

ТЕХНОЛОГІЯ БРОДІННЯ, БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА ФАРМАЦІЯ

УДК 582.998:57.086.83+581.143.6:58.085

А. О. Герштун, Р. О. Петріна

Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

КУЛЬТИВУВАННЯ ГОРИЦВІТУ ВЕСНЯНОГО (*ADONIS VERNALIS*) В УМОВАХ *IN VITRO*

© Герштун А. О., Петріна Р. О., 2016

Наведено результати введення *Adonis vernalis* в культуру *in vitro*. Підібрано оптимальні умови для проростання насіння, одержання калусу та індукції калусоутворення. Підібрано спосіб стерилізації насіння з найкращим відсотком ефективності стерилізації. Використано три варіанти живильних середовищ з різним вмістом фітогормонів ІОК, НОК та кінетику для культивування горицвіту весняного, а також підібрано найкраще за найвищим відсотком життєзданих експлантів.

Ключові слова: горицвіт весняний, *Adonis vernalis*, культивування, калусогенез, фітогормони, калус, експлант.

A. O. Hershtun, R. O. Petrina

CULTIVATION OF ADONIS SPRING (*ADONIS VERNALIS*) IN CONDITIONS *IN VITRO*

© Hershtun A. O., Petrina R. O., 2016

Article shows results of the introduction of *Adonis vernalis* to the *in vitro* culture. The optimal conditions are found for seed germination, reception and induction of callusogenesis. Method of sterilization of seeds with the best percentage efficiency of sterilization was chosen. Were used three variants of culture media with different content of phytohormones IAA, NOC and kinetycs for Adonis spring cultivation and the best for the highest percentage viable explants was chosen.

Key words: *Adonis vernalis*, callusogenesis, phytohormony, callus, explants.

Постановка проблеми. Сьогодні у медичній, народній або ветеринарній практиці застосовують понад 3000 видів рослин, з них близько 100 спеціально вирощують, а решта – дикорослі. Більшість з цих рослин (рідкісні або зникаючі види; тропічні, субтропічні, альпійські тощо) в Україні взагалі не ростуть. Відомо, що лікарські рослини є сировиною з великим вмістом вторинних метаболітів і використовуються у фармацевтичному виробництві для отримання лікарських засобів. Крім того, біологічно активні речовини, отримані з вищих рослин, мають складну хімічну будову, багато з таких природних сполук або не можна, або надзвичайно важко синтезувати хімічним шляхом. Внаслідок зменшення природних ресурсів вітчизняних лікарських рослин, які свого часу дозволяли бути Україні однією з провідних країн, в якій вирощували і

заготовлювали рослинну сировину, постає питання пошуку нових джерел виділення біологічно активних сполук.

Сучасні методи біотехнології та клітинної біології пропонують шляхи вирішення проблеми. Актуально сьогодні запропонувати альтернативний метод вирощування клітин, тканин і органів рослин у контрольованих умовах на штучних живильних середовищах з одержанням рослинної біомаси у необмеженій кількості. Вона може бути використана як лікарська сировина, бо є екологічно чистою, не забрудненою хімічними добривами, пестицидами, гербіцидами, важкими металами, радіоактивними ізотопами тощо. Для одержання біомаси, яка за якістю близька, а в деяких відношеннях є кращою за сировину, що заготовлюється в природі, не потрібні якісь особливі ґрунтово-кліматичні умови. Цей підхід має низку переваг, тому можна отримувати біомасу у великих кількостях, що не завдає шкоди природі, особливо це стосується рослин, які занесені до Червоної книги.

Цікавою щодо введення культури клітин в умовах *in vitro* є рідкісна лікарська рослина Карпат – *Adonis vernalis*, що знаходиться під загрозою знищення і занесена до Червоної книги України. Горицвіт весняний (*Adonis vernalis*) належить до родини Жовтецеві (*Ranunculaceae*). Науковий інтерес до вивчення горицвіту весняного пояснюється наявністю в ньому комплексу цінних біологічно активних сполук, зокрема, таких серцевих глікозидів, як цимарин і адонитоксин та інших маловивчених глікозидів; також таких флаваноїдів, як адіоверин, цукрів рамнози і цимарози та сапонінів. Рослину застосовують у традиційній та народній медицині як ефективний природний, біологічно дійовий засіб для лікування та профілактики різних захворювань. Для лікувальних цілей використовують всю надземну частину рослини, яку необхідно заготовляти під час цвітіння або дозрівання плоду. Фармакологічні властивості препаратів горицвіту полягають у підсиленні і сповільненні серцевих скорочень, збільшенні ударного хвилинного об'єму серця, заспокоєнні нервової системи при вегетосудинних дистоніях, кардіоневрозах тощо.

Метою роботи є введення в культуру *in vitro* горицвіта весняного (*Adonis vernalis* L.) та розроблення методики культивування в найсприятливіших умовах, що необхідні для утворення калусної біомаси.

Аналіз попередніх досліджень і публікацій. Важливими та ефективними методами збереження рослинного різноманіття є використання біотехнологічних підходів, а саме культури *in vitro*. Особливе місце посідає метод введення у культуру лікарських рослин *in vitro*, що використовується для створення колекцій сортів та видів, необхідних для селекційно-генетичних робіт та для збереження зникаючих, рідкісних рослин. Часто у такий спосіб виділяють культивовану біомасу, яка містить біологічно активні речовини. Відповідно, вона є цінною сировиною у технології отримання лікарських препаратів. Застосування методу дозволяє не тільки впровадити їх у виробництво, а й на початкових етапах значно зекономити витрати.

Технологія отримання культивованої біомаси для багатьох рослин передбачає уже розроблені і оптимізовані умови для всіх етапів процесу, що зумовлює його високу відтворюваність та результативність. Вона має низку переваг порівняно з традиційними методами вирощування. Цей метод передбачає використання стандартного обладнання низької енергоємності, проведення досліджень впродовж року незалежно від кліматичних умов на незначних площах.

Багаторічні спроби введення *Adonis vernalis* у культуру в Україні позитивного результату не дали. Створення промислових плантацій виду в Україні і надалі є актуальним. Незважаючи на широке застосування та велику кількість експериментальних даних, отриманих під час використання *Adonis vernalis*, окремі аспекти цього методу ще досі не розроблені. Тому удосконалення деяких етапів зазначеного методу для культури цього виду є актуальними.

Отже, сьогодні переважно використовують метод культури клітин, тканин та органів для мікроклонального розмноження рослин горицвіту весняного, а вирощуванню калусної біомаси для використання її як джерела біологічно активних сполук присвячено не так багато публікацій.

Виклад основного матеріалу і обговорення результатів. Метод введення в культуру *in vitro* *Adonis vernalis* полягає у вирощуванні недиференційованої біомаси рослини на модифікованому середовищі Мурасиге-Скуга за строго контрольованих умов. Важливим у технології отримання калусної біомаси є вибір вихідного матеріалу. У роботі як експланти для культивування горицвіта весняного було використано проросле насіння горицвіта весняного та асептично оброблені тканини інтактною рослини, зокрема бруньки і листки, що отримані з Ботанічного саду ЛНУ імені Івана Франка.

Першим кроком у підготовці насіння є замочування його у воді протягом доби, що сприяє кращому проростанню насіння та виводить його із стану спокою. Наступним кроком є стерилізація насіння. Спочатку насіння у ламінарному боксі поміщали у етиловий спирт 96 %-й на 5 хв, а потім витримували в різних стерилізуючих агентах (30 % перекис водню та 10 % гіпохлорит натрію), промивали три рази по 5–10 хв у стерилізованій бідистильованій воді і переносили у чашки Петрі. Час стерилізації зазвичай підбирають експериментально – у цьому випадку це було 20, 30, 40 хв. Результати наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Ефективність проростання *Adonis vernalis* на середовищі МС

Тип стерилізації	Тривалість, хв	Загальна к-ть експлантів, шт.	Кількість інфікованих експлантів	Кількість неінфікованих експлантів	Кількість пророслого насіння	Ефективність стерилізації, %
Перекис водню (30 %)	20	по 30	10	20	4	66
	30		8	22	9	72
	40		7	23	12	74
Гіпохлорит натрію (10 %)	20	по 30	15	15	5	50
	30		8	22	9	72
	40		5	25	13	75

Отже, наведені дані показують, що для отримання найбільшої кількості неінфікованого життєздатного насіння потрібно стерилізувати посадковий матеріал у гіпохлориті натрію (10 %) або перекисі водню (30 %) протягом 40 хв. Ефективність стерилізації становить 75–74 % відповідно.

Після стерилізації насіння вміщували у живильне середовище Мурасиге-Скуга без фітогормонів, отримане за відомою методикою і протягом двох тижнів проводили візуальний контроль. Проростало насіння *Adonis vernalis* L. протягом 4 тижнів на середовищі Мурасиге-Скуга (МС) за температури 24–26 °С і освітлення 3000л к. Рослини, отримані на четвертий тиждень, використано як експланти для індукції калусогенезу. Їх введено в середовище МС з фітогормонами і через 5 тижнів отримано калусну біомасу.

Важливе значення має дослідження впливу регуляторів росту, що для кожної культури визначається експериментально. Тобто в процесі роботи було вивчено вплив концентрацій трьох регуляторів росту (кінетину, індолілоцетової (ІОК), нафтилоцетової (НОК) кислот та їх співвідношень на ініціацію такої морфогенетичної реакції, як утворення калусу на первинних експлантах різного походження.

Одночасно проводилося дослідження при внесенні в культуру як експлантів безпосередньо тканини інтактною рослини *Adonis vernalis*. Для дослідження використано як експланти частини листків, пагонів та бруньок рослини, попередньо оброблені асептиками. Тканини промито протягом 3 хв у мильному розчині, 10 хв у проточній воді, 10 разів у дистильованій воді, а далі простерилізовано спиртом (96 %) 3 хв і пергідролем (30 %) 40 хв. Експланти внесено в культуру у травні місяці від зовні здорових рослин *Adonis vernalis* без фізіологічних відхилень (рис. 1).

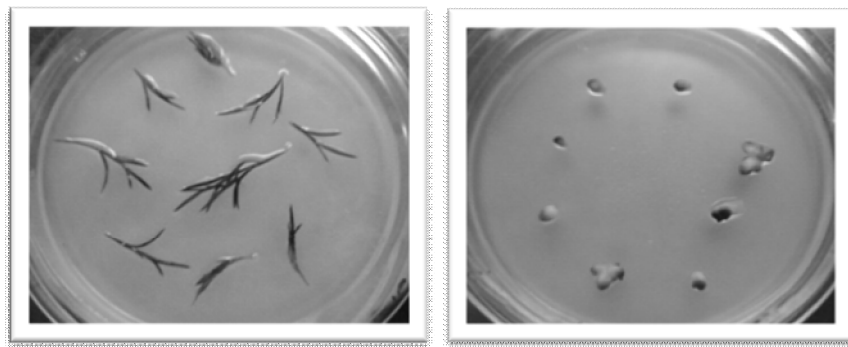


Рис. 1. Експланти з інтактної рослини (лишкові експланти та брунькові експланти) у перший день введення в культуру

Візуально аналізували експланти кожні 3 дні протягом чотирьох тижнів. На деяких експлантах спостерігали наростання калусної маси (рис. 2). Відбувалося їх потовщення, особливо помітне на кінцях сегментів, з поступовим розростанням аж до повного покривання масою первинного калусу. Також багато експлантів інфіковані, тому необхідно вибрати стерилізатор для обробки тканини.

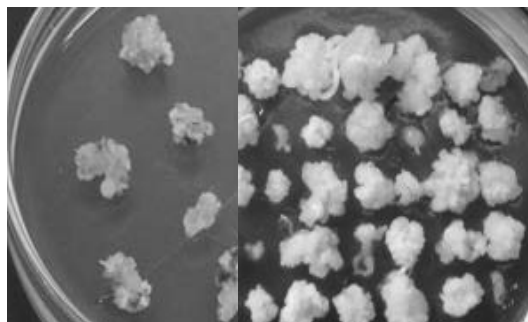


Рис. 2. Калусна біомаса *Adonis vernalis* L. на 14 та 21 добу

Для дослідження впливу регуляторів росту на ріст калусної маси та відсоток життєздатних експлантів було взято як експланти проростки, вирощені з насіння в умовах *in vitro*. Враховуючи те, що вони вирощені в асептичних умовах, відсоток інфікації менший, також вони адаптовані до середовища Мурасиге–Скуга.

Таблиця 2

Вплив фітогормонів на ріст калусу *Adonis vernalis* протягом 5 тижнів

Середовище МС	Фітогормони	Конц. фітогормонів, мг/л	К-сть життєздатних експлантів, шт.					Відсоток життєздатних експлантів, %
			1-й тиж-день	2-й тиж-день	3-й тиж-день	4-й тиж-день	5-й тиж-день	
перший варіант	НОК ІОК	1,0 2,0	68	62	57	51	45	62,5
другий варіант	ІОК НОК кінетин	1,0 2,0 0,5	55	46	36	30	28	38,9
третій варіант	НОК ІОК кінетин	1,0 2,0 0,02	65	58	55	55	55	76,4

Використано три варіанти живильного середовища МС. Перший варіант – з НОК 1,0 мг/л, ІОК 2,0 мг/л; другий варіант – з НОК 1,0 мг/л, ІОК 2,0 мг/л; кінетин 0,5 мг/л; третій варіант – з НОК

1,0 мг/л, ІОК 2,0 мг/л, кінетин 0,02 мг/л. Результати наведено в табл. 2. При меншій концентрації кінентину (0,02 мг/л) отримано більший відсоток життєздатних експлантів і відповідно більшу кількість біомаси. Максимальний відсоток життєздатних експлантів (76,4 %) спостерігався на середовищі з вмістом гормонів ІОК, НОК та кінетину в концентрації 1,0 мг/л; 2,0 мг/л; 0,02 мг/л відповідно.

Вводили *Adonis vernalis* L в культуру в умовах світла (3000 лк) при 16-годинному фотоперіоді та температурі 22–25 °С. Маса калусу при культивуванні коливається від 60 до 100 мг маси тканини на 30–40 мл живильного середовища. Протягом 5 тижнів здійснено візуальний контроль, який проводили не рідше одного разу в 3 дні – відбраковували інфіковані тканини.

Отже, у результаті проведених експериментів введено в культуру *in vitro* *Adonis vernalis*, встановлено склад живильного середовища та інші умови, які дозволяють отримати максимальний приріст калусної біомаси. Використано різні стерилізуючі агенти, різні типи експлантів, отримано калусну біомасу, яку під час експерименту можна використати для дослідження наявності біологічно активних речовин. Під час культивування *Adonis vernalis* найвищої ефективності досягають, дотримуючись оптимальних умов вирощування (освітлення, температура, відносна вологість повітря) на всіх етапах цього процесу.

Висновки. Опрацьовано літературні джерела щодо використання лікарських рослин, вмісту у їх складі біологічно активних речовин та застосування лікарських рослин у технології отримання культивованої біомаси в умовах *in vitro*. Введено в культуру *Adonis vernalis* L. та отримано асептичні проростки на середовищі Мурасиге–Скуга протягом 3 тижнів. Отримано калусну біомасу з проростків та інтактною рослини на середовищі Мурасиге–Скуга з додаванням регуляторів росту. Також досліджено вплив концентрації регуляторів на відсоток життєздатних експлантів та приріст біомаси. Найоптимальнішим середовищем виявилося середовище Мурасиге–Скуга з ІОК – 2,0 мг/л, НОК – 1,0 мг/л, кінетин – 0,02 мг/л (максимальне значення кількості життєздатних експлантів 76,8 %).

1. Бутенко Р. Г. *Культура ізолюваних тканин та фізіологія морфогенезу рослин*. – М.: Наука, 1964. – 272 с. 2. Воллосович А. Г. *Культура ізолюваних тканин і клітин рослин*. – М.: Наука, 1970. – С. 234–235. 3. Бутенко Р. Г. *Біологія культивованих клітин та біотехнологія рослин*. – М.: Наука, 1991. – 280 с. 4. Бутенко Р. Г. *Культура клітин рослин і біотехнологія*. – М.: Наука, 1986. – 286 с. 5. Червона книга України. *Рослинний світ* / за ред. Я. П. Дідуха. – К., 2009. 6. *Лікарські рослини: енциклопедичний довідник* / Відповідальний редактор А. М. Гродзінський. – К.: Видавництво “Українська енциклопедія” імені М. П. Бажана, Український виробничо-комерційний центр “Олімп”, 1992. – 544 с. ISBN 5-88500-055-7. 8. <http://fitoterapiya.org.ua/osnovni-pitannia/zagalni-vidomosti/vitamini.html>. 9. <http://www.npblog.com.ua/index.php/botanika/efirni-oliyi.html> 10. <http://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/408/flavonoidi>