

БУЛКО О.В.✉, ЛЬОШИНА Л.Г.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: obulko@ukr.net
✉ obulko@ukr.net, (050) 102-03-87

УВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* СИНЮХИ БЛАКИТНОЇ *POLEMONIUM CAERULEUM* L. ТА СКОРЦОНЕРИ ІСПАНСЬКОЇ *SCORZONERA HISPANICA* L.

Мета. Мікроклональне розмноження синюхи блакитної *Polemonium caeruleum* L. та скорцонери іспанської *Scorzonera hispanica* L., отримання культури «бородатих коренів» і рослин-регенерантів. **Методи.** Культивування рослин *in vitro*, модифікація складу живильних середовищ для мікророзмноження, інокуляція експлантатів агробактеріальними штамми. **Результати.** Уведено в культуру *in vitro* синюху блакитну і скорцонеру іспанську, підібрано оптимальний склад живильних середовищ для ефективного множення цих рослин, одержані культури коренів і рослини-регенеранти цих видів. **Висновки.** Відпрацьовану технологію введення в культуру *in vitro* *P. caeruleum* і *S. hispanica* можна використовувати для мікроклонального розмноження рослин, а культуру коренів та рослини-регенеранти, що отримані в результаті агробактеріальної трансформації, – для подальших досліджень вторинного метаболізму цих рослин.
Ключові слова: *P. caeruleum* L., *S. hispanica* L., мікроклональне розмноження, фітогормони, коренева культура.

Синюха блакитна (*Polemonium caeruleum* L.) – це багаторічна трав'яниста лікарська рослина сімейства *Polemoniaceae*, що використовується як у народній, так і в традиційній медицині, містить ряд вторинних метаболітів, основними з яких є тритерпенові сапоніни (до 30%). Методом газової хроматографії було визначено компонентний склад водноспиртових екстрактів суцвіть, листя, коренів і кореневищ *P. caeruleum* L. Ідентифіковано 22 летючі і термостабільні компоненти, основними з яких є складні ефіри, похідні альдегідів та кетонів [1].

Синюха блакитна була запропонована для медичного застосування професором М.Н. Варлаковим (Томський медичний інститут) в 1932 р. як замітник імпортової сенегі [2] і активно вивчалася в 50–60-х роках ХХ століття. Зростала вона серед трав'янистої рослинності

вологих лук, на лісових галявинах, на узліссях, серед чагарників, уздовж річок по всій європейській частині Радянського Союзу: від Сибіру до Єнісею. Крім того, її почали культивувати в 50–60-х роках у радгоспах України, Білорусі, Московської області та в Західному Сибіру. Сьогодні кореневища з корінням синюхи мають обмежене застосування і практично перестали реалізовуватися через аптечну мережу. В Україні цю рослину застосовує лікар-фітотерапевт Євген Товстуха, він збирає її в Чернігівській та Київській областях, але в останні роки природний потенціал цієї рослини значно скоротився, виснажився. У народній медицині кореневища з корінням синюхи мають більш широке застосування – не тільки як відхаркувальний засіб, а й як седативний, протизапальний, ранозагоювальний, кровоспинний, антибактеріальний та ін. [3]. Останнім часом виявлено гіпохолестеринемічну властивість сапонінів. Використовується також надземна частина рослини. Відомо, що седативна дія синюха в 8–10 разів перевищує дію валеріани, без побічних ефектів. Вид має повільну регенераційну здатність. Заготівля коренів не може проводитися в значних кількостях, повторна заготівля на одній території можлива лише через 5–7 років.

Враховуючи вищесказане, розробка технології культивування *in vitro* рослин і культур клітин *Polemonium caeruleum* є актуальним для збереження цієї рідкісної лікарської рослини і розширення ресурсної бази для фармацевтики.

Ще одним цікавим об'єктом для біотехнології є скорцонера іспанська *S. hispanica* L., або козелець, солодкий корінь, чорний корінь – дворічна рослина родини *Asteraceae* (*Compositae*), широко поширена в Західній Європі й Америці, адже за смаковими якостями є однією з найцінніших коренеплідних рослин.

Скорцонера – багатолітник, але в культурі вирощується як дворічник. У рік посіву розвиває розетку соковитого листя і коренеплід, а наступного – дає квітковий пагін. Корінь має

© БУЛКО О.В., ЛЬОШИНА Л.Г.

веретеноподібну або циліндричну форму, довжину до 30 см, товщину до 3 см. Квітує великими жовтими квітками, схожими за формою на ромашки.

У скорцонері містяться білки, цукри, вітаміни групи В, аскорбінова кислота і такі мінерали, як фосфор, літій, кальцій і калій, а також аспарагін, леулін, пектинові речовини, алкалоїди, сесквітерпеноїди, ефірні масла, смоли. Особливо цінним пряним коренеплодом скорцонера вважається завдяки вмісту у ньому інуліну, з якого при перетравленні утворюється фруктоза, а не глюкоза, що корисно для хворих на діабет. Також інулін в якості пребіотику стимулює розвиток корисної кишкової мікрофлори [4]. Наявний у значній кількості аспарагін позитивно впливає на роботу серця і нирок; низька калорійність коренеплодів і легка засвоюваність дозволяють використовувати їх за ожиріння і в дієтичному харчуванні. В народній медицині скорцонера використовується за хвороб шлунково-кишкового тракту як знеболювальний і радіопротекторний засіб. Однак насіння скорцонери швидко втрачає схожість, має термін придатності лише два роки [5]. Тому, з нашої точки зору, розробка методів мікроклонального розмноження цієї цінної дієтичної рослини є актуальною.

Матеріали і методи

Стерилізацію насіння синюхи і скорцонери проводили за такою методикою: попередньо замочували в слаборожевому розчині перманганату калію на 1–1,5 год, потім упродовж 2 хвилин витримували в 70⁰ етиловому спирті і занурювали в 0,1 % розчин HgCl₂ на 8–9 хв., потім тричі промивали стерильною дистильованою водою. Знезаражене насіння висаджували на базове середовище Мурасіге-Скуга (МС) [6].

Культуральне середовище для розмноження на основі МС доповнювали різними комбінаціями регуляторів росту рослин: 6-бензиламінопурином (6-БАП), кінетину (6-фурфурил – амінопурином), індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК), індолілмасляної кислоти (ІМК), α-нафтилоцтової кислоти (НОК) в концентрації від 0,1 до 1,0 мг/л.

Інокуляцію експлантатів *P.caeruleum* та *S.hispanica* штамми *A.rhizogenes* ATCC 15834 і А4 проводили таким методом: попередньо нащеплений штрих агробактерії змивали 5–10 мл середовища МС± (середовище МС без гліцину, з додаванням 1мг/л 2,4Д), давали відстоятися

бактеріальній суспензії впродовж 20 хв., і верхню фазу додавали до попередньо підготовлених експлантатів синюхи чи скорцонери в колбах із 20 мл середовища МС±. Інкубували добу на качалці за 26⁰С. Потім експлантати відмивали від бактеріальної суспензії і переносили на чашки з середовищем В₅, яке містило 500 мг/л цефотаксиму для елімінації агробактерії. Альтернативний метод – нанесення бактерій *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 і А4 бактеріальною петлею на місце уколу голкою.

Культивування рослин проводили в термальній кімнаті за 25±2⁰С, освітлення 4000–5000 лк, 16-годинного фотоперіоду.

Результати та обговорення

Вихідним матеріалом для введення в культуру *in vitro* стало насіння синюхи, отримане від фітотерапевта Є.Товстухи, і комерційне насіння скорцонери, оскільки саме з насіння можна отримати найбільш генетично однорідний матеріал.

Нами була обрана методика поетапної стерилізації насіння за допомогою 70⁰ етилового спирту і 0,1 % розчину HgCl₂, яка дозволила досягнути знезараження майже 100 відсотків насінин (98,4 % – для синюхи, 97,3 % – для скорцонери). Перші паростки з'явилися на 7–8 день, схожість насіння склала 86,2 % для *P. caeruleum* і 26,3 % – для *S. hispanica*.

Наступний етап роботи – підбір оптимального складу живильного середовища для культивування і мікроклонального намноження досліджуваних рослин, при цьому важливим є як вміст мінеральних речовин, так і співвідношення і концентрація доданих у середовище стимуляторів росту. Для розмноження синюхи в культурі *in vitro* було опробовано 18 варіантів комбінації цитокінінів і ауксинів у складі живильних середовищ (табл. 1).

За доповнення середовища екзогенними фітогормонами (6-бензиламінопурином (6-БАП), кінетином (6-фурфурил-амінопурином), індоліл-3-оцтовою кислотою (ІОК), індолілмасляною кислотою (ІМК), α-нафтилоцтовою кислотою (НОК) в концентрації від 0,1 до 1,0 мг/л як по одному, так і в різних комбінаціях вдалося отримати значний приріст пагоноутворення. В нашій роботі було встановлено, що найбільш придатним для множення синюхи блакитної є середовище МС, що містить 0,8 мг/л БАП, 0,8 мг/л кінетину і 0,8 мг/л ІОК; при цьому коефіцієнт множення склав 27,5 пагонів на експла-

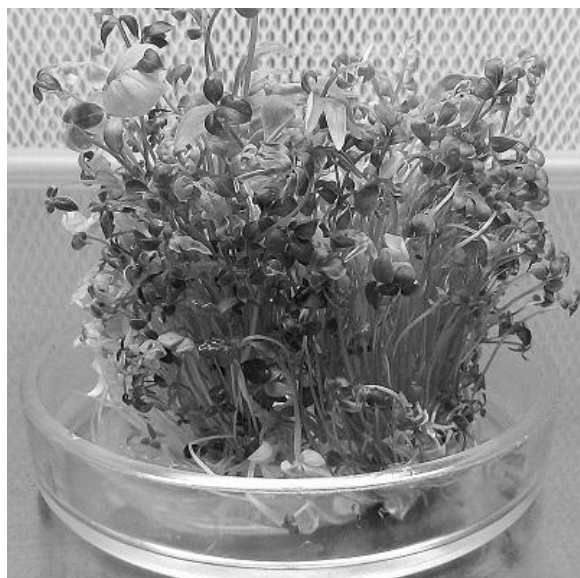
нтат (рис. 1, а). За більших концентрацій на-
множені пагони були дрібними і деформовани-
ми, під час перенесення на безгормональне се-
редовище вони погано розвивалися, частина
гинула.

Для визначення оптимального складу жи-

вильного середовища для мікророзмноження
скорцонери варіювали як кількість цитокінінів
та ауксинів (табл. 2), так і мінеральний склад
середовища, оскільки рослина була схильна до
етіоляції і всихання за вирощування на безгор-
мональному МС середовищі.

Таблиця 1. Вплив регуляторів росту на пагоноутворення *P. caeruleum*

Концентрація цитокінінів у живильному середовищі, мг/л		Концентрація ауксинів у жи- вильному середовищі, мг/л		Кількість паго- нів на експла- тат, шт.	Довжина пагонів, мм
6-БАП	кінетин	ІОК	НОК		
0,5	-	-	-	9,3±1,3	61,2±5,2
0,5	0,5	0,5	-	11,2±1,1	49,1±4,4
0,5	0,5	-	0,5	8,5±0,9	51,4±3,7
0,6	-	-	-	12,4±1,5	55,3±4,3
0,6	0,6	0,6	-	14,4±2,1	48,7±3,6
0,6	0,6	-	0,6	11,3±1,9	46,2±4,1
0,7	-	-	-	17,7±2,2	51,4±2,4
0,7	0,7	0,7	-	18,5±1,8	46,5±3,6
0,7	0,7	-	0,7	15,6±1,4	51,2±2,8
0,8	-	-	-	21,2±2,5	46,4±3,4
0,8	0,8	0,8	-	27,5±2,3	49,5±2,6
0,8	0,8	-	0,8	20,3±1,9	38,6±3,4
0,9	-	-	-	22,7±2,2	37,3±2,8
0,9	0,9	0,9	-	25,5±2,8	35,5±2,5
0,9	0,9	-	0,9	23,8±1,8	36,4±3,1
1,0	1,0	-	-	19,4±2,2	34,5±2,4
1,0	1,0	1,0	-	23,4±1,7	36,7±2,6
1,0	1,0	-	1,0	21,7±2,1	39,3±2,4



а



б

Рис. 1. *P. caeruleum* на середовищі MS+0,8 мг/л БАП, 0,8 мг/л кінетину і 0,8 мг/л ІОК (а), *S. hispanica* на середовищі з додаванням 0,2 мг/л БАП і 0,2 мг/л ІМК (б).

Таблиця 2. Залежність кількості і довжини пагонів *S. hispanica* від концентрації цитокінінів і ауксинів у живильному середовищі

Концентрація цитокінінів у живильному середовищі, мг/л		Концентрація ауксинів у живильному середовищі, мг/л		Кількість пагонів на експлантат, шт.	Довжина пагонів, мм
6-БАП	кінетин	ІМК	ІОК		
0,1	-	-	-	2,3±0,3	89±9,5
0,1	-	0,1	-	3,4±1,1	75±7,4
0,1	-	0,2	-	5,2±1,7	67±4,6
0,2	-	0,2	-	8,6±0,8	57±6,3
0,1	-	0,5	-	2,1±0,5	101±10,3
0,2	-	0,5	-	3,4±0,8	63±6,5
0,1	-	-	0,5	2,2±0,7	93±8,6
0,3	-	0,1	-	4,5±0,7	72±8,3
0,3	-	0,5	-	5,6±1,3	84±9,4
0,5	-	-	-	12,3±2,1	15±3,7
0,5	-	0,1	-	7,3±1,6	31±4,8
-	0,1	-	0,1	3,1±0,6	85±11,2
-	0,2	-	0,1	3,6±0,9	67±8,7
-	0,3	-	0,1	6,1±1,8	63±9,6
-	0,1	0,1	-	5,3±1,5	72±7,4
-	0,2	0,2	-	4,8±0,7	84±6,7
-	0,3	0,2	-	5,3±1,1	72±8,3

Було встановлено, що скорцонера в *in vitro* культурі ефективно множить за достатньо низьких концентрацій екзогенних стимуляторів росту (до 0,5 мг/л), у ході подальшого підвищення їх концентрації спостерігалось значне калюсоутворення і формування дрібних, морфологічно неоднорідних аномальних структур, непридатних для подальшого розвитку. Для кращого росту в середовище додавали підвищену кількість вуглеводнів (до 30 г/л сахарози) і подвійну концентрацію хелатованого заліза, що дозволяло отримати більш міцні, інтенсивно забарвлені рослини. Найбільш придатним для мікроклонального розмноження *S. hispanica* виявилось середовище МС з додаванням 0,2 мг/л БАП і 0,2 мг/л ІМК (рис. 1 б). За перенесення на безгормональне середовище намножені пагони скорцонери погано розвивалися, тому для вкорінення додавали ауксини (НОК і ІМК) в різній кількості, оптимальним було додавання 0,7 мг/л ІМК. Появу корінців спостерігали на 14–21 день.

Пагони синюхи, навпаки, за перенесення на безгормональне середовище успішно дорощувалися і вкорінювалися; перші корені з'явилися на 7–9-й день. *P. caeruleum* взагалі виявився здатним до довготривалого вирощування в стерильній культурі на середовищі без

додавання екзогенних гормонів, за досить значного терміну одного пасажу – до 3–4-х місяців, що може свідчити про достатній пул ендогенних гормонів, однак при цьому рослини не множилися. Розвиток сплячих бруньок спостерігався лише за внесення регуляторів росту.

Одним з шляхів підвищення рівня синтезу вторинних метаболітів у рослинах є отримання за допомогою *A. rhizogenes* культури «*hairy root*» і в подальшому – рослин-регенерантів [7–9]. Тому нами була поставлена мета відпрацювати методики агробактеріальної трансформації синюхи і скорцонери, отримання культури «*hairy roots*» і рослин-регенерантів.

Інокуляцію *P. caeruleum* та *S. hispanica* штамми *A. rhizogenes* ATCC 15834 і А4 проводили методом інкубування експлантатів у колбах із бактеріальною суспензією і подальшим перенесенням на середовище В₅ з цефотаксимом для елімінації агробактерії. Джерелом експлантатів були стебла та листя синюхи і листя скорцонери. Частота трансформації склала 10,7 ± 0,8 % (для *P. caeruleum*) і 15,4 ± 1,9 % (для *S. hispanica*), причому більшу здатність до утворення «бородатих коренів» у синюхи проявили експлантати саме з листя. Отримані культури коріння цих рослин наведені на рис. 2.

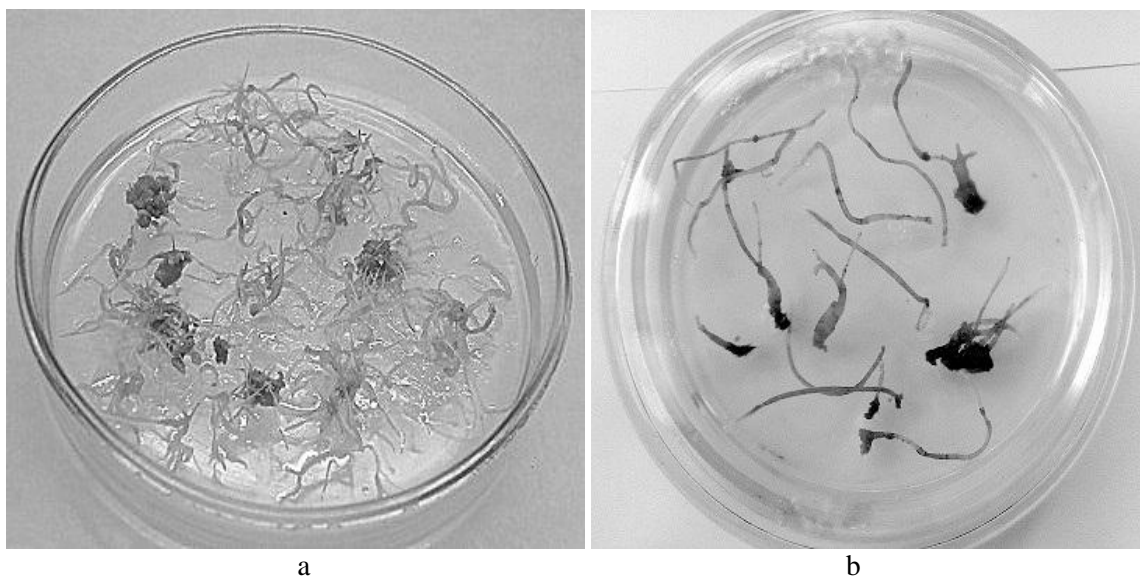


Рис. 2. Культура трансформованого коріння *P. caeruleum* (а) та *S. hispanica* (б).

За вирощування рослин обох досліджуваних видів на експлантатах утворювався калюс, який був здатний до утворення морфогенних структур. Здатність скорцонери до регенерації була значно вищою, ніж синюхи. На рис. 3 а представлена регенерація *S. hispanica* з калюсної тканини за інкубації на середовищі МС з додаванням 1,0 мг/л БАП. Ефективність регенерації складала 5–7 регенерантів на експлантат. На рис. 3 б показано морфогенне утворення з листового експлантата *P. caeruleum* на середовищі без гормонів.

Новоутворені рослини переносили на МС середовище для укорінення з додаванням 0,7

мг/л ІМК для *S. hispanica* і 0,1 ІУК для *P. caeruleum*.

Рослини-регенеранти морфологічно не відрізнялися від інтактних рослин, але були значно краще пристосовані для культивування в умовах *in vitro*, що підтверджувалося збільшенням періоду субкультивування та покращенням ростових параметрів.

Висновки

Таким чином, для уведення в культуру *in vitro* рослин синюхи блакитної і скорцонери іспанської найбільш придатною методикою є поетапна стерилізація 70 % етиловим спиртом і

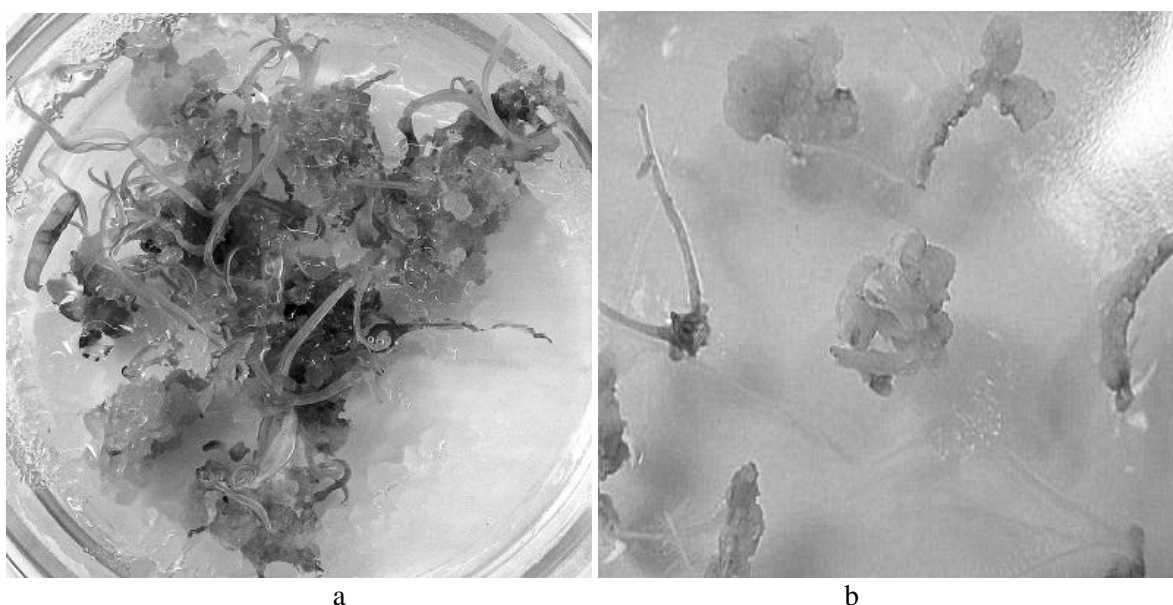


Рис. 3. Рослини-регенеранти з калюсу *Scorzonera hispanica* L. (а) і *Polemonium caeruleum* L. (б).

0,1 % розчином HgCl₂. Ефективне множення *P. caeruleum* відбувається на середовищі МС, доповненому 0,8 мг/л БАП, 0,8 мг/л кінетину і 0,8 мг/л ІОК, а *S. hispanica* – по 0,2 мг/л БАП і ІОК, з додаванням 30 г/л сахарози і збільшеною удвічі концентрацією іонів заліза. Для вкорінення мікророзмножених рослин синюхи блакитної достатньо перенесення на безгормональ-

не середовище, а для елонгації і подальшого вкорінення скорцонери іспанської потрібна інкубація на середовищі з додаванням 0,7мг/л ІМК. З експлантатів рослин, введених у культуру *in vitro*, отримані культури трансформованого коріння і рослини-регенеранти для подальшого дослідження.

Література

1. Башилов А.В. Биохимическая оценка практического использования *Polemonium caeruleum* L. в фармакологии. *Бюл. Никит. ботан. сада*. 2008. Вып. 97. С. 59–62.
2. Турова А.Д., Сапожникова Э.Н. Лекарственные растения СССР и их применение. Москва: Медицина, 1984. 304 с.
3. Хишова О.М. Фармакологическое действие синюхи голубой и применение в медицине. *Вестник фармаци*. 1999. № 1–2. С. 11–13.
4. Kelly G. Inulin-type prebiotics – a review: part 1. *Alternat. Med. Rev.* 2008. Vol. 14, No. 4. P. 315–329.
5. Stephens J.M. *Scorzonera* – *Scorzonera hispanica* L. Fact Sheet HS–664. 1994. Florida Cooperative Extension service IFAS, University of Florida, Gainesville Florida.
6. Murashige I., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*. 1962. Vol. 15, № 3. P. 473–497.
7. Giri A., Narasu M.L. Transgenic hairy roots. recent trends and applications. *Biotechnol Adv.* 2000. Vol. 18, No. 1. P. 1–22.
8. Bogdanović M., Dragičević M., Subotić A., Simonović A., Todorović S. In vitro production of chlorogenic acid in culture of transformed *Cichorium intybus* L. plants. *Lek. Sirov.* 2014. Vol. 34. P. 55–67.
9. Лёшина Л.Г., Булко О.В., Стрельник О.А. *Agrobacterium rhizogenes* – опосредованная трансформация и особенности регенерантов *Digitalis purpurea* L. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. К.: Логос, 2016. Т. 19. С. 157–161.

References

1. Bashilov A.V. Biochemical evaluation of practical use of *Polemonium caeruleum* L. in pharmacology. *Bul. Nikit. Bot. garden*. 2008. Issue 97. P. 59–62.
2. Turova A.D., Sapozhnikova E.N. Medicinal plants of the USSR and their application. – Moscow: Medicine, 1984. 304 p.
3. Khishova O.M. Pharmacological action of blue Jacob's ladder and application in medicine. *Vesnik farmacii*. 1999. № 1–2. P. 11–13.
4. Kelly G. Inulin-type prebiotics – a review: part 1. *Alternat. Med. Rev.* 2008. Vol. 14, No. 4. P. 315–329.
5. Stephens J.M. *Scorzonera* – *Scorzonera hispanica* L. Fact Sheet HS–664. 1994. Florida Cooperative Extension service IFAS, University of Florida, Gainesville Florida.
6. Murashige I., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*. 1962. Vol. 15, № 3. P. 473–497.
7. Giri A., Narasu M.L. Transgenic hairy roots. recent trends and applications. *Biotechnol Adv.* 2000. Vol. 18, No. 1. P. 1–22.
8. Bogdanović M., Dragičević M., Subotić A., Simonović A., Todorović S. In vitro production of chlorogenic acid in culture of transformed *Cichorium intybus* L. plants. *Lek. Sirov.* 2014. Vol. 34. P. 55–67.
9. Liozhina L.G., Bulko O.V., Strelnik O.A. *Agrobacterium rhizogenes* – mediated transformation and features of the regenerative *Digitalis purpurea* L. *Factors in experimental evolution of organisms*. K: Logos, 2016. Vol. 19. P. 157–161.

BULKO O.V., LIOSHINA L.G.

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of NAS of Ukraine,
Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 148, e-mail: obulko@ukr.net*

JACOB'S LADDER *POLEMONIUM CAERULEUM* L. AND BLACK SALSIFY *SCORZONERA HISPANICA* L. *IN VITRO* CULTURE

Aim. Micropropagation of Jacob's ladder *Polemonium caeruleum* L. and black salsify *Scorzonera hispanica* L., obtaining root culture and regenerated plants. **Methods.** *In vitro* plant cultivation, medium composition modification for micropropagation, inoculation of explants with agrobacterial strains. **Results.** *In vitro* cultures of Jacob's ladder and black salsify have been obtained, the optimal medium composition has been determined for the effective plants multiplication, rooting and growth, root cultures and regenerated plants of studied species have been obtained. **Conclusions.** Obtained technology of *in vitro* culture establishment of *P. caeruleum* and *S. hispanica* can be used for plants microclonal propagation so as root culture and regenerated plants acquiring due to the agrobacterial transformation – for further studies of secondary metabolism of these plants.

Keywords: *P. caeruleum* L., *S. hispanica* L., micropropagation, phytohormones, root culture.