

Р.О. Петріна, Р.Т. Конечна, О.Р. Побігушка, С.О. Матвійків
Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ВІДКАСНИКА БЕЗСТЕБЛЕВОГО

© Петріна Р.О., Конечна Р.Т., Побігушка О.Р., Матвійків С.О., 2013

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*).

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

Results of the introduction of *Carlina acaulis* into the *in vitro* culture are given. The efficiency of various methods of sterilization was investigated, the most effective of them was selected, the optimum conditions for the introduction into the culture were selected, and *Carlina acaulis* was cultivated.

Key words: *Carlina acaulis*, callusogenesis, phytohormones, callus, explant.

Постановка проблеми. Більше третини фармакологічних препаратів нині 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 деякі переваги порівняно 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*) занесена до Європейського червоного списку. Росте ця рослина в Карпатах та Прикарпатті, на Гологорох (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, орієнтир, гомоорієнтин, 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. Сьогодні в Україні культивовано в умовах *in vitro* багато рослин, зокрема і лікарських. Це є перспективним напрямком для одержання БАР та для створення безвірусних сортів рослин. Дослідження з введення рослин в культуру проводяться в Нікітському ботанічному саду, Ужгородському і Дніпропетровському університетах та в інших навчальних та науково-дослідних інститутах України та інших країн [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 цій 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 %-й 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 триразово 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, оскільки 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 (2–3 хв) – гіпохлорит Na (20 хв) – стерилізована бідистильована вода трічі.

Наступним етапом було подальше культивування *Carlina acaulis*. Сегменти асептично вирощених проростків слугували 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–дихлорфеноксоцтова кислота (2,4-Д), бензиламінопурин (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 табл. 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 %) спостерігали 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, спостерігалася вища частота калусогенезу та збільшення наростання калусної біомаси на 15 %. З часом культивування на середовищі першого і другого варіантів кількість життєздатних експлантів зменшувалась, багато відмирало. А після 40 діб на другому варіанті середовища експланти загинули. Введення *Carlina acaulis* в культуру проводили в умовах темряви і світла (2000 лк) при 16-годинному фотоперіоді та температурі 23 °С. Через 4–5 тижнів культивування первинний калус можна переносити на свіже живильне середовище такого ж складу. Протягом 5 тижнів здійснено мікробіологічний, візуальний контроль та біохімічний. Візуальний контроль проводили не рідше одного разу в 3 дні – відбраковували інфіковані тканини.

Висновки. Отже, у культуру *in vitro* введено відкашник безстеблевий *Carlina acaulis*. Підібрано схему стерилізації насіння з найбільшим виходом асептичних експлантів 65 %. Вибрано середовище МС для проростання насіння, оскільки 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. Нині проводиться робота з дослідження 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. Солодовніченко Н.М., Журавльов М.С., Ковальов В.М. 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., Bendarek 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 Нац. ун-ту “Львівська політехніка”*. Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2008. – № 609. – С. 151–155. 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 Київськ. Нац. 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.