах темряви і світла (2000 лк) при 16 годинному фотоперіоді та температурі 23°C. Через 4-5 тижнів культивування первинний калус можна переносити на свіже живильне середовище такого ж складу. Протягом 5тижнів здійснено мікробіологічний, візуальний контроль та біохімічний. Візуальний контроль проводили не рідше одного разу в 3 дні – відбраковували інфіковані тканини.

Висновки. Таким чином, у культуру *in vitro* введено відкашик безстеблевий *Carlina acaulis*. Підібрано схему стерилізації насіння з найбільшим виходом асептичних експлантів 65%. Вибрано середовище МС для проростання насіння, так як на ньому спостерігається найбільша життєздатність(50%) і швидке проростання насіння – 14 діб. Первинні калуси отримано з корінців, меристематичних верхівок та гіпокотилію насінневих проростків. У результаті проведених експериментів встановлено склад живильного середовища та інші умови, які дозволяють отримати максимальний приріст біомаси. Приріст калусу залежав від концентрації фітогормонів, умов освітлення та від походження експланту. На даний час проводиться робота по дослідженню якісного та кількісного складу калусної маси *Carlina acaulis*.

1. Биотехнология растений: культура клеток/ Пер.с англ. В.И.Негрука; с предисл. Р.Г.Бутенко. М., 1987. 2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М., 1962. 3. Н. М Солодовніченко, М.С. Журавльов, В.М. Ковальов. Лікарська рослинна сировина та фітопрепарати. - Харків: МТК-книга, 2003. 4. Комендар В.І., Скунець П.М., Гнатюк М.Ю. Зелені перлини Карпат. – Ужгород: Карпати, 1985. 5. Trejgell A., Vendarek M., Tretyn A. Micropropagation of *Carlina acaulis* L. // Acta Biologica



cracoviensia. – 2009. –V.51, N1. P.97-103. 6. Петріна Р.О., Маснюк Я.Т. Калусогенез у культурі *in vitro* арніки гірської // Вісник Національного ун-ту «Львівська політехніка». Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2008. - №609. - С. 151-1555. 7. Kumlehn J., Schieder O., Lorz H. *In vitro* development of wheat (*Triticum aestivum* L.) from zygote to plant via ovule culture. // *Plant Cell Reports*. Vol. 16. №10.1997. P. 663-667. 8. О. Тусик, Н. Дробик. Введення в культуру *in vitro* арніки гірської // Вісник Київського національного ун-ту ім. Т.Шевченка. Серія: Біологія, інтродукція та збереження рослинного різноманіття. – 2011.- С.66-70. 9. Murashige T. // *Ann. Rev. Plant Physiol.* – 1974. – 25. – P. 147-148.