

••• ФІЗИОЛОГІЯ РОСЛИН ••• PLANT PHYSIOLOGY •••

УДК. 581.192: 502.4

Отримання культури рослин *in vitro* зникаючого виду *Crambe steveniana* та вивчення впливу асептичних умов культивування на їх біохімічний склад

Н.О.Пушкарьова¹, М.С.Каліста², В.Б.Белокурова¹, М.В.Кучук¹

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (Київ, Україна)

² Національний науково-природничий музей НАН України (Київ, Україна)
pushkarovan@mail.ua

Досліджували введення в асептичну культуру зникаючого виду *Crambe steveniana* та визначали умови його швидкого мікроклонального розмноження. Визначали та порівнювали склад жирних кислот у вегетативних органах рослин, що культивувались *in vitro* та *in vivo* та у насінні. Поверхневу стерилізацію насіння проводили за розробленим авторами методом з подальшим дослідженням морфогенної відповіді експлантів (пазушних бруньок) на наявність у живильному середовищі 6-бензиламінопурина (0,5–2 мг/л). Склад жирних кислот визначали методом газової хроматографії/мас-спектрофотометрії ефірів жирних кислот, отриманих із насіння та зеленої маси рослин дослідного виду, що культивувались *in vitro* та *in vivo*. Було отримано асептичну культуру пагонів дослідного виду та показано оптимальний вміст БАП (0,6 мг/л) у живильному середовищі для швидкого розмноження асептичних паростків. Виявили підвищення загального вмісту жирних кислот у асептичних зразках порівняно із неасептичними. Крім того, було встановлено високий вміст α -ліноленової кислоти в рослинах, вирощених як в умовах *in vitro*, так і в умовах *in vivo*. У зразках із насіння спостерігається досить високий вміст ерукової кислоти.

Ключові слова: *C. steveniana*, збереження біорізноманіття, жирні кислоти, культура *in vitro*.

Endangered species *Crambe steveniana in vitro* plant culture obtaining and the study of aseptic cultivation influence on its biochemistry

N.O.Pushkarova, M.S.Kalista, V.B.Belokurova, M.V.Kuchuk

The study of endangered species *Crambe steveniana* aseptic *in vitro* culture establishing and definition of its fast microclonal propagation terms have been conducted. Fatty acid composition of vegetative parts of plants that were cultivated *in vitro* and *in vivo* along with their seeds was determined and compared. Seed surface sterilization was performed by the authors method with further morphogenic reaction of explants (lateral bud) on the presence in the medium of 6-benzylaminopurine (0,5–2 mg/L) study. Fatty acids content was determined using gas chromatography/mass spectrophotometry of fatty acid ethers obtained from seeds and green mass of plants that were cultivated *in vitro* and *in vivo*. Aseptic spouts culture of the studied species was established and optimal BA concentration (0,6 mg/L) in the medium was defined for fast multiplication of aseptic spouts. Fatty acid content increase was detected in the samples from aseptic plants compared with not aseptic ones. Also, high α -linolenic acid amount in the samples from both *in vitro* and *in vivo* grown plants was established. Significantly high erucic acid content was shown for seed samples.

Key words: *C. steveniana*, biodiversity conservation, fatty acids, *in vitro* culture.

Получение культуры растений *in vitro* исчезающего вида *Crambe steveniana* и изучение влияния асептических культивирования на их биохимический состав

Н.О.Пушкарёва, М.С.Калиста, В.Б.Белокурова, М.В.Кучук

Исследовали введение в асептическую культуру исчезающего вида *Crambe steveniana* и определяли условия его быстрого микроклонального размножения. Определяли и сравнивали состав жирных кислот вегетативных органов растений, культивируемых *in vitro* и *in vivo*, а также в семенах. Поверхностную стерилизацию семян проводили по методике, разработанной авторами с последующим исследованием морфогенного ответа эксплантов (пазушной почки) на присутствие в питательной

середі 6-бензиламінопурина (0,5–2 мг/л). Состав жирних кислот определяли методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии эфиров жирных кислот, полученных из семян и зеленой массы растений, культивируемых *in vitro* и *in vivo*. Была получена асептическая культура побегов исследуемого вида и показана оптимальная концентрация БАП в питательной среде (0,6 мг/л) для быстрого размножения асептических побегов. Было выявлено увеличение общего количества жирных кислот в асептических образцах сравнительно с неасептическими образцами. Кроме того, было установлено высокое содержание α -линоленовой кислоты в растениях, культивируемых как *in vitro*, так и *in vivo*. В образцах из семян наблюдалось относительно высокое содержание эруковой кислоты.

Ключевые слова: *C. steveniana*, сохранение биоразнообразия, жирные кислоты, культура *in vitro*.

Вступ

Рід *Crambe* включає приблизно 44 види, 8 з яких занесені до Червоної книги України з різним природоохоронним статусом: *Crambe aspera* M. Bieb. (вразливий), *Crambe grandiflora* DC. (вразливий), *Crambe koktebelica* (Junge) N. Busch (рідкісний), *Crambe maritima* L. (вразливий), *Crambe mitridatis* Juz. (вразливий), *Crambe pinnatifida* W.T.Aiton (вразливий), *Crambe steveniana* Rupr. (вразливий), *Crambe tataria* Sebeok (вразливий) (Червона книга України, 2009). Перераховані види рослин потребують не лише різнобічного вивчення, але і використання заходів по збереженню та відновленню чисельності. На даний час розрізняють два основні підходи до збереження різноманіття рослинного світу: *in situ* (збереження видів у природних умовах) та *ex situ* (збереження в контрольованих умовах – банках генів, ботанічних садах, за допомогою кріоконсервації). Кожен із підходів є досить результативним та має ряд переваг, однак має і ряд недоліків, тому для сповільнення темпів скорочення біорізноманіття та відновлення чисельності видів потрібен масштабний, міжгалузевий підхід. Методи біотехнології, зокрема метод культури *in vitro*, дають змогу отримати високий коефіцієнт розмноження рослин, навіть для видів, що погано піддаються розмноженню *in situ* та *ex situ* (Belokurova, 2010) та забезпечити потрібну кількість біомаси для всебічного вивчення видів рослин, що зберігаються. Отже, створення *in vitro* колекцій видів флори України, що охороняються, є важливим та актуальним завданням і не лише може зробити суттєвий внесок в природоохоронну роботу, а, можливо, поповнити списки рослин, які синтезують важливі біохімічні сполуки або є цінним генетичним матеріалом. Але для використання зазначеного методу для вивчення біохімічного складу рослин потрібно розуміти, який саме вплив чинять асептичні умови, в яких проростають рослини в культурі *in vitro*, на деякі біохімічні показники в порівнянні з рослинами того ж виду, що проростають без застосування культивування *in vitro*. Аналіз літературних джерел показав, що вивчення жирнокислотного вмісту вегетативних органів рослин, вирощених в культурі *in vitro*, для виду *C. steveniana* не проводилось, тому таке дослідження є досить актуальним.

Вивчення складу жирних кислот (ЖК) видів родини *Brassicaceae* може відкрити нові потенційні джерела виробництва біопалива, оскільки види даної родини відіграють ключову роль у системі світового виробництва біопалива та масла (Xiao-qin et al., 2011). В той же час в літературних джерелах існує велика кількість посилань на роботи по дослідженню та використанню одного із видів родини *Crambe* в якості економічно вигідного та конкурентоспроможного джерела біопалива та масла, що має широкий спектр застосування (Lazzeri et al., 1997; Prakhova, 2013), а також про застосування в якості корму при розведенні тварин та риб (Perry et al., 1979). Цікавим також є те, що представники даної родини здатні адсорбувати важкі метали із води, тобто виконувати ще й екологічну функцію (Artus, 2006). Попри широкий спектр застосування представники роду *Crambe* на території України не тільки не використовуються, а навіть не вивчаються в достатньому обсязі.

Методика

Підготовку експлантів та введення їх в культуру *in vitro* проводили в асептичних умовах згідно із загальноприйнятими рекомендаціями (Кушнір, Сарнацька, 2005) та намагались оптимізувати ці умови для обраного виду. Поверхневу стерилізацію проводили попередньо занурюючи насіння у 70% етанол на 60 сек., далі його занурювали у діюцид на 1–6 хв. Після обробки насіння стерилізуючими розчинами проводили промивання експлантів стерильною дистильованою водою тричі по 5 хв. Далі експланти культивували в чашках Петрі на агаризованому поживному середовищі MS (Murashige, Skoog, 1962) при 16-годинному фотоперіоді і температурі +24°C. Для визначення ефективності поверхневої стерилізації визначали відсоток асептичного насіння по

відношенню до загального числа вихідних експлантів та відсоток насіння, яке після обробки стерилізуючими сполуками утворювало паростки. Для мікророзмноження рослин дослідного виду використовували 1–1,5-місячні рослини, які висаджували на живильне середовище MS, доповнене 6-бензиламінопурином (БАП) в різних концентраціях. Виміри проводили через 30 днів після додавання у живильне середовище гормону. Мікроклонування проводили шляхом поділу отриманих рослин на пагони. Підраховували кількість новоутворених пагонів та наявність у них кореневої системи. Разом з тим досліджували вплив екзогенних гормонів росту на процес утворення калюсної тканини із пазушних бруньок. В якості контролю використовували тверде живильне середовище MS.

Як матеріал для аналізу хромо-мас-спектрометрією було використано насіння із колекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України та листя рослин, що вирощували в стерильних умовах культури *in vitro* на агаризованому живильному середовищі MS при 16-годинному фотоперіоді і температурі +24°C, та листя рослин, що культивували *in vivo* у Національному ботанічному саду імені Н.Н.Гришка НАН України (середньодобова температура +21°C) виду *C. steveniana*. Культивовані в умовах *in vivo* рослини були люб'язно надані проф. Д.Д.Рахметовим.

Газова хромато-мас-спектрометрія ефірів жирних кислот. Виділення ЖК та їх метилювання проводили одноетапно відповідно до (Garces, Mancha, 1993). Для приготування екстрактів брали 200 мг верхівкового листя рослин. Пробу подрібнювали в ступці. Перенесли рослинний матеріал у скляні пробірки із закручуваними кришками з тефлоновими прокладками і додавали спочатку 3,3 мл реакційної суміші, що містила: метанол : толуол : сірчана кислота в об'ємному співвідношенні 44 : 20 : 2, потім 1,7 мл гексану (метанол, толуол, гексан – HPLC-grade, Sigma-Aldrich, Німеччина; сірчана кислота – хч, Альфарус, Україна). Пробірки витримували на водяній бані при 80°C протягом 2 год. Після охолодження до кімнатної температури їх обережно струшували, що призводило до розділення рідини на дві фази. Відбирали верхню фазу, в якій концентрувались утворені метилові ефіри ЖК. Кислотність розчину доводили до нейтрального рН насиченням 1 М розчином фосфату натрію.

Визначення жирнокислотного складу проводили із застосуванням газової хромато-мас-спектрометричної системи Agilent 6890N/5973inert (Agilent Technologies, США) з капілярною колонкою DB-FFAP (довжина 30 м; внутрішній діаметр 0,25 мм; товщина нерухомої фази 0,25 мкм). Хроматографічне розділення відбувалось у градієнтному режимі від 150° до 220° з градієнтом температури 2°/хв. Як газ-носіє використовували гелій зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Ідентифікацію проводили, застосовуючи бібліотеку мас-спектрів NIST 02 і стандартну суміш метилових ефірів ЖК бактерій (Supelco). В якості внутрішнього стандарту була використана гептадеканова кислота (C17:0) (хч, ABCR, Німеччина).

Статистичний аналіз результатів проводили, оцінюючи різницю середніх значень (t-критерій Стьюдента) (Лакин, 1990).

Для оцінки ступеня ненасиченості ЖК в тканинах листків використовували індекс ненасиченості (індекс подвійних зв'язків – ІПЗ):

$$\text{ІПЗ} = \sum P_j n / 100,$$

де P_j – це вага ЖК (моль%), n – кількість подвійних зв'язків в кожній ненасиченій кислоті. Також використовували коефіцієнт ненасиченості (K) – відношення суми ненасичених ЖК до суми насичених (Lyons et al., 1964).

Результати

Первинні експланти виду *C. steveniana* показали досить високий відсоток асептичності насіння – 85%, при цьому 10% з цього насіння утворило асептичні паростки. У культурі *in vitro* насіння проростало в середньому на 10-й день після стерилізації – спочатку проростав корінець, рослина укорінювалась, а потім з'являлись сім'ядольні листочки. Поява у молодих асептичних паростків першого справжнього листка відбувалась в середньому через 12–16 днів після проростання насінини. Найбільше пагонів утворилось при вмісті БАП в 0,6 мг/л середовища (5,3 шт., без утворення калюсу), а зі збільшенням концентрації гормону до 1 мг/л кількість пагонів зменшувалась та починала розвиватись калюсна тканина. При цьому отримані на середовищі (MS+1 мг/л БАП) пагони мали дуже витрифіковане листя та погано укорінювались при подальшому їх перенесенні на безгормональне середовище MS, крім того майже половина новоутворених

пагонів при подальших спробах культивування гинула. На контрольному безгормональному середовищі утворювався лише один пагін, не відбувалось утворення калюсу, а укорінення пагону відбувалось через 10–14 днів після перенесення на свіже живильне середовище.



Рис. 1. Асептичні рослини виду *Crambe steveniana*: А – проростання асептичного паростка із насінини; Б – асептична рослина, що проростає на безгормональному живильному середовищі MS

Жирні кислоти діляться на три групи згідно зі ступенем насиченості (наявності подвійних зв'язків у вуглецевих ланцюгах): насичені, мононенасичені та поліненасичені ЖК. Загальна кількість ЖК у вегетативних органах асептичних та неасептичних рослин *C. steveniana* досить відрізнялась (табл. 1). Найбільша загальна кількість жирних кислот належала насінню. Рослини, що вирощувались в умовах культури *in vitro*, містили майже втричі більшу, ніж рослини, що культивувались *in vivo*, кількість загальних ЖК. При цьому співвідношення насичених ЖК до ненасичених ЖК було більш рівнозначним, а саме – в асептичних рослинах ненасичених ЖК більше, ніж насичених, в 4 рази, а в неасептичних – в 3 рази більше ненасичених, ніж насичених. Значення індексу подвійних зв'язків, навпаки, в асептичних рослинах є меншим, ніж в неасептичних (табл. 1).

Таблиця 1.

Загальний вміст жирних кислот (ΣFA), сума насичених (ΣSFA) та ненасичених ($\Sigma USFA$) жирних кислот, індекс подвійних зв'язків (ІПЗ) та коефіцієнт ненасиченості (К) жирних кислот рослин виду *C. steveniana*, що вирощувались в умовах *in vitro* та *in vivo*

Показник	Асептичні рослини (<i>in vitro</i>)	Неасептичні рослини (<i>in vivo</i>)	Насіння
ΣFA , мг/г	5,81±0,39	1,92±0,23	787,78±3,34
ΣSFA , мг/г	1,23±0,88	0,47±0,05	20,76±0,27
$\Sigma USFA$, мг/г	4,58±1,28	1,45±0,19	767,01±3,62
К	3,71±1,23	3,07±0,17	36,94±0,67
ІПЗ	1,48±0,34	2,09±0,03	1,22±0,003

Ненасичені ЖК, що можуть бути включені до раціону людини, мають профілактичні та терапевтичні властивості при багатьох захворюваннях людини (Сахно та ін., 2012), тому дослідження вмісту та кількості насичених ЖК може показати потенційну цінність зеленої маси та насіння *C. steveniana* в якості додатку до харчового раціону людини чи для кормових цілей сільськогосподарства. Серед насичених жирних кислот в усіх дослідних зразках *C. steveniana* були присутні: лауринова (C12:0), пальмітинова (C16:0) та стеаринова (C18:0) кислоти. При цьому лише у зразках із насіння була наявна арахінова кислота (C20:0) і лише у зразках із вегетативних органів асептичних рослин була наявна лігноцерінова кислота (C24:0). Також до складу вегетативних органів рослин, що вирощувались в умовах *in vitro* та *in vivo*, а також насіння входили такі поліненасичені ЖК: лінолева кислота (C18:2 $\Delta 9, 12, \omega 6$) та α -лінолева кислота (C18:3 $\Delta 9, 12, 15, \omega 3$). У насінні дослідного виду були присутні такі мононенасичені ЖК – олеїнова (C18:1 $\Delta 9, \omega$

9), гондоева (C20:1 Δ 11, ω 9) та ерукова (C22:1 Δ 13, ω 9) кислоти, хоча мононенасичених ЖК не було визначено у вегетативних органах асептичних рослин. У зразках з рослин, що проростали в умовах культури *in vitro*, було визначено лише пальмітоленову кислоту (C16:1 Δ 9, ω 7), наявність якої більше не було помічено ні в зразках із насіння, ні в зразках із вегетативних органів рослин, що культивувались в умовах *in vivo*. Також лише у зразках із вегетативних органів неасептичних рослин була наявна нервонова кислота (C24:1 Δ 15, ω 9) (рис. 1).

При вивченні газ-спектрів зразків ефірів жирних кислот, які було отримано із дослідних зразків, виявилось, що серед насичених ЖК найбільший вміст належав пальмітиновій кислоті. У вегетативних органах асептичних рослин даної кислоти виявилось більше ($28,61 \pm 0,57$ моль%), ніж у рослинах, що проростали в неасептичних умовах ($22,02 \pm 0,09$ моль%). У насіння вміст C16:0 був найменшим і становив $2,12 \pm 0,01$ моль%. Найбільша серед усіх дослідних зразків кількість лауринової та стеаринової кислот містилась в екстрактах із вегетативних органів рослин, що проростали в умовах культури *in vitro* (C12:0 – $2,54 \pm 0,6$ моль% та C18:0 – $2,97 \pm 0,28$ моль%), а найменша кількість даних кислот спостерігалась у екстрактах із насіння (C12:0 – $0,24 \pm 0,005$ моль% та C18:0 – $0,47 \pm 0,05$ моль%). Зразки із неасептичних рослин містили в 4 рази меншу кількість лауринової кислоти (C12:0 – $0,63 \pm 0,08$ моль%) та майже рівну кількість стеаринової кислоти (C18:0 – $2,65 \pm 0,54$ моль%) порівняно із вмістом цих кислот у асептичних зразках. Незначна кількість арахінової кислоти була визначена лише в екстрактах із насіння *C. steveniana* (C20:0 – $0,17 \pm 0,01$ моль%) (рис. 1).

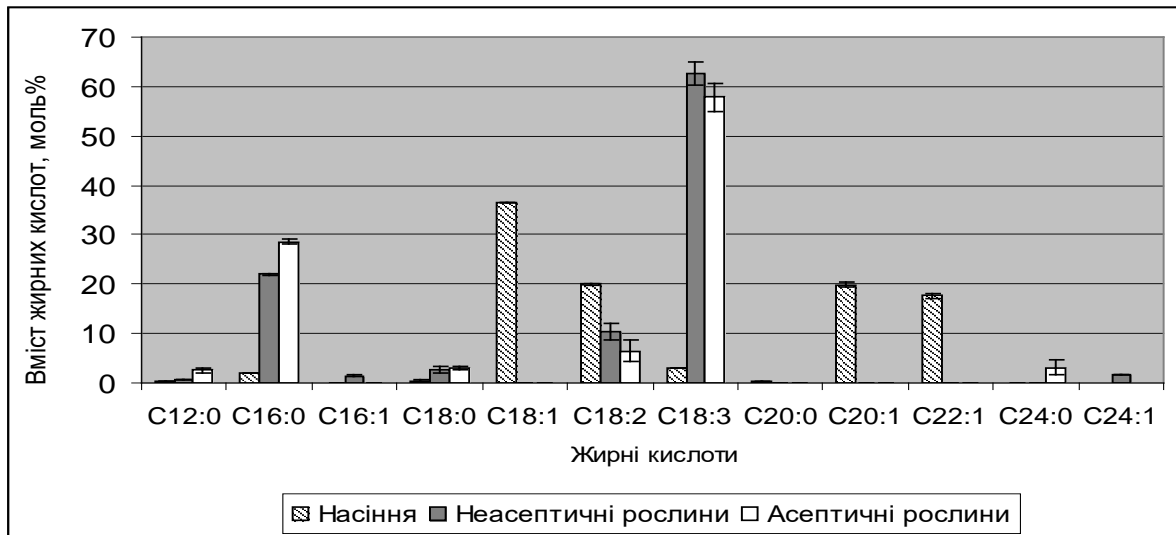


Рис. 1. Вміст жирних кислот у зразках із насіння, вегетативних органів рослин, що

В екстрактах із насіння домінуючою ЖК була лінолева кислота ($36,57 \pm 0,007$ моль%), при тому, що у зразках із вегетативних органів рослин, що культивувались *in vitro* та *in vivo*, цієї кислоти помічено не було взагалі. Незначна кількість іншої мононенасиченої ЖК – пальмітоленової, була знайдена лише у вегетативних органах рослин, що вирощувались в умовах ботанічного саду (C16:1 – $1,5 \pm 0,16$ моль%).

Лінолева та α -ліноленова кислоти не синтезуються в організмі ссавців, а потрапляють із їжею. Разом з тим, наявність поліненасичених ЖК у раціоні людини може зменшувати ризик виникнення інфекційних та неінфекційних захворювань, зокрема, α -ліноленова кислота впливає на зменшення ризику та знижує клінічні прояви деяких хронічних хвороб, таких як ревматоїдний артрит або atopічна екзема (Сахно та ін., 2012). В екстрактах із вегетативних органів рослин (як асептичних, так і неасептичних) домінуючою ЖК виявилась α -ліноленова кислота. Її вміст в асептичних рослинах (C18:3 – $57,84 \pm 2,83$ моль%) був трохи меншим, ніж в неасептичних (C18:3 – $62,69 \pm 2,38$ моль%). Згідно із літературними даними, вміст α -ліноленової кислоти (однієї з

найцінніших в харчовому раціоні людини) в найбільш вживаних видів родини Brassicaceae є нижчим за вміст даної ЖК у вегетативних органах *C. steveniana* (33,08±1,41% для рапсу, 33,79±1,53% для ріпи та 46,60±2,80% для капусти) (Imran et al., 2009), що дає можливість говорити про цінність дослідного виду у якості джерела цієї незамінної ЖК. Екстракти з насіння показали набагато менший вміст α -ліноленової кислоти (C18:3 – 2,99±0,12 моль%) в порівнянні із зеленою масою.

Найбільший вміст лінолевої кислоти було виявлено в екстрактах із насіння *C. steveniana* (C18:2 – 19,94±0,02 моль%). Серед вегетативних органів вміст даної ЖК був вищим для рослин, що вирощувались в умовах ботанічного саду (C18:2 для асептичних – 10,43±1,63 моль% та неасептичних рослин – 6,47±2,12 моль%).

Довголанцюгові мононенасичені ЖК гондоєва та ерукова були визначені лише у насінні дослідного виду. Кількість даних ЖК була майже рівною: C20:1 – 19,87±0,54 моль%, C22:1 – 17,59±0,42 моль%. В зразках, отриманих із вегетативних органів рослин, що проростали в стерильних умовах культури *in vitro*, було знайдено невелику кількість лігноцеринової кислоти (C24:0 – 3,08±1,5 моль%), а у вегетативних органах рослин, що проростали в умовах *in vivo*, знайдено її мононенасичений аналог – нервонову кислоту (C24:1 – 1,64±0,08 моль%). Нервонова кислота має широкий спектр застосування при симптоматичному лікуванні розсіяного склерозу, хвороби Паркінсона, шизофренії, хвороб, пов'язаних із неврологічними розладами (хвороба Альцгеймера), використовується також для поліпшення пам'яті, лікування артриту, захворювань печінки, ожиріння. Крім того, нервонова кислота має широке застосування на харчовому ринку в якості харчової добавки в дитячому харчуванні та сумішах (зокрема в харчовому раціоні недоношених немовлят), в раціоні харчування вагітних жінок та в збагачених енергетичних добавках, що мають нейрозахисну дію для атлетів під час тренувань (Sandhir et al., 1998; Taylor et al., 2009; Sargent et al., 1994). Беручи до уваги широке та різнопланове використання нервонової кислоти, її наявність навіть у невеликій кількості у вегетативних органах рослин виду *C. steveniana*, вирощених в умовах ботанічного саду, дає можливість говорити про доцільність використання даного виду в якості джерела C24:1 або для біотехнологічного підвищення вмісту нервонової кислоти у зеленій масі рослин.

Обговорення

Застосована схема стерилізації забезпечує максимальну кількість асептичних паростків, але кількість насіння, що проростає в культурі *in vitro*, є досить низькою. Згідно із проведеними раніше дослідженнями, дана схема є більш результативною для інших видів роду *Crambe* (для *C. tataria* – 60% асептичних насінин утворювали паростки та для *C. koktebelica* – 50% насінин проростали в культурі *in vitro*) (Пушкарьова та ін., 2016), тому можна зробити припущення про те, що така різниця у кількості насінин, що проросли, обумовлена індивідуальними особливостями виду. Аналіз літературних даних показав відсутність інформації про розмноження виду *C. steveniana* в культурі *in vitro*. Дослідження мікроклонального розмноження для роду *Crambe* були зосереджені на визначенні морфогенного потенціалу таких типів експлантів – частина кореня, частина листка та гіпокотиль. При цьому спостерігалась досить висока інтенсивність утворення калюсної тканини із тканин експланту, що підвищує ймовірність виникнення мутацій у новоутворених рослинах. Оскільки метою нашого дослідження є збереження різноманіття рослин, особливо важливим є збереження генетичної однорідності вихідного матеріалу. Для цього було проведено дослідження морфогенного потенціалу пазушних бруньок і показано можливість отримувати досить високу кількість регенерантів шляхом прямого органогенезу.

При вивченні газ-спектрів зразків ефірів ЖК, які було отримано із вегетативних органів асептичних та неасептичних рослин, а також насіння *C. steveniana*, виявили різницю як в якісному, так і кількісному складі ЖК дослідних зразків. Було показано, що рослини, які проростали в асептичних умовах, мали більшу загальну кількість ЖК, ніж ті, що проростали в неасептичних умовах. Разом із тим, культивовані *in vitro* рослини мали вищий вміст насичених ЖК і нижчий вміст ненасичених ЖК у порівнянні з рослинами, культивованими в умовах *in vivo*. Домінуючою ЖК у зразках із вегетативних органів дослідного виду була α -ліноленова кислота, як у рослин, вирощених в умовах *in vitro*, так і в умовах *in vivo*. Численними дослідженнями було показано, що культивування *in vitro* може бути потужним стресовим фактором (Gaspar et al., 2002) та здатне викликати активацію мобільних генетичних елементів (Bayram et al., 2012), що в свою чергу може

привести до виникнення мутацій або зміни експресії генів (Todorovska, 2007). Крім того, ліпіди виконують важливу роль у стійкості рослин до низьких температур та до стресових чинників (Лось, 2005; Shah, 2005; Wang et al., 2006). Підвищення вмісту ЖК (особливо ненасичених ЖК) в асептичних рослин підтверджує стресовий вплив культивування рослин *in vitro* та підкреслює необхідність подальшого молекулярно-генетичного дослідження культивованих в асептичних умовах рослин на предмет виникнення мутацій у відповідь на культивування *in vitro*. Було показано високий вміст незамінних ЖК у зразках із насіння і вегетативних органів дослідного виду. Також у зразках із насіння спостерігається досить високий вміст ерукової кислоти, а у зразках із вегетативних органів неасептичних рослин невелика кількість нервонової кислоти. Отже, одним з можливих механізмів зміни рівня та складу ЖК за культивування *in vitro* може бути посилення їх синтезу за стресу, викликаними цими умовами.

Дані було отримано з використанням обладнання Центру спільного користування в Інституті мікробіології та вірусології імені Д.К.Заболотного НАН України.

Список літератури

- Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. – К.: Наукова думка, 2005. – 269с. /Kushnir G.P., Sarnats'ka V.V. Mikroklonal'ne rozmnozheniya roslin. Teoriya i praktyka. – K.: Naukova dumka, 2005. – 269s./
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352с. /Lakin G.F. Biometriya. – M.: Vysshaya shkola, 1990. – 352s./
- Лось Д.А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений // Вестник РАН. – 2005. – Т.75. – С. 338–345. /Los' D.A. Molekulyarnye mekhanizmy holodoustoychivosti rasteniy // Vestnik RAN. – 2005. – T.75. – S. 338–345./
- Пушкарьова Н.О., Белокурова В.Б., Кучук М.В. Застосування регуляторів росту для мікроклонального розмноження *in vitro* рослин, що охороняються // Рідкісні рослини і гриби України та прилеглих територій: реалізація природоохоронних стратегій. Матеріали IV Міжнародної конференції. – 2016. – С. 218–222. /Pushkar'yova N.O., Belokurova V.B., Kuchuk M.V. Zastosuvannya regulyatoriv rostu dlya mikroklonal'nogo rozmnozheniya in vitro roslin, shcho okhoronyayut'sya // Ridkisini rosliny i gryby Ukrainy ta pryleglykh terytoriy: realizatsiya pryrodokhoronnykh strategiy. Materialy IV Mizhnarodnoi konferentsii. – 2016. – S. 218–222./
- Сахно Л.О., Остапчук А.М., Ключко В.В., Кучук М.В. Жирнокислотний склад насіння ріпаку з трансгеном *суп11А1* цитохрому Р450_{SCC} // Біотехнологія. – 2012. – Т.5, №5. – С. 27–33. /Sakhno L.O., Ostapchuk A.M., Klochko V.V., Kuchuk M.V. Zhynokyslotnyy sklad nasinnya ripaku z transgenom *суп11А1* tsitokhromu R450_{SCC} // Biotekhnologiya. – 2012. – T.5, №5. – S. 27–33./
- Червона книга України. Рослинний світ / за ред. Я.П.Дідуха. – К.: Глобалконсалінг, 2009. – 900с. /Chervona knyga Ukrainy. Roslynnyy svit / za red. Ya.P.Didukha. – K.: Globalkonsaling, 2009. – 900s./
- Artus N.N. Arsenic and cadmium phytoextraction potential of crambe compared with Indian mustard // Journal of Plant Nutrition. – 2006. – Vol. 29. – P. 667–679.
- Bayram E., Yilmaz S., Hamat-Mecbur H. *Nikita* retrotransposon movements in callus cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) // Plant OMICS: Journal of Plant Molecular Biology & Omics. – 2012. – Vol.5 (3). – P. 211–217.
- Belokurova V.B. Methods of biotechnology in system of efforts aimed at plant biodiversity preservation // Cytol. Genet. – 2010. – Vol.44, no 3. – P. 174–185.
- Garces R., Mancha M. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues // Anal. Biochem. – 1993. – Vol.211. – P. 139–143.
- Gaspar T., Franck T., Bisbis B. et al. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures // Plant Growth Regul. – 2002. – Vol.37. – P. 263–285.
- Imran Mohammad, Farah Naz Talpur, Siradjuddin, Rasool Khan Leaf lipids of some edible plants from north-west Pakistan // J. Chem. Sok. Pak. – 2009. – Vol.31, no 3. – P. 492–497.
- Lazzeri L., De Mattei F., Bucelli F., Palmieri S. Crambe oil – a potential new hydraulic oil and quenchant // Industrial Lubrication and Tribology. – 1997. – Vol.49, no 2. – P. 71–77.
- Lyons J.M., Wheaton T.A., Pratt H.K. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plant // Plant Physiol. – 1964. – Vol.39. – P. 262–268.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. - Vol.15. – P. 473–497.
- Perry T.W., Kwolek W.F., Tookey H.L. et al. *Crambe* meal as a source of supplemental protein for growing beef cattle // Journal of animal science. – 1979. – Vol.48, no 4. – P. 758–763.

Prakhova T.Ya. New unconventional oilseed – *Abyssinian Crambe* // Bulletin of Altai state agricultural university. – 2013. – Vol.8, no 106. – P. 8–10.

Sandhir R., Khan M., Chahal A., Singh I. Localization of nervonic acid beta-oxidation in human and rodent peroxisomes: impaired oxidation in Zellweger syndrome and X-linked adrenoleukodystrophy // Journal of Lipid Research. – 1998. – Vol.39, no 11. – P. 2161–2171.

Sargent J.R., Coupland K., Wilson R. Nervonic acid and demyelinating disease // Medical Hypotheses. – 1994. – Vol.42, no 4. – P. 237–242.

Shah J. Lipids, lipases, and lipid modifying enzymes in plant disease resistance // Annual Review of Phytopathology. – 2005. – Vol.43. – P. 229–260.

Taylor D.C., Guo Y., Katavic V. et al. New seed oils for improved human and animal health and as industrial feedstocks: genetic manipulation of the *Brassicaceae* to produce oils enriched in nervonic acid // Modification of seed composition to promote health and nutrition / Ed. A.B.Krishnan. – American Society of Agronomy, 2009. – P. 219–233.

Todorovska E. Retrotransposons and their role in plant – genome evolution // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2007. – Vol.21. – P. 294–305.

Wang X., Li W., Li M., Welti R. Profiling lipid changes in plant response to low temperatures // Physiologia Plantarum. – 2006. – Vol.126. – P. 90–96.

Xiao-qin S., Hui P., Jian-lin G. et al. Fatty acid analysis of the seed oil in a germplasm collection of 94 species in 58 genera of *Brassicaceae* // Chem. Ind. of Forest Prod. – 2011. – Vol.31 (6). – P. 46–54.

Представлено: А.І.Ємець / Presented by: A.I.Yemets

Рецензент: В.В.Жмурко / Reviewer: V.V.Zhmurko

Подано до редакції / Received: 30.07.2016