

## ОДЕРЖАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ КАЛУСНОЇ БІОМАСИ *ADONIS VERNALIS* ТА *AQUILEGIA NIGRICANS*

© Ільків Б.-В. В., Костик Х. В., Петріна Р. О., 2018

Одержано калусну біомасу *Adonis vernalis* та *Aquilegia nigricans* на середовищі Мурасиге-Скуга з додаванням регуляторів росту (індолілоцтова кислота, нафтилоцтова кислота, кінетин) у кількості 0,1–2,0 мг/л та вітамінів (В1, В2, В6, фолієва кислота, біотин, нікотинамід, пантотенат) за 25 °С з фотоперіодом 16/8. Визначено основні вторинні метаболіти у калусних біомасах, зокрема серцеві глікозиди та загальні феноли. В екстрактах калусних біомас *Adonis vernalis* та *Aquilegia nigricans* виявлено меншу кількість загальних фенолів і більшу кількість серцевих глікозидів, ніж у екстрактах інтактних рослин.

**Ключові слова:** *Adonis vernalis*, *Aquilegia nigricans*, культивування, регулятори росту, калус, серцеві глікозиди, загальні феноли.

B.-V. V. Ilkiv, Kh. V. Kostyk, R. O. Petrina

## OBTAINING AND RESEARCH OF CALLUS BIOMASS *ADONIS VERNALIS* AND *AQUILEGIA NIGRICANS*

© Ilkiv B.-V. V., Kostyk Kh. V., Petrina R. O., 2018

The *Adonis vernalis* and *Aquilegia nigricans* calamus biomass was obtained on the Murassige-Skooga medium with the addition of growth regulators (indolyactic acid, naphthylactic acid, kinetics) in the amount of 0.02–2.0 mg/l and vitamins (B1, B2, B6, folic acid, biotin, nicotinamide, pantothenate) at 25 °C with photoperiod 16/8. The main secondary metabolites in callus biomass, including cardiac glycosides and common phenols, have been identified. In extracts of callus biomass of *Adonis vernalis* and *Aquilegia nigricans*, fewer common phenols and more cardiac glycosides were detected than in extracts of intact of plants.

**Key words:** *Adonis vernalis*, *Aquilegia nigricans*, cultivation, growth regulators, callus, cardiac glycosides, phenols.

**Постановка проблеми.** Альтернативним методом одержання біомаси рослин є метод культури клітин, тканин та органів *in vitro*. Отримана в такий спосіб біомаса є екологічно чистою, її можна отримувати протягом усього року, не зважаючи на пори року та погодні умови [1]. Її одержання є економічно вигідним та перспективним, оскільки вона містить такі вторинні метаболіти, як і вихідна рослина. Особливо важливо це для рослин, які є цінною сировинною базою для фармації та медицини. Деякі біологічно активні речовини (БАР) отримують із рослин, які є рідкісними, зникають. Також важливою передумовою вибору біотехнологічного методу є екологічне забруднення довкілля, що негативно впливає на лікарські рослини, погіршуючи їхню якість.

Деякі БАР отримують завдяки хімічному синтезу, але вони можуть проявляти негативну дію на організм людини. Серед речовин вторинного метаболізму цікаві різні глікозиди, які проявляють широкий спектр фармакологічної дії, вибірково кардіотонічну дію на серцевий м'яз. Як відомо, серцево-судинні захворювання займають перше місце у світі в загальній структурі захворювань, тому група цих речовин в арсеналі медичних засобів має першорядне значення. Найважливішим ефектом кардіотонічної дії глікозидів є їхній вплив на діяльність серця й апарат кровообігу загалом [2]. Глікозиди виявлено в калусних і суспензійних культурах деяких рослин [3–5]. Фенольні сполуки – найпоширеніші вторинні метаболіти рослин, які позитивно впливають на фізіологічні процеси в організмі людини, підвищуючи його резистентність. Тому пошук в культивованих клітинах рослин, які ще не досліджено, серцевих глікозидів та фенольних сполук є економічно та екологічно вигідною альтернативою сучасним джерелам отримання цих сполук.

**Метою роботи** є одержання калусної біомаси *Adonis vernalis* та *Aquilegia nigricans* за допомогою біотехнологічного методу культури клітин, тканин та органів *in vitro* та дослідження її на вміст основних вторинних метаболітів, зокрема серцевих глікозидів та загальних фенолів.

**Аналіз попередніх досліджень і публікацій.** *Adonis vernalis* та *Aquilegia nigricans* – рослини родини Жовтецевих, внесені в Червону книгу України. *Adonis vernalis*, багаторічна рослина, застосовується в медичній практиці для одержання препаратів кардіологічної дії, містить глікозиди (цимарин, адонізид, адонівернозид, адонітоксин), тритерпенові сапоніни, флавоноїди. *Adonis vernalis* введено в культуру *in vitro*, підібрано умови культивування та отримано калусну біомасу [6]. *Aquilegia nigricans* – багаторічна трав'яна рослина, маловивчена, у літературі дуже стислі відомості про неї, про хімічний склад, властивості [7]. Рід *Aquilegia* культивується і дуже популярний у ботанічних і приватних садах (існує велика кількість гібридів). Рослини є отруйними, і медикаментозного використання треба уникати. Проте деякі види роду використовують у гомеопатичному лікуванні. Цей вид є ендемічним для Європи та існує переважно у центрально-східних та південно-східних гірських регіонах, здебільшого в Австрії, у південно-східних Карпатах [8–10], Західній Україні та Північній Греції. Точні дані про місцевість проростання важко отримати. У літературі описано *Aquilegia vernalis* [11], яка містить алкалоїди (0,008–0,054 %), ціаногенні сполуки й аскорбінову кислоту (у свіжому листі), рослина отруйна. Галенові препарати *Aquilegia vernalis* мають сечогінні, жовчогінні, потогінні, знеболювальні, заспокійливі, послаблювальні й антисептичні властивості.

Вирощені *in vitro* клітини та тканини рослини широко використовують для виробництва вторинних метаболітів. Залежно від цілей, біотехнологічні методи використовують для з'ясування шляхів обміну речовин та поліпшення рослин для виробництва вторинних метаболітів. Рослини є потенційним джерелом різних фармацевтичних та промислових товарів, агрохімікатів, ароматичних та харчових добавок [12, 13]. Майже 30 % вироблених лікарських засобів рослинного походження. Тканина культури лікарських рослин забезпечує безперервне і надійне джерело цих БАР протягом року без знищення всієї рослини. Культура тканини *in vitro* пропонує ефективну та потенційну альтернативу виробництву БАР, тому що кількість вторинних метаболітів, одержаних у такий спосіб, може бути навіть більшою, ніж в інтактних рослинах [13, 14].

**Виклад основного матеріалу й обговорення результатів.** Рослинний матеріал та насіння *Adonis vernalis* та *Aquilegia nigricans* зібрано в Карпатах, а також отримано з Ботанічного саду Львівського національного університету імені Івана Франка. Культуру калусу *Adonis vernalis* вирощено з насіння, культуру калусу *Aquilegia nigricans* з рослинної тканини на агаризованому середовищі Мурасиге-Скуга (МС), доповненому регуляторами росту, а саме фітогормонами

індолілоцтовою кислотою (ІОК), нафтилоцтовою кислотою (НОК), кінетином у кількості 0,1–2,0 мг/л та вітамінами В1, В2, В6, фолієвою кислотою, біотином, нікотинамідом та пантотенатом.

Середовище МС доводили до рН=5,6, використовуючи 1 N КОН або 1 % НСІ, потім стерилізували в автоклаві за 120 °С та тиску 0,8 атм протягом 20 хв. Поверхню насіння *Adonis vernalis* та *Aquilegia nigricans* тричі промивали водою та милом, а потім стерилізували у 30 % перекисі водню протягом 20 хв та асептично перенесли у скляні чашки Петрі. Чашки Петрі інкубували протягом 5 тижнів у темряві за 23–25 °С. Насіння *Aquilegia nigricans* не проросло, а з насіння *Adonis vernalis* отримано рослини, які стерильним скальпелем розрізали й асептично перенесли в інші чашки для одержання калусу. Експланти *Adonis vernalis* введено у модифіковане середовище МС з додаванням регуляторів росту ІОК, НОК та кінетину в кількості 2,0 мг/л, 1,0 мг/л, 0,1 мг/л відповідно за 23 °С, освітлення 2000 лк, фотоперіоду 16/8 [6]. Молодий та здоровий калус пасували кожні чотири тижні, переносючи на середовище МС того ж складу. Отримано калусну біомасу, яку надалі використано для дослідження.

Експлантами *Aquilegia nigricans* для ініціації калусогенезу були листки, гіпокотиль та корені інтактної рослини. Експериментально підібрано різні умови (температура, освітлення), тип експланту та різну концентрацію фітогормонів. Культивування проведено за температури 15 °С і 23 °С, на світлі й у темряві та використано різні модифікації живильного середовища МС з вмістом ІОК – 0,2–2,0 мг/л, НОК – 0,1–1,0 мг/л та кінетину – 0,1–0,5 мг/л. Здійснено культивування на шести різних модифікованих середовищах (див. таблицю), найкращі ростові характеристики спостерігались на середовищі 1 (ІОК – 0,2 мг/л, НОК – 0,2 мг/л, кінетин – 0,1 мг/л), середовищі 4 (ІОК – 0,3 мг/л, НОК – 1,0 мг/л, кінетин – 0,1 мг/л) та середовищі 5 (ІОК – 0,3 мг/л, НОК – 0,3 мг/л, кінетин – 0,5 мг/л). Культивування проведено за фотоперіоду 18/6 (світло/темрява), освітлення 2000 лк. Одержано калусну біомасу та визначено індекс росту для кожного експерименту. Результати наведено на рис. 1–3.

#### Склад модифікованого середовища МС для культивування *Aquilegia nigricans*

Середовище	Концентрація фітогормонів, мг/л		
	ІОК	НОК	кінетин
1	0,2	0,2	0,1
2	2,0	1,0	0,1
3	2,0	0,1	0,5
4	0,3	1,0	0,1
5	0,3	0,3	0,5

Експланти візуально аналізували кожні три дні. На деяких експлантах спостерігалось наростання калусної маси вже через два–три тижні. Відбувалося їх потовщення, особливо помітне на кінцях сегментів, з поступовим розростанням аж до повного покривання масою первинного калусу. Також деякі експланти інфіковані, їх відбракували і видаляли з подальшого експерименту. За однакового співвідношення ІОК та НОК (по 0,3 мг/л) отримано більший відсоток життєздатних експлантів і відповідно більшу кількість біомаси. Максимальний відсоток життєздатних експлантів (74,8 %) та найкращі ростові характеристики спостерігали у калусних культур *Aquilegia nigricans* на середовищі МС з вмістом ІОК – 0,3 мг/л, НОК 0,3 мг/л, кінетину 0,5 мг/л. Через 14 тижнів отримано четвертий пасаж калусної культури *Adonis vernalis* та *Aquilegia nigricans*, біомаса була світло-кремового та блідо-жовтого кольору і м'якої текстури.

Потім отримано екстракти з калусних біомас та рослинної сировини. Екстракцію рослинної сировини інтактних рослин одержали мацерацією 70 % етанолом подрібненої рослинної сировини (1250 г) за кімнатної температури, а розчинник міняли кожні 48 годин (3×8 л). Загальний екстракт концентрували під вакуумом. Калусну біомасу *Adonis vernalis* та *Aquilegia nigricans* сушили за кімнатної температури та екстрагували 70 % етанолом протягом 24 годин, отримані екстракти концентрували у ротаторному випарнику за низької температури.

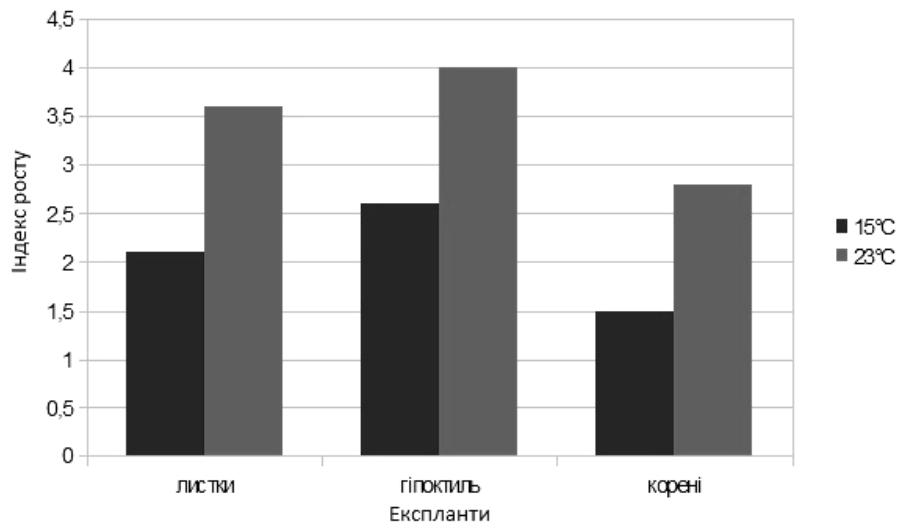


Рис. 1. Вплив температури на ріст калусної біомаси *Aquilegia nigricans*

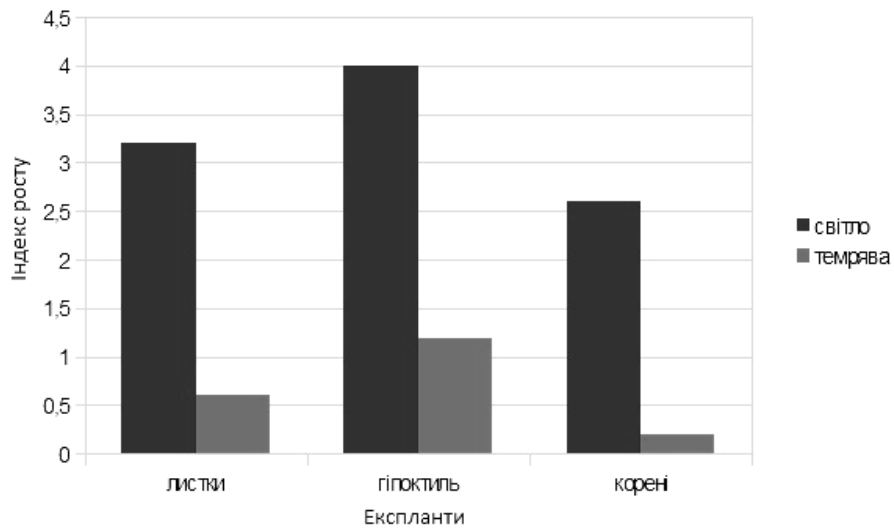


Рис. 2. Вплив освітлення на ріст калусної біомаси *Aquilegia nigricans*

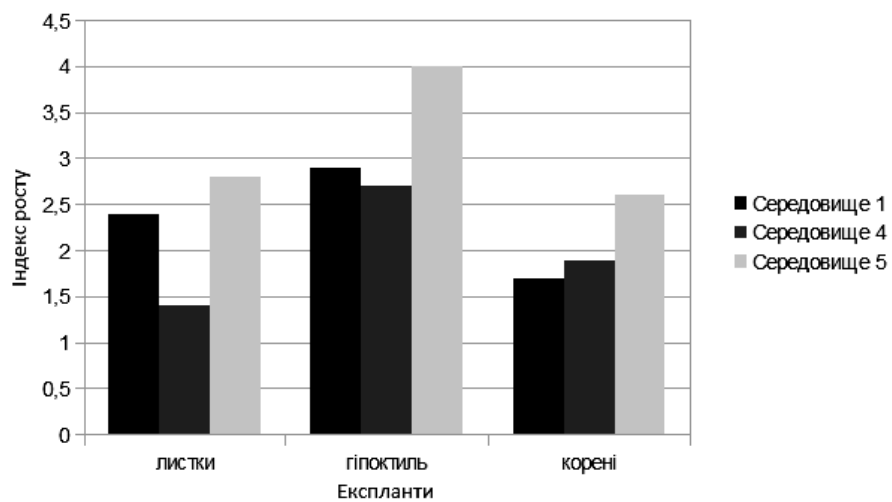


Рис. 3. Вплив складу середовища МС на ріст калусної біомаси *Aquilegia nigricans*

Одержані екстракти досліджували на вміст загальних фенолів, серцевих глікозидів та алкалоїдів. Якісні кольорові реакції дали позитивний результат, що вказувало на вміст у рослинній сировині й калусних біомасах рослин фенольних сполук, серцевих глікозидів та алкалоїдів. Також проведено кількісні визначення наявності БАР у екстрактах.

Серцеві глікозиди кожного зразка екстракту кількісно визначали згідно з методикою [15]. Екстракт змішували з 10 мл свіжоприготованого реагенту Бальє (95 мл 1 % пікринової кислоти + 5 мл 10 % NaOH). Через годину суміш розбавляли 20 мл дистильованої води і вимірювали поглинання за 486 нм за допомогою спектрофотометра. Для розрахунку концентрації глікозидів використовували калібрувальну криву, отриману колориметруванням стандартного розчину дигоксину. Вміст глікозидів був виражений в мг еквівалентів дигоксину на г сухого екстракту.

Загальні фенольні сполуки визначали за допомогою реактива Фоліна–Чокальтеу [16]. До екстрактів калусної біомаси та біомаси інтактних рослин (0,2 мл) додавали 17,5 мл гліколевого буферного розчину (рН=12,9) та 1 мл реактиву Фоліна–Чокальте і доводили очищеною водою до 25 мл. Суміш перемішували і залишали на 30 хв, а потім вимірювали оптичну густину на спектрофотометрі за довжини хвилі 760 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували суміш, що складалася з 1 мл реактиву Фоліна–Чокальте, 17,5 мл гліколевого буферного розчину з рН=12,9 і 6,5 мл води очищеної. Паралельно визначали оптичну густину розчину стандартного зразка галової кислоти, виготовленого аналогічно досліджуваному розчину. Загальний фенольний вміст був виражений у мг еквівалентів галової кислоти на г сухого екстракту у відсотках за формулою.

Серцевих глікозидів у третьому пасажі *Adonis vernalis* та четвертому пасажі *Aquilegia nigricans* калусних біомас було більше ніж у екстракті трави *Adonis vernalis*. Кількість загальних фенолів була висока під час четвертого пасажу калусної біомаси рослин, але значно нижчою, ніж в екстрактах трави *Adonis vernalis* та *Aquilegia nigricans*.

**Висновки.** Вперше введено в культуру *Aquilegia nigricans*, підібрано оптимальні умови (температура, освітлення) та склад живильного середовища (кількість та співвідношення фітогормонів) для максимального росту культури. Отримано калусні біомаси *Adonis vernalis* та *Aquilegia nigricans*. Використано середовище МС з фітогормонами ІОК, НОК та кінетином: для *Adonis vernalis* – 2,0 мг/л, 1,0 мг/л, 0,2 мг/л відповідно; для *Aquilegia nigricans* – 0,3 мг/л, 0,3 мг/л, 0,5 мг/л відповідно. Одержані культури рослин характеризуються стабільними показниками, які вказують на зручність вивчення фізіологічних, біохімічних та інших особливостей клітинних популяцій цих рослин в умовах *in vitro*. Отримано екстракти калусних біомас та інтактних рослин, як екстрагент використано 70 % етиловий спирт. Екстракти досліджено на наявність серцевих глікозидів та загальних фенолів. Результати проведених реакцій вказують на наявність у калусних біомасах усіх екстрактів серцевих глікозидів, що свідчить про можливість одержання більшої кількості серцевих глікозидів, ніж з екстракту інтактних рослин.

1. Бутенко Р. Г. *Культура клітин рослин і біотехнологія* / Бутенко Р. Г. – М.: Наука, 1986. – 286 с. 2. Чекман І. С. *Експериментальне й клінічне вивчення серцевих глікозидів* / І. С.Чекман // *Практикуючий лікар.* – 2014. – № 3.– С. 54–59. 3. Васильев І. С. *Стероидные гликозиды из культуры клеток диоскореи, их метаболизм и биологическая активность* / И. С. Васильев, В. А. Пасешиченко // *Успехи биол. химии.* – 2000. –Т. 40. – С. 153–204. 4. Карпов П. А. *Возможности использования культуры тканей *Yucca macrocarpa* для получения стероидных гликозидов* / П. А. Карпов // *Доповіді АН України.* – 2000. – № 9. – С. 180–85. 5. Кунах В. А. *Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи* / В. А. Кунах. – К. : Логос, 2005. – 730 с. 6. Герштун А. *Культивування горицвіту весняного (*Adonis vernalis*) в умовах *in vitro** / А. Герштун, Р. Петріна // *Вісник Нац. ун-ту “Львівська політехніка”. Серія “Хімія, технологія речовин та застосування”.* – 2016. – № 841. – С.133–137. 7. Gafta D., Muncaciu S., Csergo A. *Morphometric va-*

riation in a rare endemic *Aquilegia* (*Ranunculaceae*) in the Carpathians // *Plant Biosystems*. – Vol. 140. – No. 3. – 2006. – P. 297–306. 8. Assyov, B. and Petrova, A. (Eds.). 2012. *Conspectus of the Bulgarian Vascular Flora: Distribution maps and floristic element*. Bulgarian Biodiversity Foundation, Sofia. 9. Oprea, A. and Sirbu, C. 2013. *The Vascular Flora of Rarau Massif (Eastern Carpathians, Romania). Note II. Memoirs of the Scientific Sections of the Romanian Academy XXXVI: 17–36*. 10. Coldea, G., Stoica, I.-A., Pușcaș M, Ursu, T, Oprea, A, *Intrabiodiv Consortium*. 2009. *Alpine–subalpine species richness of the Romanian Carpathians and the current conservation status of rare species*. *Biodiversity Conservation*. 18. P. 1441–1458. 11. Лікарські рослини: енциклоп. довідник / А. М. Гродзінський. – К.: Видавництво “Українська Енциклопедія” ім. М. П. Бажана, Український виробничо-комерційний центр “Олімп”, 1992.– 544 с. 12. Oksman-Caldentey K. M. and Inzé D. *Plant cell factories in the post genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites*. *Trends Plant Sci*, 2004, P. 433–440. 13. Rao, S. Ramachandra and Ravishankar G. A. *Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites*. *Biotechnology Advances*, 2002. 20, P. 101–153. 14. Parr A. J. *The Production of Secondary Metabolites by Plant cell cultures*. *Journal of Biotechnology*, 1989. 10, P. 1–26. 15. Solich P., Sedliakova V., Karlicek R. *Spectrophotometric determination of cardiac glycosides by flow-injection analysis*. *Anal Chim Acta*. 1992; 269(2). P. 199–203. 16. Waterman P. G., Mole S. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific Publications. London. 1994.