

ОГЛЯДИ

УДК 582.542.11+57.085.2

¹О. М. ЗАГРИЧУК, ¹Ю. Г. ЗАГРИЧУК, ²Н. М. ДРОБИК

¹ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»

²Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* E. DESV. *IN VITRO* ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Проведено огляд наукових робіт, що стосуються дослідження *D. antarctica*; розглянуто можливості використання культур *in vitro* цього виду для отримання рослинного матеріалу, який характеризується цінними лікувальними властивостями; проаналізовано роботи, що стосуються культивування *D. antarctica in vitro* та збільшення біологічної продуктивності отриманих культур.

Ключові слова: *Deschampsia antarctica* E. Desv., культивування *in vitro*, біологічно активні речовини

Останнім часом все більшу увагу науковців привертають рослини, які в ході еволюції виробили різноманітні пристосування до екстремальних умов існування. Серед таких є щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* E. Desv.) – один із двох видів вищих судинних рослин, що зростають у складних кліматичних умовах Антарктики. Низькі температури, підвищені дози ультрафіолету, низька вологість повітря, шквальні вітри, снігові бурі, бідність ґрунтосубстрату на органічні сполуки сформували фізіологічні, анатомічні та ультраструктурні адаптаційні особливості *D. antarctica* [1, 2, 3].

D. antarctica здатна у жорстких кліматичних умовах Антарктики продукувати високий вміст сполук, що отримуються із фенольних кислот і флавоноїдів [1, 4, 5]. Ультрафіолетове випромінювання підвищує у рослинах щучника антарктичного концентрацію флавоноїдів, зокрема орієнтину, лютеніну та ізовертілапоніну 2''-о-бета-арабінопіранозид [4, 6, 7]. Флавоноїди, у свою чергу, діють як фоторецептори, хелатори металів і антиоксиданти, захищають рослини від факторів, які викликають окислювальний стрес і пошкодження, що зумовлені вільними радикалами, мають антимікробну дію тощо [8]. Вид *D. antarctica* цікавий і тим, що є природним джерелом антиоксидантів, що можуть використовуватися у фармацевтичній промисловості, косметології – у сонцезахисних кремах, у харчовій промисловості – як харчові добавки тощо [9]. Вченими встановлено здатність вторинних метаболітів *D. antarctica*, зокрема сполук фенольної природи, інгібувати проліферацію клітин меланоми [9].

Зважаючи на складність збору достатньої кількості рослинного матеріалу, несприятливість умов для проведення експериментальних досліджень у природі, доцільним є введення цієї рослини в культуру *in vitro*. Наявність рослин *D. antarctica* в колекції *in vitro* дозволить зменшити вплив на антарктичні природні популяції виду та дасть можливість круглорічно, у контрольованих лабораторних умовах отримувати рослинну сировину та шляхом регуляції умов культивування підвищувати у ній вміст цінних вторинних метаболітів [2, 9].

У літературі є небагато повідомлень, що стосуються культивування та дослідження *D. antarctica in vitro*. Зокрема, М. Суба із співавторами (2005) відпрацювали швидкий і зручний спосіб розмноження *D. antarctica* з використанням культури тканин *in vitro*. Зразки рослин з Антарктики відмивали від природного субстрату й стерилізували, після чого листові та кореневі експлантанти (5 мм) інкубували в чашках Петрі на живильному середовищі Мурасіге–Скуга (МС) з додаванням різних концентрацій регуляторів росту 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) і 6-бензиламінопурина (БАП). Через три місяці дослідникам вдалося збільшити кількість рослинного матеріалу *D. antarctica* у чотири-п'ять разів [10].

Іншими дослідниками запропоновано винахід, що стосується нового протипухлинного екстракту, отриманого з рослин *D. antarctica* [9]. Особливість цього винаходу полягає в тому, що рослини вирощують в пробірках у спеціально підібраних умовах, які забезпечують збільшення вмісту поліфенолів у рослинних тканинах. Крім того, запропоновано спосіб збільшення продуктивності активних інгредієнтів у рослинах в умовах *in vitro* шляхом піддавання їх фізичній або хімічній обробці. Вченими отримано екстракт з протипухлинною активністю, який використовують для лікування та профілактики онкологічних захворювань [9].

Для оптимізації приросту біомаси і фенілпропановидного виробництва в *D. antarctica* вченими був запропонований фотобіореактор [11]. Авторами розроблено конструкцію та описано особливості використання фотобіореактора та УФ випромінювання для продукування та збільшення біомаси *D. antarctica* і накопичення в процесі культивування вторинних метаболітів. Дія УФ випромінювання протягом 30-ти хвилин із шестигодинним інтервалом призводила до збільшення вмісту фенольних сполук у 3 рази і антиоксидантної активності в 1,5 рази порівняно з контрольною групою, що не піддавались дії УФ випромінювання. У цих проростках було виявлено значне накопичення скополетину, хлорогенової кислоти, галової кислоти і рутину [11].

Чилійськими вченими у 2013 р. розроблено спосіб культивування та мікророзмноження *D. antarctica in vitro* [12]. З цією метою автори пропонують використовувати фото-термо-біореактор для мікроклонального розмноження рослин і отримання біомаси. Фото-термо-біореактор містить засоби для хімічного індуктування (солі, метали, органічні компоненти тощо), а також освітлення або люмінесцентні засоби (УФ-радіація і температура), які можуть бути використані на будь-якій стадії росту рослинного матеріалу. Перевагою винаходу є можливість створювати умови як для збільшення приросту біомаси *D. antarctica*, так і для синтезу вторинних метаболітів, що характеризуються цінними лікувальними властивостями [12].

Виходячи з актуальності дослідження щучника антарктичного, нами у лабораторії екології та біотехнології Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка у співпраці з відділом генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України проведено комплекс експериментальних робіт для введення цього виду в культуру *in vitro* [13, 14]. Розроблено спосіб отримання вихідного асептичного матеріалу *D. antarctica*, що полягав у стерилізації і пророщуванні *in vitro* стратифікованого насіння. Для проростання насіння рослин *D. antarctica* з різних місць зростання встановлено спільні ознаки: доцільність використання для стерилізації пероксиду гідрогену, відсоток асептичного насіння у всіх випадках складав 98–100 %; ефективність порушення спокою насіння дією низьких позитивних температур (2–4 °С) та обробкою гіберелової кислоти; проростання насіння в умовах освітлення. Спосіб дозволяє одержувати впродовж усього року життєздатні морфологічно нормальні проростки цього виду [13]. Встановлено, що для мікроклонального розмноження *D. antarctica* оптимальним серед протестованих було агаризоване живильне середовище Гамборга, Евелейг (В5), доповнене 0,2 мг/л кінетину. Ефективним способом мікроклонування є відокремлення утворених на дернині пагонів [13]. Розроблено умови індукції калюсоутворення з корневих і пагонових експлантів та тривалого вирощування культури тканин *D. antarctica*. Оптимальним для отримання калюсної тканини було живильне середовище В5, доповнене 0,9–1 мг/л 2,4-Д і 0,09–0,1 мг/л БАП. Калюсогенна активність із корневих експлантів значно перевищувала (в 1,5–2 рази) таку з пагонових [14].

Отримано пагони шляхом спонтанного непрямого органогенезу. Виявлено здатність *D. antarctica* до спонтанної регенерації пагонів із калюсу на середовищах В5, МС і Шенка–Хільдебрандта (ШХ), доповнених 2,4-Д та БАП. Показники ефективності регенерації варіювали від 0,4 до 4,7 регенеранта на інокулюм і були найвищими при культивуванні калюсу на середовищі В5 з 0,9 мг/л 2,4-Д та 0,09 мг/л БАП. Вкорінено регенеровані пагони та підбрано умови для росту рослин-регенерантів *in vitro*. Приріст біомаси регенерованих з калюсу рослин був на порядок більший, порівняно з рослинами, одержаними шляхом проростання насіння в умовах *in vitro* [14].

При вивченні клонованих *in vitro* рослин *D. antarctica*, отриманих з насіння, зібраного на однаковій фізіологічній стадії росту рослин з різних регіонів Антарктики у різні роки та вирощених в однакових умовах, встановлено, що вони реалізовували свою різну здатність синтезувати фенольні сполуки [5]. Встановлено, що протипухлинна активність екстрактів з рослин *in vitro* роду *Deschampsia* прямо пов'язана з загальною кількістю в них фенольних сполук. Автори роблять висновок, що культивовані *in vitro* клони рослин роду *Deschampsia* є перспективними для розробки біотехнології отримання протипухлинних препаратів [5]. Виявлено, що культивовані *in vitro* рослини *D. antarctica* та рослини із природних популяцій, мають аналогічний склад флавоноїдів, але їх кількісний вміст був дещо нижчим у рослин, вирощених в асептичних умовах. У рослинах з різних популяцій, що містили диплоїдний набір хромосом, вміст флавоноїдів у листках був більшим порівняно з рослинами з іншим набором хромосом [15].

Отже, за відсутності достатньої кількості рослинного матеріалу через віддаленість Антарктики наявні на сьогодні методики культивування рослини *D. antarctica in vitro* можуть бути використані як базові для розроблення біотехнології отримання БАП.

1. Parnikoza I. Vascular plants of the Maritime Antarctic: Origin and adaptation / I. Parnikoza, I. Kozeretska, V. Kunakh // American Journal of Plant Sciences. — 2011. — Vol. 2. — P. 381—395.
2. Матвеева Н.А. Незнайом Антарктика: рослини розкривають свої таємниці / Н.А. Матвеева // Вісн. НАН України. — 2013. — № 10. — С. 58—70.
3. Mechanisms of Antarctic vascular plant adaptation to abiotic environmental factors / [I.P. Ozheredova, I.Yu. Parnikoza, O.O. Poronnik et al.] // Cytology and Genetics. — 2015. — Vol. 49, № 2. — P. 139—145.
4. The influence of ultraviolet-B radiation on growth, hydroxycinnamic acids and flavonoids of *Deschampsia antarctica* during springtime ozone depletion in Antarctica / [C. Ruhland, F. Xiong, W. Clark et al.] // Photochemistry and Photobiology. — 2005. — Vol. 81, № 5. — P. 1086—1093.
5. Клоновані *in vitro* рослини роду *Deschampsia* як джерело фенольних сполук з протипухлинними властивостями / [О.О. Поронник, А.В. Кузьменко, А.В. Воловик та ін] // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2014. — Т. 12, № 2. — С. 200—204.
6. Webby R. Isoswertiajaponin 2''-O- β -arabinopyranoside and other flavone-C-glycosides from the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* / R. Webby, K. Markham // Phytochemistry. — 1994. — Vol. 36, № 5. — P. 1323—1326.
7. Day T.A. Influence of solar ultraviolet-B radiation on Antarctic terrestrial plants: results from a 4-year field study / T.A. Day, C.T. Ruhland, F.S. Xiong // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. — 2001. — Vol. 62. — P. 78—87.
8. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part II: Reconstruction of multienzyme pathways in plant and microbes / F. Ververidis, E. Trantas, C. Douglas // Biotechnology Journal. — 2007. — Vol. 2, № 10. — P. 1235—1249.
9. Pat. US 2010/0310686 A1 Extracts of *Deschampsia antarctica* Desv. with antineoplastic activity / [M. Gidekel, H. Weber, G. Cabrera et al.]; this application claims priority of the U.S. provisional application № 61/003,058 filed on Nov. 14, 2007; date of publication 12.12.2010.
10. Micropropagation of *Deschampsia antarctica* — a frost resistant Antarctic plant / [M. Cuba, A. Gutierrez-Moraga, B. Butendieck et al.] // Antarctic science. — 2005. — Vol. 17, № 1. — P. 69—70.

11. *Production of phenolic metabolites by Deschampsia antarctica shoots using UV-B treatments during cultivation in a photobioreactor* / A. Sequeira, E. Tapia, M. Ortega // *Electronic Journal of Biotechnology*. — 2012. — Vol. 15, № 4. — P. 1—8.
12. *Pat. EP 2638798 A1 Thermo-photo-bioreactor and method for the culture and mass micropropagation of Deschampsia antarctica in vitro* / Z. Navarro, S. Honorato, C. Oyarzun [et al.]; applicant Universidad De Santiago De Chile 3363 Santiago; representative: L Carpintero, Francisco, Herrero & S.L. Asociados. — № 11805371.9; date of filing 09.11.2011; date of publication 18.09.2013.
13. *Введення в культуру in vitro Deschampsia antarctica з двох районів Прибережної Антарктики* / [О.М. Загричук, Н.М. Дробик, І.А. Козерецька та ін.] // *Український антарктичний журнал* — 2011/2012. — № 10—11. — С. 289—295.
14. *Калюсогенез та регенерація рослин Deschampsia antarctica Desv. (Poaceae) в культурі in vitro* / О.М. Загричук, А.І. Герц, Н.М. Дробик [та ін.] // *Biotechnologia Acta*. — 2013. — Vol. 6. — P. 77—85.
15. *Рослини Deschampsia antarctica E. Desv. з різним числом хромосом в умовах вирощування in vitro. Довжина листків та вміст флавоноїдів у культурі in vitro та в природі* / [О.О. Пороннік, І.Ю. Парнікоза, Н.Ю. Мірюта та ін.] // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. — 2017, Т. 20. — С. 310—313.

О. М. Загричук, Ю. Г. Загричук, Н. М. Дробик

ГВНЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского МОЗ Украины»

Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* E. DESV. *IN VITRO* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Проведен обзор научных работ, касающихся исследования *D. antarctica*; рассмотрены возможности использования культур *in vitro* этого вида для получения растительного материала, характеризующегося ценными лечебными свойствами; проанализированы работы, касающиеся культивирования *D. antarctica in vitro* и увеличения биологической продуктивности полученных культур.

Ключевые слова: *Deschampsia antarctica* E. Desv., культивирование *in vitro*, биологически активные вещества

О. М. Zahrychuk, Y. H. Zahrychuk, N. M. Drobyk

I. Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ukraine

Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine

PROSPECTS FOR THE USE OF *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* E. DESV. *IN VITRO* FOR THE PRODUCTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Research works concerning *Deschampsia antarctica* E. Desv. and its *in vitro* cultivation for the purpose of obtaining plant material, capable of synthesizing flavonoids and other biologically active substances (BAS), have been surveyed.

Despite harsh Antarctic climate, *D. antarctica* has been found to produce high content of compounds, obtained from phenic acids and flavonoids. *D. antarctica in vitro* culture has been found applicable for obtaining plant material, capable of synthesizing equally active substances. UV radiation increases the plant concentration of certain flavonoids, acting as photoreceptors, metal chelators and antioxidants, and protecting the plants from the factors, responsible for the oxidative stress and damages.

Complicacy of collecting sufficient amount of plant material and lack of favourable conditions for experimental research in the natural medium taken into consideration, introduction of the plant into *in vitro* culture seems to be reasonable. *D. antarctica* plants availability in the *in vitro* collection

will enable to grow raw material under laboratory control as well as to increase the content of valuable secondary metabolites by regulating cultivation conditions.

M. Cuba et al. were the first to work through prompt and handy method of *D. antarctica* proliferation using *in vitro* tissue culture. Vegetable samples from the Antarctic were cleaned from the natural substrate and sterilized that was followed by incubation of leaf and root explants (5 mm) in Petri dishes on the Murashige-Skoog growth medium, various concentrations of growth regulators added. 4-5 times increase in the amount of *D. antarctica* vegetable material within 3 months is a proof of experiment efficacy.

Another group of researchers have suggested a new method of growing plants in test tubes under matched conditions, providing polyphenol content increase in plant tissues. As a result, extracts with antitumoral activity, used for treatment and prevention of oncologic diseases, have been obtained.

In order to optimize biomass gain and *D. antarctica* phenylpropanoid production, a research crew have developed a photobioreactor, providing considerable accumulation of scopoletin, rutin, chlorogenic and gallic acids in the sprouts, exposed to UV radiation.

In 2013, the Chilean scientists patented a photo-thermo-bioreactor for microclonal proliferation and obtaining *D. antarctica in vitro* biomass. It is equipped with the devices for chemical induction, lighting or luminescence (UV radiation and temperature), which can be used at any phase of plant growth. Thus, increased biomass gain can be combined with providing conditions for the synthesis of secondary metabolites, possessing important therapeutic properties.

On the basis of Ecology and Biotechnology Laboratory, D. Hnatyuk Ternopil Teachers' Training University, and in cooperation with the Department of Cell Population Genetics of the Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, a research work package has been performed to introduce *D. antarctica* plants into *in vitro* culture. In particular, the conditions for germination, microclonal proliferation, and for callus formation from different types of explants have been developed. Due to durable growing of *D. antarctica* tissue culture through spontaneous indirect organogenesis, sprouts have been grown and conditions for their rootage and for the growth of regenerant plants have been selected.

In vitro cultivated *D. antarctica* plants have been found to possess flavonoid content similar, though lower quantitatively, to that in natural populations. In the plants with diploid number of chromosomes, the leaf flavonoid content was lower as compared with the plants with different chromosome number.

Sufficient amount of the plant material being scarce owing to the Antarctic remoteness. The newly-developed methods of *D. antarctica* plants *in vitro* cultivation can be applied for growing sufficient amount of raw material, needed for BAS production.

Key words: *Deschampsia antarctica* E. Desv., *in vitro* cultivation, biologically active substances

Рекомендує до друку
В. В. Грубінко

Надійшла 21.02.2018