

КАЛУСОГЕНЕЗ У КУЛЬТУРІ *IN VITRO* АРНІКИ ГІРСЬКОЇ

© Петріна Р.О., Маснюк Я.Т., 2008

Досліджено здатність *Arnica montana* рости на різних субстратах в умовах *in vitro*. Запропоновано оптимальні умови для індукції калусогенезу арніки гірської, а саме модифіковане поживне середовище Мурасіге-Скуга, освітлення 2000 лк та відповідне співвідношення гормонів; досліджено приріст та динаміку росту калусної культури *Arnica montana*.

Ability *Arnica montana* growths in the conditions of *in vitro* have been investigated. Optimum terms for induction of callusogenesis arnica of mountain has been proposed (the modified nourishing environment of Murasige-Skuga, illumination 2000 lk and proper correlation of hormones); the increase of callus and dynamic growths of callus *Arnica montana* have been investigated.

Постановка проблеми. Одним з напрямків біотехнології є використання методу культури клітин та тканин для одержання в умовах *in vitro* калусної культури лікарських рослин, які є генетично цінним природним матеріалом. Один з напрямків методу пов'язаний із здатністю ізольованих рослинних клітин продукувати цінні для медицини, парфюмерії, косметики та інших галузей промисловості речовини вторинного синтезу: алкалоїди, стероїди, глікозиди, гормони, ефірні масла тощо. Одержані з калусу речовини вторинного метаболізму мають широкий спектр дії і використовуються у медицині, фармації і біотехнології [1, 2]. Серед лікарських рослин цікавою є *Arnica montana*, багаторічна трав'яниста рослина з родини Asteraceae. Препарати арніки гірської тонізують і стимулюють центральну нервову систему, є кровоспинними, жовчогінними, заспокійливими, протизапальними. Арніку застосовують для загоювання ран, широко використовують у гінекологічній та акушерській практиці. Для виготовлення ліків використовують сухі квіткові кошики арніки, кореневища і корені арніки гірської [3, 4].

Аналіз попередніх досліджень і публікацій. Нині відомо більше ніж 100 000 вторинних метаболітів, які продукуються рослинами. Багато з них є економічно важливими продуктами і використовуються у фармакологічній, косметичній, харчовій промисловості. Лікарські рослини роблять значний внесок у фармацевтичну промисловість, становлять близько 25 % важливих лікарських засобів. Нині є багато клітинних культур рослин із різних сімей, які широко використовують у промисловості. До них належать: женьшень далекосхідний – джерело диосгеніну, диоскорея дельтовидна – стероїдні глікозиди, раувольфія зміїна – продуцент антиаритмічного алкалоїда аймаліну тощо. Встановлено, що клітини тиса ягідного синтезують речовину – таксон, яка є антираковим препаратом [5–10].

Мета. Метою роботи є підбір оптимальних умов для індукції калусогенезу і вивчення регенеративної здатності *Arnica montana* в умовах *in vitro*.

Експериментальна частина. Об'єктом дослідження є насіння арніки гірської (*Arnica montana*). Для введення в поживне середовище використовують стратифіковане у розчині гіберелової кислоти насіння. Насіння витримували у розчині гіберелової кислоти (0,001 мг/л) протягом однієї доби. Після чого стерилізували в 96° етанолі упродовж 2 хв та в пергідролі 5 хв у стерильних хімічних склянках, накритих чашками Петрі, і 3 рази промивали дистильованою водою.

Як експланти використовували корінці, меристематичні верхівки і гіпокотиль. Тканини культивували на агаризованих поживних середовищах Мурасіге-Скуга (М-С), Гамборга (Г), Шенка-

Хільдебрандта (Ш-ХТ), Уайта (У). У склад середовищ вносили β -індолілоцтову кислоту (IAA), α -нафтилоцтову кислоту (NAA) та кінетин.

Експланти висаджували на одну з 8 поживних середовищ, які відрізнялись вмістом фітогормонів (мг/л): № 1 – Ш-ХТ + IAA (3), NAA (2,1), кінетин (0,3); № 2 – Ш-ХТ + IAA (0,3), NAA (2,0), кінетин (2,1); № 3 – М-С + IAA (3), NAA (2,1), кінетин (0,3); № 4 – М-С + IAA (0,3), NAA (2,0), кінетин (2,1); № 5 – Г + IAA (3), NAA (2,1), кінетин (0,3); № 6 – Г + IAA (0,3), NAA (2,0), кінетин (2,1); № 7 – У + IAA (3), NAA (2,1), кінетин (0,3); № 8 – У + IAA (0,3), NAA (2,0), кінетин (2,1).

Рослинний матеріал інкубували в темряві і на світлі, при температурі $23 \pm 1^\circ\text{C}$ і вологості повітря – 60 % протягом 50 днів. Регенерацію здійснювали на світлі (2000 лк) при 16-годинному фотоперіоді і температурі 23°C ($\pm 2-3^\circ\text{C}$).

Кожен варіант досліду виконували у трьох повторях.

Результати та їхнє обговорення. Одержання асептично вироцених експлантів арніки гірської. У цій роботі при пророщуванні насіння *Arnica montana* використовувалося середовище Мурасіге-Скуга. Проростання відбувалось після стратифікації у розчині гіберелової кислоти (0,001 мг/л) протягом однієї доби. Обробка гібереловою кислотою насіння приводить до зняття у нього стану спокою і стимулює швидке проростання. На агаризованому стерильному поживному середовищі в чашках Петрі вироцено насіння *Arnica montana* при температурі (23 ± 1) $^\circ\text{C}$ протягом 2–3 тижнів в умовах темряви (рис. 1). Пророщення насіння відбувалося на безгормональному середовищі.



Рис. 1. Проростки *Arnica montana* через 18 днів проростання в умовах *in vitro*

Культивування арніки гірської в різних умовах. Сегменти асептично вироцених проростків слугували експлантами для ініціації калусогенезу (корінці, меристематичні верхівки і гіпокотиль). При культивуванні калусу у поживне середовище додавалися: β -індолілоцтова кислота (IAA), α -нафтилоцтова кислота (NAA), кінетин (kin), попередньо розчинені у спирті (NAA та IAA) і концентрованої соляній кислоті (kin).

Культивування виконували на агаризованих поживних середовищах Мурасіге-Скуга (рН 5,7), Гамборга (рН 5,5), Шенка–Хільдебрандта (рН 5,8), Уайта (рН 5,5) із різним вмістом фітогормонів в умовах темряви і освітлення при 16-годинному фотоперіоді. У всіх варіантах спостерігалось збільшення розмірів експлантів і сильне набухання тканин. Приріст калусу залежав від середовища, концентрації фітогормонів, умов освітлення та від походження експланта.

Найоптимальнішим поживним середовищем (табл.1) для утворення і росту калусів *Arnica montana* та індукції морфогенезу виявилось середовище Мурасіге-Скуга, на ньому відзначено максимальний приріст калусу *Arnica montana*. Перевірка одержаних оптимізованих поживних середовищ порівняно із початковим показала вищу частоту калусогенезу і збільшення наростання біомаси калусу на 15 %.

Середовище Мурасіге-Скуга має високий вміст солей (порівняно з іншими, приміром, низько-сольове середовище Уайта), містить залізо у хелатній формі у комплексі з етилендіамід-

тетраацетатом (ЕДТА). Це забезпечує його доступність при рН до 8,0 протягом усього періоду росту культури, тоді як за відсутності характеристичного агента нестача заліза може виникнути дуже швидко.

Таблиця 1

Частота калусогенезу, %

№ середовища	Світло	Темрява
1	60	40
2	56	42
3	45	17
4	40	22
5	42	12
6	45	8
7	15	3
8	10	1

Освітлення пропонується в умовах *in vitro* здійснювати за допомогою люмінесцентних ламп з урахуванням вимог материнської рослини до інтенсивності освітлення. Т. Мурасиге [11] рекомендує на першому етапі освітлення 1000–5000 лк і 14–16-годинний період. Нами вибрано освітлення 2000 лк та 16-годинний період, що сприяє ініціації пагонів і коренів. Температура має значний вплив на ріст і регенерацію, сприяє активації метаболічних процесів. Для *Arnica montana* було вибрано температуру 23 °С ($\pm 2-3$ °С).

Походження експланту також мало велике значення, сегмент гіпокотило найкраще приживався, і калус, одержаний з нього, мав більший приріст на одиницю часу. Але на калусі, отриманому з меристематичних верхівок, після 30 діб було помітно морфогенетичні зміни.

При культивуванні на агаризованих середовищах калус повинен мати масу 60–100 мг на 30–40 мл свіжого середовища. Для деяких зразків необхідно було два-три пасажі, щоб одержати максимальну масу. Калусна тканина має аморфну структуру, що являє собою масу тонкостінних паренхімних клітин. Хімічний склад калусної тканини звичайно відрізняється від складу відповідного органа рослини. Калусні клітини після декількох поділів переходять на звичайний для цієї рослини цикл розвитку, тобто починається диференціація.

Час культивування пропонується для різних культур різних. У цьому разі через 4–6 тижнів культивування експланту виникає первинний калус, який переносять на свіже поживне середовище.

Дослідження калусного росту арніки гірської. Тривалість культивування – 50 діб при 16-годинному фотоперіоді. У цей час було здійснено мікробіологічний та візуальний контроль (здійснювався не рідше від одного разу на три дні). Відбиралися чашки з культурами тканин кращих ростових ознак, для яких характерні швидкий ріст, максимальне використання поживного середовища, колір тканини від ясно-жовтого до молочного, відсутність некротичних включень. Калусна тканина має аморфну структуру, що являє собою масу тонкостінних паренхімних клітин. Хімічний склад калусної тканини звичайно відрізняється від складу відповідного органа рослини.

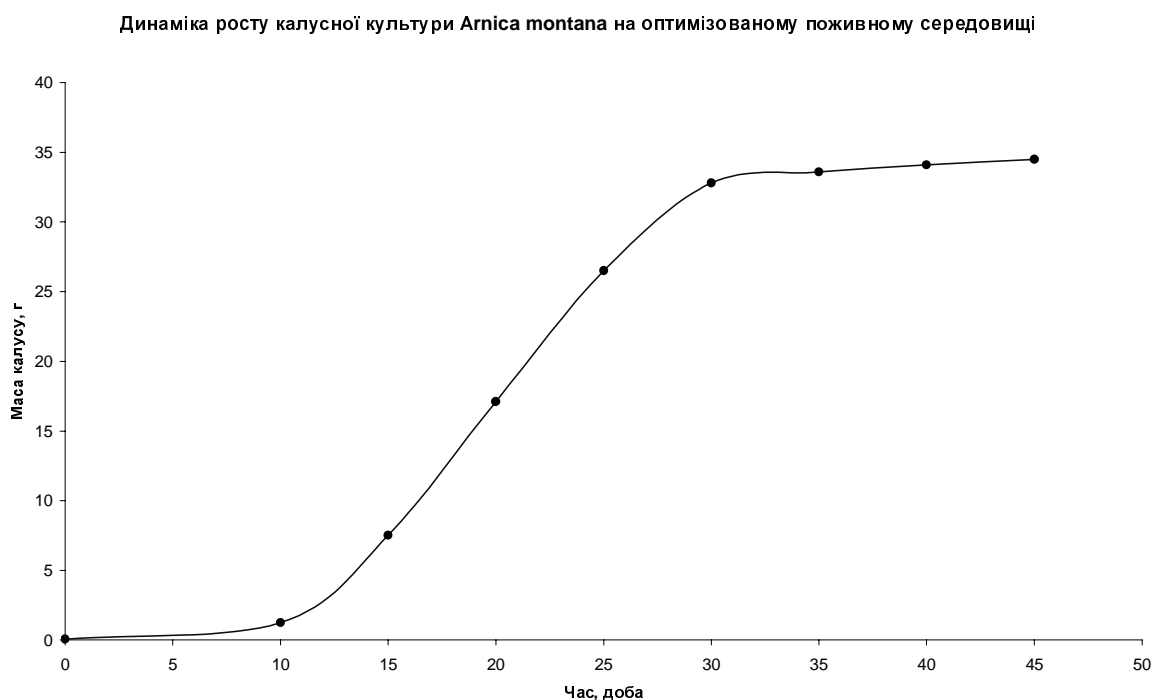
З метою визначення оптимального часу культивування було досліджено динаміку росту калусу на оптимізованому поживному середовищі. Результати наведено у табл. 2. та на рис. 2.

Таблиця 2

Результати дослідження динаміки росту калусу на оптимізованому поживному середовищі

τ, доба	0	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Біомаса, г	0,05	0,27	7,5	17,1	26,51	32,8	33,6	34,1	34,5	34,9

Ріст тканини на агаризованому середовищі упродовж пасажу характеризується S-подібною кривою, до якої входять 4 фази. Перша фаза – лаг-фаза, тривала 10–12 діб. У цей час клітини практично не поділяються і середній розмір їх не змінюється порівняно з розмірами клітин вихідної рослини.



*Рис. 2. Динаміка росту калусної культури *Arnica montana* на оптимізованому поживному середовищі*

Друга фаза – фаза експоненційного росту, тривала приблизно 20 діб. Для цієї фази характерна найбільша мітотична активність клітин. Максимальна кількість клітин, що діляться, випадає на 12-ту та 20-ту добу культивування. Середній розмір клітин зменшується, приріст біомаси арніки гірської на цій стадії вирощування становить 5–8 г з 1 л середовища на добу. Третя фаза – фаза лінійного росту, характеризується найінтенсивнішим накопиченням біомаси. Приріст тканини на 25–28-му добу становить 120–150 г/л на добу. У цій фазі мітотична активність зменшується, клітини збільшуються у розмірі. На 30-ту добу знижується вміст сухої речовини. Для четвертої фази – стаціонарного росту – характерна часткова загибель клітин та поява некротичних зон. У зв'язку з цим для підтримування культури в активному стані її необхідно пересівати на свіже поживне середовище на 30-ту добу вирощування.

Ріст культури тканини протягом пасажу супроводжується змінами рН середовища. Упродовж лаг-фази і фази експоненційного росту відбувається “підкислення” середовища переважно за рахунок поглинання відновлених форм азоту. У фазі лінійного росту спостерігається “підлужування” середовища, зв'язане з активним винесенням із нього і накопиченням у тканині нітратних форм азоту. Наприкінці пасажу тканина починає поглинати аміачні форми азоту, що призводить до “підкислення” середовища.

Кожна окрема культура ізольованих тканин має певні цитологічні, генетичні, морфологічні й синтетичні особливості. Тому необхідно всебічно вивчати кожну калусну культуру – продуцент діючих речовин.

Висновки. Результати дослідження показали, що арніка гірська (*Arnica montana*) здатна рости на різних субстратах в умовах *in vitro* і утворювати калус. Підібрано оптимальні умови для індукції калусогенезу арніки гірської, а саме модифіковане поживне середовище Мурасіге-Скуга, освітлення

2000 лк та відповідне співвідношення гормонів. Визначено оптимальний час культивування – 30 діб, після чого необхідно пересівати на свіже поживне середовище. Одержаний калус пропонується використовувати для подальших досліджень з визначення вторинних метаболітів і порівняння їхнього якісного та кількісного складу з вторинними метаболітами, виділеними з природної сировини.

1. Демидова Е.В., Решетняк О.В., Носов А.М. Влияние состава живительных сред на ростовые характеристики и состав тритерпеновых гликозидов суспензионной культуры клеток женьшеня японского (*Panax japonicus var. repens*) // Биотехнология. – 2006. – № 2. – С. 32–39.
2. Болтенков Е.В., Зарембо Е.В. Регенерация и калусогенез в культуре *in vitro* тканей органов цветка видов рода *Iris L.* (Iridaceae) // Изв. РАН. Сер. биологическая. – 2005. – № 2. – С. 174–179.
3. Солодовниченко Н.М., Журавльов М.С., Ковальов В.М. Лікарська рослинна сировина та фітопрепарати. – Харків: Вид-во НФАУ: Золоті сторінки, 2001.
4. Комендар В.І., Скунець П.М., Гнатюк М.Ю. Зелені перлини Карпат. – Ужгород: Карпати, 1985.
5. Биотехнология растений: культура клеток / Пер. с англ. В.И. Негрука; с предисл. Р.Г. Бутенко. – М., 1987.
6. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М., 1962.
7. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – К.: Наук. думка, 1992.
8. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. – К., 1984.
9. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полтчук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К., 1980.
10. Сидоров В.А. Биотехнология растений: клеточная селекция. – К., 1990.
11. Murashige T. // *Ann. Rev. Plant Physiol.* – 1974. – 25. – P. 147–148.

УДК 547.543:547.26'122

Г.М. Хоміцька, Г.Б. Шиян, С.В. Василюк, Д.Б. Баранович,
Д.О. Хоміцький, В.І. Лубенець, В.П. Новіков
Національний університет “Львівська політехніка”
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

РЕАКЦІЇ АЗОСПОЛУЧЕННЯ S-ЕСТЕРІВ 4-АМІНОБЕНЗЕНТІОСУЛЬФОКИСЛОТИ ТА ПРОГНОЗ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ НОВИХ ТІОСУЛЬФОСПОЛУК ЗА ДОПОМОГОЮ КОМП'ЮТЕРНОЇ СИСТЕМИ PASS

© Хоміцька Г.М., Шиян Г. Б., Василюк С.В., Баранович Д.Б.,
Хоміцький Д.О., Лубенець В.І., Новіков В.П., 2008

Встановлено особливості перебігу реакцій азосполучення S-естерів 4-амінобензентіосульфокислоти. Здійснено прогнозований скринінг біологічної активності синтезованих сполук з використанням програми PASS.

The features of behavior of reactions of azocoupling S-esters of 4-aminobenzenthiosulfoacid has been established. The predicted search of biological activity of synthesized compounds with using of computerized program PASS has been performed.

Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень і публікацій. Однією з проблем сьогодення, що все частіше привертає до себе увагу науковців, є проблема захисту промислових матеріалів, сировини, виробів і конструкцій від біопошкоджень, оскільки втрати від цих пошкоджень досягають колосальних розмірів. Відомо, що у ході експлуатації матеріали, сировина та конструкції піддаються дії різноманітних мікроорганізмів, внаслідок чого погіршується товарний