

КОЛОМІЄЦЬ Ю.В.¹, БУЦЕНКО Л.М.²

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування України, Україна, 03041, Київ, вул. Героїв Оборони, 15, e-mail: julyja@i.ua

² Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України Україна, Д 03680, Київ, вул. Заболотного, 154, e-mail: plant_path@ukr.net

КУЛЬТИВУВАННЯ ALOE VERA В УМОВАХ IN VITRO ТА ВИВЧЕННЯ ЇЇ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ

Aloe vera широко використовується як в медицині, так і у косметології. У сучасній медицині використовують свіжий або консервований сік алое, а також біостимульований сік, як протизапальний засіб при внутрішніх і зовнішніх інфекціях, як лікувальний засіб при анеміях, туберкульозі, диспепсії, катарі, стоматитах. Сік алое використовують при псоріазі, радіаційному ураженні шкіри, СНІДі.

Біохімічний склад соку листків алое обумовлює широкий спектр його застосування. Алое містить антраценові глікозиди (емодин, алое-емодин, хризофанол, реін). До складу клітинного соку входять вуглеводи – глюкоза, фруктоза, галактоза, сахароза, а також водорозчинні вітаміни – В₁, В₂, С, РР, значна кількість органічних кислот – лимонної, ізолимонної, яблучної, коричної, саліцилової та жирних кислот, всі амінокислоти, крім метіоніну, у зв'язаному стані, а у вільному – відсутні цистеїн, цистин, гліцин та тирозин. З неорганічних елементів у соку алое присутня значна кількість Са, К, Р, Сl [3].

Підвищення інтересу до лікарських засобів на основі біологічно активних сполук природного (рослинного) походження зумовлене зростанням в сучасному світі мутагенів, що є однією з найбільших загроз здоров'ю і життю людини. Саме мутаційні пошкодження у клітинах є причиною багатьох захворювань, в тому числі і онкологічних, кількість яких постійно зростає. Оскільки значна кількість мутагенів є речовинами, без яких складно уявити життя сучасної людини, єдиним шляхом захисту від їхньої шкідливої дії залишається вживання сполук з антимуагенними властивостями. І тут у пригоді людині можуть стати давно відомі лікарські рослини, які містять багато корисних сполук і часто виявляють антимуагенну дію [1, 4].

Зростаючі потреби промисловості в натуральній рослинній сировині для потреб медицини забезпечує біотехнологія. Зокрема, значну частину біологічно активних сполук нині отримують із біомаси культивованих *in vitro* клітин лікарських рослин. Застосовуючи методи вирощування клітин, тканин і органів рослин у контрольованих умовах на штучних живильних середовищах, одержують рослинну біомасу у необмеженій кількості, її можна використовувати як лікарську сировину, бо вона є екологічно чистою, не забруднена хімічними добривами, пестицидами, гербіцидами, важкими металами, радіоактивними ізотопами тощо [2].

Метою нашої роботи було вивчення калюсогенезу та морфогенезу *Aloe vera* в умовах *in vitro* та виявлення антимуагенних властивостей соку із рослин, вирощених *in vitro*.

Для здійснення досліджень мікропагони *Aloe vera* стерилізували розчином 16,5% перекису водню. Простерилізовані мікропагони розрізали на шматочки і висаджували на модифіковані поживні середовища Мурасіге-Скуга (МС) для калюсогенезу МС1: 0,25 мг/л кінетину (Кін) + 0,5 мг/л індолілоцтової кислоти (ІОК), МС2: 4,0 мг/л Кін + 8,0 мг/л ІОК, МС3: 1,0 мг/л 6-бензиламінопурину (6-БАП) + 3,0 мг/л нафтілоцтової кислоти (НОК). Для індукції непрямого морфогенезу було використано три варіанти поживного середовища МС – МС4: 1,0 мг/л 6-БАП + 3,0 мг/л НОК, МС5: 2,0 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л НОК + 0,1 мг/л ІОК, МС6: 0,05 мг/л 6-БАП. Пробірки переносили в світлову кімнату з заданими умовами: температура 25°C, 16-годинний фотоперіод, освітлення 3000 – 4000 лк. Для укорінення пагони висаджували на поживні середовища МС – МС7: 0,4 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л НОК + 2 мг/л індолілмасляної кислоти (ІМК) + 0,5 мг/л аденіну, МС8: 0,02 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л НОК + 0,1 мг/л ІОК. Після вирощування в стерильних умовах одержували сік із

листіків рослин. Мутагенні та антимутагенні властивості досліджували у стандартному напівкількісному тесті Еймса. Як тест-культури використали ауксотрофні за гістидином штами *Salmonella typhimurium* TA100 і *S. typhimurium* TA98. Як модельні мутагени використали біхромат калію (2,0 мг/мл) або N-нітро-N-нітрозогуанідін (0,1-мг/мл).

При культивуванні експлантів на поживних середовищах МС1, МС2 ознак утворення калюсу не виявлено, найкраще формування калюсу на експлантах *Aloe vera* спостерігалось на середовищі МС3, яке доповнене 1,0 мг/л 6-БАП і 3,0 мг/л НОК.

Для індукції непрямого морфогенезу в калюсній тканині *Aloe vera* змінювали концентрацію екзогенних гормонів в поживному середовищі. Калюси висаджували на поживне середовище МС, яке містило БАП, НОК, Кін, ІОК в різних концентраціях. Найкраще формування мікропагонів із морфогенного калюсу спостерігалось на середовищі МС5 з невисоким вмістом 6-БАП (0,05 мг/л), при відсутності ауксинів.

Частота формування морфогенного калюсу на даному середовищі сягала 51 – 58%. Найменша частота утворення морфогенної калюсної маси відмічалася на середовищі МС3, яке містило 3,0 мг/л НОК, 1,0 мг/л 6-БАП. При цьому частота формування не перевищувала 30%.

В процесі культивування на поверхні калюсу утворювалися зелені ділянки клітин, які через декілька тижнів розвивалися в морфологічно нормальні пагони. У калюсних ліній утворення повністю сформованих мікропагонів висотою до 3,5 – 5 см спостерігали на 24 – 31 день (рис. 1 А).



А



Б

Рис. 1. А – морфогенез в калюсній кальтурі *Aloe vera*;
Б – індукція соматичного ембріогенезу *Aloe vera*.

В наших дослідках мікропагони висаджували на свіжі модифіковані поживні середовища МС4, МС5 з додаванням 0,1 мг/л ІОК, 0,5 мг/л НОК, 2,0 – 0,05 мг/л 6-БАП. Поживне середовище для пагоноутворення містило речовину групи цитокинінів, яка сприяє інтенсивному утворенню соматичних ембріодів із клітин мікропагонів. За один цикл вирощування (30 діб) з одного мікропагона розвивалося 5 – 6 рослин-регенерантів (рис. 1 Б), що підтверджує перевагу клонального мікророзмноження перед звичайним розмноженням, оскільки із одержаних пагонів можна отримати необмежену кількість садивного матеріалу, знову розділяючи рослини-регенеранти, що утворилися, і пересаджуючи їх на нове поживне середовище (рис. 2 А).

Надалі рослини-регенеранти пересаджували на середовище для укорінення. Найкращі результати вкорінення *Aloe vera* відмічали на середовищі МС8, яке містить НОК в концентрації 0,5 мг/л. Утворення коренів спостерігали на 10 день культивування, довжина коренів сягала 2 мм, на 20 день культивування – 6 мм, на 35 день культивування сягала до 3 см (рис. 2 Б). Активного укорінення на інших модифікаціях середовища не спостерігали. Найнижчий відсоток укорінення рослин-

регенерантів спостерігався на середовищі МС7, доповненому аденином в концентрації 0,5 мг/л, ІМК – 2 мг/л.

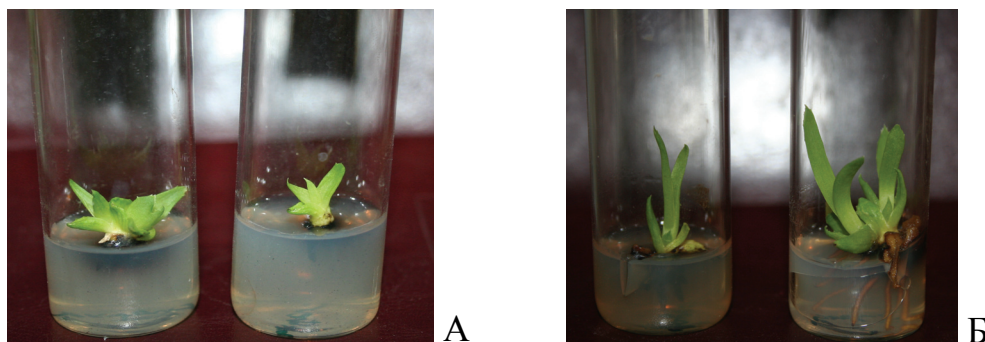


Рис. 2. А – Одержання рослин-регенерантів *Aloe vera*;
Б – укорінення рослин-регенерантів *Aloe vera* на середовищі МС8.

Наступним етапом нашої роботи було вивчення антимуутагенної активності соку *Aloe vera*.

Сік алое зменшує кількість спонтанних мутацій тест-штаму *S. typhimurium* ТА 100 на 33% і не впливає на кількість спонтанних мутацій тест-штаму *S. typhimurium* ТА 98. Сік алое не впливає на мутагенез, індукований біхроматом калію у обох тест-штамів. Так кількість мутацій у *S. typhimurium* ТА 100 за внесення біхромату калію становить $180,0 \pm 27,9$ колоній на чашку, а за внесення соку алое і біхромату калію $176,0 \pm 23,6$.

Сік *Aloe vera* виявив антимуутагенну активність щодо індукованого N-нітро-N-нітрозогуанідіном мутагенезу у тест-штаму *S. typhimurium* ТА 100. Кількість His⁺ ревертантів була $672,0 \pm 20,6$ колоній на чашку, а при додаванні соку алое зменшувалася на 52% до $325,0 \pm 19,8$ колоній His⁺ ревертантів на чашку.

Таким чином, нами запропоновані оптимальні концентрації регуляторів росту для калюсогенезу та морфогенезу. Встановлено, що сік алое *Aloe vera*, вирощеного в умовах *in vitro*, має антимуутагенну дію. Це може розширити сфери використання цього цінного продукту.

Література

1. Бариляк І.Р., Исаева А.В. Антимуутагенные и генопротекторные свойства препаратов растительного происхождения // Цитология и генетика. – Т. 28, №3. – С. 3 – 17.
2. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи: Моногр. / В.А. Кунах; НАН України. Ін-т молекуляр. біології і генетики. – К.: Логос, 2005. – 724 с.
3. Гайдаржи М.М. Сучасний стан та перспективи використання соку листків алое, гастерій та гавортій // Фітотерапія. – 2004. - №1. – С. 47 – 51.
4. Джуренко Н.І., Паламарчук О.П., Ващенко Л.М. Антимуутагенна активність рослинних субстанцій // Фітотерапія. – 2006. - №2. – С. 63 – 67.

Резюме

Досліджено особливості калюсогенезу і регенерації рослин у культурі ізолюваних тканин *Aloe vera*. Показано вплив на ці процеси складу поживного середовища. Сік *Aloe vera* виявив антимуутагенну активність щодо індукованого N-нітро-N-нітрозогуанідіном мутагенезу у тест-штаму *S. typhimurium* ТА 100. Кількість His⁺ ревертантів при додаванні соку алое зменшувалася на 52%.

Исследованы особенности каллюсогенеза и регенерации растений в культуре изолированных тканей *Aloe vera*. Показано влияние на эти процессы состава питательной среды. Сок *Aloe vera* проявил антимуутагенную активность к индуцированному N-нитро-N-нитрозогуанидином мутагенеза у тест-штамма *S. typhimurium* ТА 100. Количество His⁺ ревертантов при добавлении сока алоэ уменьшалось на 52%.

The peculiarities of callusogenesis and plant regeneration in isolated tissue culture of *Aloe vera* have been investigated. The influence of nutrient medium composition on these processes was shown. Juice of *Aloe vera* can reduce the frequency of induced by N-nitro-N-nitrosoguanidine mutations *S. typhimurium* TA 100. Juice of *Aloe vera* reduce the induced mutagenesis *S. typhimurium* TA100 on 52 %.

КОРНЯ Т. М., ИГНАТОВА С. А.

Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН

Украина, 65036, Одесса, ул. Овидиопольская дорога 3, e-mail: odonata@mail.ru

МОРФОГЕНЕЗ ЭКСПЛАНТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ОТБОРА IN VITRO ТОЛЕРАНТНЫХ К ФИЛЬТАТУ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ГРИБА FUSARIUM GRAMINEARUM SCHWABE ОБРАЗЦОВ

Одними из важных критериев селекции при создании качественного зерна пшеницы являются: продуктивность колосьев, устойчивость к полеганию, гербицидам, засухе, низким температурам и, конечно же, к болезням [1]. *Fusarium graminearum* Schwabe – возбудитель фузариоза колоса пшеницы, при котором потери урожая достигают в годы эпифитотий более 50%, при этом зерно становится непригодным для дальнейшего производства продуктов питания, в первую очередь из-за его низкого качества и содержащихся в зерне микотоксинов. Токсины разных штаммов данного гриба не разрушаются при обычной термической обработке в процессе приготовления пищи и способны вызывать тяжелые токсикозы, как у животных, так и у человека [2,3]. *F. graminearum* – представитель несовершенных грибов Deuteromycetes [4]. Патоген широко распространен в почве, способен наносить существенный вред сельскохозяйственным растениям [5]. В Одесском регионе по данным фитопатологов непатогенные и слабопатогенные изоляты фузариевых грибов способны вызывать чрезмерный рост растений, в то время как сильнопатогенные штаммы существенно сокращают количество и качество урожая [6]. Экологически чистым способом борьбы с фузариозом является создание устойчивых сортов. Однако селекция устойчивых к грибным патогенам сортов пшеницы длится около 10 лет. Поэтому для сокращения сроков создания устойчивых форм на некоторых этапах отбора целесообразным является применение методов биотехнологии, а именно – селекции *in vitro* и метода культуры пыльников пшеницы, что основывается на феномене андрогенеза [7,8].

В литературе описаны методы клеточной селекции с применением культуральных фильтратов, что дает возможность получать устойчивые к болезням растения с новыми ценными признаками [9,10]. Перспективным направлением селекции *in vitro* является метод гаплоидии или культуры пыльников [8], позволяющий создавать стабильные формы удвоенных дигаплоидов на селективном фоне патогена, что имеет ряд преимуществ. Однако регенерация растений мягкой пшеницы в культуре пыльников остаётся все еще низкой, поэтому актуальным для повышения эффективности создания толерантных форм пшеницы на селективном фоне является подбор питательных сред и условий культивирования пыльников пшеницы в присутствии селективного фактора.

Культивирование различных эксплантов пшеницы на таком селективном фоне как фильтрат культуральной жидкости (ФКЖ) *F. graminearum* в оптимальной концентрации направлено на получение толерантных к метаболитам гриба регенерантов. Вследствие этого необходимым является подбор концентрации в питательной среде ФКЖ *F. graminearum* для культивирования соматических эксплантов контрастных по полевой устойчивости сортов пшеницы для последующего использования данного уровня селективного фона в лабораторной оценке и отборе в условиях *in vitro* на устойчивость к фузариозу колоса. Ответ растения на действие культурального фильтрата в *in vitro* условиях проявляется в морфогенетических реакциях его эксплантов. Вследствие этого, целью работы было