

After germination of seeds, the appearance of cotyledons, their deployment and growth, the appearance of the first pair of real leaves, intensive growth in height, root growth.

It was found that the seed reproduction of *R. tinctoria in vitro* depends both on the way of overcoming organic rest, and on the quantitative content of phytohormones in nutrient media. The most effective variant was the scarification of seeds with concentrated sulfuric acid (15 min.) and a nutrient modified medium supplemented with BAP 1.0 mg/L and 1 mg/L NAA, which promoted active release of seeds from the resting state and its germination on the 11th day.

*Key words: Rhamnus tinctoria Waldst. Et Kit., seed propagation, scarify, stratification, phytohormones, in vitro*

Рекомендує до друку

Надійшла 27.12.2018

Н. М. Дробик

УДК 582.923.1:581.43:616 – 092.4

<sup>1</sup>Н. Й. ЯВОРСЬКА, <sup>1</sup>Н. М. ВОРОБЕЦЬ, <sup>2</sup>М. І. СКИБЦЬКА

<sup>1</sup>Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

вул. Пекарська, 69, Львів, 79010

<sup>2</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка

вул. Грушевського, 4, Львів, 79005

## **КУЛЬТУРА КОРЕНІВ *GENTIANA CRUCIATA* L. IN VITRO**

Отримання культури ізольованих коренів *Gentiana cruciata* L. є перспективним як можливе джерело біосинтезу і нагромадження вторинних метаболітів. Метою досліджень було визначення дії різних концентрацій і типів ауксинів на ініціацію ризогенезу в калюсній культурі *Gentiana cruciata* L. Отримано культуру коренів із калюсної тканини *G. cruciata* L. та оптимізовано умови для їх тривалого вирощування *in vitro*. Підібрано ефективні концентрації ауксинів для ініціації ризогенезу.

*Ключові слова: Gentiana cruciata* L., калюс, ризогенез *in vitro*

Рослини природної флори є цінним генофондом та джерелом біологічно активних речовин. На особливу увагу заслуговують рідкісні та зникаючі види лікарських рослин, які мають важливе значення для біологічної науки як об'єкт дослідження та для фармації як лікарська рослинна сировина (ЛРС). До групи таких рослин належать види роду Тирлич (*Gentiana* L.). У флорі України рід представлений 10 видами, дев'ять з яких ростуть, переважно, у гірських районах Карпат [8]. Види роду *Gentiana* належать до економічно-цінних, це – лікарські, декоративні, медоносні рослини. Деякі види тирличів використовують в офіциальній медицині, вони також входять у фармакопеї багатьох країн світу, та у понад 100 найменувань препаратів [14]. Багаторічний досвід заготівлі видів роду *Gentiana* як лікарської сировини призвів до різкого скорочення ареалів, тож їх сировинні запаси недостатні для промислової заготівлі. В якості ЛРС найчастіше використовують корені та кореневища тирличів, які містять комплекс біологічно активних речовин (БАР): іридоїди, флавоноїди, ксантони, та ін. (понад 40) [7, 14]. *Gentiana cruciata* L. – тирлич хрещатий в Україні росте фрагментарно або розсіяно у південній частині лісових районів (зокрема у Львівській, Тернопільській, Волинській, Хмельницькій областях), у Лісостепу центральної частини та в гірських районах Криму на сухих луках і схилах, виходах вапняків, серед чагарників та по узліссях [6, 8].

Відома доволі низька здатність видів роду до генеративного та вегетативного розмноження. Одним із перспективних шляхів отримання додаткового джерела сировини, а також збереження цінних видів лікарських рослин, поряд із класичними природоохоронними

заходами, є застосування біотехнологічних методів, зокрема розмноження в умовах *in vitro*. Одержана в такий спосіб ЛРС може бути стандартизована з GMP і GACP, відповідно до Настанови СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2008 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика» [4].

Особливості культури тканин окремих видів роду Тирлич детально описані [1, 2]. Деякі з таких культур та регенеранти, вирощені з них, накопичують достатньо БАР для використання цільового продукту [10–14]. Тому отримання культури ізольованих коренів *G. cruciata* є перспективним, як можливе джерело біосинтезу і нагромадження вторинних метаболітів.

Метою досліджень було визначення дії різних концентрацій і типів ауксинів на ініціацію ризогенезу в калюсній культурі *G. cruciata*.

### Матеріал і методи досліджень

Насіння *G. cruciata* одержували з рослин, які експонуються в колекції ботанічного саду Львівського національного університету імені Івана Франка і пройшли перше інтродукційне випробування [5].

Насіння *G. cruciata* після обробки 0,01% гібереловою кислотою (24 год), стерилізували 96 %-м етиловим спиртом (1 хв) і 33 %-им розчином  $H_2O_2$  (5–7 хв), промивали у стерильній бідистильованій воді (5–6 разів) та висівали на безфітогормональне живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС) з додаванням сахарози – 3 % та агару – 0,7 %. Пророшували насіння в темряві за температури +24° С. Сегменти 10-12-ти добових проростків, вирощених асептично, служили експлантами для ініціації калюсогенезу. Експланти культивували в чашках Петрі на модифікованих живильних середовищах Мурасіге–Скуга (МС): **I** – середовище з ІОК ( $\beta$ -індолілоцтова кислота) – 0,6 мг/л, НОК (1-нафтилоцтова кислота) – 0,6 мг/л, синтетичний ауксин – 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д) 4 мг/л, кінетин (синтетичний цитокінін) 0,3 мг/л; **II** – середовище з ІОК 3 мг/л, НОК 0,6 мг/л, 2,4-Д 2,1 мг/л, кінетином 2,1 мг/л; **III** – середовище з 2,4-Д 3 мг/л, кінетином 0,3 мг/л; **IV** – середовище з 2,4-Д – 9 мг/л, кінетином – 0,3 мг/л. Культивування проводили за температури 24±2 °С та відносній вологості – 70 %, у двох варіантах: при освітленні (2000 лк) та у темряві. Для ініціації ризогенезу отриманий калюс продовжили культивувати в умовах темряви на модифікованих живильних середовищах МС I і III з різними концентраціями ІОК та 2,4-Д: А–середовище з ІОК – 1 мг/л, НОК – 0,6 мг/л; та кінетином – 0,3 мг/л; В– середовище ІОК – 3 мг/л, НОК – 0,6 мг/л, кінетин – 0,3 мг/л; С– середовище з ІОК – 6 мг/л, НОК – 0,6 мг/л, кінетин – 0,3 мг/л; D– середовище з 2,4-Д – 1 мг/л, кінетин – 0,3 мг/л; Е – середовище з 2,4-Д 3 мг/л, кінетин 0,3 мг/л; F – середовище з 2,4-Д – 6 мг/л, кінетин 0,3 мг/л. в присутності синтетичного цитокініну – 6-бензиламінопурину (БАП) – 2 мг/л. Відзначали термін початку коренеутворення та визначали частоту ризогенезу (%) на 4й тиждень культивування. Калюс із ознаками диференційованих коренів переносили на свіже живильне середовище у колби ємністю 200 мл. Через 50–60 діб кореневу культуру знову пересаджували на свіже середовище. Величину приросту маси ( $\Delta W$ ) виражали у відсотках:  $\Delta W = (W_t - W_0) / W_0 \cdot 100\%$  (де  $W_t$  – маса калюсу в момент визначення;  $W_0$  – початкова маса калюсу) [3]. Статистичну обробку даних виконували з використанням Microsoft Excel.

### Результати досліджень та їх обговорення

Для індукції калюсогенезу оптимальними виявилися живильні середовища I і II. Приріст маси калюсу залежав від концентрації і співвідношення ауксинів та кінетину у живильному середовищі. Ріст калюсу *G. cruciata* на модифікованих живильних середовищах МС має нелінійний характер (рис. 1 а,б).

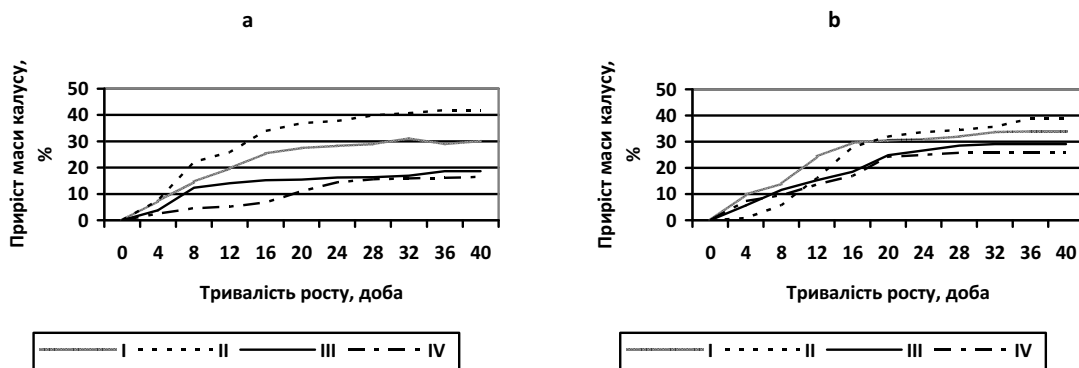


Рис.1 Ріст калусу *Gentiana cruciata* L. : а – в умовах освітлення, б – в умовах темряви; I-IV – варіанти живильних середовищ МС.

Найвища інтенсивність росту калусу зафіксована на збагаченому регуляторами росту живильному середовищі II в умовах освітлення (рис. 1а). Незважаючи на це, здатним до регенерації був лише калус, вирощений в умовах темряви. Інтенсивне наростання калусу в умовах освітлення супроводжувалося його побурінням, що свідчить про наявність ділянок відмерлих клітин, тоді як у калусі, вирощуваному в умовах темряви, побуріння спостерігали лише в стаціонарній фазі росту [9]. У темряві ріст калусу менш інтенсивний, ніж за освітлення на всіх досліджуваних середовищах (рис. 2).

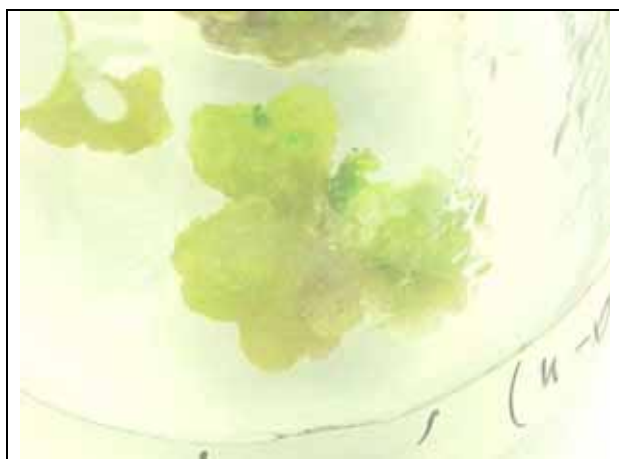


Рис. 2. Калус *G. cruciata* з ознаками диференціації, вирощений в умовах освітлення

Як в умовах освітлення, так і в умовах темряви, калус найшвидше наростав на живильному середовищі II, де різко вирізнялася lag-фаза тривалістю до 3 діб, після чого крива росту плавно переходила в експоненційну фазу росту, яка тривала до 20–22-ої доби (рис. 1).

Культура ізольованих коренів *G. cruciata*, одержана різними способами, є перспективною з погляду можливого біосинтезу і нагромадження цінних вторинних метаболітів, притаманних кореням цілих рослин [1, 12]. У нашій роботі використано метод непрямого соматичного ембріодогенезу одержання кореневої культури із калусної тканини (рис. 3), що вважається одним із перспективних напрямків індукції мінливості в культурі *in vitro*, обумовлює їх потенційну цінність для поліпшення існуючих характеристик рослин.



Рис. 3. Індукція ризогенезу з калюсу *G. cruciata* на модифікованому живильному середовищі МС (А, D) в умовах темряви

Аналіз отриманих результатів показав, що найбільш ефективною для ініціації коренеутворення з калюсної тканини *G. cruciata* виявилася концентрація ІОК – 1,0 мг/л у живильному середовищі, де частота ризогенезу становила – 85 %, а підвищення її вмісту в живильному середовищі до 3 мг/л інгібувало процес ризогенезу (57 %) (таблиця). Дія НОК та 2,4-Д на процес ризогенезу була позитивно помітною лише в поєднанні з ІОК.

Таблиця

Параметри індукції ризогенезу з калюсної культури *G. cruciata*

Живильне середовище	Кількість грудок калюсу у ч. Петрі	Середня кількість ініційованих корінців на ч. Петрі	Частота ризогенезу, %	Особливості індукції ризогенезу
А – середовище з ІОК – 1 мг/л, НОК – 0,6 мг/л; та кінетином – 0,3 мг/л	9	38,6±3,4	85,1±4,6	Утворення коренів та їх ріст. Ріст коренів випереджає наростання калюсу
В – середовище ІОК – 3 мг/л, НОК – 0,6 мг/л, кінетин – 0,3 мг/л	9	22,4±1,9	57,3±2,6	Ріст коренів супроводжувався інтенсивним наростанням калюсної маси
С – середовище з ІОК – 6 мг/л, НОК – 0,6 мг/л, кінетин – 0,3 мг/л	9	6,1±1,1	12,2±2,1	Переважає наростання калюсу
Д – середовище з 2,4-Д – 1 мг/л, кінетин – 0,3 мг/л	9	24,3±2,1	48,3±2,8	Спостерігається ріст коренів
Е – середовище з 2,4-Д 3 мг/л, кінетин 0,3 мг/л	9	27,3±1,5	56,3±2,2	Ріст коренів супроводжувався та інтенсивним наростанням калюсної маси
Ф – середовище з 2,4-Д 6 мг/л, кінетин 0,3 мг/л	9	0	0	Повільний ріст калюсу. Корені не утворюються.

Для тривалого росту отриманої кореневої культури *G. cruciata* важливою є наявність у живильному середовищі БАП у концентрації 2 мг/л. Довготривале культивування кореневої культури дозволило одержати достатню біомасу для подальших досліджень (рис. 4).



Рис. 4 Культивування кореневої культури *Gentiana cruciata* L. на живильному середовищі МС (D)

### Висновки

Отже, у результаті проведених досліджень із калусної тканини *G. cruciata* отримано культуру коренів, яка здатна до тривалого росту в умовах *in vitro*, вивчено вплив комбінації різних концентрацій ауксинів на індукцію та інтенсивність ризогенезу тирличу хрещатого. БАР в її складі потребують подальшого вивчення.

1. Конвалюк І. І. Прямий органогенез *in vitro* тирличу жовтого (*Gentiana lutea* L.) / І.І. Конвалюк, Н.Б.Кравець, Н.М.Дробик [та ін.] // Біотехнологія. — 2010. — Т. 3 (5). — С. 66—72.
2. Конвалюк І. І. Отримання та характеристика культури ізольованих коренів рослин видів роду Тирлич (*Gentiana* L.) / І.І. Конвалюк, Л.Р. Грицак, В.М. Мельник [та ін.] // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 3. — С. 29—35.
3. Мусієнко М. М. Біотехнологія рослин. Навчальний посібник / М.М. Мусієнко, О.О. Панюта — К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. — 114 с.
4. *Належна* практика культивування і збору лікарських рослин (GACP) та гарантія якості лікарської рослинної сировини і препаратів на її основі / кол. авт.: науково-практ. посіб. — К.: Комітет сприяння боротьбі з економічною злочинністю і корупцією, 2013. — 104 с.
5. Скибіцька М. Біологічні особливості видів роду *Gentiana* L. в умовах ботанічного саду Львівського національного університету імені Івана Франка / М. Скибіцька, Н. Яворська // *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality*. — 2016. — Slovak University of Agriculture in Nitra., Ed. by J.Brindza, S.Klymenko. — P. 434—439.
6. Страшнюк Н. М. Види роду *Gentiana* L. флори України у природі та культурі *in vitro* / Н.М. Страшнюк, Л.Р. Грицак, О.М. Леськова, В.М. Мельник // Укр. ботан. журн. — 2005. — Т. 62, № 3. — С. 337—348.
7. Страшнюк Н. М. Біологічно активні речовини видів роду *Gentiana* L. 1. Біосинтез та фізіологічна дія / Н.М. Страшнюк, О.М. Леськова, Г.Я. Загречук, В.М. Мельник, В.А. Кунах // Фітотерапія. Часопис. — 2006. — № 1. — С. 31—41.
8. Чопик В.І. Флора Українських Карпат / Чопик В.І., Федорончук М.М. — Тернопіль: ТЗОВ «Тернограф», 2015. — 712 с.
9. Яворська Н. Й. Ріст та диференціація калусу *Gentiana cruciata* L. (*Gentianaceae* Juss.) у процесі мікроклонального розмноження / Н.Й. Яворська, Т.М. Алембець, Л.О. Демків, О.Я. Хоркавців // Укр. ботан. журн. — 2000. — Т.56, № 1. - С.91—95.
10. *Changes of gentiopicroside synthesis during somatic embryogenesis in Gentiana macrophylla* / L.Y. Chen, Q.L. Chen, D. Xu [et al.] // *Planta Med.* -2009. - Vol.75(15). — P.1618—1624.
11. *Skrzypczak L. Gentiana Species: In Vitro Culture, Regeneration, and Production of Secoiridoid Glucosides* / L.Skrzypczak, M.Wesolowska, E.Skrzypczak In: Bajaj Y.P.S. (eds) *Medicinal and Aromatic Plants IV. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol 21. Springer, Berlin, Heidelberg, 1993. DOI [https://doi.org/10.1007/978-3-642-77004-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-77004-3_12)
12. *Shoot proliferation and HPLC-determination of iridoid glycosides in clones of Gentiana cruciata L.* / S.Hayta, I.H. Akgun, M.Ganzer [et al.] // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* — 2011. — Vol. 107. — P. 175—180.

13. *Tissue and Organ Cultures of Gentians as Potential Sources of Xanthenes and Flavonoids* / Drobyk N.M., Mel'nyk V.M., Twardovska M.O., Konvalyuk I.I., Kunakh V.A. // In: *The Gentianaceae. Vol. 2. Biotechnology and Applications.* / Ed. by. Rybczyński J.J., Davey M.R., Mikula A. — Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer, 2015. — P. 307—317.
14. *Xu Y. Analytical Methods of Phytochemicals from the Genus Gentiana* / Y.Xu, Y. Li, K.G. Maffucci, [et al.] // *Molecules.* — 2017, 22, 2080; doi:10.3390/molecules22122080

*N. Ya. Yavorska, N. M. Vorobets, M. I. Skibitska*

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ukraine

Ivan Franko Lviv National University, Ukraine

#### CULTURE OF THE ROOTS OF *GENTIANA CRUCIATA* L. *IN VITRO*

The culture of isolated roots of *Gentiana cruciata* L. is promising as a possible source of biosynthesis and accumulation of secondary metabolites. The aim of the research was to determine the effect of various concentrations and types of auxins on the induction of rhizogenesis in the *G. cruciata* callus culture. *G. cruciata* root culture was obtained and the conditions for their long-term cultivation under *in vitro* conditions were optimized. Selected effective concentrations of auxins to induce of rhizogenesis have been defined.

*Key words: Gentiana cruciata L., callus, rhizogenesis in vitro*

Рекомендує до друку

Н. М. Дробик

Надійшла 14.08.2018