андроклинной гаплоидии яровой мягкой пшеницы. Предложены некоторые термины.

By the position of plant embryology the using terminology as the methodological base of elaboration of innovation biotechnology of spring soft wheat androclinal haploidy has been analyzed. The some terms have been proposed.

ЛЬОШИНА Л.Г., БУЛКО О.В., ГАЛКІН А.П.
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,
Україна, 02660, Київ, вул. Мурманська, 1, e-mail: llioshina@ukr.net

ОТРИМАННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛУСНОЇ І СУСПЕНЗІЙНОЇ КУЛЬТУРИ БАРВІНКА МАЛОГО *VINCA MINOR L.*

Для лікування багатьох хвороб споконвіку використовуються активні компоненти лікарських рослин. При нестачі лікарської сировини створюють їх синтетичні аналоги. Недоліком синтетичних препаратів порівняно з натуральними є те, що вони можуть викликати небажані побічні ефекти і гірше переносяться організмом. Тому виділення активних компонентів з лікарських рослин є достатньо актуальним завданням. Окрім нативних рослин, для цього можливе використання культури клітин *in vitro*. Перевагою речовин, виділених із культури клітин, є те, що вони екологічно чисті і вирощування їх біомаси не залежить від умов навколишнього середовища.

Для роботи нами обрана лікарська рослина - барвінок малий *(Vinca minor* L.), що є лікарською рослиною, яка продукує ряд речовин, важливих для фармакологічної промисловості. В траві виявлено близько 30 алкалоїдів індольного ряду (вінин, вінкамин, пубесцин, мінорин і ін.), а також кислоти (урсолова і аскорбінова), віницилін, кемпферол, дубильні і гіркі речовини, флавоноїди, сапоніни, рутини, каротин, вітамін С, цукор і т.д. Одним з найважливіших алкалоїдів є вінкамін, який первинно знайдено в листях [1]. Вінкамін і його похідні виробляються деякими фармацевтичними компаніями в Європі і Японії у складі препаратів, що поліпшують мозковий кровообіг, мають заспокійливу, гіпотензивну, судинорозширювальну, кровоспинну, протимікробну і в'яжучу властивості. Але *V.minor* - багаторічна рослина, яка повільно росте, окрім того, рослина зазвичай розмножується живцями, а не насінням, тому кількість рослин, які можуть бути отримані одночасно, обмежена. Внаслідок цього інтерес до отримання культури клітин досить обґрунтований. Були спроби культивування калусу, який би продукував вінкамін у помітних кількостях [2,3], проте однозначного збільшення виходу вінкаміну в недиференційованій культурі досягнуто не було. Тому подальші експерименти по підвищенню продуктивності клітинних культур барвінку малого актуальні й на сьогоднішній день.

Матеріали і методи

Для введення в культуру *in vitro* фрагменти стебла й листа нарізали шматочками по 1 см, промивали в проточній воді 30 хв, обполіскували 70% етиловим спиртом і занурювали на 5 хв. в 0,1% $HgCl_2$. Потім відмивали стерильною дистильованою водою й поміщали на безгормональне середовище MS у світловий блок при Т 27±2°С і 16-годинному фотоперіоді (2000-2500 люкс). Калусогенез був ініційований з листових експлантів, отриманих з асептичних рослин, на середовищі з додаванням 1мг/л 2,4-Д + 1мг/л кінетину при інкубації в темряві при Т26±2°С.

Поверхневе культивування проводили на середовищі Мурасіге-Скуга (MS) [4] з додаванням 2,4-Д 2,0 мг/л, НОК-0,45 мг/л, ІОК-0,55 мг/л, кінетин – 0,18 мг/л, при 26±1°С і вологості 80%, у темряві.

Суспензійне культивування проводили на качалці Elpan (Польща) у колбах на 250 мл, при швидкості перемішування 120 об/хв. У 100мл живильного середовища MS без Ca^{2+}, з додаванням гормонів як для поверхневого культивування, вносили 2-3 г калусних клітин.

Підрахунок *кількості клітин* проводили в камері Фукса-Розенталя після мацерації суспензії в 10% розчині хромової кислоти при 60° на протязі 15 хв.

Ріст культури визначали по вазі сирої і сухої біомаси. Суспензію клітин фільтрували через змочений і зважений фільтр, вкладений у лійку Бюхнера під слабким вакуумом. Клітини промивали дистильованою водою, відділяли воду під вакуумом і зважували знову разом з фільтром. Суху масу визначали аналогічно, але зважували сухий фільтр, а клітини сушили разом з фільтром у термостаті при 60^o до постійної маси [5].

Життєздатність клітин визначали, оцінюючи співвідношення кількості життєздатних клітин до загальної кількості (приблизно 500 клітин). Життєздатні культури характеризувались наявністю клітин з ядрами й рухом цитоплазми при фарбуванні препаратів 0,1% водним розчином метиленового синього на протязі 2 хв.

Для визначення *мітотичного індексу* клітини фіксували у спирті й оцтовій кислоті (3:1) протягом 24 годин. Зразки фарбували 1,5 % орсеїном (приготованому на 45 % оцтовій кислоті). На кожному препараті аналізували по 1000 кліток.

Якісний аналіз на присутність алкалоїдів. 60 мг сухої біомаси екстрагували 1 мл водного розчину 0,1% H_2SO_4. 6 мкл надосадової рідини наносили на ТШС-пластини із сорбентом Kieselgel 60 F_{254} (Merck, Німеччина), висушували в струмі теплого повітря. Пластини поміщали в насичену камеру із системою розчинників - хлороформ : ізопропанол : вода : оцтова кислота (20:20:5:5 по об'єму) [6]. В якості стандарту використовували спиртовий розчин вінкамину. Оцінку якісного складу алкалоїдів проводили при довжині хвилі 365 нм та 283нм.

Статистична і комп'ютерна обробка. Статистичну обробку результатів проводили за керівництвами [7,8]. Комп'ютерну обробку даних проводили за допомогою програми Excel, стандартного пакета програм Microsoft Office XP («Microsoft», США).

Результати і обговорення

Нами запропоновано методику введення в культуру *in vitro,* отримання калусної тканини та суспензійної культури *Vinca minor* L. як джерела сировини для отримання індольних алкалоїдів.

Підбір умов для культивування починали з введення рослини в культуру *in vitro*. Введення в культуру проводилося за Стафером з соавт. [9]. Стерилізовані рослини інкубувались на середовищі MS. Певна проблема була з індукцією ризогенезу. Для утворення коріння було визначено необхідність додавання ІМК (0,2 мг/л) та БАП (0,5 мг/л) з чергуванням росту рослини на безгормональному середовищі. Утворене коріння розташовувалось на поверхні середовища, що змусило нас зменшити концентрацію агарози в середовищі (рис. 1).

Рис. 1. *V.minor* в культурі *in vitro*

Рис. 2. Калус *V.minor*

Наступним був етап калусоутворення. Для індукції калусогенеза в якості експлантів використовували тканини тритижневих асептично вирощуваних рослин барвінку малого. Листя, стебло і коріння розчленовували в стерильних умовах, і експланти поміщали на модифіковане живильне середовище MS [4] з додаванням фітогормонів в різних комбінаціях: 1 мг/л 2,4Д + 1 мг/л кінетина; 1 мг/л НУК + 0,1 мг/л кінетина. Експланти інкубували в термостаті при Т26^{0}С, в темряві. Утворення калусу спостерігалося на 21 день. Морфологічно калус був середньої щільності, жовто-білого кольору (рис. 2). Більш ефективний калусогенез спостерігався на середовищі, яке містило 1мг/л 2,4Д + 1 мг/л кінетину . Найбільшу здатність до калусоутворення мали експланти з листя верхньої частини рослини, найменшу – стеблеві експланти. Експланти з різних частин проростка формували схожі типи калусів, які складались з двох типів клітин - меристематичних і паренхімних. Основна маса дрібноглобулярного калусу була представлена крупними, сильно вакуолізованими клітинами, покритими зверху шаром меристематичних клітин. Крупноглобулярний калус складався тільки з щільно зчеплених паренхімних клітин. Меншою мірою утворювався калус пухкого типу, що складався з окремих клітинних кластерів, розділених крупними міжклітинниками. На цитологічних препаратах спостерігалися клітини округлої форми з чітко вираженими ядрами. Відсоткове співвідношення меристемних і паренхімних клітин змінювалось на користь останніх на протязі циклу культивування. Максимум мітотичної активності спостерігався на 11 добу культивування.

Глибинне культивування проводили на середовищі, що використовувалось для субкультивування, за відсутності іонів кальцію. Відбір проб суспензійної культури проводили через кожні 5 днів, аналізуючи динаміку накопичення сирої й сухої біомаси, зміну кількості клітин у циклі вирощування й їх життєздатність. Три паралельні субкультивування в стандартних умовах показали мінімальну різницю по кількості клітин і приросту біомаси. За результатами цього аналізу побудовано графік (Рис.3).

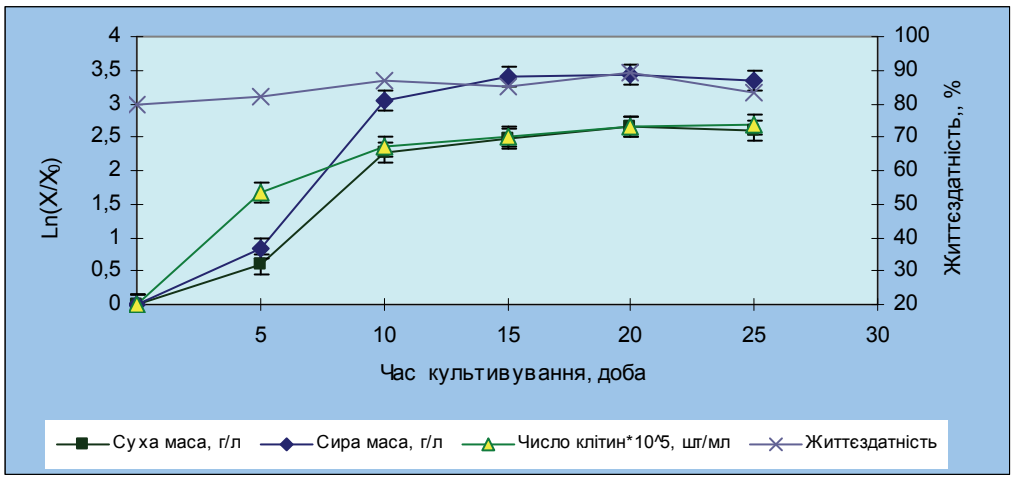

Рис. 3. Криві росту суспензійної культури *V.minor* в напівлогарифмічній системі координат

Вирахувані за допомогою графіку кількісні характеристики росту культури клітин були такими: питома швидкість росту (μ, доба$^{-1}$) дорівнювала 0,12 для кількості клітин; 0,14 для сирої біомаси і 0,13 для сухої біомаси. Час подвоєння культури клітин (τ, доба), який показує часовий період, на протязі котрого відбувається подвоєння розрахункового показника, становило в середньому 4-5 діб. Життєздатність клітин під час усього періоду культивування трималась в середньому на рівні 84±0,5 %. Індекси росту (I) суспензійної культури дорівнювали: по кількості клітин I = 2,59±1,3; по сирій біомасі I = 3,04±1,1; по сухій біомасі I =

3,52±0,9. Інтервал розходження по індексу росту між цими показниками показав, що найменше значення І приймає при перерахунку по кількості клітин (2,59), а найбільше – при визначені І по сухій біомасі (3,52). Але ці розбіжності не суттєві, що свідчить про стабільність отриманої культури.

По агрегованості клітин суспензія була крупноагрегованою, тому що більше половини клітин перебували в агрегатах, що перевищують 20 клітин.

Порівняльне вивчення наявності алкалоїда вінкаміна в інтактній рослині і культурі барвінка малого визначали за допомогою ТШХ, використовуючи у якості контролю очищений препарат вінкаміну. Аналіз отриманих хроматограм в ультрафіолетовому опроміненні показав наявність вінкаміну в калусній і суспензійній культурі, але кількість цього алкалоїду в культурі клітин була суттєво нижче, ніж у інтактної рослини. Тому надалі ми плануємо провести роботу з одержання культури клітин барвінку, яка б виробляла вінкамін у більшій кількості.

У результаті проведеної роботи нами введено в культуру *in vitro* лікарська рослина барвінок малий *Vinca minor* L.. Підібрано середовище для калусогенезу барвінку, отримано стійкий калус і суспензійну культуру цієї рослини і досліджені їх цитоморфологічні і ростові характеристики. Показана спроможність культури клітин синтезувати алкалоїд вінкамін.

Література

1. *Ortiscu C., Macoveanu M., Horoba E., Cojocaru M., Poiorac E*. The study of the extraction process of vincamine // Rev. Rournaine Chem. - 1985. - vol.30.- P. 807-815.

2. *Petiard V., Dernarly Y.* Mise en evidence da glucosides el d'alcaloides dans les cultures de tissue vegetaux // Ann. Amelior. Plantes.-1972.- vol.22.- P.361-374.

3. *Gamier J., Kunesch N., Siou E., Poisson J., Kunesch C., Koch M.* Etude des cultures de tissus de *Vinca minor* isolement d'un lignane, le lirioresinoi // B. Phytochemistry.- 1975.-vol.14. -P.385-138.

4. *Murashige I., Scoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plantarum. -1962.- vol.15, N3.- P.473-497.

5. *Титова М.В., Шумило Н.А., Куличенко И.Е., Коростелев В.В., Орешников А.В., Носов А.М.* Длительное аппаратное выращивание суспензионной культуры *Dioscorea deltoidea Wall* в полупроточном режиме // Биотехнология. – 2006. – №2. – С.28-31.

6. Давыденков В.Н., Тареева Н.В., Кирьянов А.А., Бондаренко Л.Т., Количественное определение стефарина в культуре ткани стефании гладкой // Хим.-фарм. журн.-1988.- № 3 - С.326.

7. *Лакин Г.Ф.* Биометрия.- М.: Высшая школа, 1990.-352с.

8. *Перт С. Дж*. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С. Дж. Перт. М.: Мир, 1978.

9. *Stapfer R.E., Heuser C.W*. In-vitro propagation of periwinkle *Vinca minor* cultivar bowles // Hortscience.-1985.-vol. 20.- P.141-142.

Резюме

Введено в культуру in vitro барвінок малий Vinca minor L. Отримано й охарактеризовано по ростовим і деяким цитоморфологічним параметрам калусну й суспензійну культури клітин цієї рослини. За допомогою ТШХ встановлено їх здатність синтезувати алкалоїд вінкамін.

Введен в культуру in vitro барвинок малый Vinca minor L. Получены и охарактеризованы по ростовым и некоторым цитоморфологическим параметрам каллусная и суспензионная культура клеток этого растения. С помощью ТСХ показана их способность синтезировать алкалоид винкамин.

The periwinkle Vinca minor L. has been entered into culture in vitro. A callus and suspension cultures of this plants has been obtained and characterized for its growth and some cytomorphological parameters. Ability of a plant to synthesize alkaloid vincamin has been shown by TLC.

МИТРОФАНОВА И.В., МИТРОФАНОВА О.В., РАБОТЯГОВ В.Д.
Никитский ботанический сад – Национальный научный центр,
Украина, 98648, АР Крым, Ялта, e-mail: in_vitro@.ukr.net

РОЛЬ АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В СИСТЕМЕ ПРЯМОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ ИССОПА (*HYSSOPUS OFFICINALIS* L.) И КОТОВНИКА (*NEPETA CATARIA VAR. CITRIODORA* BECK.) *IN VITRO*

Различные виды родов *Nepeta* L. и *Hyssopus* L., относящиеся к семейству губоцветных (*Lamiaceae*), являются перспективными эфирномасличными, пряно-ароматическими и лекарственными растениями [3, 4]. Котовник кошачий (*Nepeta cataria* L.), или котовник лимонный (*N. cataria* var. *citriodora* Beck.) – многолетнее растение. Эфирное масло котовника лимонного отличается высокой антимикробной активностью и фунгицидным действием по отношению к плесневым грибам, рекомендуется для использования в новых композициях парфюмерных изделий. Иссоп обыкновенный (*Hyssopus officinalis* L.) с мелкими розовыми, темно-синими и белыми цветами также является многолетним растением, достигая высоты 80 см. Эта культура уже давно и широко используется в народной и традиционной медицине различных стран (Индия, Болгария, Германия, Австрия, Франция и т.д.), и как пряно-вкусовое сырье в пищевой промышленности при производстве рыбных продуктов. Эфирное масло иссопа широко применяется в косметической промышленности [3]. Совсем недавно это растение стало популярным в озеленении.

Первое сообщение по культуре тканей иссопа появилась в 1987 году во Франции. Учеными был исследован морфогенетический потенциал пыльников, зародышей и отдельных семядолей иссопа в условиях *in vitro* [8]. Более глубокое изучение морфогенетических способностей вегетативных органов и тканей котовника и иссопа было начато в 90-х годах в отделе биотехнологии Никитского ботанического сада [6, 9, 10]. Учеными НБС-ННЦ совместно со специалистами из Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины был разработан способ полиплоидизации котовника с помощью антимикротрубочковых соединений и получены новые формы [11, 12]. Однако для размножения генетически однородного посадочного материала, эффективного применения мутагенов и генетической трансформации котовника и иссопа необходимо разработать прямую регенерацию этих культур в условиях *in vitro*.

Целью настоящего исследования было выявление основных факторов влияющих на систему прямой регенерации растений иссопа и котовника *in vitro*.

Материалы и методы

Исследования по культуре органов и тканей котовника *N. cataria* и иссопа *H. officinalis* выполняли на базе отдела биотехнологии и биохимии растений НБС-ННЦ. Для прямой регенерации были использованы листовые диски котовника и иссопа размером 1-2 мм, с культивируемых в условиях *in vitro* растений. Исходный растительный материал котовника и иссопа был отобран в коллекционных посадках отдела новых ароматических и лекарственных культур НБС. В исследования были включены две формы иссопа: с синей (80882) и белой (38285) окраской венчика цветка. В качестве базовой культуральной среды использовали питательную среду МС с половинным набором макро- и микросолей, полным составом витаминов, 30 г/л сахарозы, 6 г/л агара Difco («Sigma», США). Эффективность влияния тидиазурона (ТДЗ) в концентрациях 0,5, 1,0, 3,0, 6,0, 9,0