

**ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ *LYSIMACHIA NUMMULARIA* L.  
ПРИ ВВЕДЕННІ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO***

**В. Г. РАДЧЕНКО**, академік НАН України,

*ДУ «Інститут еволюційної екології НАН України»*

**С. Ю. БІЛОУС**, доцент кафедри дендрології та лісової селекції,

кандидат біологічних наук

*Національний університет біоресурсів і природокористування України*

**Р. К. МАТЯШУК**, кандидат біологічних наук

*ДУ «Інститут еволюційної екології НАН України»*

*E-mail: forest\_biotech@ukr.net*

**Анотація.** Рослина родини Первоцвітних, зокрема *Lysimachia nummularia* L., – багаторічна, трав'яниста, ґрунтопокривна рослина, цінна лікарська сировина, джерело отримання широкого спектра біологічно активних речовин.

Обґрунтовано актуальність отримання асептичної культури *Lysimachia nummularia* L. Проведено експерименти з використанням різних концентрацій і комбінацій стерилізуючих речовин 70 %  $C_2H_5OH$ , 1,0 %  $AgNO_3$ , 12,5–25,0 % розчин  $H_2O_2$  з метою отримання асептичного рослинного матеріалу *Lysimachia nummularia* L., здатного до морфогенезу *in vitro*.

Встановлено основні етапи стерилізації експлантатів *L. nummularia in vitro* й особливості отримання морфогенно активних первинних мікропагонів.

З'ясовано, що ріст і розвиток первинних експлантатів залежить від стерилізуючої речовини, яку використовували на початку введення, і типу пагонів.

Досліджено, що найменша контамінація і найбільший відсоток життєздатних експлантатів *L. nummularia* отримано за комплексної стерилізації використання 25 % розчину  $H_2O_2$  – 7 хв та одноразове відмивання у стерильній  $dH_2O$  – 10 хв.

Підібрані умови стерилізації щонайменше пошкоджували рослинні тканини та забезпечили отримання 93 % асептичних життєздатних експлантатів *Lysimachia nummularia* L., у яких на 5-10 добу культивування відмічали початок росту первинних мікропагонів.

**Ключові слова:** *Lysimachia nummularia* L., асептична культура, живильне середовище, експлантат, морфогенез, *in vitro*.

Вербозілля лучне – *Lysimachia nummularia* L. – багаторічна трав'яниста, ґрунтопокривна рослина родини Первоцвітних – *Primulaceae*, яка налічує близько 165 видів. Серед трав'янистих рослин рід *Lysimachia* особливо цінний як лікарська сировина, що використовується в народній медицині багатьох країн [6, р. 16–20; 7, р. 299–309; 10, р. 024–027; 12, р. 83–85]. Отримання вторинних метаболітів із представників *Lysimachia* зумовлює необхідність використання асептичної, оздоровленої рослинної сировини у великій кількості. В цій ситуації біотехнологічні методи розмноження мають першочергове значення.

Першим етапом будь-яких біотехнологічних досліджень, пов'язаних з культурою тканини рослин, є добір ефективних способів стерилізації та отримання стерильно чистої культури. Повна стерилізація вихідного матеріалу є невід'ємною частиною на перших етапах мікроклонального розмноження, від якої залежить подальший ріст і розвиток рослин-регенерантів та їхня здатність до морфогенезу. Якість її залежить від стериліанта, його концентрації та експозиції. Оптимальний добір стерилізуючої речовини полягає в тому, щоб вона знешкоджувала патогенну бактеріальну та грибкову мікрофлору на поверхні рослин і якомога менше шкодила рослинним тканинам і органам всередині [1, с. 34; 3, с. 241; 4, с. 120].

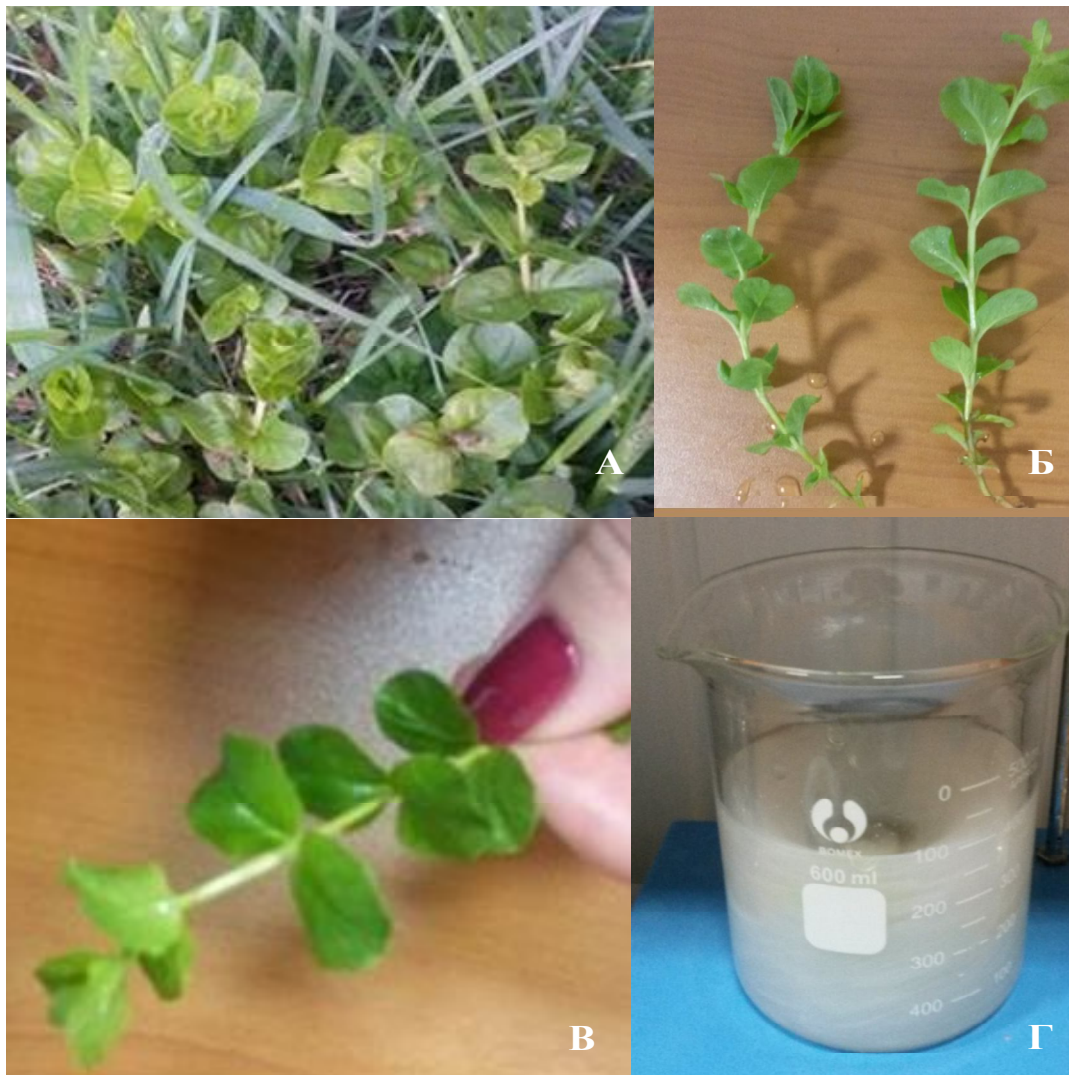
Зазвичай режим стерилізації підбирають експериментально, однак існують загальні правила, яких дотримуються на початкових етапах досліджень.

**Мета дослідження** – встановлення особливостей морфогенезу рослин *L. nummularia* на етапі введення в культуру *in vitro* залежно від типу стериліанта, часу експозиції, умов культивування та складу живильного середовища.

**Матеріали і методи.** Об'єктом досліджень слугували зразки *L. nummularia*, взяті з популяції парку-пам'ятки садово-паркового мистецтва

загальнодержавного значення «Феофанія» (ППСПМ «Феофанія», м. Київ) у період масової вегетації та на початку цвітіння рослин.

Для введення в культуру *in vitro* використовували рослини без зовнішніх ознак бактеріального, вірусного і грибового ураження, які були вирощені в умовах відкритого ґрунту. Як первинні експлантати відбирали весняно-літні рослини (рис. 1).



**Рис. 1. Початковий етап стерилізації експлантатів *L. nuttalliana*:**

*A* – рослина-донор; *Б, В*– вихідні експлантати; *Г* – витримання у мильному розчині

Для знезараження вихідних експлантатів використовували загальноприйняті методи [2, с. 38–42]. Як стерилізуючі речовин використовували 70 % розчин  $C_2H_5OH$ , 1,0 %  $AgNO_3$ , 12,5–25,0 % розчин  $H_2O_2$  різної концентрації та експозиції.

Пагони нарізали на фрагменти завдовжки 3-5 см і промивали в мильному розчині протягом 5-10 хв. (інтенсивно помішуючи) (див. рис. 1). Потім промивали під проточною водою 5 хв.

Зразки переносили в посудину зі стерильною дистильованою водою. Всі наступні маніпуляції проводили в ламінарному боксі за загальноприйнятою методикою [5, с. 102].

Як базове живильне середовище (ЖС) використовували середовище Мурасіге і Скуга (MS) [9, р. 473–497]. У процесі культивування використовували ЖС MS та Драйвера (DKW) [8, р. 507–509] з додаванням до їхнього складу різних груп регуляторів росту, як окремо, так і комбінуючи між собою. Додатково до середовища додавали активоване вугілля ( $1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ ), як вуглеводневе живлення сахарозу ( $30 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ ), мезоінозит ( $100 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ), агар (0,7 %) і дві хелатні форми заліза: етилендіамін-ді-2-гідрокси-фенілоцтової кислоти (Fe-EDDHA) і етилендіамінтетраоцтової кислоти (Fe-ЕДТА), рН середовища 5,6–5,7 [7, р. 299–309].

Експлантати культивували за температури  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  за 16-годинного фотоперіоду при постійному освітленні інтенсивністю 2000-3000 лк [2, с. 38–49; 3, с. 395; 4, с. 110–129].

Виникали труднощі у стерилізації об'єктів із тріщинами, заглибинами, пошкодженнями. У цьому випадку не лише поверхнева стерилізація, а й проникання всередину стерилізуючого розчину негативно впливали на ріст тканини в умовах *in vitro*. Тому підбирали стерилізуючий розчин, який легко вимивався з тканин дистильованою водою або розкладався, щоб не отруювати їх [2, с. 38–49; 4, с. 110–129; 6, р. 16–20]. З цією метою в дослідженнях випробовували різні концентрації  $\text{H}_2\text{O}_2$  12,5 %, 25,0 % та  $\text{AgNO}_3$  1,0%. Для досягнення поставленої мети реагенти використовували як окремо, так і в комбінації. Кожен стериліант проявляв різну дію на експлантати.

Допоміжними речовинами були мильний розчин, розчин 70 % етилового спирту ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), стерильна  $\text{dH}_2\text{O}$ .

За основний показник ефективності стерилізуючої речовини прийнята кількість експлантатів, що нормально розвивались у культурі *in vitro* [2, с. 40–56; 5, с. 102].

Дослідження показали, що жодна спроба застосувати як стерилізуючий розчин  $\text{AgNO}_3$  1,0 % не призвела до позитивного результату. Встановлено, що за м'яких умов стерилізації загибель експлантатів відбувалася на 2-3 добу через зараження культури, а за жорсткіших – через окислення рослинних тканин.

Стерилізація з використанням 25 % розчину  $\text{H}_2\text{O}_2$  і відмиванням у стерильній дистильованій воді протягом 5 хв дозволила отримати  $90 \pm 0,4$  % асептичних експлантатів, у яких на 5-7 добу відмічали набубнявіння і розкривання бруньок з подальшим утворенням мікропагонів.

Застосування 12,5 % розчину  $\text{H}_2\text{O}_2$ , як із відмиванням у стерильній воді, так і без відмивання, виявилось невдалим, оскільки отримані життєздатні експлантати на 3-5 добу після введення мали ознаки грибкового та бактеріального інфікування. Це може бути пов'язано з розміром пагонів рослин-донорів, що вводились без обрізання листкової пластини, незалежно від активності утворення первинних мікропагонів (рис. 2).

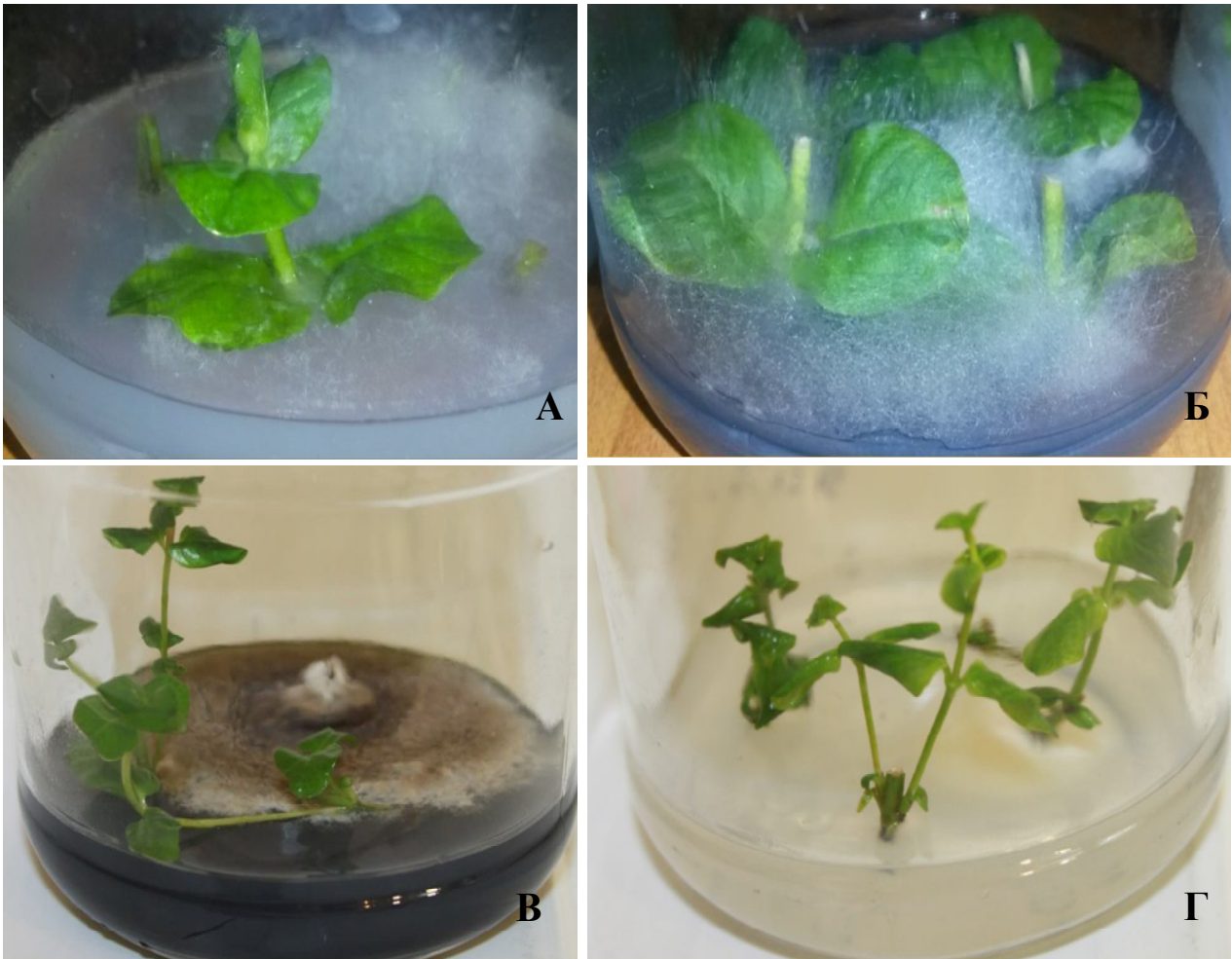
Особливість формування ґрунтопокривних рослин підвищує їхню взаємодію з мікроорганізмами ґрунтової мікрофлори, відповідно ймовірність зараження *in vitro* у таких рослин значно вища.

Найменша контамінація і найбільший відсоток життєздатних експлантатів *L. nummularia* отримано за комплексної стерилізації 25 % розчином  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 7 хв і одноразовим відмиванням протягом 5 хв у стерильній  $\text{dH}_2\text{O}$ .

В отриманих життєздатних експлантатів на 5–7, а у деяких на 10 добу культивування відмічали початок росту первинних мікропагонів (рис. 3).

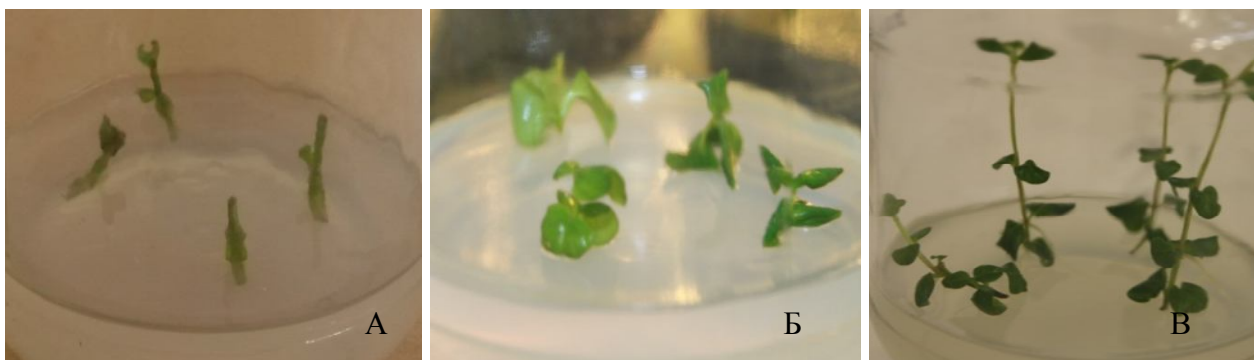
Аналіз отриманих даних показав, що найвищу ефективність стерилізації забезпечено використанням розчину  $\text{H}_2\text{O}_2$  25 % за експозиції 7 хв. та одноразовим відмиванням у стерильній  $\text{dH}_2\text{O}$  впродовж 10 хв., що найменше

пошкоджувало рослинні тканини та знешкоджувало епіфітну мікрофлору, забезпечуючи ефективність стерилізації 93 %.



**Рис. 2. Інфікування експлантатів *L. nummularia* в умовах *in vitro*:**

*A, B – 3 доба культивування; C, D – 7–10 доба культивування*



**Рис. 3. Формування асептичних мікропагонів *L. nummularia* *in vitro*:**

*A – на 3–4 добу культивування; B – на 7–10 добу культивування; C – 14 доба культивування*

**Висновок.** У результаті проведених досліджень встановлено, що ріст і розвиток первинних експлантатів варіював залежно від стерилізуючої речовини, що використовувалась на початку введення та типу пагонів. Таким чином, попередніми дослідженнями встановлено, що оптимальними експлантатами для введення *L. nummularia* в культуру *in vitro* є частини стебел з одним міжвузлям, ізольовані у травні–червні. Найвищу ефективність стерилізації отримано при використанні розчину  $H_2O_2$  25 % (експозиція 7 хв) та одноразового відмивання у стерильній дистильованій воді впродовж 10 хв, що найменше пошкоджувало рослинні тканини та знешкоджувало епіфітну мікрофлору, забезпечуючи ефективність стерилізації 93 %.

Подальша розробка мікроклонального розмноження забезпечить можливість отримати максимальну кількість мікроклонів безпосередньо з клітин тканин експлантату, що є передумовою успішного впровадження даних методів у фармацевтиці для отримання стерильного, оздоровленого садивного матеріалу *L. nummularia* вегетативного походження.

### Список використаних джерел

1. Бутенко Р. Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений / Р. Г. Бутенко. – М. : Наука, 1975. – 51 с.
2. Ковалевський С. Б. Культура *Populus tremula* L. / С. Б. Ковалевський, С. Ю. Білоус. – К. : НУБіП України, 2014. – 189 с.
3. Лікарські рослини : енциклопедичний довідник / відп. ред. А. М. Гродзинський. – К. : Гол.ред. УРЕ, 1989. – 544 с.
4. Митрофанова И. В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур : монография / И. В. Митрофанова. – К. : Аграрная наука, 2011. – 342 с.
5. Радченко В. Г. Особливості отримання асептичної культури стеблових експлантів *Lysimachia nummularia* L. в умовах *in vitro* / В. Г. Радченко, С. Ю. Білоус, Р. К. Матяшук // Актуальні проблеми лісового сектору та садово-паркового господарства: Міжн. наук.-практ. конф. – 2016. – С. 102.

6. Podolak I. A new cytotoxic triterpene saponin from *Lysimachia nummularia* L. / I. Podolak, P. Koczurkiewicz, M. Michalik, A. Galanty, P. Zajdel, Z. Janeczko // Carbohydrate Research. – Elsevier, 2013. – Vol. 375. – P. 16–20.
7. Svetla D. Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during in vitro organogenesis in apple / D. Svetla, G. Sara, F. Ervinet // Plant Sci. – 2003. – № 165. – P. 299–309.
8. Driver J. A. In vitro propagation of Paradox walnut root stock / J. A. Driver, A. H. Kuniyuki // Hort Science. – 1984. – №19. – P. 507–509.
9. Murashige T. A revised medium for rapid, grow than dbioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. A. Scoog // Physiol. plantarum. – 1962. – Vol. 15. – № 3. – P. 473–497.
10. Micropropagation of *Lysimachia laxabauda* / S. Gupta, S. Kaliamoorthy, D. Jayashankar, A. Mao, S. Soneswar // Asian Journal of Science and Technology. – 2012. – Vol. 4, Issue, 12. – P. 024–027.
11. Xu G. F. Physiological process of drough tresistance of two *Lysimachias pecies* // J. North west Forestry Univ. – 2007. – Vol. 22. – P. 12–14.
12. Zhang H. Z. Tissue culture of *Lysimachia christinae* / H. Z. Zhang, J. Q. Jie, D. Lv. // Hum. Agric. Sci. – 2005. – Vol. 3. – P. 83–85.

### References

1. Butenko, R. G. (1975). Eksperymentalnyi morfohenez i dyferentsiatsiia v kulturi klityn roslyn [Experimental morphogenesis and differentiation in plant tissue culture]. Moscow, 51.
2. Kovalevsky, S. B., Bilous, S. Yu. (2014). Kultura *Populus tremula* L. [Culture of *Populus tremula* L.]. Kyiv, 189.
3. Grodzinsky, A. M. (ed.). (1989). Likarski Roslinu [Medicinal plants]. Kyiv, 544.
4. Mitrofanova, I. V. (2011). Somatychnyi embriohenez i orhanohenez yak osnova byotekhnolohii otrymannia ta zberezhennia bahatorichhykh sadovykh kultur [Somatic embryogenesis and organogenesis as a basis for biotechnology obtaining and maintaining perennial of horticultural]. Kyiv, 342.



5. Radchenko, V. G., Bilous, S. Yu., Matashuk, R. K. (2016). Osoblyvosti otrymannia aseptychnoi kultury steblovykh eksplantiv *Lysimachia nummularia* L. v umovakh *in vitro* [Features of getting aseptic culture of stem explants *Lysimachia nummularia* L. *in vitro*]. Int. nauk. and practical. Conf. Actual problems of the forest sector and Landscape Architecture, 102.
6. Podolak, I., Koczurkiewicz, P., Michalik, M., Galanty, A., Zajdel, P., Janeczko, Z. (2013). A new cytotoxic triterpene saponin from *Lysimachia nummularia* L. Carbohydrate Research. Elsevier, 375, 16–20.
7. Svetla, D., Sara, G., Ervinet, F. (2003). Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during *in vitro* organogenesis in apple. Plant Science, 165, 299–309.
8. Driver, J. A., Kuniyuki, A. H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut root stock. Hort Science, 19, 507–509.
9. Murashige, T., Scoog, A. (1962). A revised medium for rapid, grow than dbioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. plantarum, 15 (3), 473–497.
10. Gupta, S., Kaliamoorthy, S., Jayashankar, D., Mao, A., Soneswar, S. (2012). Micropropagation of *Lysimachia laxabaudo*. Asian Journal of Science and Technology, 4 (12), 024–027.
11. Xu, G. F. (2007). Physiological process of drought tresistance of two *Lysimachias pecies*. Journal North west Forestry University, 22, 12–14.
12. Zhang, H. Z., Jie, J. Q., Lv, D. (2005). Tissue culture of *Lysimachia christinae* Hum. Agric. Sci., 3, 83–85.

## **ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА *LYSIMACHIA NUMMULARIA* L. ПРИ ВВЕДЕНИИ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO***

**В. Г. Радченко, С. Ю. Белоус, Р. К. Матяшук**

**Аннотация.** Растение семейства Первоцветных, в частности *Lysimachia nummularia* L., – многолетнее, травянистое, почвопокровное растение, ценное лекарственное сырье, источник получения широкого спектра биологически активных веществ.

Обоснована актуальность получения асептической культуры *Lysimachia nummularia* L. Проведены эксперименты с использованием различных концентраций и комбинаций стерилизующих веществ 70 %  $C_2H_5OH$ , 1,0 %  $AgNO_3$ , 12,5–25,0 % раствор  $H_2O_2$  с целью получения асептического

растительного материала *Lysimachia nummularia* L., имеющего способность к дальнейшему морфогенезу *in vitro*.

Установлены основные этапы стерилизации эксплантатов *L. nummularia in vitro* и особенности получения морфогенно активных первичных микропобегов.

Выяснено, что рост и развитие первичных эксплантатов зависит от вещества, которое использовалось для стерилизации, а также типа побегов.

Доведено, что минимальная контаминация и максимальный процент жизнеспособных эксплантатов *L. nummularia* получены при комплексной стерилизации с использованием 25 % раствора  $H_2O_2$  – 7 мин и одноразовым отмыванием в стерильной  $dH_2O$  – 10 мин.

Подобранные условия стерилизации способствовали минимальному повреждению растительных тканей и максимальному, 93% получению асептических жизнеспособных эксплантатов *Lysimachia nummularia* L., у которых на 5–10 сутки культивирования отмечали начало роста первичных микропобегов.

**Ключевые слова:** *Lysimachia nummularia* L., асептическая культура, питательная среда, эксплантаты, морфогенез, *in vitro*.

## FEATURES OF THE MORPHOGENESIS OF *LYSIMACHIA NUMMULARIA* L. AT THE *IN VITRO* INTRODUCTION

V. Radchenko, S. Bilous, R. Matyashuk

**Abstract.** The representative of Primulaceae Family, such as *Lysimachia nummularia* L. perennial, herbaceous, groundcover plants, valuable medicinal raw, source of a wide range of biologically active substances.

Topicality of getting aseptic cultures of *Lysimachia nummularia* L. was justified.

The experiments with using different concentrations and combinations of sterilizing agents such as 70 %  $C_2H_5OH$ , 1,0 %  $AgNO_3$ , 12,5-25,0 %  $H_2O_2$  for obtaining of aseptic plant material *Lysimachia nummularia* L. for capable of morphogenesis *in vitro* were determined.

The basic steps of sterilize explants of *L. nummularia in vitro* and features of morphogenic receiving active primary microshoots were established.

It was found that the growth and development of primary explants depends on sterilizing substances used for the introduction and type of shoots.

Investigated that the much less contamination and the largest percentage of viable explants *L. nummularia* have been obtained with using the complex of solution 25%  $H_2O_2$  – 7 min and one-time washing in sterile  $dH_2O$  – 10 min.

The conditions of sterilization which was selected much less influenced on plant tissues and provide receipt of 93% of viable aseptic explants of *Lysimachia nummularia* L., after 5-10 days of cultivation *in vitro* have been forming of primary microshoots.

**Keywords:** *Lysimachia nummularia* L., aseptic culture, nutrient medium, explant, morphogenesis, *in vitro*.