

ПІДБІР УМОВ ДЛЯ ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* РОСЛИН *LYCIUM BARBARUM* (L.)

Lycium barbarum (L.) або годжі є представником родини Пасльонових. Екстракти годжі виявляють нейропротекторну, антивікову, цитопротекторну та імуномодельную дію [1–3]. Вживання плодів сприяє збільшенню витривалості організму, покращує обмін речовин та регулює рівень глюкози при цукровому діабеті, запобігає розвитку глаукоми [4]. Плоди *L. barbarum* або годжі викликають значний інтерес, оскільки характеризуються високим вмістом біологічно-активних речовин, таких як полісахариди, каротиноїди та флавоноїди. Попередні дослідження показали, що саме полісахариди годжі можуть підвищувати імунну функцію організму, мають гепатопротекторну дію, можуть знижувати рівень глюкози в крові, зменшувати побічні ефекти хіміотерапії та променевої терапії, мають протипухлинну активність [5–9]. Домінуючим каротиноїдом є зеаксантин, ізомер лютеїну. Дослідженнями встановлено, що ця сполука сприяє захисту рогівки ока від дегенерації, що викликається надмірною дією сонячного (ультрафіолетового) світла та іншими окислювальними процесами [10–12]. Високий вміст флавоноїдів виявлено в листках рослин годжі. Основний флавоноїд, який був виявлений у рослині є рутин [13, 14]. Крім того, плоди *L. barbarum* багаті на вітаміни (В₁, В₂, В₆, С, Е), мінерали (кальцій, цинк, залізо, хром, магній, селен, кальцій, фосфор тощо), амінокислоти [15].

Завдяки здатності соматичних тканин в культурі *in vitro* до синтезу вторинних метаболітів, дослідження в цьому напрямку на сьогодні є актуальними. Для отримання сполук вторинного синтезу використовують два основних типа культур *in vitro*: культуру калюсних тканин, суспензійну культуру клітин. Переваги цих методів у тому, що за досить короткий період часу можливо отримати велику кількість досліджуваного чистого рослинного матеріалу без шкідників і хвороб. При цьому є можливість отримання екологічно чистого продукту та не має потреби використовувати великі площі для вирощування рослин у відкритому ґрунті.

Метою даної роботи було здійснення підбору умов для введення в культуру рослин *L. barbarum* для отримання калюсної культури *in vitro*.

Матеріали і методи

В якості вихідного матеріалу використовували насіння *L. barbarum*, яке стерилізували спочатку 2 хв в 70 %-ному етиловому спирті, а потім 5 хв. в гіпохлориті натрію та промивали дистильованою водою. Стерильне насіння пророщували у чашках Петрі на зволоженому фільтрувальному папері протягом 7 діб. Отримані рослини мікроклонально розмножували в стерильних умовах та висаджували в пробірки на безгормональне живильне середовище, що містило солі і вітаміни MS, сахарозу і агар. Рослини вирощували при температурі 23 ± 1 °C з 16/8 ч фотоперіодом [16].

Для отримання калюсу використовували експланти листових дисків і міжвузля пагонів розміром 5–7 мм чотирирохтижневих рослин. Їх висаджували на середовища з різним складом фітогормонів. Всі середовища містили мінеральні солі та вітаміни MS, а також 2 % сахарозу, 8 % агар, рН 5,7. Калюс витримували на експериментальних поживних середовищах протягом 6 тижнів, ефективність кожного середовища оцінювали по наявності калюсоутворення на експлантах, тобто появі калюсних колоній більше, ніж 1–2 мм розміру та морфології отриманих калюсів. Морфологічно калюси розрізняли за кольором, структурою, оводненістю та щільністю.

Результати та обговорення

На першому етапі нами були проведені експерименти по підборі умов для культивування рослин *L. barbarum in vitro*. Було встановлено, що оптимальний вік рослин для мікроклонального розмноження складав чотири-п'ять тижнів. 60 % мікроклонально розмножених шести-восьми тижневих рослин не укорінювались.

Для виявлення впливу сахарози на розвиток коренів у рослин її додавали у середовище в концентрації 10, 15, 20 та 25 г/л. Виходячи з отрима-

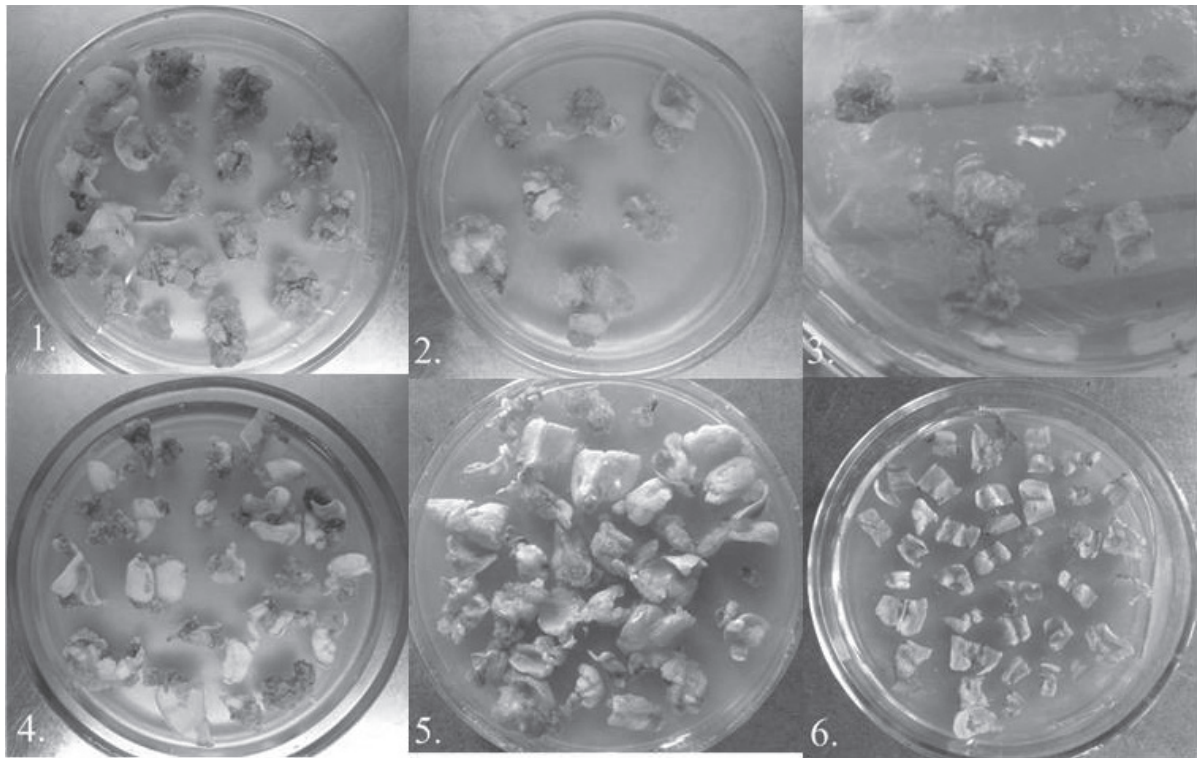


Рис. 1. Калюсогенез на середовищах з різним складом фітогормонів: 1.1 – 2,4-Д – 0,1 мг/л; 1.2 – 2,4-Д – 0,2 мг/л; 1.3 – 2,4-Д – 0,4 мг/л; 1.4 – 2,4-Д – 0,6 мг мг/л; 1.5 – 2,4-Д – 0,4 мг/л; кінетин – 0,5 мг/л; 1.6 – 2,4-Д – 0,5 мг/л ; НОК – 1 мг/л; кінетин – 0,5 мг/л. Експланти – листові диски *L. barbarum*. Масштаб: 9 см; 9 см; 8,3 см; 9 см; 9 см; 9 см

них даних встановили, що за умов низької концентрації сахарози у середовищі (10 г/л) рослини розвивалися повільніше, ніж на середовищі, яке містило не менше 25 г/л сахарози. Було показано, що через 15 діб після мікроклонального розмноження рослин спостерігалось утворення коренів та швидкий розвиток рослини, тоді як на середовищі з низькою концентрацією сахарози розвиток рослини та утворення коренів тільки починався.

На наступному етапі нами були проведені експерименти по вивченню потенціалу утворення калюсної маси у різних типів експлантів *L. barbarum*. Виходячи з літературних джерел в роботі використовували 2,4-Д, кінетин та НОК в різних концентраціях, окремо та в комбінації між собою. Для отримання первинного калюсу на експлантах були протестовані поживні середовища, що містили наступні комбінації фітогормонів: 1- 0,1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д); 2- 0,2 мг/л 2,4-Д; 3- 0,4мг/л 2,4-Д; 4- 0,6 мг/л 2,4-Д; 5- 0,4 мг/л 2,4-Д; 0,5 мг/л кінетину; 6- 0,5мг/л 2,4-Д; 1 мг/л НОК (нафтилоцтової кислоти); 0,5 мг/л кінетину (табл.).

Калюс витримували на підібраних поживних середовищах протягом 6 тижнів. Було встановлено, що найбільш оптимальним поживним середовищем для індукції структурованого та щільного калюсу виявилось те, що містило 2,4-Д у концентрації 0,1 мг/л та 0,2 мг/л відповідно (рис. 1.1 та 2.1). За таких умов через чотири тижні спостерігали інтенсивне утворення добре розвинутого калюсу яскравого кольору та щільної структури. На середовищі (рис. 1.3 та 2.3), що містило 0,4 мг/л 2,4-Д, новоутворений калюс, на відміну від інших, на перших етапах мав яскраво зелене забарвлення та достатньо щільну структуру.

Таблиця

Концентрація фітогормонів для калюсоутворення

№ середовища	Комбінації фітогормонів у середовищі MS
1	0,1 мг/л 2,4-Д
2	0,2 мг/л 2,4-Д
3	0,4мг/л 2,4-Д
4	0,6 мг/л 2,4-Д
5	0,4 мг/л 2,4-Д; 0,5 мг/л кінетину
6	0,5 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л НОК; 0,5 мг/л кінетину

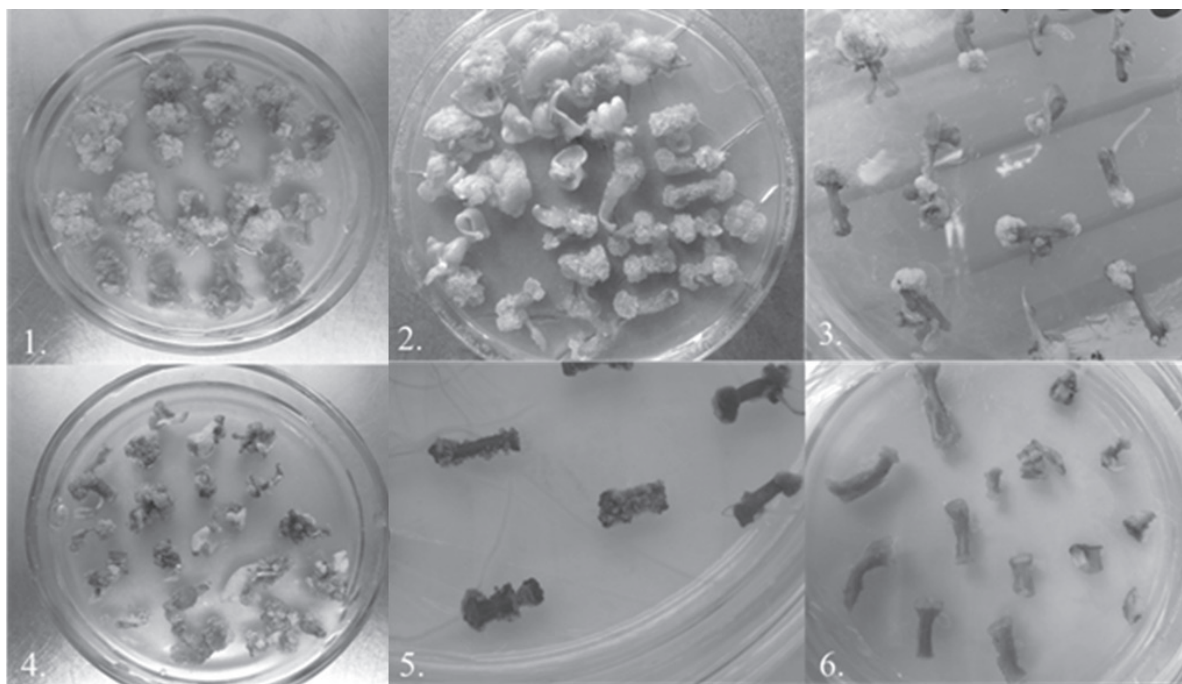


Рис. 2. Калусогенез на середовищах з різним складом фітогормонів: 2.1 – 2,4-Д – 0,1 мг/л; 2.2 – 2,4-Д – 0,2 мг/л; 2.3 – 2,4-Д – 0,4 мг/л; 2.4 – 2,4-Д – 0,6 мг/л; 2.5 – 2,4-Д – 0,4 мг/л; кінетин – 0,5 мг/л; 2.6 – 2,4-Д – 0,5 мг/л ; НОК – 1 мг/л; кінетин – 0,5 мг/л. Експланти – міжвузля пагонів *L. barbarum*. Масштаб: 9 см; 9 см; 8,3 см; 9 см; 8,7 см; 9 см

ру. Однак при подальшому культивуванні на цьому середовищі спостерігалось потемніння калусної маси і загибель клітин. Виходячи з отриманих даних нами було зроблено висновок, що для утворення калусу з експлантів листових дисків і міжвузлів пагонів необхідна низька концентрація фітогормони 2,4-Д.

На основі проведених експериментів було встановлено, що здатністю формувати калус володіли як міжвузля пагонів, так і листові диски на всіх досліджуваних середовищах. Експланти листових дисків виявляли однакову інтенсивність калусоутворення в порівнянні з міжвузлями. В результаті проведеного дослідження було отримано калус на середовищах, що містили тільки 2,4-Д, а також 2,4-Д у комбінації з кінетином та НОК. Інтенсивний ріст калусної тканини спостерігався на середовищі, яке містило 2,4-Д в концентраціях 0,1 мг/л (міжвузля) та 0,2 мг/л (листові диски).

На сьогоднішній день все ще багато метаболітів отримують шляхом екстракції з рослин,

тому що калусні і суспензійні культури клітин синтезують вторинні метаболіти в менших кількостях, ніж сама рослина. Утворення вторинних метаболітів в культурі рослин може збільшуватись під впливом деяких стресових факторів (продуктів життєдіяльності певних мікроорганізмів, іонів важких металів, осмотичного шоку, тощо). В подальшому отримана калусна культура використовуватиметься для дослідження впливу елісіторів на синтез та накопичення біологічно-активних речовин в культурі *in vitro*.

Висновки

Підібрані умови отримання калусної маси для рослин *L. barbarum*. В результаті проведеної роботи визначено оптимальну концентрацію сахарози у середовищі для мікроклонального розмноження. Експланти листових дисків і міжвузля пагонів виявляли однакову інтенсивність калусоутворення. Підібрано концентрацію фітогормону для інтенсивного росту калусної тканини на поживному середовищі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Yu M.S., Leung S.K., Lai S.W., Che C.M., Zee S.Y., So K.F., Yuen W.H., Chang R.C.C. Neuroprotective effects of anti-aging oriental medicine *Lycium barbarum* against beta-amyloid peptide neuro-toxicity // *Exp. Gerontol.* – 2005. – 40, N 8. – P. 716–727.
2. Lin F.Y., Lai Y.K., Yu H.C., Chen N.Y., Chang C.Y., Lo H.C., Hsu T.H. Effects of *Lycium barbarum* extract on production and immunomodulatory activity of the extracellular polysaccharopeptides from submerged fermentation culture of *Coriolus versicolor* // *Food Chem.* – 2008. – 110. – P. 446–453.
3. Ming M., Guanhua L., Zhanhai Y., Guang C., Xuan Z. Effect of the *Lycium barbarum* polysaccharides administration on blood lipid metabolism and oxidative stress of mice fed high-fat diet *In Vivo* // *Food Chem.* – 2009. – 113. – P. 872–877.
4. Fraser P.D., Bramley P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids // *Prog. Lipid Res.* – 2004. – 43. – P. 228–265.
5. Gan L., Zhang S.H., Liu Q., Xu H.B. A polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* up-regulates cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells // *Eur. J. Pharmacol.* – 2003. – 471. – P. 217–222.
6. Zhang X., Li Y., Cheng J., Liu G., Qi C., Zhou W., Zhang Y. Immune activities comparison of polysaccharide and polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2014. – 65. – P.441–445.
7. Jin M., Huang Q., Zhao K., Shang P. Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2013. – 54. – P. 16–23.
8. Zhu J., Liu W., Yu J., Zou S., Wang J., Yao W., Gao X. Characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide extracted from the fruit of *Lycium barbarum* L. // *Carbohydr. Polym.* – 2013. – 98. – P. 8–16.
9. Gong H., Shen P., Jin L., Xing C., Tang F. Therapeutic effects of *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) on irradiation or chemotherapy-induced myelo suppressive mice // *Cancer Biother and Radiopharm.* – 2005. – 20, N 2. – P. 155–162.
10. Cheng C.Y., Chung W.Y., Szeto Y.T., Benzie I.F. Fasting plasma zeaxanthin response to *Fructus barbarum* L. (wolfberry; Kei Tze) in a food-based human supplementation trial // *British J. of Nutr.* – 2005. – 93, N 1. – P. 123–130.
11. Rosenthal J.M., Kim J., deMonasterio F., Thompson D.J., Bone R.A., Landrum J.T., de Moura F.F., Khachik F., Chen H., Schleicher R.L., Ferris F.L. 3rd, Chew E.Y. Dose-ranging study of lutein supplementation in persons aged 60 years or older // *Investigative Ophthalm and Visual Scien.* – 2006. – 47, N 12. – P. 5227–5233
12. Trieschmann M., Beatty S., Nolan J. M., Hense H.W., Heimes B., Austermann U., Fobker M., Pauleikhoff D. Changes in macular pigment optical density and serum concentrations of its constituent carotenoids following supplemental lutein and zeaxanthin // *Experim. Eye Resear.* – 2007. – 84, N 4. – P. 718–728.
13. Dong J.Z., Lu D.Y., Wang Y. Analysis of flavonoids from leaves of cultivated *Lycium barbarum* L. // *Plant Foods for Hum. Nutr.* – 2009. – 64, N 3. – P. 199–204.
14. Mocan A., Vlase L., Vodnar D. C., Bischin C., Hanganu D., Gheldiu A., Oprean R., Silaghi-Dumitrescu R., Crisan G. Polyphenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. Leaves // *Molecules.* – 2014. – P. 19.
15. Amagase, H., Farnsworth N.R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). // *Food Res. Int.* – 2011. – 44. – P. 1702–1717.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – 15. – P. 473–497.

ZHUK V.P., ZABEIDA O.F., NAUMENKO V.D.

Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv-143, Osipovskogo str., 2a, e-mail: viktoria.zhuk@gmail.com

SELECTION OF THE CONDITIONS FOR THE INTRODUCTION OF *LYCIUM BARBARUM* (L.) INTO *IN VITRO* CULTURE

Aims. Chinese wolfberry or goji (*Lycium barbarum* (L.)) is attractive object for plant biotechnologists due to the high content of such biologically active compounds as polysaccharides, carotenoids and flavonoids. **Methods.** Our study was aimed to select the optimal conditions for the initiation of *L. barbarum* aseptic callus *in vitro* culture using leaf disks and internodes as explants. **Results.** In the present study, the best explants and corresponding treatment for callus induction were determined. The optimized protocol includes 25 g of sucrose per 1L of Murashige-Skoog medium. In turn, optimal phytohormone concentrations for the intensive growth of callus were 0.1 mg/L 2,4-D for internodes and 0.2 mg/L 2,4-D for leaf discs, while NAA and kinetin were not such effective. **Conclusions.** Our optimized protocol for *L. barbarum* callus initiation could be used for further studies of the synthesis and accumulation of biologically active metabolites in goji tissue culture.

Keywords: *Lycium barbarum* (L.), callus, *in vitro* culture, 2,4-D.