

БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 577.127: 582.923.1 + 58.085

Н. М. ДРОБИК

Тернопільський національний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027

ДИНАМІКА РОСТОВИХ ТА БІОСИНТЕТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК КУЛЬТУРИ ТКАНИН *GENTIANA ACAULIS* L. ТА *GENTIANA LUTEA* L.

Досліджено динаміку приросту біомаси стабільних калюсних культур кореневого походження *Gentiana acaulis* L. і *Gentiana lutea* L. та синтезу в них флавоноїдів і ксантонів протягом пасажу. Виявлено взаємозв'язок між проліферацією культури тканин, вмістом у них біологічно активних речовин та умовами культивування *in vitro*. Доведено, що підібране живильне середовище сприяє як приросту біомаси, так і синтезу флавоноїдів і ксантонів. Встановлено розмежованість цих процесів у часі та зворотну залежність між ними.

Ключові слова: *Gentiana acaulis* L., *Gentiana lutea* L., культура тканин рослин, приріст біомаси, флавоноїди і ксантони

Культура клітин і тканин *in vitro* у даний час знаходить застосування у широкому діапазоні біологічних досліджень [6, 7, 9]. Важливою особливістю культивованих клітин є їхня здатність утворювати клітинну біомасу і накопичувати продукти метаболізму. При цьому в культивованих клітинах, які не перебувають під контролем розвитку цілісного організму, шляхи метаболізму можуть відрізнятися від процесів, властивих самій рослині. Для більшості культур характерний нижчий, порівняно з інтактними рослинами, рівень синтезу вторинних сполук, що робить їх вирощування економічно не вигідним. Однак, оптимізація умов вирощування *in vitro* неорганізовано проліферуючих клітин може привести до значного збільшення продуктивності культури з необхідним комплексом метаболітів [6, 9].

Зважаючи на фармакологічну цінність представників роду *Gentiana* флори України і зменшення їхньої чисельності, спричинене різними, у тому числі антропогенними чинниками, а також складну біологію та фрагментарність досліджень цих рослин, раніше нами отримані культури тканин семи видів тирличів та досліджено їхніх фізіолого-біохімічні особливості [3, 4, 13].

Однак, відомо, що у багатьох випадках культури тканин рослин накопичують вторинні метаболіти в значних кількостях лише при сповільненні або зупинці росту клітин, хоча у деяких випадках синтез продукту сприяє росту клітин [6, 10]. Приріст біомаси та рівень біосинтезу часто пов'язані зворотною кореляцією. Інколи спостерігається накопичення продуктів вторинного метаболізму в клітинах на стаціонарній фазі кривої росту [14]. Тому для одержання специфічного продукту при періодичному вирощуванні необхідно було підібрати оптимальні умови як для приросту біомаси, так і для біосинтезу та накопичення біологічно активних речовин (БАР). Важливою умовою ефективності отриманих культур *in vitro* є збереження ними здатності до синтезу БАР впродовж тривалого часу.

Метою даного дослідження було вивчення динаміки ростових та біосинтетичних параметрів стабільних калюсних культур кореневого походження *G. acaulis* та *G. lutea*.

Матеріал і методи досліджень

У роботі використовували культури тканин *G. acaulis* та *G. lutea*. Калюси були отримані з кореневих експлантів рослин *G. acaulis* з туркульської (г. Туркул, хребет Чорногора, ISSN 2078-2357. Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол., 2011, № 1 (46) 37

Закарпатська обл., 1750 м.н.р.м) та *G. lutea* з трояської (г. Трояска, хр. Свидовець, Закарпатська обл., 1695 м н.р.м.) популяцій. Умови отримання та вирощування калюсів *G. acaulis* та *G. lutea* описано в роботі [3]. Тривалість пасажу калюсів становила 4 тижні.

Індекс росту (ІР) за сухою масою калюсу та вміст флавоноїдів і ксантонів визначали у стабільних сформованих калюсах кореневого походження *G. acaulis* – на 33 та *G. lutea* – на 26 пасажів через кожні 5 діб впродовж 45 діб культивування. Індекс росту (відносний приріст сухої маси калюсу) за сухою масою калюсу визначали за формулою:

$$IP = \frac{M - m}{m},$$

де ІР – індекс росту за сухою масою калюсу, M – маса калюсу через кожні 5 діб, m – початкова маса калюсу.

Сумарний вміст флавоноїдів і ксантонів у досліджених зразках визначали як описано в [1, 12].

Отримані результати відносного приросту біомаси та кількісного визначення суми флавоноїдів і ксантонів опрацьовували статистично [8].

Результати досліджень та їх обговорення

У результаті нами досліджено динаміку фізіолого-біохімічних характеристик стабільних калюсних культур кореневого походження *G. acaulis* та *G. lutea*.

***G. acaulis*.** Дослідження кореневого калюсу *G. acaulis* показало, що протягом 20 діб пасажу відбувається зменшення синтезу ксантонів порівняно з першим днем (рис. 1). Вміст флавоноїдів на 5-ту добу був досить високим, проте вже на 10-ту добу цей показник зменшувався у 2,5 раза, тоді як індекс росту за сухою масою протягом цього періоду збільшувався в 1,7 раза. З 15-ї по 35-ту добу вміст флавоноїдів практично не змінювався порівняно з 10-ю добою, і залишався невисоким. У той же час з 10-ї по 15-ту добу відбувався найбільш інтенсивний ріст калюсу: його ІР за сухою масою на 15-ту добу був максимальний і становив 1,1. Показники вмісту ксантонів і флавоноїдів дещо збільшувалися на 30-ту добу культивування, тоді як приріст біомаси калюсу в цей час порівняно з 15-ю добою зменшувався в 1,6 раза. Після 30-ї доби ріст калюсу продовжував сповільнюватися: його ІР за сухою масою становив 0,6–0,7, у той час як на 40-у добу культивування показники вмісту ксантонів і флавоноїдів у дослідженому калюсі були найвищими і склали 3,52 % і 4,77 % відповідно. Приріст калюсу на 40-у добу порівняно з 15-ю зменшувався в 1,8 раза [11].

Порівнюючи динаміку накопичення БАР у калюсній культурі із динамікою приросту біомаси калюсу (рис. 1), слід відзначити зворотну залежність: коли приріст біомаси зменшується – вміст БАР збільшується, що часто спостерігається в культурах тканин [6]. Очевидно, в даному випадку на 40-у добу культивування ріст калюсу *G. acaulis* сповільнюється, а весь потенціал спрямовується на синтез вторинних метаболітів.

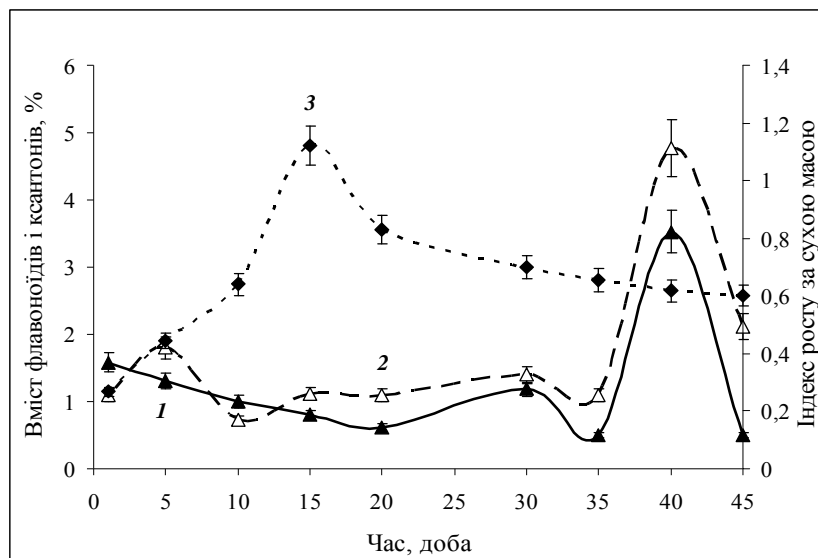


Рис. 1. Динаміка приросту біомаси в культурі тканин *G. acaulis* (туркульська популяція) протягом 33-го пасажу та синтезу в ній ксантонів і флавоноїдів: 1 – ксантони, %; 2 – флавоноїди, %; 3 – індекс росту за сухою масою

Порівняння отриманих результатів вмісту БАР в калюсі *G. acaulis* та дикорослих рослинах показало високу активність синтезу ксантонів і флавоноїдів в культурі *in vitro*. Вміст флавоноїдів у калюсній культурі перевищував такий у коренях рослин *G. acaulis* з туркульської популяції в 3,9 раза, з реберської – в 2,9 раза, а також у надземній частині рослин реберської популяції – у 2,1 раза, однак був дещо нижчий, ніж у надземній частині рослин туркульської популяції (рис. 2, а).

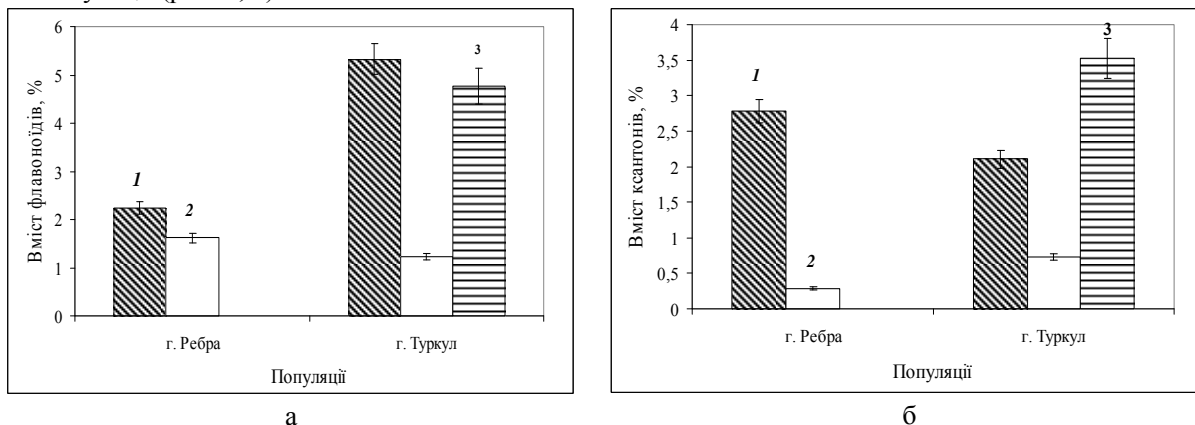


Рис. 2. Сумарний вміст флавоноїдів (а) та ксантонів (б) у зразках *G. acaulis* з реберської і туркульської популяції: 1 – пагони рослин; 2 – кореневище і корені рослин; 3 – культура тканин 33-го пасажу (туркульська популяція)

Максимальний вміст ксантонів у калюсі кореневого походження перевищував такий не лише у коренях рослин *G. acaulis* з туркульської (у 4,8 раза) і реберської (у 12,2 раза) популяції, але й у надземних частинах рослин (туркульської – у 1,7 раза, реберської – у 1,3 раза) (рис. 2, б) [11], хоча у природі в надземних частинах рослин ксантонів синтезується більше, ніж у коренях [5].

***G. lutea*.** Дослідження стабільної культури тканин кореневого походження *G. lutea* показало, що протягом перших 20 діб відбувається збільшення відносного приросту сухої маси калюсу (рис. 3). Вміст флавоноїдів на 5-у добу росту був невисоким (0,38 %), на 10-у – збільшувався в 1,4 раза, на 15-у – зменшувався майже у 2,3 раза на фоні збільшення індекса

росту за сухою масою калюсу. Вміст ксантонів, як і флавоноїдів, на 5-у добу був низьким (0,12 %). З 5-ї по 10-ту добу цей показник зростав у 2 рази, з 10-ї до 15-ту доби – залишався без суттєвих змін. З 15-ї до 20-ї доби вміст флавоноїдів і ксантонів практично не змінювався [2]. На 20-ту добу культивування ІР за сухою масою калюсу *G. lutea* був найвищим і становив 1,85, тоді як показники вмісту БАР були низькими. Починаючи з 20-ї доби вміст як флавоноїдів, так і ксантонів, зростав, досягаючи максимуму на 35-ту добу культивування – 2,34 % та 1,64 % відповідно. У той же час, на даному етапі культивування ІР за сухою масою калюсу був мінімальним. З 35-ї доби і до закінчення експерименту (до 45-ї доби) відбувалося зменшення вмісту флавоноїдів і ксантонів більше, ніж у 7 та 6 разів відповідно.

Порівнюючи динаміку накопичення БАР у калюсній культурі *G. lutea* із динамікою приросту калюсу (рис. 3), слід відзначити зворотну залежність – при збільшенні ІР за сухою масою, вміст флавоноїдів і ксантонів зменшується, і навпаки, що є характерним для багатьох культур.

Порівняння отриманих результатів вмісту БАР у калюсі *G. lutea* та дикорослих рослинах показало високу активність синтезу флавоноїдів і ксантонів в культурі *in vitro*.

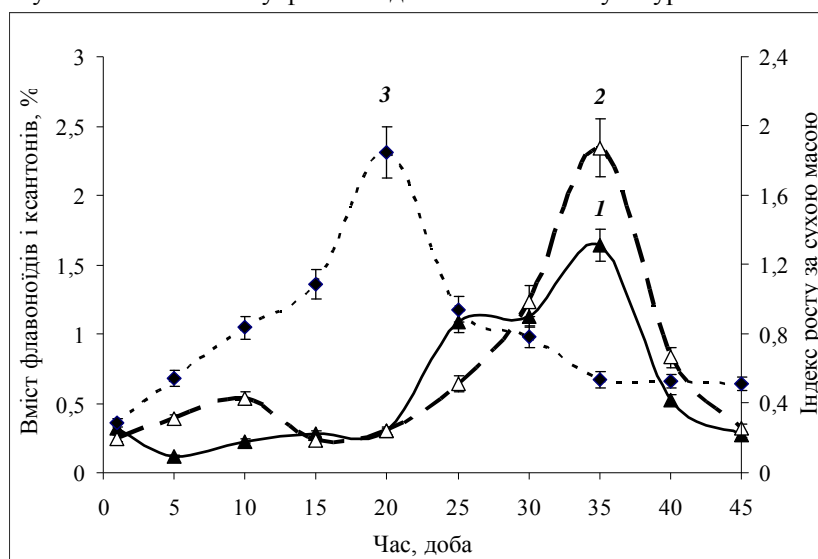


Рис. 3. Динаміка приросту біомаси в культурі тканин *G. lutea* (трояська популяція) протягом 26-го пасажу та синтезу в ній ксантонів і флавоноїдів: 1 – ксантони, %; 2 – флавоноїди, %; 3 – індекс росту за сухою масою

Їхній максимальний вміст у калюсі перевищував такий у коренях рослин *G. lutea* з рогнеської, пожижевської та трояської популяцій (флавоноїдів – у 5,1; 4,9 та 5,4 рази; ксантонів – у 3,8; 3 та 3,5 рази відповідно), однак був нижчим від таких показників у пагонах рослин (флавоноїдів – у 1,9; 4,2 та 2,9 рази; ксантонів – у 1,2; 2,4 та 1,7 рази відповідно) (рис. 4, а, б) [2].

Проведені дослідження вказують на те, що підібрані умови культивування забезпечують ріст калюсів *G. lutea* і *G. acaulis* та синтез у них вторинних метаболітів. Порівняння вмісту флавоноїдів і ксантонів на 28-у добу культивування на 15-ому та 33-ому пасажах у калюсі *G. acaulis* та на 13-ому і 26-ому пасажах – у калюсі *G. lutea* показали [1, 12], що кількість цих вторинних метаболітів змінюється несуттєво, тобто в процесі тривалого культивування продуктивність залишається відносно стабільною (рис. 5).

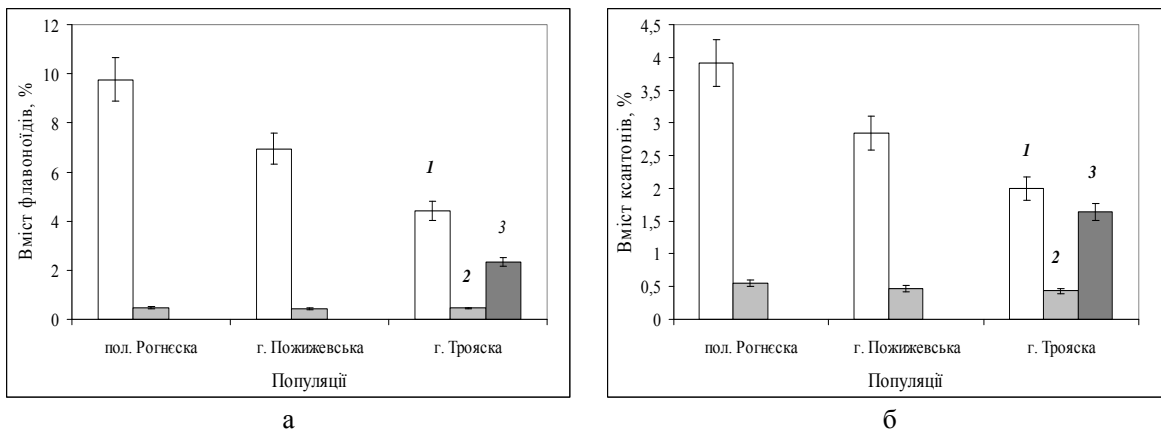


Рис. 4. Сумарний вміст флавоноїдів (а) та ксантонів (б) у зразках *G. lutea* з рогнеської, пожижевської та трояської популяцій: 1 – пагони рослин; 2 – кореневище і корені рослин; 3 – культура тканин 26-го пасажу (трояська популяція)

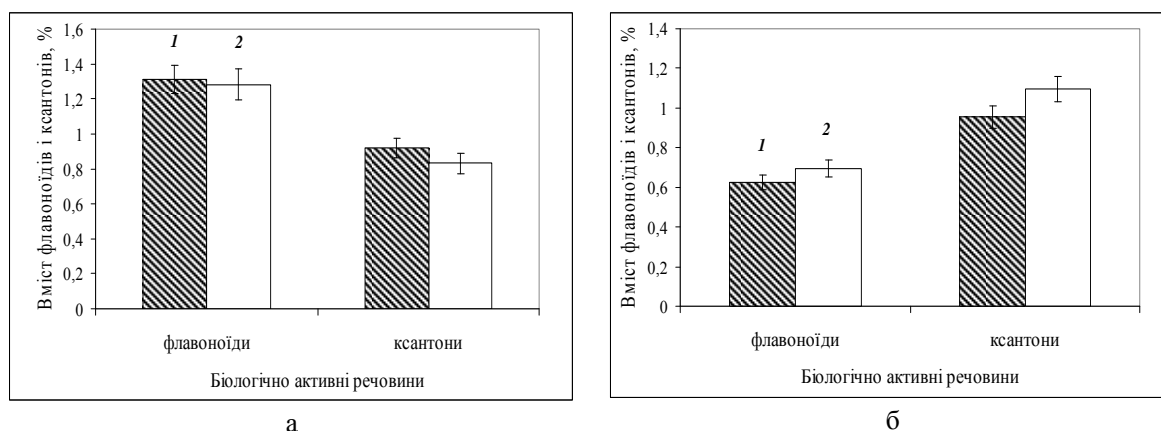


Рис. 5. Сумарний вміст флавоноїдів і ксантонів у культурі тканин за різної тривалості культивування: а – *G. acaulis* (туркульська популяція) на 15-ому (1) і 33-ому (2) пасажах; б – *G. lutea* (трояська популяція) на 13-ому (1) і 26-ому (2) пасажах

Підсумовуючи результати проведених досліджень, слід відзначити, що прослідковується взаємозв'язок між проліферацією калюсів *G. acaulis* та *G. lutea*, синтезом у них БАР та умовами культивування *in vitro*. При введенні в культуру *in vitro* важливим завданням є підбір таких умов, які б одночасно забезпечували і ріст калюсу, і синтез в ньому цінних вторинних метаболітів. Перешкодою на шляху максимальної реалізації біосинтетичного потенціалу культури тканин часто є антагонізм між процесами проліферації і накопичення БАР. Підібране нами живильне середовище сприяє проходженню обох цих процесів, однак приріст біомаси (максимум на 15-ту – *G. acaulis* та 20-ту добу – *G. lutea*) та синтез флавоноїдів і ксантонів (максимум на 40-ву – *G. acaulis* та 35-ту добу – *G. lutea*) у калюсних тканинах *G. acaulis* та *G. lutea* чітко розмежовані в часі. Виходом з такої ситуації є відбір матеріалу для подальшого пасажування на 21–26-ту доби, тоді як для отримання БАР («знімання врожаю») тривалість пасажу потрібно продовжувати до 35–40-ої доби.

У літературі відсутні дані, що стосуються синтезу флавоноїдів і ксантонів у культурі тканин видів роду *Gentiana*, проте відомо, що у деяких випадках культура *in vitro* тирличів втрачає здатність синтезувати інші вторинні метаболіти. Наприклад, проведено порівняльний аналіз вмісту секоїридоїдів у листках інтактних рослин та калюсі *G. cruciata*. Показано, що в листках рослин амарогентин присутній у достатній кількості, тоді як у калюсі виявлено його залишкові кількості. Проте, в калюсі *G. cruciata* синтезувалися деякі секоїридоїди, не характерні для інтактних рослин [15].

Висновки

Досліджено динаміку приросту біомаси калюсів кореневого походження *G. acaulis* (туркульська популяція) і *G. lutea* (трояська популяція) та синтезу в них ксантонів і флавоноїдів протягом пасажу. Показано зворотну залежність між приростом біомаси і накопиченням БАР. Виявлено, що вміст ксантонів і флавоноїдів протягом пасажу змінювався – був максимальним на 40-ву (*G. acaulis*) та 35-ту (*G. lutea*) доби культивування, і перевищував, у випадку калюсу *G. acaulis*, аналогічні показники у коренях та пагонах дикорослих рослин туркульської та реберської популяцій, та, у випадку калюсу *G. lutea* – у коренях рослин цього виду з трояської, рогнеської та пожижевської популяцій. Встановлено, що в процесі тривалого культивування продуктивність калюсних культур залишається відносно стабільною.

1. Біологічно активні речовини видів роду *Gentiana* L. Вміст ксантонів у культурі тканин // Н.М. Дробик, О.М. Леськова, В.М. Мельник [та ін.] // «Наукові записки» Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. – 2010. – №4 (45). – С. 34–40.
2. Біологія кліток рослин *in vitro* і біотехнологія: матеріали ІХ междунар. конф., 8-12 сентября 2008 г., Звенигород. – Москва, ИД ФБК-ПРЕСС. – 2008. – 462 с.
3. Введення в культуру *in vitro* деяких видів роду *Gentiana* L. / Н.М. Страшнюк, Л.Р. Грицак, О.М. Леськова [та ін.] // Физиология и биохимия культ. растений. – 2004. – Т.36, №4. – С. 327–334.
4. Введення в культуру *in vitro* рідкісного виду Українських Карпат *Gentiana verna* L. / Н.М. Страшнюк, Н.Б. Кравець, І.І. Конвалюк [та ін.] // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія. – 2008. – Вип. 22. – С. 49–53.
5. Денисова-Дятлова О.А. Природные ксантоны / Ольга Александровна Денисова-Дятлова, Владимир Иванович Глызин // Успехи химии. – 1982. – Вып. 10. – С. 1753–1773.
6. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / Віктор Анатолійович Кунах. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
7. Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* / В.А. Кунах // Физиол. раст. – 1999. – Т.46, №6. – С. 919–929.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биологических специальностей вузов / Георгий Филиппович Лакин. – М.: Высш. школа, 1980. – 293 с.
9. Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент / А.М. Носов // Физиол. раст. – 1999. – Т. 46, №6. – С. 837–844.
10. Носов А.М. Функции вторичных метаболитов растений *in vivo* и *in vitro* / А.М. Носов // Физиол. раст. – 1994. – Т.41, №6. – С. 873–878.
11. Отримання та біохімічний аналіз культури тканин тирличу безстеблового (*Gentiana acaulis* L.) / Н.М. Страшнюк, О.М. Леськова, В.М. Мельник, [та ін.] // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2006. – Т.4, №1. – С. 89–95.
12. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция / Владимир Анатольевич Сидоров. – К.: Наук. думка, 1990. – 280 с.
13. Спектрофотометричне визначення суми флавоноїдів у рослинах деяких видів роду *Gentiana* L. / О.М. Леськова, В.М. Мельник, Г.Я. Загричук [та ін.] // «Наукові записки» Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. – 2004. – №3-4 (24). – С. 54–57.
14. Страшнюк Н.М. Введення в культуру *in vitro* видів тирличу хрещатого (*Gentiana cruciata* L.) та тирличу звичайного (*Gentiana pneumonanthe* L.) / Н.М. Страшнюк, М.О. Твардовська, В.М. Мельник // «Наукові записки» Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: біологія. – 2006. – №2 (29). – С. 100–107.
15. The synthetic potential of cultured plant cell / M.M. Yeoman, M.B. Miedzybrodska, K. Lindsey [et al.] // Plant Cell Cultures: Resultes and perspectivs. Amsterdam etc.: Elsevier, 1980. – P. 327.
16. Wesolowska M. Rodzaj *Gentiana* L. w kulturze *in vitro* / M. Wesolowska, L. Skrzypczak, R. Dudzinska // Acta Polon. Pharm. – 1985. – Vol.42, №1. – P. 79–83.

Н. М. Дробык

Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка, Украина

ДИНАМІКА РОСТОВИХ І БІОСИНТЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КУЛЬТУРИ ТКАНЕЙ *GENTIANA ACAULIS* L. І *GENTIANA LUTEA* L.

Исследована динаміка прироста біомаси стабільних калюсних культур кореневого походження *Gentiana acaulis* L. і *Gentiana lutea* L. і синтезу в них флавоноїдів і ксантонов на протяженіе пасажу. Установлена взаємозв'язь между пролиферацией каллусов,

содержанием в них биологически активных веществ и условиями культивирования *in vitro*. Доказано, что подобранная питательная среда способствует как приросту биомассы, так и синтезу флавоноидов и ксантонов. Установлена разграниченность этих процессов во времени и обратная зависимость между ними.

Ключевые слова: *Gentiana acaulis L.*, *Gentiana lutea L.*, культура тканей растений, прирост биомассы, флавоноиды и ксантоны

N.M. Drobyk

Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine

DYNAMICS OF GROWTH AND BIOSYNTHETIC CHARACTERISTICS FOR *GENTIANA ACAULIS L.* AND *GENTIANA LUTEA L.* TISSUE CULTURES

There have been investigated the dynamics of biomass surplus of *Gentiana acaulis L.* and *Gentiana lutea L.* stable callus cultures of root origin as well as flavonoids and xanthonenes synthesis in them during the passage. The interconnection between proliferation of tissue cultures, amount of biologically active substances in them and conditions of cultivation *in vitro* has been found. It has been proved that the chosen nutrient medium promotes both biomass surplus and flavonoids and xanthonenes synthesis. It has also been established time differentiation of these processes and inverse dependence between them.

Key words: *Gentiana acaulis L.*, *Gentiana lutea L.*, plant tissues culture, biomass surplus, flavonoids and xanthonenes

Рекомендує до друку

В.В. Грубінко

Надійшла 24.09.2010