



Матеріали XXII Міжнародної науково-практичної конференції  
«Екологія. Людина. Суспільство» (м. Київ, Україна, 2021 р.)

Handbook of the XXII International Science Conference  
«Ecology. Human. Society» (2021 Kyiv, Ukraine)

ISSN (Online) 2710-3315

<https://doi.org/10.20535/EHS.2021.233150>

УДК 58.085

## ОТРИМАННЯ ТА БІОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ КАЛУСНОЇ, СУСПЕНЗІЙНОЇ ТА КУЛЬТУРИ RI-КОРЕНІВ *TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM L.*

С.С. Ремезовський

*Київський Палац дітей та юнацтва*

Вул. Івана Мазепи, 13, Київ, 01010, Україна

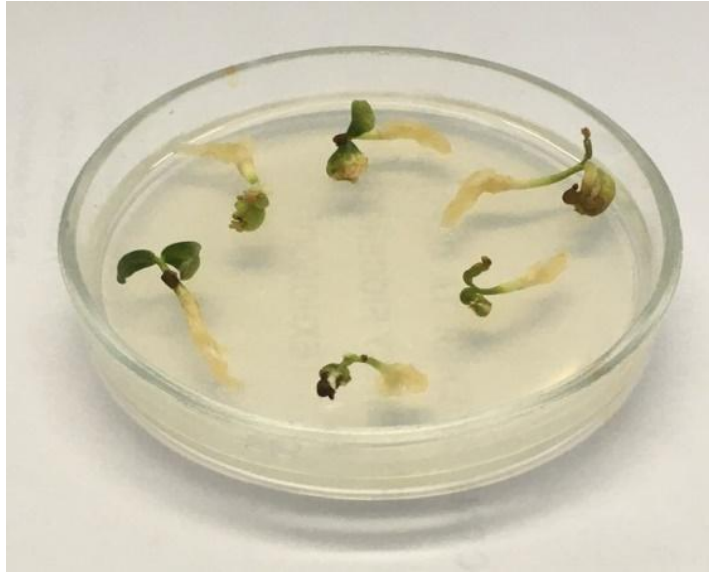
e-mail: [Svyatoslav\\_remezovskyi@ukr.net](mailto:Svyatoslav_remezovskyi@ukr.net)

Сьогодні важливим джерелом екологічно чистої сировини лікарських рослинних препаратів може бути біомаса культивованих клітин. Вона може стати також джерелом харчової сировини контрольованої високої якості, за необхідності збагаченої мікроелементами, вітамінами, іншими біологічно активними речовинами. Використання рослинної культури *in vitro* дозволяє за строго контрольованих умов визначити особливості накопичення цінних речовин, в тому числі і таких, що мають лікарські властивості. Крім того, такі дослідження уможливають відбір ліній рослин, що характеризуються підвищеною продуктивністю цінних лікарських речовин, а також стандартизувати умови вирощування рослин або клітинних культур з метою підвищення рівня виходу цільових речовин.

Зважаючи дані щодо високого рівня вмісту поліфруктанів та інших поживних речовин у насінні гуньби сінної [1], **метою** нашої роботи було ініціювати утворення калусної, суспензійної культури та культури «бородатих» коренів гуньби сінної та виміряти вміст поліфруктанів у рослинах, клітинній, суспензійній та кореневій культурі гуньби сінної та оцінити можливість використання рослинної культури *in vitro* для біотехнологічного виробництва поліфруктанів.

З метою введення рослин гуньби сінної культуру *in vitro* насіння стерилізували протягом однієї хвилини у 70% етиловому спирті, потім у 50% розчині білизни (2% гіпохлориту натрію) протягом 5 хвилин, потім промивали стерильною дистильованою водою (п'ять рази по п'ять хвилин).

Стерильне насіння висаджували у чашки Петрі на живильне середовище MS [2]. Рослини грибною трави культивували при постійному освітленні, температурі 22°C. Для ініціації калусної культури до живильного середовища додавали 2 мг/л 2,4-дихлорфенооцтової кислоти. Надалі експланти (черешкові, кореневі, листкові) культивували в термостаті при температурі 28°C, після стимуляції калусотворення отримані калусні культури культивували при 22°C, постійному освітленні.

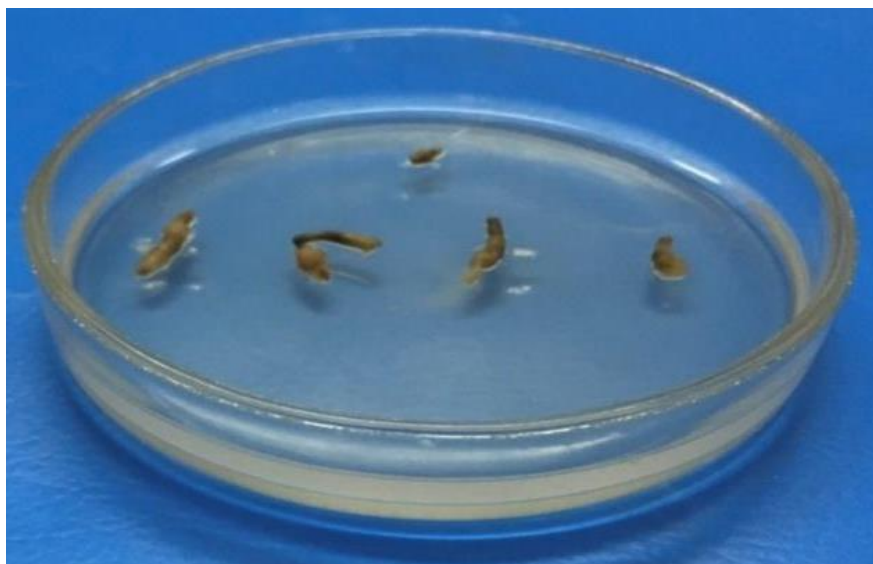


**Рисунок 1. Ініціація калусоутворення на гіпокотильних проростках гуньби**

З метою ініціації суспензійної культури отримані калусні культури переносили до рідкого живильного середовища та культивували на орбітальному шейкері (150 об./хв.) при 28°C.

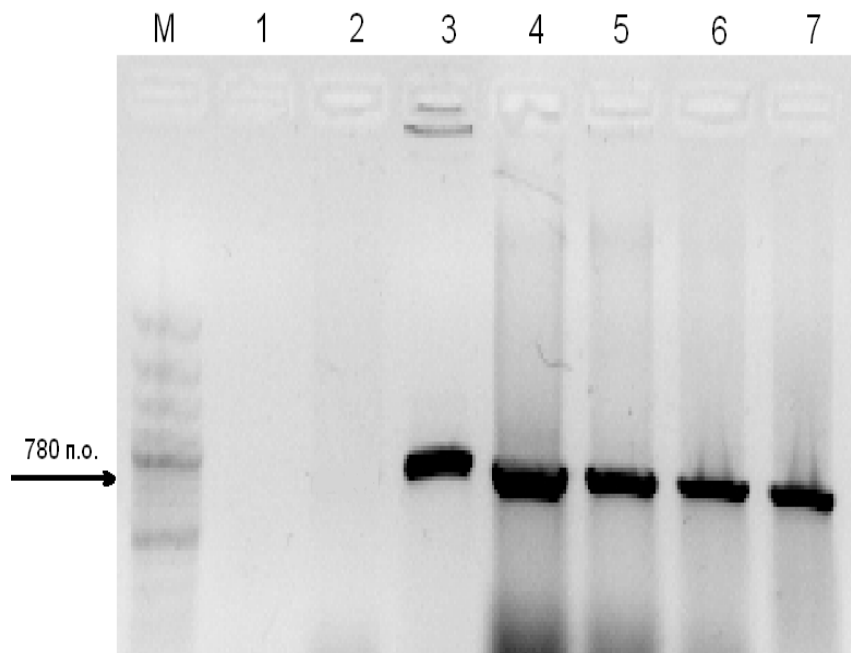
Для отримання культури трансгенних коренів використовували агропіновий штам A4 *Agrobacterium rhizogenes*. Бактеріальну суспензійну культуру отримували у рідкому живильному середовищі LB на шейкері (200 об./хв.) за температури 28°C протягом 24 годин.

Суспензійну бактеріальну культуру осаджували центрифугуванням (5000 об./хв.), ресуспендували у рідкому живильному середовищі MS з додаванням 200 мкМ ацетосирингона. Рослинні експланти інкубували бактеріальною суспензією протягом 48 годин на розсіяному світлі. В подальшому експланти перенесли на агаризоване живильне середовище з додаванням 500 мг/л антибіотику цефотаксима для елімінації бактерій.



**Рисунок 2. Ініціація Ri-коренетворення на гіпокотильних проростках гуньби**

Для підтвердження трансгенної природи отриманої культури «бородатих» коренів проводили ПЛР аналіз. ПЛР для ампліфікації фрагмента (780 п.н.) агробактеріального *rolB* гена для підтвердження трансгенної природи отриманої культури „бородатих” коренів проходила з використанням праймерів 5'-atggatccsaaattgctattcctccacga-3', 5'-ttaggcttcttcttcaggttactgcagc-3' за наступних умов: денатурація 94°C/5 хв.; 34 цикли (денатурація 94°C/30 с, відпал 65°C/30 с, синтез 72°C/45 с); заключний синтез 72°C/5 хв. ПЛР-аналіз дозволив виявити присутність агробактеріального гену *rolB*, що підтверджує трансгенну природу отриманої кореневої культури для всіх аналізованих ліній культури „бородатих” коренів

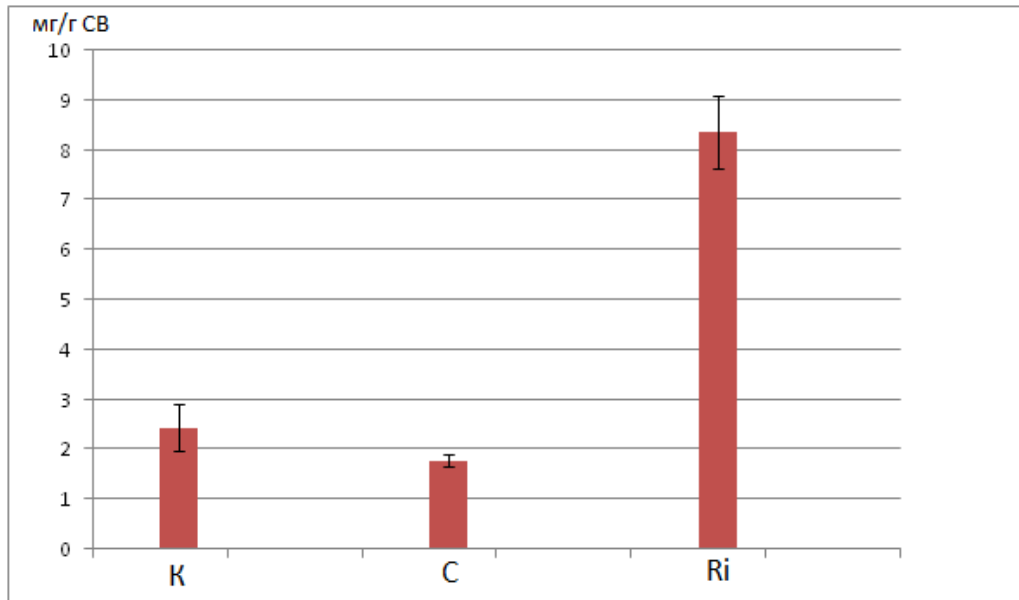


**Рисунок 3. Електрофореграма ПЛР-аналізу на присутність *rolB* гену**  
М – Маркер (1 kbPlusDNA Ladder, Fermentas), 1 – негативний контроль (проба без ДНК), 2 – негативний контроль (ДНК нетрансформованої рослини), 3 – позитивний контроль (плазмідна ДНК (A4)), 4-7 – ДНК аналізованих зразків культури „бородатих” коренів

Для приготування екстрактів ініційованих калусних, суспензійних культур та зразків культури «бородатих» коренів рослини зважували, перетирали у рівному об'ємі гарячої дистильованої води, екстракти кип'ятили протягом 10 хв. на водяній бані, центрифугували. Для аналізу використовували надосадну рідину.

Вміст поліфруктанів визначали за методом Мак-Рері та Слатері [3], який базується на реакції Селіванова, суть якої полягає в здатності кетоцукрів забарвлюватись ризорцимом в кислому середовищі. Далі відбирали 0,5 мл екстракту і додавали 0,5 мл 0,1% розчину резорцину та 0,5 мл концентрованої соляної кислоти. Нагрівали на водяній бані протягом 20 хв. при температурі 80°C. Отримані розчини охолоджували та вимірювали інтенсивність забарвлення на спектрофотометрі при довжині хвилі 490 нм. Концентрацію визначали за калібрувальним графіком, побудованим на основі вимірювання інтенсивності забарвлення стандартних розчинів фруктози з концентраціями 0 мг/мл, 1,25 мг/мл, 2,5 мг/мл, 5 мг/мл.

Було виявлено, що найбільше поліфруктанів міститься у культурі Ri-коренів (до 9 мг/г СВ), менше - у суспензійній культурі та калусній культурі, можливо, через низьку диференціацію клітин у даних культурах та через той факт, що для проведення експерименту використовували суспензійні культури тривалого культивування (підвищений вміст поліфруктанів є характерною рисою ювенільних рослинних тканин).



**Рисунок 4. Вміст поліфруктанів у рослинній клітинній, суспензійній та кореневій культурі пажитника**

(К – калусна культура, С – суспензійна культура, Ri - культура волохатих коренів)

**Література:**

1. Pribacl C., Ardelean A. *In Vitro* culture of *Trigonella foenum-graecum* plantules and their anatomic characterization. // EMC 2008 14th European Microscopy Congress 1-5 September 2008, Springer Berlin Heidelberg, Aachen, Germany. Vol.3, pp: 181-182
2. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol.Plant.*, 1962, Vol.15(3), pp. 473–97.
3. Єрмаков А.І., Арасімовіч В.В., Ярош Н.П. та ін. *Методи біохімічного дослідження рослин.* Л.: Агропромиздат, 1987, С. 143