

Р. О. Петріна, А. С. Кривавич, Н. О. Січевська, В. П. Новіков
Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

РОЗРОБЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО МЕТОДУ КУЛЬТИВУВАННЯ КОСАРИКІВ ЧЕРЕПИТЧАСТИХ (*GLADIOLUS IMBRICATUS*) *IN VITRO*

© Петріна Р. О., Кривавич А. С., Січевська Н. О., Новіков В. П., 2015

Наведено результати введення в культуру *in vitro* косариків черепитчастих (*Gladiolus imbricatus*). Вибрано оптимальні умови для проростання насіння, одержання калусу та індукції калусоутворення з калусів кореневого, листкового і черешкового походження. Проведений порівняльний аналіз наявності біологічно активних речовин в екстрактах трави та калусної маси *Gladiolus imbricatus* методом ТЛХ. Запропоновано методику культивування та одержання біомаси *Gladiolus imbricatus*. Результати культивування *in vitro* допоможуть зберегти популяції цього виду і отримати цінне джерело БАР.

Ключові слова: косарики черепитчасті, *Gladiolus imbricatus*, калус, калусна культура, експлант, калусогенез, флавоноїди, пасаж.

The results of the introduction to the *in vitro* culture of *Gladiolus imbricatus* are shown. The optimal conditions for seed germination, reception callus and induction of callus formation from callus with origin from root, leaf and pedicel have been selected. The comparative analysis of the presence of biologically active compounds in extracts of herbs and callus mass of *Gladiolus imbricatus* by TLC has been conducted. The technique of cultivation and obtaining biomass of *Gladiolus imbricatus* has been proposed. The results of *in vitro* cultivation will help in preserving populations of this species and obtaining valuable source of BAS.

Key words: *Gladiolus imbricatus*, callus, callus culture, explants, callogenesis, flavonoids, passage.

Постановка проблеми. Лікарські рослини є сировиною для отримання засобів, що використовуються в народній, медичній або ветеринарній практиці з лікувальною або профілактичною метою. Сьогодні відомо близько 500 000 видів рослин, однак лише невелика частина (приблизно 10 %) з них застосовується в медицині [1].

Сьогодні в аптеках України присутня велика кількість чужоземних препаратів. Препарати з аналогічною дією є і у нас і вони значно дешевші від зарубіжних аналогів, але їх на полицях аптек дуже мало. Одна з причин відсутності вітчизняних препаратів – це відсутність достатньої кількості і асортименту лікарської рослинної сировини для їх виготовлення. Вирішення нагальних проблем лікарського рослинництва України дасть можливість суттєво збільшити обсяги заготівлі лікарської продукції, забезпечити в достатній кількості фармацевтичну промисловість якісною сировиною та створити гідну конкуренцію іноземним фармацевтичним виробникам лікувальних засобів, виготовлених на основі рослинної сировини.

Сучасні методи біотехнології пропонують шляхи вирішення проблеми, використовуючи методи вирощування клітин, тканин і органів рослин у контрольованих умовах на штучних живильних середовищах [2]. Одержана рослинна біомаса отримується у необмеженій кількості і може бути використана як лікарська сировина, бо є екологічно чистою, не забрудненою хімічними добривами, пестицидами, гербіцидами, важкими металами, радіоактивними ізотопами тощо [3, 4].

Рослини мають різний полівалентний хімічний склад, до якого можуть входити речовини з фармакологічними властивостями. Біологічно активні речовини (БАР) групують у широкі хімічні класи: терпеноїди (ізопреноїди), фенольні сполуки, ліпіди, моно- та полісахариди, алкалоїди, вітаміни, органічні кислоти, мінеральні речовини [5].

Рослини, які потребують охорони, занесені в Червону книгу України. Вона налічує понад 600 видів рослин [6]. Деякі з них занесені в Червону книгу Карпат: арніка гірська (*Arnica montana*), відкаслик безстеблний (*Carlina ocaulis*), мильнянка лікарська (*Saponaria officinalis*), календула лікарська (*Calendula officinalis*), ромашка лікарська (*Matricaria recutita*), ехінацея пурпурна (*Echinacea purpurea*), тирлич крапчастий (*Gentiana punctata*), конвалія звичайна (*Convallaria majalis*) та інші. Однією з рідкісних рослин Карпат, що знаходиться під загрозою знищення і занесена до Червоної книги України, є косарик черепитчастий (*Gladiolus imbricatus*).

Косарик черепитчастий (*Gladiolus imbricatus*) – рослина з подвійною бульбоцибулиною. Великі рожево-фіолетові квітки з неправильною, майже 2-губою оцвітиною зібрані в одnobічний, доволі густий колос на верхівці високого (30–60 см) квітконосного стебла, з мечоподібними широколінійними листками. Тичинок 3, маточка одна з нитковидним стовпчиком і 3 майже пелюстковидними приймочками. Цвіте в червні. Причини зміни чисельності: пасовищне та рекреаційне навантаження, осушувальна меліорація з подальшим розорюванням територій. Поблизу населених пунктів та в зонах рекреації рослини під час цвітіння зривають на букети. В Україні поширений у Карпатах, на Поліссі, Малому Поліссі, Розточчі-Опіллі, у Зх. Лісостепу, на Лівобережжі та в Криму. Вони належать до зникаючого виду рослин, занесені в Червону книгу України. У цій рослині синтезуються цінні з фармацевтичного погляду БАР: флавоноїди, полісахариди, вітаміни, ефірні олії та глікозиди.

У народній медицині рослину використовують як болетамувальний, високовітамінний та лактогенний засіб. Як вітамінний засіб вживають настій листя, а приготовленою з нього настоянкою розтираються при ревматизмі. Настій бульб п'ють при золотусі, алергії, при захворюваннях нирок і сечовивідних шляхів (зокрема, при каменях у нирках) та для стимулювання виділення молока у матерів-годувальниць. Подрібнені бульби прикладають до ран і виразок.

Аналіз попередніх досліджень і публікацій. Культивуванням рослин в умовах *in vitro* сьогодні займаються в багатьох науково-дослідних та навчальних лабораторіях світу і України. У більшості випадків культивування проводять для одержання як нових форм рослин, так і клітинної біомаси. Наразі у виробництві широко використовують культуру тканин і клітин для одержання як нових форм рослин, так і клітинної біомаси. Зокрема, з 54 [7] томів 13 присвячені лікарським та ароматичним рослинам. Тут наведено конкретні результати біотехнологічних досліджень близько 300 родів лікарських рослин. Роботи в цій галузі ведуться в багатьох розвинених країнах світу і передусім тих, де було започатковано дослідження з культурами ізольованих тканин рослин: США, Англії, Франції, Німеччині, Росії, а також у Японії, Індії, Китаї, Південній Кореї, Фінляндії, Угорщині й багатьох інших [8, 9]. Не останнє місце тут посідає й Україна. Деякі з таких культур накопичують у 10–30 разів більше цільового продукту, ніж природні рослини. Відомо, що деякі речовини перевищують вміст у рослині в 100 разів, як це описано, наприклад, для клітин раувольфії зміїної, які здатні накопичувати до 20 % алкалоїду аймаліну [10, 11].

Мета. Метою роботи було введення в культуру косариків черепитчастих та визначення оптимальних умов отримання та росту калусної культури *Gladiolus imbricatus*.

Експериментальна частина. У цій роботі для культивування *Gladiolus imbricatus* було застосовано метод культури клітин і тканин. Цей метод ґрунтується на вирощуванні недиференційованої калусної маси в стерильних умовах на штучних живильних середовищах. Одна з важливих особливостей культури клітин і тканин – збереження здатності до синтезу вторинних речовин, притаманних вихідній рослині. Для проведення дослідів було використано насіння *Gladiolus imbricatus*, отримане з Ботанічного саду ЛНУ імені Івана Франка. Першим кроком у

підготовці насіння є замочування його у розчині гіберелової кислоти, яка сприяє проростанню насіння, стимулює ріст і розвиток рослин. Насіння *Gladiolus imbricatus* стратифікували у розчині гіберелової кислоти в концентрації 0,01мг/л протягом однієї доби. Наступним кроком є стерилізація насіння, яку проводили розчином етилового спирту 70 % 2–3 хв, а потім витримували в різних стерилізуючих агентах – перекис водню (30 %), натрій гіпохлорит (10 %), сулема (0,1 %), промивали три рази по 5–10 хв у стерилізованій воді і переносили на агаризоване живильне середовище в стерильні чашки Петрі.

Результати та їх обговорення. У результаті стерилізації було виявлено, що після обробки гіпохлоридом кількість життєздатних експлантів була найменшою і становила лише 66 %, з використанням сулеми показник був вищим і становив 73 %. Кількість життєздатних експлантів при використанні перекисом водню (30 %) становила 93 %, мікробних заражень не спостерігалось (табл.1). Візуальний контроль проводили через 7 днів після введення насіння в культуру.

Таблиця 1

Ефективність стерилізації насіння *Gladiolus imbricatus* на середовищі МС

Тип стерилізації	Тривалість, хв	Загальна кількість експлантів, шт	Кількість інфікованих, шт	Кількість неінфікованих, шт	Кількість насінин, які проросли, шт	Ефективність стерилізації, %
Гіпохлорид (10 %)	20	30	10	20	2	66
Перекис водню (30 %)	20	30	2	28	20	93
Суліма (0,1 %)	20	30	8	22	5	73

Отже, найкращим стерилізатором є перекис водню (30 %), тривалість індикації 20 хв.

Використовували отримані з насіння асептичні 1,5–2 місячні рослини, які поміщали на агаризоване живильне середовище Мурасиге-Скуга, доповнене фітогормонами. Використано три варіанти живильного середовища МС. Перший варіант – з НОК 0,5 мг/л, ІОК 3,0; другий варіант – з ІОК 1,0 мг/л, НОК 3,0 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 проводили дослід у 9 чашках Петрі, в кожній з яких було по 12 експлантів (108 експлантів – 36 сегментів корінців, 36 сегментів черешків і 36 сегментів листків). Ознаки росту калусу спостерігаються на 15–20 день культивування. Калус був світлий, м'якої консистенції і відрізнявся невисокою інтенсивністю росту.

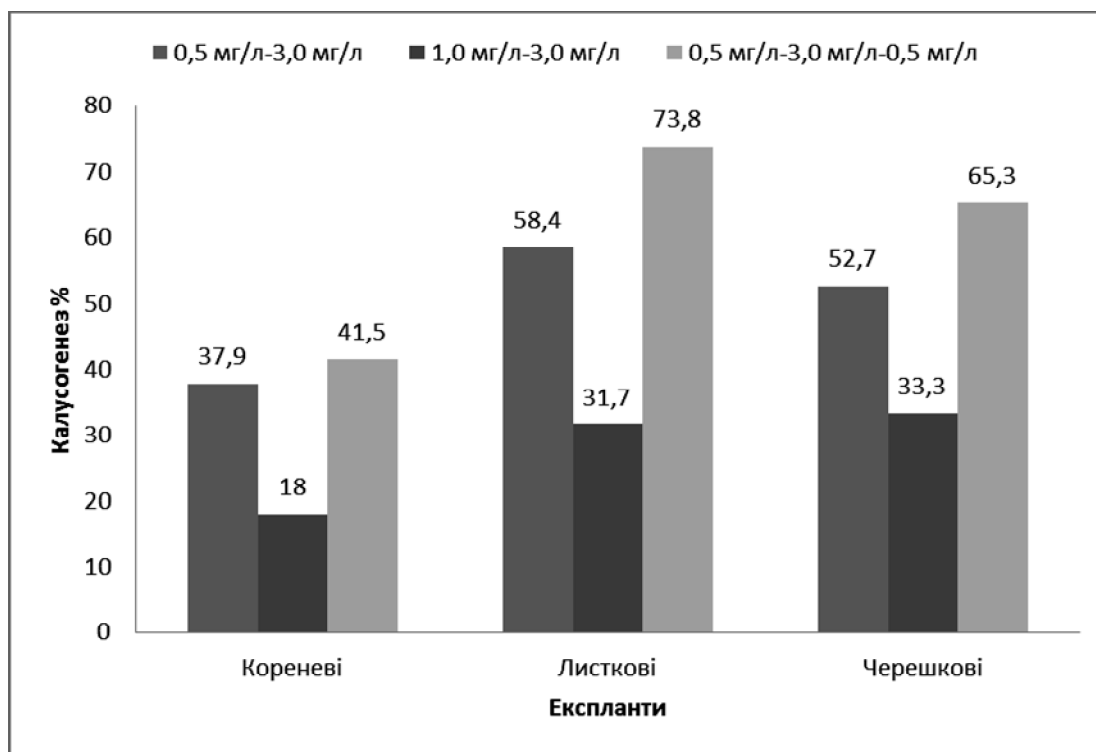
Таблиця 2

Вплив фітогормонів на ріст калусу *Gladiolus imbricatus* протягом 5 тижнів

Середовище МС	Фітогормони	К-сть життєздатних експлантів, шт					Відсоток життєздатних експлантів, %
		1-й тижд.	2-й тижд.	3-й тижд.	4-й тижд.	5-й тижд.	
перший варіант	НОК (0,5) ІОК (3,0)	105	98	96	75	53	49,1
другий варіант	ІОК (1,0) НОК (3,0)	97	85	72	51	30	27,8
третій варіант	НОК (0,5) ІОК (3,0) кінетин (0,5)	103	95	82	71	65	60,2

Протягом п'яти тижнів культура тканин росла, структура калусу була щільна, складалась з клітинних агрегатів (глобул) розміром 2-4 мм, колір від світло-жовтого до бурого, декілька з зеленою пігментацією. Приріст калусу залежав від концентрації фітогормонів та від походження експланта.

Максимальний відсоток життєздатних експлантів (60,2 %) спостерігався на середовищі зі вмістом гормонів ІОК, НОК та кінетину в концентрації 3,0 мг/л; 0,5 мг/л; 0,5 мг/л відповідно. Результати з індукції калусогенезу *Gladiolus imbricatus* з різних за типом експлантів наведено на діаграмі (рисунок).



Індукція калусоутворення з експлантів рослин *Gladiolus imbricatus* на живильному середовищі МС, доповненому різними концентраціями фітогормонів

Особливо життєздатними виявилися листкові експланти із листкових експлантів, спостерігалася вища частота калусогенезу та збільшення наростання калусної біомаси на 15 %. З часом культивування на середовищі за першим і другим варіантами кількість життєздатних експлантів зменшувалась, багато відмирало. А після 40 діб у середовищі за другим варіантом експланти загинули.

Вводили *Gladiolus imbricatus* в культуру в умовах світла (2000 лк) при 16-годинному фотоперіоді та температурі 22–25 °С. Відносну вологість у ламінарному боксі, де росли рослини, підтримували на рівні 65–75 %. Для поліпшення культивування фізичні фактори необхідно підбирати з врахуванням природного ареалу проростання культивуваної рослини. Через 4–5 тижнів культивування первинний калус переносили на свіже живильне середовище такого самого складу. Протягом 5 тижнів здійснено мікробіологічний, візуальний контроль. Візуальний контроль проводили не рідше одного разу в 3 дні – відбраковували інфіковані тканини.

Оптимальними ми вважали середовища, на яких у максимальної кількості експлантів спостерігалось утворення калусу, тобто була найвища частота калусогенезу. Експланти всіх типів виявились здатними до цього виду морфогенезу. Дедиференціація для листкових експлантів полягала у руйнуванні епідермісу, розростанні паренхімних клітин по всій поверхні листка з одночасною втратою зеленого забарвлення. Під час культивування корневих експлантів на

середовищах для калусогенезу відбувалось їх потовщення, особливо помітне на кінцях сегментів, з поступовим розростанням аж до повного покривання масою первинного калусу. На стеблових експлантах ознаки дедиференціації виявлялись значно повільніше, у багатьох видів спостерігались некротичні явища; первинний калус, як правило, з'являвся на протилежному від кореня кінці сегмента стебла.

У результаті проведених досліджень визначено оптимальний склад живильних середовищ для калусогенезу у косариків черепитчастих.

Для хімічного аналізу на вміст флавоноїдів використовували біомасу 1-го і 2-го пасажу. Одержану калусну масу спочатку обережно знімали, потім висушували при температурі 58 ± 2 °C. Час сушіння біомаси залежить: від початкової вологості біомаси; товщини шару біомаси; температури сушіння. Суха маса повинна бути пухкою, легко розсипатись при продавлюванні між пальцями і мати забарвлення від жовтого до коричневого кольору. Залишкова вологість біомаси після висушування – не більше 12 %.

Підтверджували наявність флавоноїдів за методом тонкошарової хроматографії. Використовували пластинки TLS Silicagel 60, 20×20 см фірми Merk, Німеччина. Як елюент використовували: хлороформ-метанол-етилацетат (85:15:3). Пластини нагрівали при температурі 100–120 °C. Візуалізацію проводили в УФ світлі, за специфічною флуоресценцією. Контролем слугували водно-спиртові екстракти з трави *G. imbricatus* [12].

Таблиця 3

**ТШХ-ідентифікація БАР у екстракті біомаси
косариків черепитчастих**

Значення Rf після обробки хроматографа розчином Се-Р-Мо			Флуористенція в УФ світлі при 254 нм			Ідентифікація БАР
Стандартні зразки	Екстракт трави	Екстракт калусу	Стандартні зразки	Екстракт трави	Екстракт калусу	
0,85	0,88	0,86	коричнева	коричнева	коричнева	Галангін
0,46	0,46	0,45	голуба	світло голуба	голуба	3-гідроксибензойна кислота
0,73	0,73	0,73				кверцетин
0,83	0,8	0,82	яскраво рожева	яскраво рожева	рожева	Кемферол
0,99	0,97	0,98	рожева	рожева	рожева	3,4-гідроксибензойна кислота
0,04	0,05	0,05	коричнева	коричнева	коричнева	Рутин

На хроматограмах екстракту калусної маси косариків черепитчастих виявлено галангін, 3-гідроксибензойну кислоту, кверцетин, кемферол, 3,4-гідроксибензойну кислоту, рутин, що відповідали розчинам стандартних зразків за значенням Rf (табл. 2).

Висновки. Результати дослідження показали, що косарики черепитчасті (*Gladiolus imbricatus*) здатні до калусоутворення в умовах *in vitro*. Підібрано стерилізуючі агенти для експлантів (96 % етанолом 1–2 хвилини, розчином перексиду водню (30 %) 20 хвилин і промивання в трьох порціях стерилізованої води). Підібрано оптимальні умови калусогенезу, а саме модифіковане агаризоване живильне середовище Мурасиге–Скуга із фітогормонами НОК (0,5 мг/л), ІОК (3,0 мг/л), кінетин (0,5 мг/л); освітлення 2000 лк при 16-годинному фотоперіоді; температура 24–28 °C. Визначено оптимальний час культивування – 5 тижнів. При цьому показано чітку залежність індукції калусогенезу від кількості фітогормонів та типу експланту. Калусну

культуру *Gladiolus imbricatus*, одержану під час експерименту, використано для дослідження наявності БАР і підтверджено якісний склад методом тонкошарової хроматографії.

1. 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. 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 з. 4. Бутенко Р. Г. Культура клітин рослин і біотехнологія. – М.: Наука, 1986. 286 з. 5. Викторов А. П. Фитопрепараты: рациональный подход к медицинскому применению / А. П. Викторов // Фитотерапия. Часопис. – 2011. – № 3. – С. 3 – 12. 6. Червона книга України. Рослинний світ / за ред. Я. П. Дідуха. – К., 2009. 7. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* / Ed. J.P. S. Bajaj. — Berlin: Springer etc., 1986–2003. — V. 1–54. 8. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіологічно-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с. 9. Кунах В. А. Біотехнологія рослин для поліпшення умов життя людини / Біотехнологія, Т. 1, №1, 2008. – С.28–39. 10. Бутенко Р. Г. Культура ізолюваних тканин та фізіологія морфогенезу рослин. – М.: Наука, 1964. 272 з. 11. Носаль І. Від рослини – до людини / І. Носаль – К.: Веселка, 1993. – 606 с. 12. Eike Reich, Anne Schibli. *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*. – New York: Thieme, 2006 – 264 с.