

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук
Кафедра біології

Кваліфікаційна робота
освітній ступінь – бакалавр

на тему «**ОТРИМАННЯ КУЛЬТУР *IN VITRO* РІЗНИХ ВИДІВ РОДУ
RUMEX ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ В НИХ БІОЛОГІЧНО
АКТИВНИХ РЕЧОВИН»**

Виконала: студентка 4-го року навчання
Спеціальність 091 – Біологія

Мамій Олександра Володимирівна

Керівники:

Листван К.В.,
кандидат біологічних наук, науковий
співробітник Інституту клітинної біології
та генетичної інженерії НАН України;

Пасічник Т.В.,
кандидат біологічних наук, старший
викладач кафедри біології НаУКМА

Рецензент Банникова М.О.,
к.б.н., с.н.с. Інституту клітинної біології
та генетичної інженерії НАН України

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пасічник Т.В.

«__» червня 2020 року

Київ 2020

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Загальна характеристика рослин роду <i>Rumex</i>	6
1.2. Загальна характеристика біологічно активних речовин роду <i>Rumex</i>	8
1.2.1. Характеристика рослинних біологічно активних речовин	8
1.2.2. Загальна характеристика фенольних сполук	9
1.2.3. Загальна характеристика терпенів	14
1.3. Основні типи рослинних культур <i>in vitro</i>	15
1.3.1. Характеристика рослинних культур <i>in vitro</i>	15
1.3.2. Культура клітинної суспензії	17
1.3.3. Культура протопластів	18
1.3.4. Калусна культура	19
1.3.5. Культури ізольованих органів рослин	20
1.4. Застосування культур <i>in vitro</i> для отримання біологічно активних речовин	20
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	22
2. 1. Характеристика об'єкта дослідження	22
2.2. Характеристика матеріалів та реактивів дослідження	23
2.3. Методи дослідження	25
2.3.1. Метод культивування <i>in vitro</i> представників роду <i>Rumex</i>	25
2.3.2. Метод визначення загальної кількості фенольних сполук	26
2.3.3. Метод визначення сумарного вмісту флавоноїдів	27
2.3.4. Статистична обробка даних	28
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	29

3.1. Культивування <i>in vitro</i> видів роду <i>Rumex</i> з використанням фітогормональних середовищ	29
3.2. Визначення фенольних сполук	40
3.3. Визначення флавоноїдів	43
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	46
ВИСНОВКИ	48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	49

ВСТУП

З давніх часів людина використовує рослини як джерело корисних для себе речовин. Зростання населення опосередковано збільшує і потреби в рослинах: сьогодні рослини використовують як джерела нетрадиційних ліків приблизно 70–80% населення. Стає зрозумілим, що такий попит є однією з основних причин зменшення популяцій цінних видів рослин і деградації їх місць існування [1].

Для того щоб вирішити ці проблеми, замість плантаційного способу вирощування рослин зараз використовують метод культивування рослинних клітин та тканин, оскільки такий метод має низку переваг, серед яких незалежність від навколишніх умов, висока швидкість накопичення біомаси, зменшений вплив на екосистему, асептичність культур, можливість культивувати рідкісні рослини та отримувати більшу кількість вторинних метаболітів завдяки використанню еліситорів або за допомогою методів генної інженерії. Однак різні види рослин потребують різних умов культивування, зокрема певний склад середовища, навіть якщо ці види – представники одного роду. Підбір певного складу живильного середовища, що використовується для культивування *in vitro* того чи іншого виду, є важливим кроком як для розуміння загальних закономірностей отримання тканинних культур, так і для оновлення знання, визначення найефективнішого середовища та його складових для рослин [1,2].

Біологічно активні речовини, які використовує людина, є нічим іншим, як вторинними метаболітами рослин. Рослина має значну кількість таких метаболітів, які зазвичай виконують роль захисту від абіотичних та біотичних стресорів. Визначення, вивчення та використання рослинних біологічно активних речовин дає змогу зрозуміти якісний склад речовин у рослині та їхній вплив на організм людини, а саме як вони допомагають у лікуванні хвороб [2].

Метою роботи був підбір умов для формування калусних культур представників роду *Rumex* та кількісне визначення вмісту фенольних речовин та флавоноїдів в асептичних рослинах.

Для досягнення мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Визначити для видів *Rumex japonicus*, *Rumex alpestris*, *Rumex palustris* і *Rumex hydrolapathum* оптимальну концентрацію 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти та бензиламінопурину в середовищі Мурасіге – Скуга для калусогенезу листових та черешкових експлантів.

2. Наростити *in vitro* надземні частини видів *Rumex japonicus*, *Rumex alpestris*, *Rumex palustris*, *Rumex hydrolapathum*, *Rumex acetosa*, *Rumex euxinus*.

3. Підготувати зразки з надземних частин представників роду *Rumex* для визначення в них біологічно активних речовин.

4. Дослідити загальний вміст фенольних сполук та флавоноїдів у надземних частинах представників роду *Rumex* із використанням спектрофотометрії.

Експериментальну частину роботи виконано на базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика рослин роду *Rumex*

Рід *Rumex* (щавель) належить до родини покритонасінних дводольних рослин – космополітів *Polygonaceae* (гречкові), порядку *Caryophyllales* (гвоздикоцвіті). Родина в свою чергу нараховує близько 56 родів і 1266 видів рослин. Рід *Rumex* охоплює понад 200 видів одно- або багаторічних трав та чагарників, які мають широке екологічне розповсюдження та економічну значущість для людини [3– 5].

Більшість щавлів росте на території північної півкулі, в природних зонах з помірним кліматом, на кислих зволжених ґрунтах. Зазвичай представники роду *Rumex* є багаторічними, рідше однорічними трав'янистими рослинами або чагарниками висотою від 15 до 150 см, характеризуються наявністю стрижневої кореневої системи (але частіше спостерігаються кореневища), розташованим почергово великим базальним цілісним зеленим листям ланцетної форми, дрібними квітками з шістьма тичинками і шістьма пелюстками, зібраними у термінальні мутовки. На пелюстках квітів представників роду *Rumex*, біля їхньої основи, є невелике утворення, яке після дозрівання плода (трикутний горіх) огортає його [5].

Найбільш вивченими є такі види роду *Rumex*: *R. acetosa* (щавель кислий), *R. japonicus* (щавель японський), *R. crispus* (щавель кучерявий), *R. confertus* (щавель кінський), *R. dentatus* (щавель зубчастий), *R. maritimus* (щавель приморський), *R. alpinus* (щавель альпійський), *R. obtusifolius* (щавель туполистий), *R. longifolius* (щавель довголистий) (рис. 1.1).



Рис. 1.1. *Rumex obtusifolius* [6].

Rumex acetosa (щавель кислий) багаторічна трав'яниста рослина висотою 40–100 см, із прямими стеблами і короткими тонкими коренями. Базальні листя рослини яйцевидно-ланцетні з цілісними краями розміром 3 - 12 × 2 - 4 см. Квіти одностатеві. *Rumex longifolius* (щавель довголистий) характеризується як багаторічна трав'яниста рослина висотою 60–120 см. Стебла прямостоячі, листя довгасто-ланцетної форми 20 - 35 × 5 - 10 см. Квіти двостатеві. *Rumex japonicus* (щавель японський) багаторічна трав'яниста рослина. Стебла рослини прямі висотою 50–100 см, зверху гіллясті. Листова пластинка довгаста або ланцетно-довгаста розміром 8 - 25 × 3 - 8 см. Квіти є двостатевими [7].

Відомо, що в надземній частині представників роду *Rumex* міститься велика кількість вторинних метаболітів, завдяки чому сьогодні щавлі активно використовуються як джерела біологічно активних речовин та знаходять застосовуються при лікуванні різноманітних захворювань, з-поміж яких є такі як запалення, цукровий діабет, злоякісні пухлини, проблеми зі шлунково-кишковим трактом та інші [5].

1.2. Загальна характеристика біологічно активних речовин роду *Rumex*

1.2.1. Характеристика рослинних біологічно активних речовин.

Сьогодні рослини є одним із джерел хімічних сполук, які застосовуються у фармацевтичній, харчовій та інших галузях промисловості. Біологічно активні сполуки – це хімічні сполуки, які мають фармакологічний або токсикологічний вплив на людей і тварин. У рослинах біологічно активні сполуки синтезуються у вигляді вторинних метаболітів декількома шляхами в процесах вторинного метаболізму. Найголовнішою функцією вторинних метаболітів у рослинному організмі є захист від біотичних та абіотичних стресорів [8,9].

Класифікувати рослинні біологічно активні сполуки можна по-різному. У більшості джерел вторинні метаболіти рослин ділять на три основні хімічні групи: терпени і терпеноїди (приблизно 25 000 різновидів), алкалоїди (приблизно 12 000 різновидів) і фенольні сполуки (приблизно 8 000 різновидів). Синтез біологічно активних речовин здійснюється чотирма шляхами: шикиматний шлях, шлях малонової кислоти, шлях мевалонової кислоти і немевалонатний шлях. Фенольні сполуки синтезуються шляхом шикимової кислоти і шляхом малонової кислоти. Терпени утворюються шляхом мевалонової кислоти і шляхом немевалоната (рис. 1.2) [8,9].

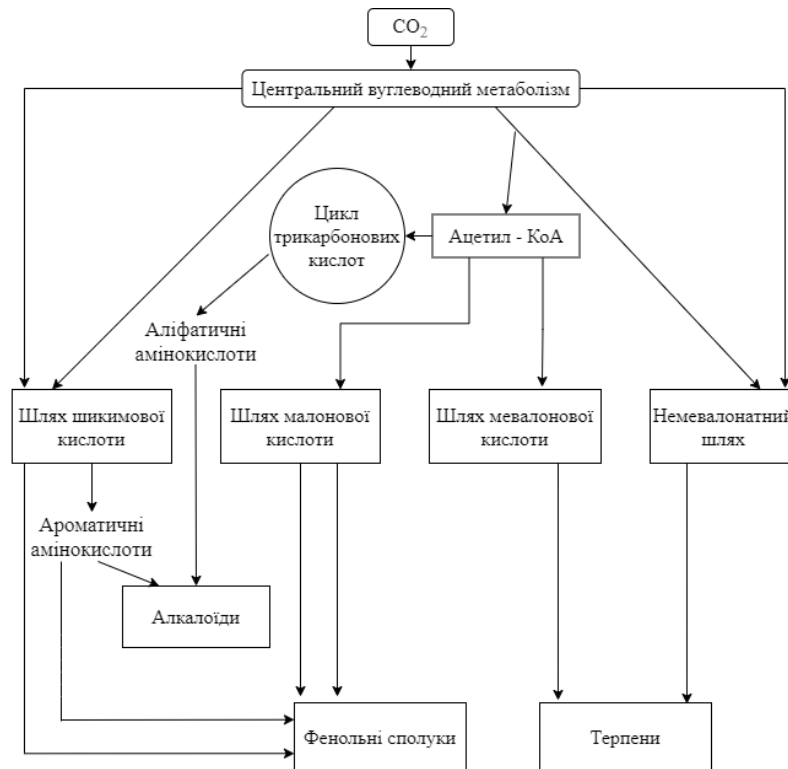


Рис. 1.2. Схема біосинтезу біологічно активних речовин. Адаптовано за [10].

Представники роду *Rumex* характеризуються синтезом і накопиченням в різних частинах організму груп таких вторинних метаболітів, як феноли (флавоноїди, антрахінони, таніни, катехіни, кумарини, стилбеноїди) і терпени [5]. Щавлі характеризуються наявністю таких поліфенольних сполук, як кверцетин, емодин, рутин, полідатин, цитреорозеїн, хризофанол, неподин, вітексин. На даний момент доведено, що ці сполуки мають фармакологічний ефект (антиканцерогенна, протизапальна, антиоксидантна дії).

1.2.2. Загальна характеристика фенольних сполук. Фенольні сполуки характеризуються наявністю як мінімум одного бензольного кільця з однією або декількома гідроксильними групами. Така будова визначає феноли як донорів або акцепторів водню, чим і пояснюються їхні антиоксидантні властивості [11,12]. Фенольні та поліфенольні сполуки залежно від хімічної

структури поділяються на кілька класів: фенольні кислоти, флавоноїди, стильбеноїди, кумарини, лігніни і дубильні речовини [13]. Незважаючи на те, що феноли є вторинними метаболітами, вони необхідні для підтримки таких процесів у рослині як зростання, розвиток і розмноження. Також феноли беруть участь у пігментації органів рослинного організму, захищають від патогенних мікроорганізмів і виконують роль сигнальних молекул [14].

Основний клас фенолів представлений фенольними кислотами, які є незамінним компонентом рослинних клітинних стінок, в яких вони утворюють містки з макромолекулами целюлози, геміцелюлози, пектину. Фенольні кислоти діляться на дві групи: гідроксикоричні і оксибензойні. Гідроксикоричні кислоти містять *p*-кумарову, кавову, ферулову і сінапінову кислоти. Гідроксибензойні кислоти містять *p*-гідроксибензойну, протокатехінову, ванільну, галову кислоти (рис. 1.3). Особливість тієї чи іншої фенольної кислоти визначається функціональними групами, що заміщуються (гідроксильні і метоксигрупи) [13].

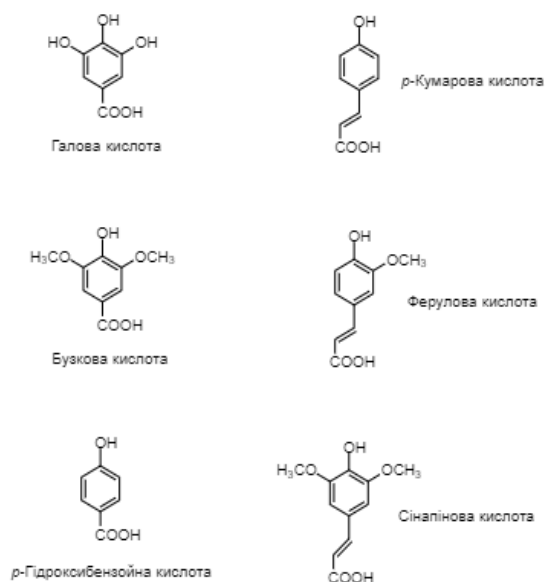


Рис. 1.3. Фенольні кислоти. Адаптовано за [13].

Флавоноїди мають трикільцеву структуру (С6-С3-С6). Залежно від вуглецю кільця С, до якого приєднано кільце В, і ступеня ненасиченості та окиснення кільця С, флавоноїди можна розділити на кілька підгруп, а саме: флавони, флавоноли, флаванони, флаваноноли, ізофлавоноли і антоціанідини. У ізофлавонолах кільце В пов'язано в положенні 3 кільця С. Якщо кільце В пов'язано в положенні 4, такі флавоноїди називаються неофлавоноїдами. Флавоноїди, в яких кільце В пов'язано в положенні 2, можуть бути додатково поділені на кілька підгруп на основі структурних особливостей кільця С, а саме на флавони, флавоноли, флаванони, флаваноноли, катехіни, антоціани і халкони (рис. 1.4) [15].

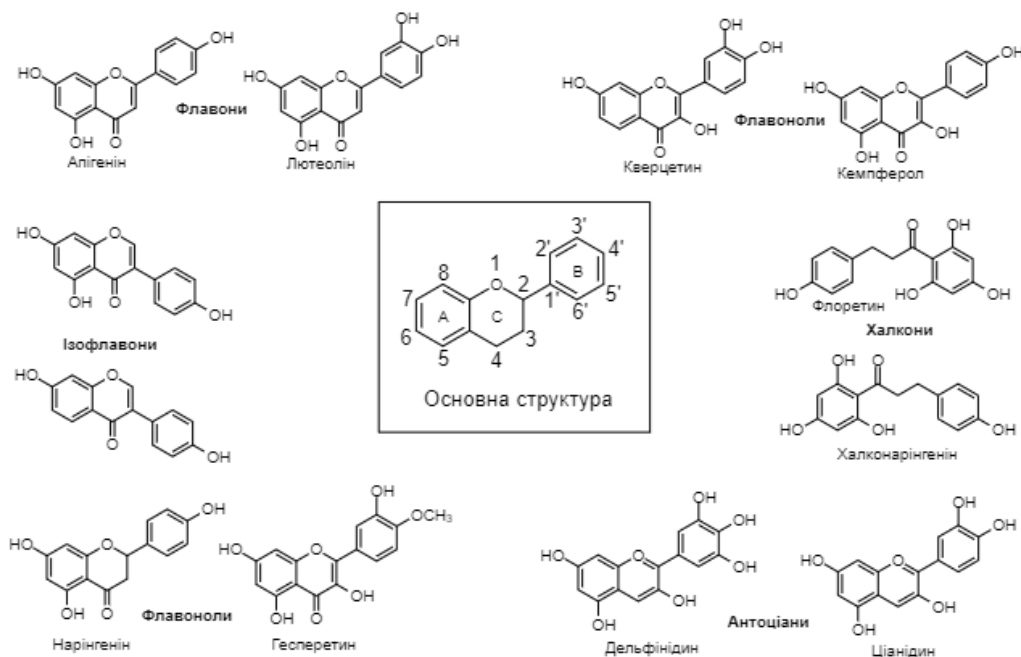


Рис. 1.4. Загальна структурна формула флавоноїдів та їх підгрупи.

Адаптовано за [15].

У рослин флавоноїди відповідають за колір і аромат квітів, плодів, які залучають запилювачів. Крім зазначених раніше функцій вторинних метаболітів, флавоноїди є унікальним УФ-фільтром. Флавоноїди мають

інгібуючу дію на такі ферменти як альдозоредуктаза, ксантиноксидаза, фосфодіестераза, АТФаза, ліпоксигеназа, циклооксигеназа [12].

Одним із флавоноїдів, характерним для представників *Rumex*, є кверцетин. Кверцетин (аліконова форма флавоноїдних глікозидів) присутній у рослинах у багатьох різних глікозидних формах, причому кверцетин-3-рутинозид (рутин) є однією з найпоширеніших форм. Кверцетин за хімічною структурою є флавоноїдом і містить п'ять гідроксильних груп (рис. 1.5). Кверцетин – жовта кристалічна тверда речовина з гірким смаком, нерозчинна у воді, слабо розчинна в спирті і розчинна у крижаній оцтовій кислоті та водних лужних розчинах. Відомо, що кверцетин може пригнічувати проліферацію різних типів ракових клітин, а також має протиалергійний, протівірусний, протизапальний вплив, протидіабетичний ефект [16,17,18].

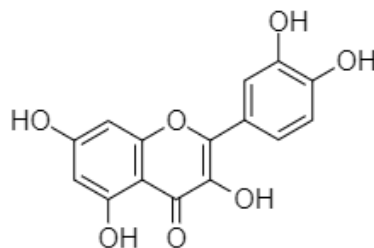


Рис. 1.5. Структурна формула кверцетину. Адаптовано за [17].

Стильбеноїди характеризуються наявністю вуглецевого скелета С6-С2-С6. Порівняно з багатьма іншими фенольними сполуками, у рослині синтезуються в невеликій кількості. Найбільш вивченим стильбеноїдом є ресвератрол, який має низку фармакологічних впливів, тобто може брати участь у модуляції проліферації клітин, ангіогенезу, окислювально-відновного потенціалу, мітохондральної активності та інгібувати процес запалення (рис. 1.6) [19].

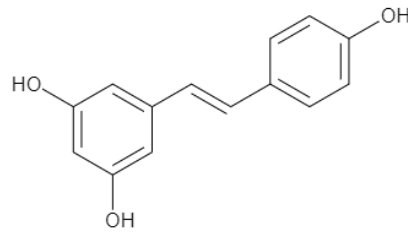


Рис. 1.6. Структурна формула ресвератролу [19].

Кумарини є бензопіронами зі скелетом С6-С3 і кисневим гетероциклом в ланці С3 [11]. Володіють такими фармакологічними діями: антибактеріальними, протитуберкульозними, протигрибковими, противірусними, антимуtagenними, антиоксидантними, протизапальними, антитромботичними, протипухлинними, антикоагулянтними [20].

Таніни діляться на дві групи: гідролізовані таніни, такі як еллагітаніни і галлотаніни; і конденсовані дубильні речовини, так звані проантоціанідіни. Остання група ділиться на кілька підкласів залежно від типу зв'язку між флавоноїдами, а саме одинарного або подвійного зв'язку [13].

Антрахінони або глікозильовані флавоноїди – клас органічних сполук, у структурі яких є циклічний дікетон (рис.1.7). Найбільш поширеними є О-глікозиди флавонів і флавонолів і С-глікозиди флавонів. 9,10-антрахінони є важливою підгрупою. Їхня структура заснована на жорсткій, плоскій трикільцевій ароматичній системі антрацену, яка містить дві кето-групи в положеннях 9 і 10 [21,22].

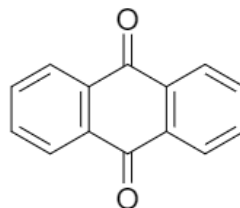


Рис. 1.7. Загальна структура антрахінонів [22].

Найпоширенішим антрахіноном в щавлях є емодин. У рослинах емодин присутній у вегетативних і генеративних органах. Для біологічної активності емодину критичною є наявність метильної та карбонільної функціональних груп (рис. 1.8).

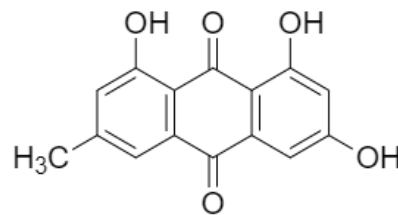


Рис. 1.8. Загальна структура емодину [22].

Емодин має протипухлинну, антибактеріальну, сечогінну і судинорозширювальну дію і характеризується подвійною активністю: з одного боку, він може викликати генотоксичні порушення первинних ДНК, мутації генів, а з іншого – проявляє ДНК-захисну активність завдяки антиоксидантним властивостям [23].

1.2.3. Загальна характеристика терпенів. Терпени, основні складові рослинних ефірних олій, є вуглеводнями, які складаються з ланок ізопренів (C 5, тобто одна одиниця ізопрену), що є основою для їхньої класифікації. Дві ізопренових ланки утворюють монотерпени (C 10), три ланки – сесквітерпени (C 15), чотири – дітерпени (C 20), шість одиниць утворюють тритерпени (C 30), а вісім одиниць – каротиноїди (C 40). Найбільш поширеними є моно-, сескві- і дітерпени. Монотерпени і сесквітерпени є летючими сполуками, а дітерпени і тритерпени завдяки вищій молекулярній масі – нелеткими. Дітерпени синтезуються в пластидах, тритерпени – у цитоплазмі рослини [24–27].

Торментова кислота є сполукою, яка наявна у рослин роду *Rumex* (рис.1.9). За хімічною структурою ця сполука є тритерпеноїдом. Торментова кислота проявляє гіпоглікемічний ефект, має протизапальні і антиатерогенні властивості і може знижувати проліферацію клітин гладких м'язів судин [28].

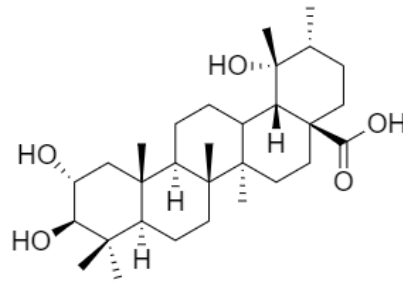


Рис. 1.9. Структурна формула торментової кислоти. Адаптовано за [28].

Терпеноїди беруть участь у регуляції екологічних взаємодій між рослинами і тваринами: з одного боку, завдяки їм рослина здатна залучати запилювачів, з іншого – відштовхувати травоядних тварин [24–26].

1.3. Основні типи рослинних культур *in vitro*

1.3.1. Характеристика рослинних культур *in vitro*. Наука про культуру рослинних тканин бере свій початок із відкриття клітин, за яким була оприлюднена теорія клітин. У 1838 році Шлейден і Шванн зробили припущення, що клітина є основною структурною одиницею всіх живих організмів. Вони довели, що клітина здатна до автономії, тобто клітина має можливість стати цілою рослиною, що нормально функціонує. Спираючись на це припущення, в 1902 році німецький фізіолог Готліб Хаберландт, якого вважають батьком культури рослинних тканин, уперше спробував культивувати виділені поодинокі палисадні клітини з листя в сольовому розчині Кнопа, збагаченому сахарозою. У результаті клітини залишалися

живими до одного місяця, збільшувалися в розмірах і накопичували крохмаль [29].

Найбільший прогрес у розвитку методів культивування рослинних тканин спостерігався в період 1940–1960 років. У цей період покращувалися вже наявні методи, для культивування почали застосовувати фітогормони, були розроблені середовища для культивування, створені калусні культури [30].

Культура рослинних тканин (рослинна культура *in vitro*) – асептична культура *in vitro* клітин, тканин, органів або цілої рослини, яка перебуває у певних умовах, створюваних і контрольованих людиною. Під умовами розуміють постачання культур середовищем із поживними речовинами і оптимальним рівнем рН, сприятливою температурою, світловим режимом тощо. Важливе значення для культур *in vitro* має тотипотентність рослинних клітин, тобто вроджена здатність рослинної клітини або тканини розвиватися в цілу рослину [31, 32].

Середовище для вирощування тканин рослин містить усі поживні речовини, необхідні для нормального росту і розвитку рослин, а саме макроелементи, мікроелементи, вітаміни, інші органічні компоненти, регулятори росту рослин, джерела вуглецю і агар у випадку твердого середовища. Середовище Мурасіге – Скуга (середовище МС) найбільш широко використовують для вегетативного розмноження багатьох видів рослин *in vitro*. Значення рН середовища впливає на ріст рослин і на активність регуляторів росту рослин, тому його значення повинно бути в межах 5,4–5,8. Регулятори росту рослин відіграють істотну роль у визначенні шляху розвитку клітин і тканин рослин у культуральному середовищі. Ауксини, цитокініни і гібереліни є найбільш часто використовуваними регуляторами росту рослин. Тип і концентрація використовуваних гормонів залежать насамперед від виду рослини, типу тканини або органу, що культивуються, і від мети експерименту [33].

Культуру рослинних тканин широко застосовують у різних галузях, таких як сільське господарство, садівництво, лісове господарство та селекція рослин, біотехнологія, яка використовується для виробництва вторинних метаболітів і клонування рослин *in vitro*. Культуру рослинних тканин використовують для збереження видів рослин, що зникають, шляхом довготривалих збережень завдяки забезпеченню повільного зростання (додавання інгібіторів росту в середовище) і кріоконсервації (зберігання культур при -196°C). Відзначається, що рослинні культури тканин мають генетичну нестабільність, що характеризується як соматональна мінливість. У результаті тривалого культивування геном культивованого рослинного об'єкта може зазнавати змін, внаслідок чого утворюються більш стресостійкі зразки [33].

Залежно від частини рослини, яка застосовується для культивування, культури *in vitro* можна класифікувати на категорії: культура клітин (культура клітинної суспензії і культура протопластів), культура тканин (калусна культура) і культура органів (будь-який орган рослини) [31].

1.3.2. Культура клітинної суспензії. Культуру клітинної суспензії отримують шляхом перенесення частини калусу в рідке поживне середовище і підтримується у відповідних умовах аерації, перемішування, світла, температури та інших фізичних параметрів (рис. 1.10).

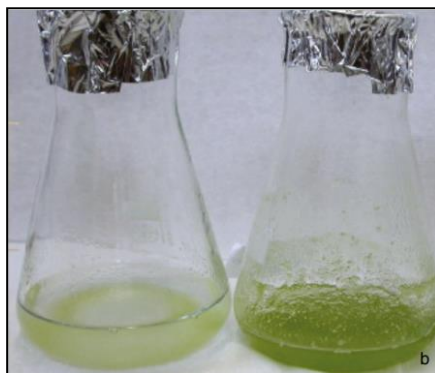


Рис. 1.10. Суспензійні культури [34].

Системи культивування клітинної суспензії використовують сьогодні для широкомасштабного культивування рослинних клітин, з яких можуть бути отримані вторинні метаболіти. Суспензійні культури повинні постійно перемішуватися при 100–250 обертах за хвилину. Культури суспензії ростуть набагато швидше, ніж культури калусу. Клітинні культури можуть не тільки давати певні фітохімічні речовини у великих обсягах, а й усувати присутність токсичних сполук, які трапляються в рослинах, вирощених плантаційним способом. Основною перевагою клітинних культур є синтез біологічно активних вторинних метаболітів, незалежно від клімату і ґрунтових умов [29,30].

1.3.3. Культура протопластів. Протопласт – жива цитоплазма рослинної клітини, яка обмежена клітинною мембраною. З огляду на це, стає очевидним, що культура протопластів – це культура рослинних клітин, клітинна стінка яких відсутня [35,36].

Для виділення протопластів існує кілька методів. Механічний метод використовується вкрай рідко, в тих випадках, коли потрібно отримати обмежену кількість протопластів або коли використовуються великі за розміром клітини. Ферментативна дія заснована на застосуванні ферментів целюлази, геміцеллюлази і пектинази і використовується при створенні великої кількості протопластів. Протопласти є досить крихкими і чутливими структурами стосовно умов, тому часто перед ферментацією клітинних стінок тканини плазмолізують для уникнення цитоплазматичних ушкоджень [35,36].

Суть культури протопластів полягає в тому, що отримані протопласти рослинних тканин об'єднуються під дією хімічних речовин або електричного струму. Злиття протопластів передбачає не тільки злиття їхньої цитоплазми, а й також їхніх ядер. Злиті протопласти здатні рости на культуральному середовищі і утворювати власні клітинні стінки, внаслідок чого вони будуть називатися соматичними гібридними клітинами. Після цього відбувається

утворення калусу, а з нього утворюється нова рослина, яка є соматичним гібридом двох рослин [32,36].

1.3.4. Калусна культура. Калус складається з аморфної маси вільно розташованих тонкостінних паренхіматозних клітин, що виникають із проліферуючих клітин батьківської тканини. Калус можна отримати практично з будь-якої частини рослини. Залежно від їхнього потенціалу в регенерації органів існують різні типи калусу. Середовище для калусу зазвичай містить ауксин, 2,4-D, (2,4-діхлорфеноксицтова кислота) і цитокінін, такий як ВАР (бензиламінопурин). Калус утворюється протягом 2–3 тижнів (рис. 1.11) [37,38].

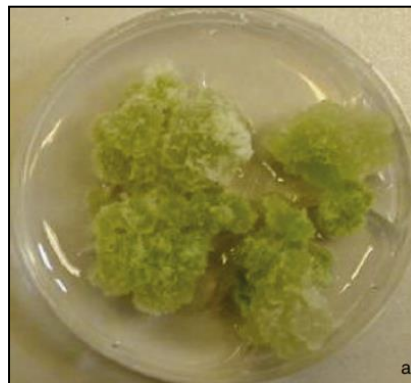


Рис. 1.11. Калусна культура [34].

Калус істотно відрізняється за формою і текстурою – від твердих вузлових клітинних мас до пухких м'яких. Він може бути білим або кремовим, зеленим (хлоропласти) або пурпуровим (антоціаніни). Форма окремих клітин у масі калусу варіюється від майже сферичної до помітно витягнутої. Калусні культури застосовують для отримання біологічно активних речовин і в інших промислових виробництвах. Із клітин калусу також утворюється самостійний рослинний організм [37,38].

1.3.5. Культури ізольованих органів рослин. Культури ізольованих органів рослин – це культури, які можуть бути отримані з вегетативних і генеративних органів рослини: коренів, пагонів, зачатків листя або незрілих частин квітів і плодів. Органні культури діляться на ті, які мають обмежений і необмежений ріст. Рослина з певним типом росту перестає рости щойно досягає зрілої фази. Отже, ті органи рослин, які припиняють рости в зрілому віці і характеризуються детермінованим ростом, називаються детермінованими культурами органів [33,37].

1.4. Застосування культур *in vitro* для отримання біологічно активних речовин

Дослідження, проведене Всесвітньою організацією охорони здоров'я, показало, що близько 70-80% населення світу покладається на нетрадиційні ліки, в основному з рослинних джерел. З огляду на досить високий попит на лікарські продукти, одержувані з рослинної сировини, виникають такі екологічні проблеми: втрата популяцій рослин, їхньої генетичної різноманітності, деградація місць існування і навіть зникнення видів [39].

Вторинні метаболіти досить рідкісні, їхня структура дуже складна, а синтез вимагає багатоетапних ферментативних реакцій. Рівень їхнього вмісту в рослинах низький, зазвичай становить менше 0,1–5% від біомаси і варіює залежно від численних факторів, таких як тип тканини, стадія розвитку рослини, умови навколишнього середовища тощо [40].

Разом із тим високий попит на натуральні і відновлювальні продукти переорієнтував увагу на культивування рослин *in vitro* як на потенційні фабрики вторинних рослинних метаболітів і заклав фундамент для нових досліджень, які вивчають синтез вторинних продуктів *in vitro*. Здатність культур клітин, тканин і органів рослин *in vitro* виробляти і накопичувати

багато цінних хімічних сполук, як і рослина в природі, була визнана практично з моменту появи *in vitro* технології [41].

Існує низка переваг виробництва вторинних метаболітів з культурами рослинних клітин у порівнянні зі звичайним сільськогосподарським виробництвом рослин. По-перше, не існує сезонної залежності від виробництва вторинних метаболітів *in vitro*, виробництво і виділення вторинних метаболітів простіше, доступніше, надійніше. По-друге, в клітинних культурах можна уникнути зайвих сполук, які трапляються в рослині, що росте плантаційним способом. Є можливість отримувати більшу кількість метаболітів. Низький вплив на екосистему. Культивовані клітини не містять мікроорганізмів і комах. Клітини рідкісних і недоступних на цій території рослин можна легко розмножити, щоб отримати їхні специфічні метаболіти [41,42,43].

Останні досягнення в дослідженнях рослинних клітин, тканин і органних культур здебільшого зосереджені на поліпшенні виробництва біологічно активних речовин шляхом оптимізації умов культивування, використання елісаторів, трансгенних технологій. Елісаторами називають речовини, які здатні ініціювати стрес у рослин і тим самим підвищувати в них вміст вторинних метаболітів (оскільки таким чином рослина намагається адаптуватися до стресорів). Елісаторами можуть бути хімічні сполуки (жасмонова кислота, саліцилова кислота), фізичні фактори (ультрафіолетове випромінювання), мікроорганізми [2,44].

Основною проблемою, яка виникає при культивуванні рослинних клітин і тканин, залишається соматональна мінливість, саме тому сьогодні цей процес активно вивчається і розробляються способи його ліквідації [44]. Крім того, культивування рослин *in vitro* вважається дорогим методом вирощування рослин в порівнянні з традиційним способом [2].

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2. 1. Характеристика об'єкта дослідження

Об'єктом дослідження були такі представники роду *Rumex*: *R. japonicus* (щавель японський), *R. alpestris* (щавель приальпійський), *R. palustris* (щавель болотяний), *R. hydrolapathum* (щавель прибережний), *R. acetosa* (щавель кислий), *R. euxinus* (щавель бульбовий) (рис. 2.1).

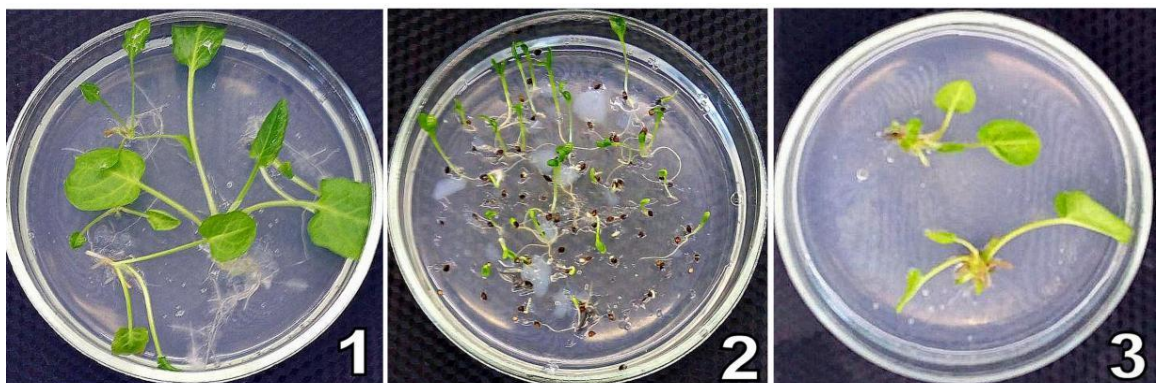


Рис. 2.1. Види *Rumex in vitro*: 1 - *Rumex japonicus* (щавель японський); 2 - *Rumex acetosa* (щавель кислий), 3 - *Rumex alpestris* (щавель приальпійський).

Види *R. japonicus*, *R. alpestris*, *R. palustris*, *R. hydrolapathum*, *R. Euxinus* було взято з колекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Вид *R. acetosa* (щавель кислий) був отриманий із насіння шляхом його подальшого культивування *in vitro* на поживному середовищі Мурасіге – Скуга (МС) за кімнатної температури (20°C) та за умов світлового режиму рослин.

2.2. Характеристика матеріалів та реактивів дослідження

Культивування *in vitro* для отримання калусних культур представників роду *Rumex* проводилося на середовищі Мурасіге – Скуга з додаванням певних співвідношень штучних фітогормонів 2,4-D (2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота) та ВАР (бензиламінопурин), що представлені в таблиці 2.1.

Склад середовища Мурасіге – Скуга (1000 мл):

- 10х стоковий розчин макросолей (NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 100 мл, х.ч.
- 100х стоковий розчин мікросолей (H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) – 1мл, х.ч.
- 25х стоковий розчин вітамінів (тіамін НСІ, піридоксин НСІ, нікотинова кислота, гліцин) – 2 мл, х.ч.
- 20х стоковий розчин Fe хелат ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2EDTA) – 5 мл, х.ч.
- Інозитол – 100 мг, х.ч.
- Сахароза – 30 г, х.ч.
- Агар – 8 г, х.ч.

Таблиця 2.1

Середовища МС із різним вмістом фітогормонів 2,4-D та ВАР

		ВАР 10 мг/мл*			
		0**	0,5	1	2
2,4-D 10 мг/мл	0	№1***	№2 0,5 мг ВАР	№3 1 мг ВАР	№4 2 мг ВАР
	0,5	№5 0,5 мг 2,4-D	№6 0,5 мг ВАР 0,5 мг 2,4-D	№7 1 мг ВАР 0,5 мг 2,4-D	№8 2 мг ВАР 0,5 мг 2,4-D

Продовження табл. 2.1

2,4-D 10 мг/мл	1	№9 1 мг 2,4-D	№10 0,5 мг ВАР 1 мг 2,4-D	№11 1 мг ВАР 1 мг 2,4-D	№12 2 мг ВАР 1 мг 2,4-D
	2	№13 2 мг 2,4-D	№14 0,5 мг ВАР 2 мг 2,4-D	№15 1 мг ВАР 2 мг 2,4-D	№16 2 мг ВАР 2 мг 2,4-D

Примітки:

- * – фітогормон, концентрація;
- ** – концентрація фітогормона, яку використовували (мг/л);
- *** – порядковий номер середовища.

Для екстракції зразків використовували 96% етиловий спирт. Реактиви, що використовували під час визначення фенольних сполук:

- 10% водний розчин реактиву Фоліна – Чокальтеу, х.ч.
- 7,5% водний розчин Na_2CO_3 , х.ч.
- Стандартні розчини ферулової кислоти, х.ч.

Реактиви, що використовували під час визначення флавоноїдів:

- 5% NaNO_2 , х.ч.
- 2% розчину AlCl_3 , х.ч.
- 1 М розчин NaOH , х.ч.
- Стандартні розчини рутину, х.ч.

Прилади, які використовували під час дослідження:

- Лабораторні ваги;
- Магнітна мішалка;
- Ліофільна сушарка;
- Кульковий млин Retsch MM400;

- Центрифуга Eppendorf 5415c;
- Ультразвукова баня;
- Спектрофлуориметр Флюорат-Панорама.

2.3. Методи дослідження

2.3.1. Метод культивування *in vitro* представників роду *Rumex*.

Проводилося культивування *in vitro* для отримання калусних культур представників роду *Rumex* на середовищі Мурасіге – Скуга з додаванням певних співвідношень штучних фітогормонів. Як експланти використовували листові пластинки і черешки рослини (рис. 2.2).

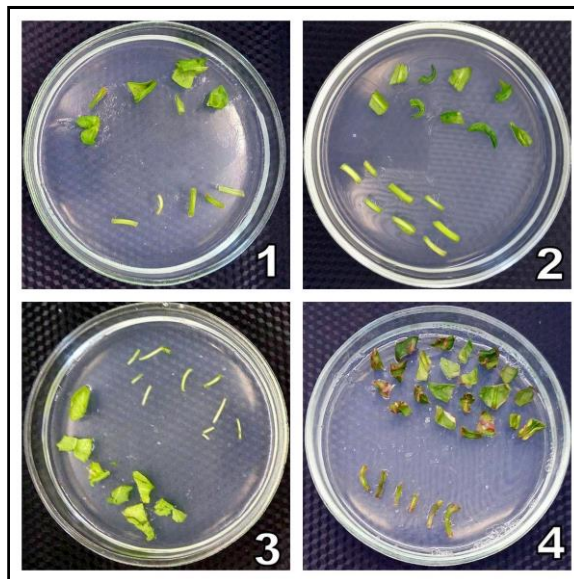


Рис. 2.2. Листкові пластинки і черешки як експланти для культивування *in vitro*: 1 - *Rumex alpestris* (щавель приальпійський), 2 - *Rumex palustris* (щавель болотяний), 3 - *Rumex japonicus* (щавель японський), 4 - *Rumex hydrolapathum* (щавель прибережний).

Після кожних двох тижнів культивування проводили опис, в якому зазначали стан калусоутворення у рослинних експлантів, характеристику калусу (колір, щільність) за його наявності, пігментація. Після кожних трьох

тижнів проводився пасаж експлантів, які культивували на середовищі МС. У середньому проводилося три-чотири пасажі залежно від стану культури, тобто культивування калусних культур проводилося протягом двох-трьох місяців.

Культивування *in vitro Rumex* для отримання цілісних рослин проводилося на середовищі Мурасіге – Скуга без додавання фітогормонів протягом тижня. Культивування як калусних культур, так і окремих рослин відбувалося за кімнатної температури (20⁰С) та за умов світлового режиму рослин.

2.3.2. Метод визначення загальної кількості фенольних сполук. Для визначення вмісту фенольних сполук у надземній частині представників роду *Rumex* була зроблена підготовка зразків (рис. 2.3).



Рис. 2.3. Підготовка зразків надземних частин представників *Rumex* для подальшого висушування.

Проводилося висушування зразків. Було зроблено 8 наважок сухого рослинного матеріалу по 20 мг для кожного з таких видів: *R. japonicus*, *R. alpestris*, *R. palustris*, *R. hydrolapathum*, *R. acetosa*, *R. euxinus*. Здійснювалася

гомогенізація зразків у кульковому млину (25 струшувань/сек. протягом 5 хвилин) за допомогою додавання в еппендорфи 10 залізних кульок діаметром до 1 мм. Зразки екстрагували 96% етиловим спиртом (10 мг сухої наважки на 1 мл спирту) із застосуванням ультразвукової бані, після чого вони були відцентрифуговані за допомогою центрифуги erpendorf 5415c. 50 мкл екстрактів кожного виду змішували з 50 мкл 96% етилового спирту в епендорфах. В отримані розчини додавали 200 мкл 10% водного розчину реактиву Фоліна – Чокальтеу, перемішували. Після цього до розчинів додавали 800 мкл 7,5% водного розчину Na_2CO_3 . Отримані розчини залишали на 2 години за кімнатної температури.

Для побудови калібрувального графіка залежності показників поглинання від концентрацій було взято стандартні розчини ферулової кислоти різних концентрацій (0,01 мг/мл; 0,025 мг/мл; 0,05 мг/мл; 0,1 мг/мл; 0,25 мг/мл). Вимірювання проводили при 765 нм на спектрофлуориметрі Флюорат-Панорама, який використовували у спектрофотометричному режимі.

2.3.3. Метод визначення сумарного вмісту флавоноїдів. Сумарний вміст флавоноїдів було визначено за допомогою спектрофотометра за реакцією комплексоутворення флавоноїдів із хлоридом алюмінію. У пробірках 600 мкл екстракту розбавляли 600 мкл 96% етилового спирту. До отриманих розчинів додавали 360 мкл 5% NaNO_2 з подальшим інкубуванням протягом 5 хвилин. Для утворення забарвлених комплексів до пробірок додавали 600 мкл 2% розчину AlCl_3 , після чого їх ретельно перемішували та залишали на 6 хвилин. Для нейтралізації додавали 600 мкл 1 М розчину NaOH . Інкубували вміст пробірок протягом 10 хвилин, після чого суміш змінювала колір на рожевий. Відразу вимірювали оптичну щільність сумішей.

Для побудови калібрувального графіка залежності показників поглинання від концентрацій були взяті стандартні розчини рутину різних

концентрацій (0,01 мг/мл; 0,05 мг/мл; 0,1 мг/мл; 0,5 мг/мл). Вимірювання проводили при 510 нм на спектрофлуориметрі Флюорат-Панорама, який використовували у спектрофотометричному режимі.

2.3.4. Статистична обробка даних. Усі отримані під час дослідження дані, а саме результати визначення загального вмісту фенольних сполук та флавоноїдів у надземних частинах видів роду *Rumex*, були перевірені на нормальність розподілу критерієм Колмогорова-Смірнова. Порівняння результатів було здійснено з використанням однофакторного дисперсійного аналізу з подальшим використанням критерію Тьюкі для попарного порівняння результатів кожного з видів між собою.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Культивування *in vitro* видів роду *Rumex* з використанням фітогормональних середовищ

Відомо, що для калусогенезу і синтезу вторинних метаболітів необхідно підібрати певний склад фітогормонального середовища, тобто поєднувати складові, які сприяють здійсненню зазначених завдань [45]. Зазвичай для калусогенезу використовують два фітогормони: ауксин і цитокінін [46]. Протягом культивування *in vitro* 4 видів щавлів, а саме *Rumex japonicus*, *Rumex alpestris*, *Rumex palustris*, *Rumex hydrolapathum*, на 16 різних за складом середовищах отримано результати, які характеризуються внутрішньовидовою та міжвидовою відмінністю та подібністю калусу як листових пластин, так і черешків.

Калус листових експлантів виду *Rumex japonicus* на контрольному МС утворюється повільно і в незначних кількостях. Збільшення в середовищі вмісту ВАР (середовища №2, №3, №4) призводить до зменшення калусоутворення на листових пластинках. На середовищі №3 калусоутворення середнє, на середовищі № 2 калусоутворення сильне, відбувається після першого пасажу і характеризується щільною культурою клітин із зеленим забарвленням. На відміну від середовищ №2 і №3, у середовищі №4 з максимальним вмістом ВАР калусоутворення не спостерігається. У середовищах, які містять лише 2,4-D (середовища №5, №9, №13), калусоутворення відбувається після внесення експлантів на середовище протягом двох тижнів, характеризується відсутністю забарвлення та рихлою структурою. Цікавим є те, що на середовищі №9 з середнім вмістом 2,4-D калусоутворення слабке, але на середовищах №5 та

№13 із мінімальною та максимальною кількістю 2,4-D відповідно калус на листкових пластинках є досить рясним. На середовищах №11 та №16, які характеризуються рівним співвідношенням внесених гормонів, спостерігається гарне калусоутворення. Середовище №10 (співвідношення ВАР до 2,4-D - 1:2) дає змогу отримати протягом двох тижнів середню за обсягом калусну культуру, безбарвну та рихлу. На середовищах №7, №8, №12 (вміст ВАР більший за 2,4-D) калус такий самий, як на середовищі №10. На середовищах №14 і №15 (вміст 2,4-D більший за ВАР) зеленого та рихлого калусу утворюється багато після посіву протягом двох тижнів. Найбільш ефективними середовищами для утворення калусу є середовища №2, №3, №5 №8, №11, №12, №13, №14, №15, №16.

Калусоутворення черешків виду *Rumex japonicus* на контрольному МС є слабким та відбувається лише у половини експлантів (черешків). Збільшення в середовищі МС вмісту ВАР призводить до утворення зеленого щільного калусу після початку культивування протягом двох тижнів. Зі збільшенням вмісту 2,4-D в середовищі МС калусоутворення спостерігається протягом перших двох тижнів після початку культивування і, на відміну від калусу в середовищах МС з ВАР, є більш продуктивним, характеризується безбарвним калусом із рихлою структурою. На середовищах із рівним співвідношенням фітогормонів калус утворюється у вигляді безбарвної рихлої маси, максимальне калусоутворення відбувається на середовищі зі середнім вмістом обох гормонів (№11), а середнє калусоутворення навпаки – на середовищі з максимальним вмістом гормонів (№16). Оптимальними для калусоутворення можна вважати середовища №14, №15, №7, №8, №12.

Калус листкових пластинок виду *Rumex alpestris* на безгормональному середовищі МС відсутній, як і на середовищах, які містять лише ВАР. Не відбувається утворення калусу на середовищах №8, №11, №12, №14, №15, №16, що відокремлює цей вид від інших через те, що у інших наявне калусоутворення на цих середовищах. Спостерігається слабке

калусоутворення (безбарвний, рихлий калус) на середовищах, які містять із фітогормонів лише 2,4-D (№5, №9, №13) і на середовищах №7 та №10 (зелений, щільний калус).

Черешкове калусоутворення виду *Rumex alpestris* на безгормональному середовищі МС не відбувається. Слабке калусоутворення на середовищах №2, №3, №4, №10, №14, тобто в середовищах із ВАР та в тих, де вміст 2,4-D більший за ВАР. Стабільне середнє утворення безбарвного щільного калусу відбувається на середовищах №5, №9, №13 з 2,4-D. На середовищах із рівним співвідношенням фітогормонів калус утворюється у вигляді зеленої щільної маси, слабке калусоутворення притаманне середовищу №16, а максимальне калусоутворення відбувається на середовищі №11. Середовища, які містять обидва гормони, підходять для утворення калусу у *Rumex alpestris* у тому випадку, якщо вміст ВАР більше, ніж 0,5 мг/л. Тому з таких середовищ найефективнішими є №7, №8, №12.

Листкові експланти виду *Rumex palustris* на безгормональному середовищі МС калус не утворюють. Слабке калусоутворення на середовищах під номерами 2, 3 та 4, які характеризуються вмістом лише ВАР. Середнє калусоутворення на середовищах №5, №9 (з 2,4-D). Найефективніше калусоутворення спостерігається на середовищах із рівним вмістом обох фітогормонів (№6, №11, №16) та на середовищі з максимальним вмістом фітогормону 2,4-D (№13). На середовищах із різними варіаціями вмісту фітогормонів (№7, №8, №12, №14, №15) утворення калусу трохи менше, ніж на вже зазначених попередньо.

Калусогенез черешкових експлантів виду *Rumex palustris* на безгормональному середовищі МС не відбувається. Середнє калусоутворення відбувається на середовищах із ВАР (№2, №3, №4) та на середовищі з середньою кількістю 2,4-D (№9). На середовищах МС із рівним співвідношенням гормонів калусоутворення ефективно, що можна сказати і про середовища №5 та №13 із мінімальним і максимальним вмістом 2,4-D.

Також непогані результати за калусоутворенням були отримані під час використання середовищ МС зі вмістом обох фітогормонів із різною варіацією (рис. 3.1).

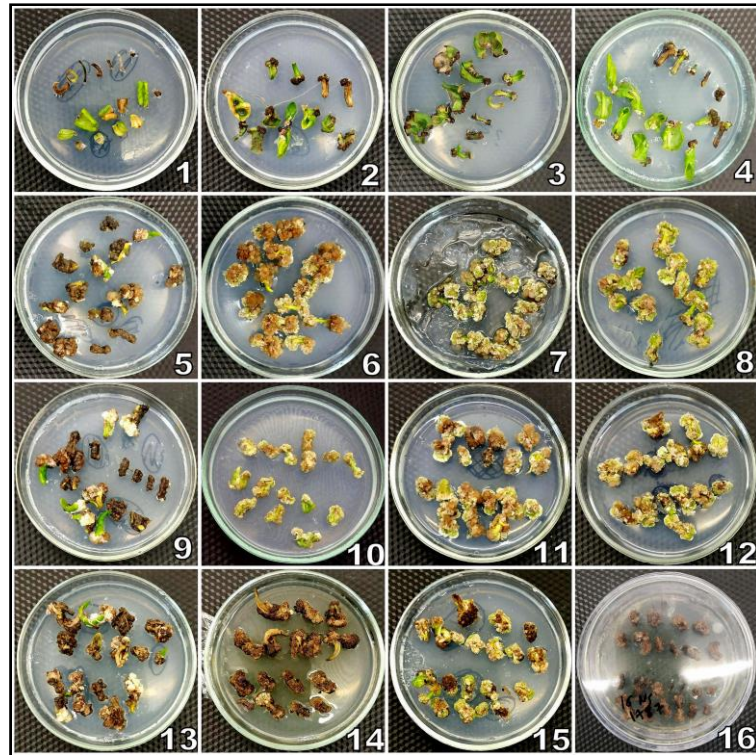


Рис. 3.1. Калусогенез виду *Rumex palustris* на базальному середовищі МС з додаванням фітогормонів.

Калусогенез листкових пластинок виду *Rumex hydrolapathum* не відбувається на безгормональному середовищі МС. На середовищах із ВАР калусоутворення середнє, калус зелений, щільний. Також середнє калусоутворення на середовищах №6, №9, №13, №14. Калусоутворення ефективно на середовищі №5 з мінімальним вмістом 2,4-D, а також на середовищі №7, де вміст 2,4-D менший за вміст ВАР. Калус листкових і черешкових експлантів має вигляд рихлої, безбарвної маси на середовищах лише з 2,4-D. З додаванням у середовище фітогормона ВАР калус має зелене забарвлення з рихлою структурою.

Черешки виду *Rumex hydrolapathum* на безгормональному середовищі МС не утворюють калусні культури. На середовищах МС із ВАР (№2, №3, №4), як і на середовищах із 2,4-D (№9, №13), калус утворюється в середній кількості, але з ВАР калус зелений і щільний, а з 2,4-D безбарвний, щільний та слабкий за життєздатністю (темний через місяць культивування). На середовищі з мінімальною кількістю 2,4-D утворюється велика кількість калусу. На середовищах із рівним співвідношенням гормонів калусоутворення продуктивне лише на середовищах №6, №11. Середовище з максимальною кількістю фітогормонів №16 дає можливість отримати середній за кількістю калус. На середовищах, де вміст 2,4-D більший за ВАР, калусоутворення має слабкий, не яскраво виражений характер на відміну від середовищ, де вміст ВАР менший за 2,4-D (рис. 3.2).

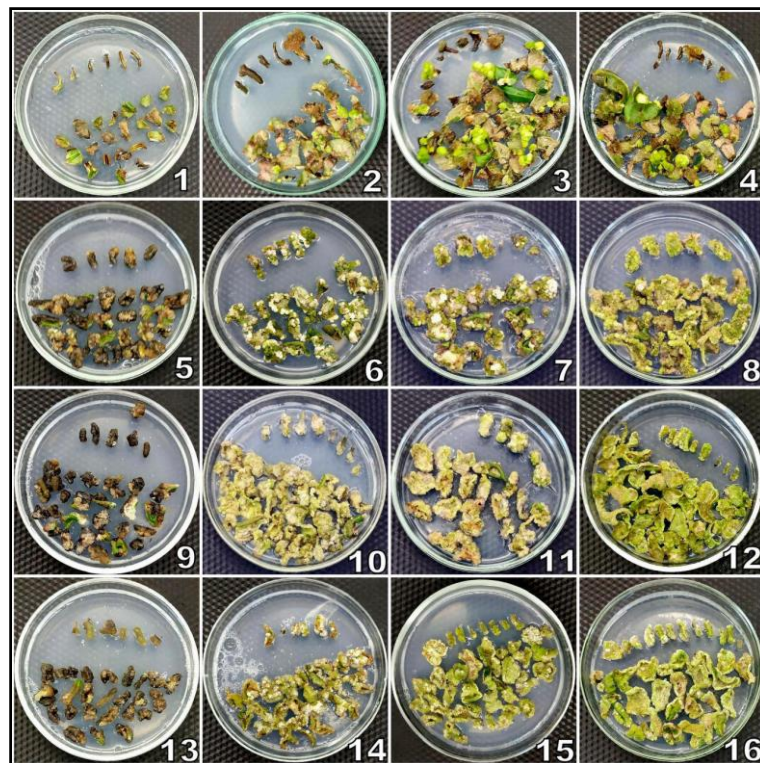


Рис. 3.2. Калусогенез виду *Rumex hydrolapathum* на базальному середовищі МС з додаванням фітогормонів.

Продовження табл. 3.1

Концентрація 2,4-D 10 мг/мл	0,5	№5 (0,5 мг 2,4-D)		№6 (0,5 мг ВАР, 0,5 мг 2,4-D)		№7 (1 мг ВАР, 0,5 мг 2,4-D)		№8 (2 мг ВАР, 0,5 мг 2,4-D)	
		1	+++	1	нд	1	++	1	+++
		2	+	2	нд	2	+	2	-
		3	+++	3	+++++	3	+++++	3	+++++
	4	+++++	4	+++	4	+++++	4	+	
	1	№9 (1 мг 2,4-D)		№10 (0,5 мг ВАР, 1 мг 2,4-D)		№11 (1 мг ВАР, 1 мг 2,4-D)		№12 (2 мг ВАР, 1 мг 2,4-D)	
		1	±	1	++	1	+++	1	+++
		2	++	2	+	2	-	2	-
		3	+++	3	++	3	+++++	3	+++++
	4	+++	4	+++	4	+	4	+	
	2	№13 (2 мг 2,4-D)		№14 (0,5 мг ВАР, 2 мг 2,4-D)		№15 (1 мг ВАР, 2 мг 2,4-D)		№16 (2 мг ВАР, 2 мг 2,4-D)	
		1	+++++	1	+++++	1	+++++	1	+++++
		2	++	2	-	2	-	2	-
		3	+++++	3	+++++	3	+++++	3	+++++
	4	+++	4	+++	4	++	4	+	

Примітки:

- * – концентрація фітогормона, яку використовували (мг/л);
- ** – порядковий номер середовища, концентрація фітогормонів (мг/л);
- *** – 1 – *Rumex japonicus*, 2 – *Rumex alpestris*, 3 – *Rumex palustris*, 4 – *Rumex hydrolapathum*;
- **** – “-” – відсутність калусу, “±” – поодинокі випадки калусоутворення, “+”, “++” – слабе калусоутворення, “+++” – середнє калусоутворення, “++++”, “+++++” – сильне калусоутворення, “нд” – не досліджували.

Середовище, яке було б найефективнішим для калусогенезу обох експлантів щавлів не виявлено, проте є такі середовища, які підходять для утворення калусних культур черешків для всіх досліджених видів. Середовищам для ефективного калусоутворення черешкових експлантів притаманний вміст обох фітогормонів із мінімальною і середньою концентрацією 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти і середньою та максимальною концентрацією бензиламінопурину. Непоганий результат калусогенезу листкових і черешкових експлантів для видів *Rumex japonicus*, *Rumex palustris*, *Rumex hydrolapathum* показують середовища з максимальним вмістом 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти, а для *Rumex japonicus* також середовища лише з бензиламінопурином. Калусоутворення черешків слабке на середовищі з максимальним вмістом обох фітогормонів у виду *Rumex alpestris*. Середнє калусоутворення черешків у видів *Rumex japonicus* і *Rumex hydrolapathum* на середовищі з максимальним вмістом обох фітогормонів (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Калусогенез черешків видів роду *Rumex*

		Концентрація ВАР 10 мг/мл							
		0*		0,5		1		2	
		№1**		№2 (0,5 мг ВАР)		№3 (1 мг ВАР)		№4 (2 мг ВАР)	
Концентрація 2,4-D 10 мг/мл	0	1***	±****	1	++++	1	+++	1	+++++
		2	-	2	±	2	±	2	+
		3	-	3	++	3	++	3	++
		4	-	4	++++	4	+++	4	+++
	0,5	№5 (0,5 мг 2,4-D)		№6 (0,5 мг ВАР, 0,5 мг 2,4-D)		№7 (1 мг ВАР, 0,5 мг 2,4-D)		№8 (2 мг ВАР, 0,5 мг 2,4-D)	
		1	+++	1	нд	1	++++	1	+++++
		2	++	2	нд	2	+++++	2	++++
		3	++++	3	+++++	3	++++	3	++++
		4	+++++	4	++++	4	++++	4	+++++

	Г	№9 (1 мг 2,4-D)		№10 (0,5 мг ВАР, 1 мг 2,4-D)		№11 (1 мг ВАР, 1 мг 2,4-D)		№12 (2 мг ВАР, 1 мг 2,4-D)	
		1	++	1	+++	1	+++++	1	+++++
		2	++	2	+	2	+++++	2	+++++
		3	+++	3	+++++	3	+++++	3	+++++
		4	+++	4	+++	4	+++++	4	+++
	З	№13 (2 мг 2,4-D)		№14 (0,5 мг ВАР, 2 мг 2,4-D)		№15 (1 мг ВАР, 2 мг 2,4-D)		№16 (2 мг ВАР, 2 мг 2,4-D)	
		1	+++++	1	+++	1	+++	1	+++
		2	++	2	±	2	±	2	±
		3	+++++	3	+++++	3	+++++	3	+++++
		4	+++	4	+++	4	+++	4	+++

Примітки:

- * – концентрація фітогормона, яку використовували (мг/л);
- ** – порядковий номер середовища, концентрація фітогормонів (мг/л);
- *** – 1 – *Rumex japonicus*, 2 – *Rumex alpestris*, 3 – *Rumex palustris*, 4 – *Rumex hydrolapathum*;
- **** – “-” – відсутність калусу, “±” – поодинокі випадки калусоутворення, “+”, “++” – слабе калусоутворення, “+++” – середнє калусоутворення, “++++”, “+++++” – сильне калусоутворення, “нд” – не досліджували.

Серед усіх видів можна відзначити тенденцію у кореляції зовнішнього вигляду калусу і складом середовища. Калуси, що утворюються на середовищах із бензиламінопурином, мають яскраве зелене забарвлення і щільну структуру. Калуси, які утворюються на середовищах зі вмістом 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти, поступово втрачають зелене забарвлення,

вони мають або слабе зелене забарвлення, або є безбарвними, а їхня структура рихла та волога. Зазначені закономірності не підходять для виду *Rumex alpestris*: зі збільшенням у середовищі вмісту 2,4-D зовнішній вигляд калусу їхніх експлантів не стає рихлим, а колір залишається зеленим із легким білим нальотом.

На основі отриманих результатів можна сказати, що для успішного калусогенезу видів роду *Rumex* є необхідним поєднання в живильному середовищі для культивування двох фітогормонів: 2,4-D і ВАР. Калуси, які утворюються на середовищі лише з ВАР, відзначаються малою вираженістю маси і низькою життєздатністю. Калуси, які наявні на середовищі лише з 2,4-D, характеризуються високою проліферацією клітин, але також низькою життєздатністю. Для найбільш вдалого культивування *in vitro* видів роду *Rumex* у середовище треба вносити бензиламінопурин і 2,4-дихлорфеноксоцтову кислоту у співвідношеннях 1:1, 2:1 або 4:1 відповідно, тобто щоб вміст бензиламінопурину був набагато більшим за 2,4-дихлорфеноксоцтову кислоту у середовищі.

Фітогормони є регуляторами росту, тому їх активно використовують для культивування *in vitro*. Фундаментальна роль у розвитку рослин відводиться ауксинам і цитокінінам. Крім того, що фітогормони можуть впливати на швидкість розвитку і відсоток індукції культури, вони також мають важливе значення щодо збільшення кількісного виходу певних вторинних метаболітів. Вплив на синтез вторинних метаболітів пояснюється в свою чергу впливом тих чи інших факторів на ферменти, які опосередковують власне синтез метаболітів (наприклад, вуглеводи впливають на фенілаланін-аміак-ліазу, яка каталізує першу стадію основного шляху загального метаболізму фенілпропаноїдів). Однак однією з істотних проблем є потемніння калусу протягом культивування, причиною чого є накопичення фенольних сполук із їхнім подальшим окисненням [47,48].

Відомо, що калусогенез залежить не тільки від складу живильного середовища, умов культивування, а й від того, яка рослинна тканина береться як експлант, оскільки в різних тканинах містяться різні рівні ендогенних гормонів. Важливо відзначити те, що в процесі калусогенезу відбувається реакція тих чи інших видів рослин на певний тип фітогормонів, тобто кожен вид має різний ступінь спорідненості з регуляторами росту. Основоположним фактором для отримання калусу шляхом культивування *in vitro* є не тільки додавання регуляторів росту в живильне середовище, а й правильна їх комбінація, вибір оптимального рівня концентрацій фітогормонів. З усього зазначеного попередньо можна зробити висновок, що культивування *in vitro* є видоспецифічним і залежить від підбору фітогормонального середовища, тому потребує великої кількості експериментальних даних. Щодо видів *Rumex* проведено мало досліджень у галузі культивування, попри те, що існує безліч даних про вплив різних фітогормонів на індукцію і проліферацію калусу *in vitro* [47].

В одному дослідженні, де об'єктом був вид *Rumex vesicarius* (щавель пухирчастий), було з'ясовано, що культивування *in vitro* на живильному середовищі з додаванням фітогормону 2,4-D дало невисокий вихід біомаси калусу і найнижчий відсоток вмісту фенольних речовин [47]. З огляду на результати власного дослідження калусогенезу декількох видів *Rumex*, слід сказати, що 2,4-D позитивно впливає на калусоутворення, однак при цьому ефективність окремого використання цього гормону в живильному середовищі для отримання калусу не відображено. Навпаки, окреме використання іншого гормону, а саме ВАР, дає менш позитивні результати калусогенезу або не дає їх узагалі, але може впливати на ініціацію органогенезу експлантів рослини.

3.2. Визначення фенольних сполук

У результаті спектрофотометричного вимірювання загального вмісту фенольних сполук у спиртових екстрактах надземних частин представників роду *Rumex* отримано значення, представлені в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Загальний вміст фенольних сполук у представників роду *Rumex*

Вид	Вміст фенольних сполук мг/г сухої речовини							
	№ зразка							
	1*	2	3	4	5	6	7	8
<i>R. euxinus</i> **	0,014▪	0,012	0,009	0,016	0,043	0,015	0,015	0,016
<i>R. palustris</i>	0,025	0,029	0,014	0,024	0,021	0,021	0,020	0,019
<i>R. japonicus</i>	0,007	0,004	0,014	0,012	0,006	0,012	0,008	0,011
<i>R. acetosa</i>	0,002	0,007	0,006	0,004	0,007	0,008	0,004	0,006
<i>R. hydrolapathum</i>	0,013	0,014	0,029	0,022	0,016	0,021	0,016	0,012
<i>R. alpestris</i>	0,012	0,012	0,007	0,010	0,008	0,008	0,007	0,003

Примітки:

1. * – номер зразка;
2. ** – назва виду;
3. ▪ – вміст фенольних сполук у мг/г сухої речовини.

Розподіл дослідженої ознаки в кожній вибірці виявився нормальним. У результаті використання однофакторного дисперсійного аналізу різниця між

середніми значеннями статистично значуща ($F = 10,59 > F_{\text{табл}} = 2,44$ (рівень значущості 0,05); 3,49 (рівень значущості 0,01), $v_{\text{вн.}} = 42, v_{\text{між}} = 5$). Порівняння середніх значень між собою за критерієм Тьюкі підтвердило статистичну різницю середніх значень видів *R. euxinus* і *R. acetosa*, *R. palustris* і *R. japonicus*, *R. palustris* і *R. acetosa*, *R. palustris* і *R. alpestris*, *R. acetosa* і *R. hydrolapathum* (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Результати порівняння фенольних сполук у досліджених групах за критерієм Тьюкі

Вид	<i>R. euxinus</i>	<i>R. palustris</i>	<i>R. japonicus</i>	<i>R. acetosa</i>	<i>R. hydrolapathum</i>	<i>R. alpestris</i>
Середнє значення	0,018*	0,022	0,009	0,006	0,018	0,008
<i>R. euxinus</i>		1,764**	3,635	5,262▪	0,158	4,009
<i>R. palustris</i>			5,399▪	7,026▪	1,606	5,773▪
<i>R. japonicus</i>				1,627	3,794	0,374
<i>R. acetosa</i>					5,421▪	1,253
<i>R. hydrolapathum</i>						4,168

Примітки:

1. * – середнє значення вмісту фенольних сполук;
2. ** – фактичні значення критерію Тьюкі;
3. ▪ – статистично значущі результати (рівень значущості 0,05 = 4,232; рівень значущості 0,01 = 5,114).

Отримані статистичні дані порівняння за середнім значенням вмісту фенольних сполук показують, що вид *R. euxinus* має більш вищий вміст досліджених сполук, ніж вид *R. acetosa*. Вид *R. palustris* за збільшеним вмістом фенольних сполук відрізняється від видів *R. japonicus*, *R. acetosa* і *R. alpestris*. Вид *R. acetosa* характеризується низьким вмістом фенольних сполук порівняно з видом *R. hydrolapathum*.

Дані щодо загального вмісту фенольних сполук і флавоноїдів серед представників *Rumex* активно досліджували серед таких представників, як *Rumex japonicus*, *Rumex dentatus* (щавель зубчастий), *Rumex crispus* (щавель кучерявий), *Rumex obtusifolius* (щавель туполистий). Необхідно вказати, що досліджені рослини для аналізу складових є не культивованими *in vitro*, а були отримані в природних умовах. Крім цього, найчастіше у щавлі для кількісного аналізу фенолів і флавоноїдів використовуються коріння, оскільки в них міститься найбільша кількість досліджених складових. Було доведено, що для ефективної екстракції поліфенолів використовують як екстрагент етиловий або метиловий спирти [49–51].

Загальний вміст фенольних сполук у надземній частині щавлю японського в дослідженні Elzaawely, A.A., Xuan, T.D., Tawata, S. (2005) варіювався від 5,04 мг / г сухої речовини до 200,4 мг / г сухої речовини залежно від використовованого екстрагента. При використанні етилового спирту як екстрагента загальний вміст фенольних сполук склав 112,8 мг / г сухої речовини [49]. У виду *Rumex dentatus* в одному з досліджень загальний вміст фенольних сполук склав 38,9 мкг / мг сухої речовини [50].

Вміст фенольних сполук у видів *Rumex crispus* та *Rumex obtusifolius* у дослідженні склав до 120,6 мг / г сухої речовини в листі. Показово, що в обох видах найбільш низький вміст фенолів виявився в коренях, але у *R. crispus* вміст фенолів у листі мав тенденцію до зниження від старого листа до більш молодого, натомість у *R. obtusifolius* максимальний рівень фенольних сполук спостерігався в листі першого вузла. Функція поліфенольних сполук у

життєвому циклі рослин і фаза зростання впливають на накопичення і концентрацію поліфенольних сполук у різних частинах рослин [51].

3.3. Визначення флавоноїдів

У результаті спектрофотометричного вимірювання флавоноїдів у спиртових екстрактах надземних частин представників роду *Rumex* отримано значення, представлені в таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

Загальний вміст флавоноїдів у представників роду *Rumex*

Вид	Вміст флавоноїдів мг/г сухої речовини							
	№ зразка							
	1*	2	3	4	5	6	7	8
<i>R. euxinus</i> **	0,035 [■]	0,037	0,029	0,066	0,115	0,040	0,076	0,040
<i>R. palustris</i>	0,062	0,095	0,050	0,065	0,037	0,074	0,050	0,056
<i>R. japonicus</i>	0,037	0,025	0,044	0,022	0,022	0,045	0,028	0,048
<i>R. acetosa</i>	0,012	0,015	0,012	0,027	0,029	0,020	0,018	0,012
<i>R. hydrolapathum</i>	0,037	0,034	0,049	0,039	0,033	0,033	0,043	0,041
<i>R. alpestris</i>	0,034	0,032	0,023	0,022	0,022	0,019	0,023	0,013

Примітки:

- * – номер зразка;
- ** – назва виду;
- – вміст флавоноїдів у мг/г сухої речовини.

Розподіл дослідженої ознаки в кожній вибірці виявився нормальним. У результаті використання однофакторного дисперсійного аналізу різниця між середніми значеннями статистично значуща ($F = 9,77 > F_{\text{табл.}} = 2,44$ (рівень значущості 0,05); 3,49 (рівень значущості 0,01), $v_{\text{вн.}} = 42, v_{\text{між}} = 5$). Порівняння середніх значень між собою за критерієм Тьюкі підтвердило статистичну різницю ознаки видів *R. euxinus* і *R. acetosa*, *R. palustris* і *R. japonicus*, *R. palustris* і *R. acetosa*, *R. palustris* і *R. alpestris*, *R. euxinus* і *R. alpestris* (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Результати порівняння флавоноїдів у досліджених групах за критерієм Тьюкі

Вид	<i>R. euxinus</i>	<i>R. palustris</i>	<i>R. japonicus</i>	<i>R. acetosa</i>	<i>R. hydrolapathum</i>	<i>R. alpestris</i>
Середнє значення	0,055*	0,061	0,034	0,018	0,039	0,024
<i>R. euxinus</i>		1,057**	3,341	5,871▪	2,544	4,960▪
<i>R. palustris</i>			4,398▪	6,928▪	3,601	6,017▪
<i>R. japonicus</i>				2,531	0,797	1,619
<i>R. acetosa</i>					3,327	0,911
<i>R. hydrolapathum</i>						2,416

Примітки:

- * – середнє значення вмісту флавоноїдів;
- ** – фактичні значення критерію Тьюкі;
- – статистично значущі результати (рівень значущості 0,05 = 4,232; рівень значущості 0,01 = 5,114).

Отримані статистичні дані порівняння за середнім значенням вмісту флавоноїдів показують, що вид *R. euxinus* має вищий вміст флавоноїдів, ніж *R. acetosa*. Вид *R. palustris* має збільшений вміст флавоноїдів ніж види *R. japonicus*, *R. acetosa* і *R. alpestris*. Вид *R. euxinus* має високий вміст флавоноїдів порівняно з видом *R. alpestris*.

Одне з попередніх досліджень показало, що вміст флавоноїдів у виду *Rumex dentatus* склав 17,2 мкг/мг [46]. Порівняно з отриманими результатами, вміст флавоноїдів у *Rumex dentatus* є більшим.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У результаті проведених досліджень були підібрані фітогормональні середовища для калусоутворення видів *Rumex japonicus*, *Rumex alpestris*, *Rumex palustris*, *Rumex hydrolapathum*. Визначено, що для отримання великої кількості найбільш життєздатного калусу з експлантів досліджених представників роду *Rumex* необхідно вносити в середовище фітогормони бензиламінопурин і 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту у співвідношеннях 1:1, 2:1 або 4:1 відповідно, щоб вміст бензиламінопурину був набагато більшим за 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту у середовищі. Без фітогормонів живильне середовище не підходить для калусогенезу, а використання окремо одного фітогормону від іншого не дає такої результативності, як при їхньому спільному використанні [47]. Окрім цього, отримані дані показують, що три з чотирьох видів щавлів, а саме *Rumex japonicus*, *Rumex palustris* і *Rumex hydrolapathum*, можна об'єднати на основі підбору фітогормонального складу живильного середовища цими видами для утворення калусу. Вид *Rumex alpestris* відрізняється від інших видів, які були досліджені в цій роботі, тим, що не утворює калус на тих середовищах, на яких його утворюють вже згадані види щавлів. Дослідження необхідно продовжувати, оскільки додавання інших фітогормонів у поживне середовище може сприяти збільшенню калусу та його життєздатності.

Визначення біологічно активних речовин із спиртових екстрактів надземної частини щавлів показало, що загальний вміст як фенольних сполук, так і флавоноїдів є досить невеликим порівняно з даними попередніх досліджень. Однак треба зазначити, що кількість наукових робіт, присвячених дослідженню загального вмісту фенольних сполук та флавоноїдів саме у щавлів, є незначною, а для деяких видів ця проблема є зовсім не вивченою. Окрім цього, у використаних для порівняння джерелах об'єктом дослідження були щавлі, отримані плантаційним способом

вирощування, на відміну від досліджених у цій роботі щавлів, вирощених шляхом культивування *in vitro*. На мою думку, таке значне розходження під час порівняння отриманих результатів із науковими літературними даними свідчить про те, що синтез вторинних метаболітів у рослині ініціюється біотичними та абіотичними стресорами, які в свою чергу впливають на експресію генів, відповідальних саме за синтез речовин [46,49–51].

Статистична обробка даних показала, що існує статистично значуща різниця між результатами загалом, а також між певними видами. Різниця загального вмісту як фенольних, так і флавоноїдних сполук між представниками роду *Rumex* була наявна у видів *R. euxinus* і *R. acetosa*, *R. palustris* і *R. japonicus*, *R. palustris* і *R. acetosa*, *R. palustris* і *R. alpestris*. Різниця за вмістом фенольних сполук була наявна між видами *R. acetosa* і *R. hydrolapathum*, а за вмістом флавоноїдів – між видами *R. euxinus* і *R. alpestris*. Аналіз значень вмісту фенольних сполук та флавоноїдів між видами, які статистично відрізняються за їхнім вмістом, виявив, що вид *R. euxinus* має вищий вміст фенольних та флавоноїдних сполук, ніж вид *R. acetosa*; вид *R. palustris* відрізняється за збільшеним вмістом фенольних сполук і флавоноїдів від видів *R. japonicus*, *R. acetosa* і *R. alpestris*. Вид *R. hydrolapathum* характеризується високим вмістом фенольних сполук порівняно з видом *R. acetosa*. Вид *R. euxinus* має високий вміст флавоноїдів порівняно з видом *R. alpestris*.

ВИСНОВКИ

1. За результатами культивування видів *Rumex japonicus*, *Rumex alpestris*, *Rumex palustris*, *Rumex hydrolapathum* визначено, що калусогенез листкових і черешкових експлантів відбувається на середовищах Мурасіге – Скуга з додаванням бензиламінопурину і 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти у співвідношеннях 1:1, 2:1 або 4:1 відповідно, так, щоб вміст бензиламінопурину був значно більшим за 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту у середовищі.
2. Калусогенез на середовищі Мурасіге – Скуга без додавання фітогормонів не відбувається, а на середовищах лише з 2,4-дихлорфеноксиоцтовою кислотою або бензиламінопурином є неефективним.
3. Серед досліджених представників роду *Rumex* у видів *R. euxinus* і *R. alpestris* вміст фенольних сполук і флавоноїдів є найвищим, а у *R. acetosa* – найнижчим.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Chandran, H., Meena, M., Barupal, T. and Sharma, K., 2020. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports*, 26, p.e00450.
2. Cardoso, J., Oliveira, M. and Cardoso, F., 2019. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. *Horticultura Brasileira*, 37(2), pp.124-132.
3. Bello, O., Fasinu, P., Bello, O., Ogbesejana, A., Adetunji, C., Dada, A., Ibitoye, O., Aloko, S. and Oguntoye, O. (2019). Wild vegetable *Rumex acetosa* Linn.: Its ethnobotany, pharmacology and phytochemistry – A review. *South African Journal of Botany*, 125, pp.149-160.
4. Maksimović, Z., Kovačević, N., Lakušić, B. and Čebović, T. (2010). Antioxidant activity of yellow dock (*Rumex crispus* L., Polygonaceae) fruit extract. *Phytotherapy Research*, 25(1), pp.101-105.
5. Vasas, A., Orbán-Gyapai, O. and Hohmann, J. (2015). The Genus *Rumex*: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 175, pp.198-228.
6. Valente, J., Doldersum, M., Roers, C. and Kooistra, L., 2019. Detecting *Rumex Obtusifolius* weed plants in grasslands from UAV RGB imagery using deep learning. *ISPRS Annals of Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, IV-2/W5, pp.179-185.
7. Rao, K., Ch, S., Banji, D. and Sandhya, S., (2011). A Study On The Nutraceuticals From The Genus *Rumex*.
8. Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I. and Jokić, S. (2018). New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioproducts Processing*, 109, pp.52-73.

9. Biesalski, H., Dragsted, L., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P. and Weber, P. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity.
10. Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M., Ghafoor, K., Norulaini, N. and Omar, A. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), pp.426-436.
11. Yang, X. and Guido, J. (2018). An Overview of Plant Phenolics Measurement. *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences - Open Journal*, SE(2), pp.S34-S44.
12. Xiao, J., Ni, X., Kai, G. and Chen, X. (2014). Advance in Dietary Polyphenols as Aldose Reductases Inhibitors: Structure-Activity Relationship Aspect. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(1), pp.16-31.
13. Shahidi, F. and Yeo, J. (2018). Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), p.1573.
14. Tanase, C., Coșarcă, S. and Muntean, D. (2019). A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity. *Molecules*, 24(6), p.1182.
15. Panche, A., Diwan, A. and Chandra, S. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5.
16. Erlund, I., 2004. Review Of The Flavonoids Quercetin, Hesperetin, And Naringenin. *Dietary Sources, Bioactivities, Bioavailability, And Epidemiology*.
17. Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J. and Gao, Y., 2016. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 56, pp.21-38.

18. Parasuraman, S., Anand David, A. and Arulmoli, R., 2016. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy Reviews*, 10(20), p.84.
19. El Khawand, T., Courtois, A., Valls, J., Richard, T. and Krisa, S. (2018). A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability. *Phytochemistry Reviews*, 17(5), pp.1007-1029.
20. Stefanachi, A., Leonetti, F., Pisani, L., Catto, M. and Carotti, A. (2018). Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. *Molecules*, 23(2), p.250.
21. Veitch, N. and Grayer, R. (2011). Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural Product Reports*, 28(10), p.1626.
22. Malik, E. and Müller, C. (2016). Anthraquinones As Pharmacological Tools and Drugs. *Medicinal Research Reviews*, 36(4), pp.705-748.
23. Monisha, B., Kumar, N. and Tikku, A., 2016. Emodin and Its Role in Chronic Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp.47-73.
24. Gonzalez-Burgos, E. and Gomez-Serranillos, M. (2012). Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. *Current Medicinal Chemistry*, 19(31), pp.5319-5341.
25. Mewalal, R., Rai, D., Kainer, D., Chen, F., Külheim, C., Peter, G. and Tuskan, G. (2017). Plant-Derived Terpenes: A Feedstock for Specialty Biofuels. *Trends in Biotechnology*, 35(3), pp.227-240.
26. Bergman, M., Davis, B. and Phillips, M. (2019). Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action. *Molecules*, 24(21), p.3961.
27. Huang, A. and Osbourn, A., 2019. Plant Terpenes That Mediate Below-Ground Interactions: Prospects For Bioengineering Terpenoids For Plant Protection.
28. Zhang, T., Yang, L. and Jiang, J., 2015. Tormentic acid in foods exerts anti-proliferation efficacy through inducing apoptosis and cell cycle arrest. *Journal of Functional Foods*, 19, pp.575-583.

29. Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H. and Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities.
30. Thorpe, T. (2012). History of Plant Tissue Culture. *Plant Cell Culture Protocols*, pp.9-27.
31. Loyola-Vargas, V. and Ochoa-Alejo, N. (2018). An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. *Plant Cell Culture Protocols*, pp.3-13.
32. Ogita, S. (2015). Plant Cell, Tissue and Organ Culture: The Most Flexible Foundations for Plant Metabolic Engineering Applications. *Natural Product Communications*, 10(5), pp.1934578X1501000.
33. Oseni, O., Pande, V. and Nailwal, T. (2018). A Review on Plant Tissue Culture, A Technique for Propagation and Conservation of Endangered Plant Species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(07), pp.3778-3786.
34. Clark, D. and Pazdernik, N., 2016. Transgenic Plants and Plant Biotechnology. *Biotechnology*, pp.461-492.
35. Davey, M., Anthony, P., Power, J. and Lowe, K. (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 23(2), pp.131-171.
36. Wiszniewska, A. and Pindel, A. (2010). Protoplast culture utilization in studies on legume crops. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Science*, 60(5), pp.389-399.
37. Bhatia, S. (2015). Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences. Amsterdam: Academic Press.
38. Eibl, R., Meier, P., Stutz, I., Schildberger, D., Hühn, T. and Eibl, D. (2018). Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(20), pp.8661-8675.

39. Dias, M., Sousa, M., Alves, R. and Ferreira, I. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products*, 82, pp.9-22.
40. Meskaaoui, A. (2013). *Plant Cell Tissue and Organ Culture Biotechnology and Its Application in Medicinal and Aromatic Plants*. *Medicinal & Aromatic Plants*, 02(03).
41. Hussain, M., Rahman, M., Fareed, S., Ansari, S., Ahmad, I. and Mohd. Saeed (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(1), p.10.
42. Murthy, H., Lee, E. and Paek, K. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(1), pp.1-16.
43. Alamgir, A., 2018. *Biotechnology, In Vitro Production of Natural Bioactive Compounds, Herbal Preparation, and Disease Management (Treatment and Prevention)*. *Progress in Drug Research*, pp.585-664.
44. Wang, J., Li, J., Li, J., Li, J., Liu, S., Huang, L. and Gao, W. (2017). Production of Active Compounds in Medicinal Plants: From Plant Tissue Culture to Biosynthesis. *Chinese Herbal Medicines*, 9(2), pp.115-125.
45. Efferth, T., 2018. *Biotechnology Applications Of Plant Callus Cultures*.
46. Ikeuchi, M., Sugimoto, K. and Iwase, A., 2013. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*, 25(9), pp.3159-3173.
47. El-Shafey, N., S. Ahmed, E., Sayed, M., Hammouda, O. and Khodary, S., 2016. Effect of Growth Regulators, Carbohydrates and Antioxidant Compounds on Biomass, Flavonoid Accumulation and Enzyme Activity in Callus Cultures of *Rumex vesicarius* L. *Egyptian Journal of Botany*, 56(3), pp.595-612.
48. Nowakowska, K., Pacholczak, A. and Tepper, W., 2019. The effect of selected growth regulators and culture media on regeneration of

Daphne mezereum L. 'Alba'. Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali, 30(1), pp.197-205.

49. Elzaawely, A., Xuan, T. and Tawata, S., 2005. Antioxidant and Antibacterial Activities of *Rumex japonicus* HOUTT. Aerial Parts. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 28(12), pp.2225-2230.

50. Batool, R., Aziz, E., Salahuddin, H., Iqbal, J., Tabassum, S. and Mahmood, T., 2019. *Rumex Dentatus* Could Be A Potent Alternative To Treatment Of Microbial Infections And Of Breast Cancer - CNKI.

51. Feduraev, P., Chupakhina, G., Maslennikov, P., Tacenko, N. and Skrypnik, L., 2019. Variation in Phenolic Compounds Content and Antioxidant Activity of Different Plant Organs from *Rumex crispus* L. and *Rumex obtusifolius* L. at Different Growth Stages. Antioxidants, 8(7), p.237.