

**РОЛЬ ФІЗИЧНИХ І ЕПІГЕНЕТИЧНИХ ФАКТОРІВ
У КАЛЮСОУТВОРЕННІ *IN VITRO* *POTENTILLA RECTA* L. SUBSP.
LACINIOSA (WALDST. ET KIT .EX NESTLER) NYMAN**

О.Ю. Заяць, аспірант*

**І.В. Митрофанова, доктор біологічних наук
Нікітський ботанічний сад**

Показано можливість калюсоутворення з різних експлантів *Potentilla recta* в умовах *in vitro*. Відібрано штами калюсів, які відрізняються світло-коричневим забарвленням, щільною консистенцією, низьким рівнем вітрифікації. Встановлено достовірні відмінності в кількісних характеристиках отриманих штамів залежно від типу експланта, розміщення його відносно поживного середовища і фізичних факторів культивування.

Potentilla recta*, калюсогенез, експлант, фізичні фактори, *in vitro

Рід *Potentilla*, що належить до родини Rosaceae, широко відомий з давніх часів своїми лікувальними властивостями [10]. Одним із представників цього роду, що використовуються в традиційній медицині та гомеопатії, є перстач прямий (*Potentilla recta* L.) [1]. Це багаторічна лікарська, трав'яниста рослина, яка має бактерицидну, в'яжучу і гемостатичну дію. Кореневища *P. recta* використовують для лікування і профілактики дизентерії, при виразкових колітах, гастритах, холециститах і цирозі печінки. Водні та спиртові настої перстачу прямого застосовують для лікування ран і нігтьових [1, 5, 7, 11].

Нині з рослинного матеріалу отримують більше третини лікарських препаратів, структура багатьох з них настільки складна, що рослини ще довго будуть їх єдиним джерелом [6]. Звертаючи увагу на актуальність проблеми виробництва високоякісної лікарської сировини, пошук нових альтернативних і економічно доступних джерел отримання біологічно активних речовин рослинного походження є, безсумнівно, перспективним. Одним із таких джерел є культура клітин, органів і тканин рослин.

Незважаючи на те, що декоративні й цілющі властивості представників роду *Potentilla* є широковідомими, дослідженням особливостей калюсоутворення в умовах *in vitro* різних видів перстачів присвячені поодинокі публікації [2, 8].

Мета досліджень - виявлення особливостей калюсоутворення *in vitro* *Potentilla recta*.

Матеріали та методика досліджень. Об'єктами нашого дослідження були сегменти черешків і висічки листя асептичної культури *P. recta* subsp. *laciniosa* (Waldst. Et Kit. Ex Nestler) Nyman. У роботі використовували загальноприйняті біотехнологічні методи [4] і розроблені в Нікітському ботанічному саду – Національному науковому центрі (НБС-ННЦ) [3]. Роботу зі стерильним матеріалом проводили в ламінарних боксах марки Fatran (Чехія) і БП-4-004 (Україна). Сегменти черешків і висічки листків культивували на модифікованих поживних середовищах Піріка [9], доповнених 6-БАП, 2,4-Д або кінетином і НОК (Sigma, США) в різних концентраціях і співвідношеннях.

* Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор І.В. Митрофанова

Культивування експлантів проводили в термостаті в темряві при 26 ± 1 °C або у культуральній кімнаті при температурі 24 ± 1 °C, 16-годинному фотоперіоді та інтенсивності освітлення 2000–3000 лк. Частоту калюсоутворення оцінювали у відсотках за кількістю експлантів, що формують калюс, від їх загального числа. Для оцінки морфології калюсу використовували бінокулярний мікроскоп МБС-10 (Росія). Експеримент проводився в трьох повторностях. Статистичний аналіз даних проводили із застосуванням критеріїв Краскала-Уолліса, Манна-Уїтні, хі-квадрат. Для розрахунків використовували програмний пакет *StatSoft Statistica 10.0*.

Результати досліджень. У процесі досліджень вивчено вплив освітлення на особливості калюсоутворення у різних експлантів *P. recta*. Була показана можливість корене- і калюсоутворення з сегментів черешка і висічок листка (рис. 1, 2). У результаті проведеного експерименту були відібрані штами калюсів, які відрізняються світло-коричневим забарвленням, щільною консистенцією, низьким рівнем вітрифікації.

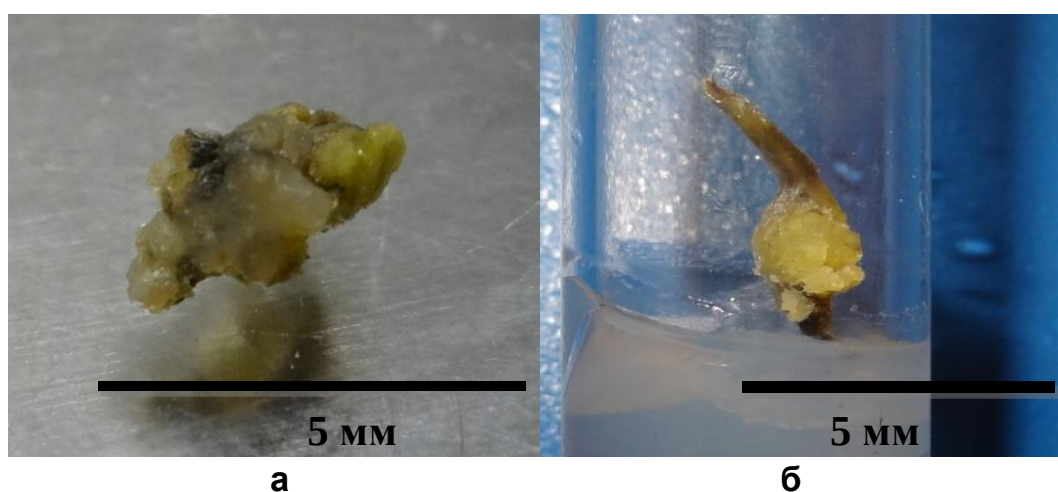


Рис. 1. Калюс *P. recta* з висічок листка (а) і сегментів черешка (б)

При культивуванні експлантів *P. recta* на світлі й у темряві частота калюсоутворення становила 54,5 % і 72,4 % відповідно. На світлі 20,6 % експлантів формували адвентивні корені. Разом з тим, культивування їх у темряві не призводило до утворення коренів *de novo* (рис. 3, а, б). Загальний аналіз експериментальних даних з використанням критерію хі-квадрат дозволив виявити деякі закономірності.

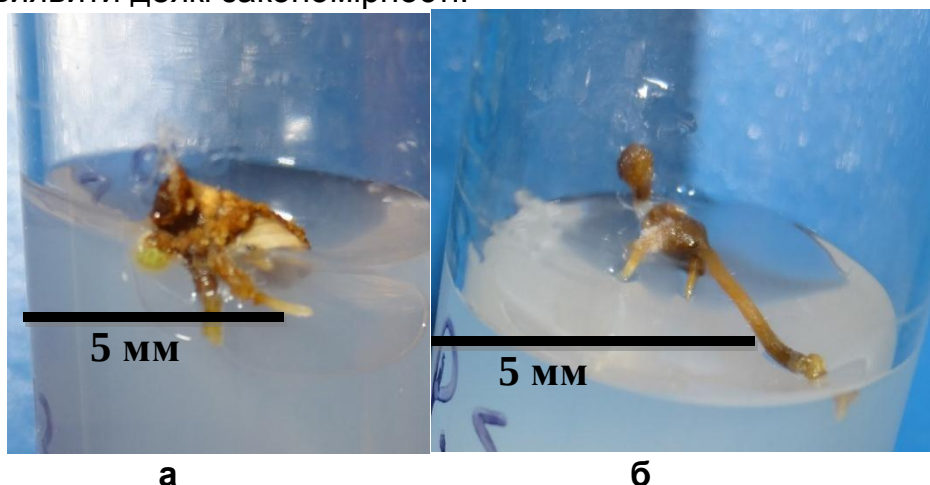


Рис. 2. Формування коренів з висічок листка (а) і сегментів черешка (б) *P. recta*

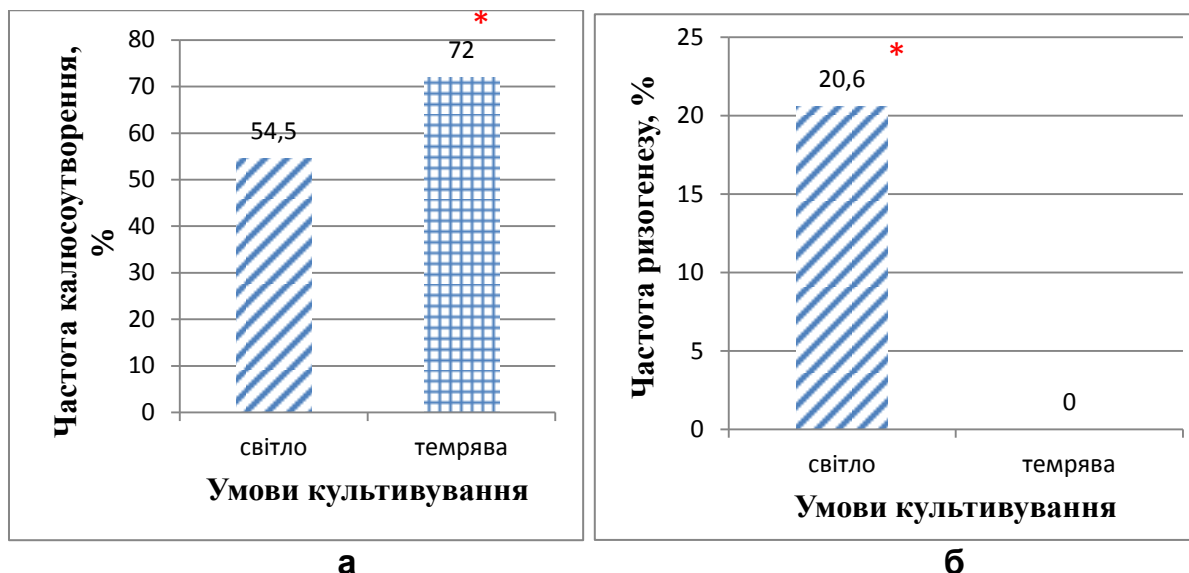


Рис. 3. Вплив умов культивування на частоту калюсоутворення (а) та частоту ризогенезу (б) з експлантів *P. Recta*
 (* – статистично достовірні відмінності при рівні значимості $\leq 0,05$)

Було виявлено, що умови культивування достовірно впливають на частоту калюсоутворення ($p=0,042$) та частоту ризогенезу ($p=0,001$) з різних експлантів *P. recta*.

У процесі досліджень встановлено, що культивування в темряві є оптимальною умовою для накопичення як сирої, так і сухої біомаси калюсу (рис. 4, а, б). Виявлено достовірний вплив світла на накопичення маси калюсу. Встановлено, що під впливом світла достовірно знижується накопичення як сирої, так і сухої маси калюсної тканини. Так, при культивуванні експлантів у темряві накопичення сирої та сухої маси калюсу становило $22,9 \pm 7,6$ і $8,2 \pm 3,35$ мг/експлант, тоді як на світлі – $8,1 \pm 2,6$ і $1,1 \pm 0,25$ мг/експлант відповідно.

У висічок листка, адаксіально орієнтованих до середовища, суха маса калюсу сягала в темряві – $8,7 \pm 5,2$, а на світлі – $0,8 \pm 0,2$ мг/експлант.

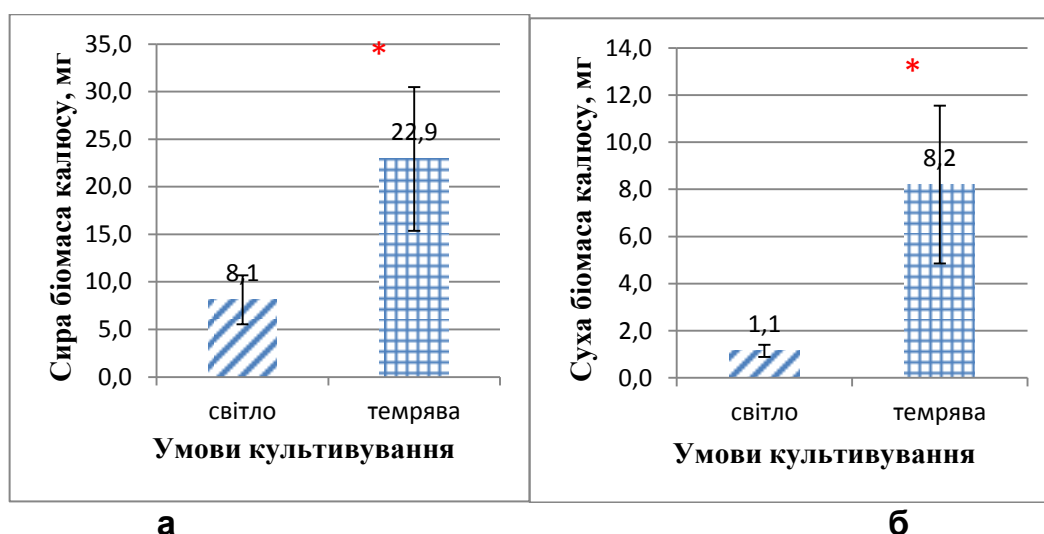


Рис. 4. Вплив умов культивування на накопичення сирої (а) та сухої (б) біомаси калюсу
 (* – статистично достовірні відмінності при рівні значимості $\leq 0,05$)

Для детальнішого вивчення та виявлення різних закономірностей був проведений додатковий аналіз. Вибірка була розділена на три групи за типами експлантів і способами їх орієнтації до поживного середовища: до першої групи віднесли висічки листка, розташовані до середовища абаксіально; до другої – висічки листка, розташовані відносно поживного середовища адаксіально; до третьої – сегменти черешків.

При культивуванні сегментів черешка на світлі й у темряві частота калюсоутворення становила 69,0 і 76,2 % відповідно. Разом з тим, частота калюсоутворення для висічок листка, розміщених абаксіально до поверхні поживного середовища, становила в темряві – 73,1 %, на світлі – 42,5 %. У висічок листка, адаксіально орієнтованих до середовища, частота калюсоутворення сягала в темряві – 62,6%, на світлі – 39,4% (рис. 5, А, Б). На цьому етапі аналізу експериментальних даних порівнювання вибірок відбувалося попарно за принципом група 1 (світло) з групою 1 (темрява). При цьому виявлено достовірний негативний вплив світла на частоту калюсоутворення висічок листка, абаксіально ($p=0,04$) та адаксіально ($p=0,02$) розташованих до середовища. При культивуванні сегментів черешка на світлі 28,57% експлантів формували адвентивні корені. У разі культивування висічок листка, розташованих адаксіальною та абаксіальною стороною до поживного середовища, 16,7% експлантів утворювало адвентивні корені. Культивування всіх типів експлантів в умовах відсутності освітлення не викликало утворення коренів *de novo*. Для всіх типів експлантів і способів їх розміщення на поживному середовищі встановлено достовірний позитивний вплив світла на частоту ризогенезу *in vitro* ($p \leq 0,05$).

При культивуванні сегментів черешка на світлі й у темряві накопичення сирової біомаси калюсу сягало $13,3 \pm 6,7$ і $16,7 \pm 6,1$ мг/експлант відповідно. Водночас накопичення сирової маси калюсної тканини для висічок листка, розміщених абаксіальною стороною до поверхні поживного середовища, становила в темряві – $31,3 \pm 18,1$, на світлі – $7,7 \pm 2,4$ мг/експлант (відмінності достовірні на рівні $p=0,49$). У висічок листка, адаксіально розташованих до середовища, сира маса калюсу сягала в темряві – $21,6 \pm 13,8$, а на світлі – $2,9 \pm 0,9$ мг/експлант (рис. 6, А).

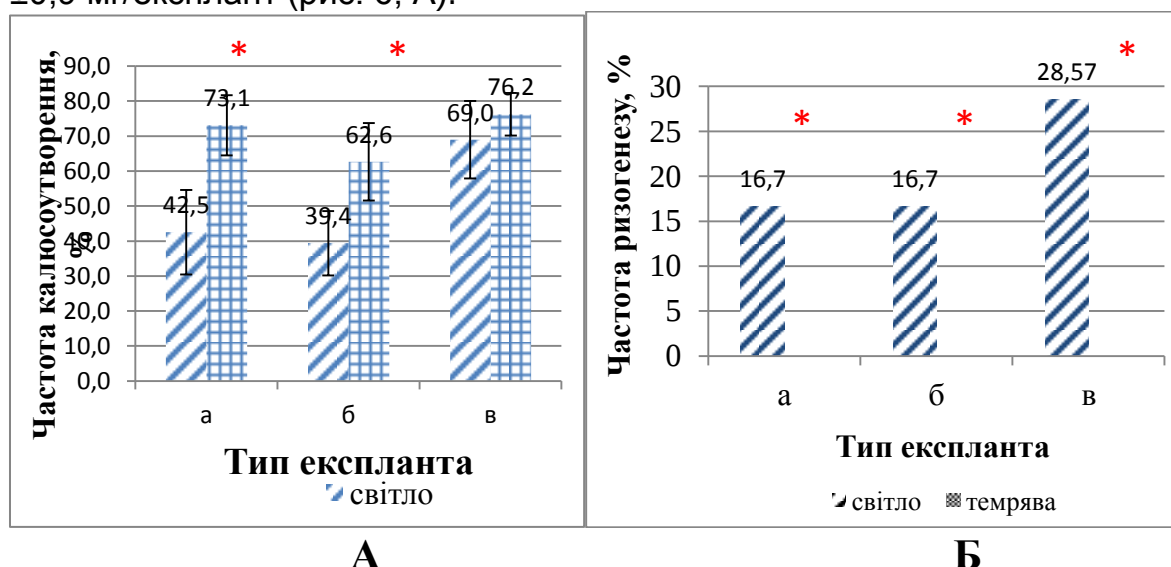


Рис. 5. Залежність частоти калюсоутворення (А) та ризогенезу (Б) від умов культивування та типу експланту:
а – висічки листка, розташовані абаксіально до середовища;
б – висічки листка, розташовані адаксіально до середовища;

в – сегменти черешка.

(* – статистично достовірні відмінності при рівні значимості $\leq 0,05$)

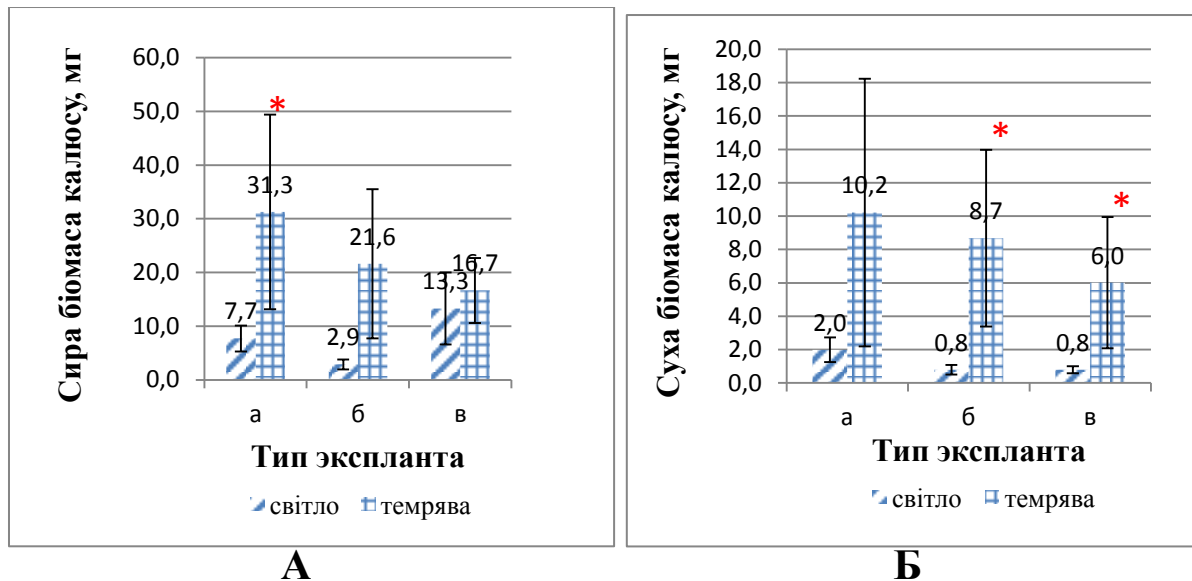


Рис. 6. Залежність накопичення сирої (А) та сухої (Б) біомаси калюсної тканини від умов культивування та типу експлантат:

а – висічки листка, розташовані абаксіально до середовища;

б – висічки листка, розташовані адаксіально до середовища;

в – сегменти черешка.

(* – статистично достовірні відмінності при рівні значимості $\leq 0,05$)

Разом з тим, встановлено достовірний вплив умов освітленості (наявність або відсутність світла), типу експланта та способів його розміщення на поживному середовищі на накопичення сирої біомаси калюсу ($p=0,029$).

Так, при культивуванні сегментів черешка на світлі й у темряві накопичення сухої біомаси калюсу досягало $6,0 \pm 3,1$ і $0,8 \pm 0,2$ мг/експлант відповідно (рис. 6, Б). При цьому відмінності достовірні на рівні $p=0,05$. Водночас накопичення сухої маси калюсної тканини для висічок листка, розміщених абаксіально до поверхні поживного середовища, становила в темряві – $10,2 \pm 8,0$, на світлі – $2,0 \pm 0,7$ мг/експлант ($p=0,045$). У висічок листка, адаксіально розташованих до середовища, суха маса калюсу сягала в темряві – $8,7 \pm 5,2$, а на світлі – $0,8 \pm 0,2$ мг/експлант.

Порівняльний аналіз між умовними групами за показниками накопичення сирої та сухої біомаси дозволив встановити, що оптимальним типом експланта є висічки листка, що абаксіально розміщені на поживному середовищі та культивуються в темряві. Вони відрізняються найбільш високими показниками накопичення сирої ($31,3 \pm 18,1$ мг/експлант) та сухої ($10,2 \pm 8,0$ мг/експлант) біомаси калюсу.

Висновки

Встановлено, що умови культивування достовірно впливають на частоту калусоутворення ($p=0,042$) і частоту ризогенезу *in vitro* ($p=0,001$) різних експлантів *P. recta*. Виявлено достовірний негативний вплив світла на частоту калусоутворення висічок листка, розташованих абаксіальною ($p=0,04$) та адаксіальною ($p=0,02$) стороною до середовища. Для всіх типів експлантів і способів їх розміщення на поживному середовищі встановлено достовірний позитивний вплив світла на частоту ризогенезу ($p \leq 0,05$).

Відмічено, що під впливом світла достовірно знижується накопичення як сирії, так і сухої маси калюсу. Виявлено достовірний вплив умов культивування (наявність або відсутність світла), типу експланта і способів його розміщення на поживному середовищі на накопичення сирії біомаси калюсу ($p = 0,029$).

Показано, що висічки листка, які абаксіально розміщені на поживному середовищі та культивуються в темряві, відрізняються найвищими показниками накопичення сирії ($31,3 \pm 18,1$ мг/експлант) та сухої ($10,2 \pm 8,0$ мг/експлант) біомаси калюсу.

Список літератури

1. Вторичные метаболиты фенольной природы *Potentilla alba* L. в условиях *in vitro* / М.В. Китаева, А.В. Зубарев, Е.В. Спиридович, В.Н. Решетников // Труды БГУ. – Минск, 2011. – Т. 6, ч. 1. – С. 123–127.
2. Китаева М.В. Введение в культуру *in vitro* редких лекарственных растений *Potentilla* L. / М.В. Китаева // Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры: материалы междунар. конф., посвященной 80-летию Центр. бот. сада Национальной академии наук Беларуси, (Минск, 19–22 июня 2012 г.). – Минск, 2012. – С. 398–401.
3. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
4. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых культур / О.В. Митрофанова, И.В. Митрофанова, А.В. Смыков, Н.П. Лесникова // Сб. тр. Никит. ботан. сада. – 1999. – Т. 118. – С. 189–199.
5. Орлова Л. Лечение корнем лапчатки / Л. Орлова. – Мн. Харвест, 2006. – 64 с.
6. Пасешниченко В.А. Растения–продуценты биологически активных веществ / В.А. Пасешниченко // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, № 8. – С. 13–19.
7. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав и использование / [отв. ред. П. Д. Соколов]. – Л.: Наука, 1987. – С. 59–69.
8. Kovalenko P.G. Secondary metabolites synthesis in transformed cells of *Glycyrrhiza glabra* L. and *Potentilla alba* L. as producers of radioprotective compounds / P.G. Kovalenko, V.P. Antonjuk, S.S. Maliuta // Ukrainica Bioorganica Acta. – 2004. – №1-2 – P. 13-22.
9. Pierik R.L. *Anthurium andreaeanum* plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro* / R.L. Pierik // Physiol. Plant. –1976. – Vol. 37, №1. – P. 80-82.
10. Tomczyka M. *Potentilla* — A review of its phytochemical and pharmacological profile / M. Tomczyka, K.P. Lattéb // [Journal of Ethnopharmacology](#). – 2009. – [Vol. 122, Issue 2](#). – P. 184-204.
11. Tosun A. Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine in Turkey / A. Tosun, Ö. Bahadır, N. Altanlar // Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2006. – №3. – P. 167-176.

Показана возможность каллусообразования из различных эксплантов Potentilla recta в условиях in vitro. Отобраны штаммы каллусов, которые отличаются светло-коричневой окраской, плотной консистенцией, низким уровнем витрификации. Отмечены достоверные различия в количественных характеристиках полученных штаммов в зависимости от типа экспланта, размещения его относительно питательной среды и физических факторов культивирования.

***Potentilla recta*, каллусогенез, эксплант, физические факторы, *in vitro*.**

The possibility of callus formation in vitro has been shown. The strains of Potentilla recta callus which are differ by light – brown color, compact texture and low vitrification have been selected during the experiment. In this case significant discrepancies in the quantitative characteristics of the obtained strains due to the type of explants, its placing on the media and physical factors of culture (darkness or light) have been found.

Potentilla recta, calluogenesis, explant, physical factors, in vitro.