

ВПЛИВ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ ПАГОНІВ РОСЛИН *HYPERICUM PERFORATUM* L. ТА *TARAXACUM OFFICINALIS* L.

Hypericum perforatum і *Taraxacum officinalis* – лікарські рослини, які застосовуються в народній медицині при різноманітних захворюваннях. *H. perforatum* (звіробій звичайний) – багаторічна трав'яниста рослина родини *Hypericaceae*. Вид родом з Європи, зустрічається в Азії, Африці, Австралії, Північній та Південній Америці [1]. Ще з часів Стародавньої Греції звіробій був популярним засобом при лікуванні стресів, депресій, порізів і опіків [2]. Останні дослідження свідчать про ефективність цієї трави при лікуванні онкозахворювань, запальних процесів, у ролі антиоксиданта та нейропротектора [3]. Лікувальні властивості рослин зумовлені тим, що у них синтезуються біологічно активні сполуки (БАС), дві з яких – гіперіцин (нафтодіантрон) і гіперфорин (ліпофільний флороглюцінол), – мають найбільшу медичну цінність. Звіробій також містить рутин, кверцетин, кемпферол (флавоноїди) і похідні ксантину [4, 5]. Загалом в рослинах *Hypericum* виявили 7 груп активних речовин [6].

T. officinalis (кульбаба лікарська) – багаторічна трав'яниста рослина родини *Asteraceae*, поширена на всій території України, особливо у лісостепових районах, на луках, серед чагарників, як бур'ян у садах, на городах, уздовж доріг [7]. Рослини використовують як тонізуючий і жовчогінний засіб, вони мають діуретичну та антигістамінну дію [8, 9]. Корені кульбаби містять тритерпенові сполуки з протипухлинною активністю (таракастерол, тараксерол та ін.), стерини (ситостерин, стигмастерин), а також холін, тараксол, цукор (левульозу), нікотинову кислоту, нікотинамід, каучук (близько 3%), смоли і віск. У них дуже багато, особливо восени, інуліну (близько 40%) [10]. У суцвіттях і листках рослини є каротиноїди (тараксантин, флавоксантин), лютеїн і віолоксантин, тритерпенові спирти (арнідіол, фарадіол), а також вітаміни B₂ і C [11].

У зв'язку з комерційним потенціалом рослин цих видів проводиться дослідження щодо підвищення їх біологічної цінності [12], у тому числі в культурі *in vitro*. Ефективність регенерації є важливим фактором для успішного використання рослин у біотехнологічних дослідженнях

[13]. На даний час існує ряд досліджень з регенерації рослин *H. perforatum* та *T. officinalis* з пелюсток, коренів і листків [14, 15].

Метою нашої роботи було порівняння частоти регенерації рослин *H. perforatum* з листків, міжвузлів і коренів та *T. officinalis* з використанням проксимальної, середньої і дистальної частини листка, а також визначення оптимального типу експланту.

Матеріали і методи

Асептичні рослини *H. perforatum* і *T. officinalis* отримували шляхом поверхневої стерилізації насіння («Насіння України»). Для введення рослини в культуру *in vitro* насіння стерилізували у 70% етанолі (30 секунд), розчином комерційного препарату «Білізна» у співвідношенні з водою 1:3 протягом 10 хвилин, після чого тричі по 5 хв промивали стерильною дистильованою водою та переносили на поверхню агаризованого середовища Мурасіге та Скуга (МС) зі зменшеним вдвічі вмістом макросолей (1/2 МС) [16]. Культивування проводили при температурі 24 °С та 16-годинному світловому дні.

Рослини розмножували живцюванням на середовищі 1/2 МС. Для індукції регенерації пагонів *H. perforatum* використовували живильне середовище МС, доповнене 6-бензиламінопурином (БАП) та кінетином у концентраціях 0,5; 1; та 2 мг/л (*H. perforatum*) або 1; 2 та 3 мг/л БАП (*T. officinalis*), а також 6-нафтилоцтовою кислотою (НОК) у концентрації 0,1 мг/л. У якості експлантів використовували листки, міжвузля та корені асептичних рослин *H. perforatum*. Для індукції регенерації *T. officinalis* в якості експлантів використовували листки, які розрізали упоперек на три частини (дистальна, серединна та проксимальна), пошкоджуючи їх при цьому скальпелем. Для оцінки регенерації кількісно використовували показник частоти регенерації (ЧР). ЧР оцінювали через 4 тижні і визначали як відношення кількості експлантів з ознаками регенерації до загальної кількості експлантів, виражене у відсотках.

Частота регенерації (%) з листків, міжвузлів та коренів *H. perforatum*

Експлант	Частота регенерації (%) експлантів при культивуванні на середовищі MS з регуляторами росту, мг/л											
	кінетин			БАП			0,1 НОК +					
							БАП			кінетин		
	0,5	1	2	0,5	1	2	0,5	1	2	0,5	1	2
Листок	0	0	0	100	43	12,5	100	100	100	0	100	100
Міжвузля	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Корінь	50	50	75	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Результати та обговорення

Встановлено, що живильні середовища, доповнені НОК і різними цитокінінами, відрізнялися за здатністю індукувати регенерацію. Присутність цих регуляторів росту майже у всіх випадках стимулювала пагоноутворення для експлантів *H. perforatum*. На середовищах з додавання 0,5 мг/л БАП через 4 тижні формувалася калус і далі утворювалися пагони довжиною до 5 см на 100 % експлантів (табл. 1). При збільшенні вмісту БАП до 1 мг/л утворення пагонів розпочиналося уже на третьому тижні, а частота регенерації з листових експлантів становила 43 %, з коренів і міжвузлів – 100 %. При збільшенні концентрації БАП до 2 мг/л частота регенерації становила для листків – 12,5 %, для міжвузлів і коренів – 100 %. Отже, найкращу здатність до регенерації на середовищах з БАП мали корені і міжвузля, при використанні яких частота регенерації становила 100 %.

На середовищах з додаванням кінетину спостерігалася пряма регенерація пагонів з коренів та міжвузлів без калусоутворення. При концентрації кінетину 0,5 мг/л утворення пагонів почалося вже на другому тижні культивування. Частота регенерації з коренів становила 50 %, з міжвузлів – 100 %, а з листків пагони не утворювалися. Підвищення концентрації кінетину до 1 мг/л не призвело до суттєвих змін у частоті регенерації. При збільшенні концентрації кінетину до 2 мг/л збільшувалася довжина пагонів до 8 і 4 см відповідно при використанні міжвузля та кореня у якості експлантів. Частота регенерації з коренів збільшилася до 75 %, з міжвузля становила 100 %, а на листках регенерація була відсутня. Отже, додавання до середовища кінетину забезпечувало пряму регенерацію, причому існує пряма залежність між концентрацією кінетину і часом регенерації. Найкращу здатність до прямої регенерації мали міжвузля.

При використанні середовища з додаванням кінетину (0,5 мг/л) та НОК (0,1 мг/л) частота регенерації з кореневих експлантів та міжвузлів становила 100 %, а на листках пагони не утворювалися. При збільшенні концентрації кінетину до 1 мг/л та 2 мг/л у комбінації з 0,1 мг/л НОК пагони утворювалися на експлантах усіх типів з частотою 100 %. Ці показники свідчать про більш ефективну регенерацію у порівнянні з регенерацією при використанні середовища без додавання НОК.

Отже, збільшення концентрації кінетину 1–2 мг/л та додавання до нього НОК (0,1 мг/л) призводить до швидкої і ефективної прямої регенерації, а найкращим типом експланту при використанні вказаного живильного середовища MS є корінь та міжвузля.

Використання середовища з додаванням як БАП (0,5 мг/л), так і НОК у концентрації 0,1 мг/л забезпечило формування щільного зеленого калусу починаючи з першого тижня культивування з наступним формуванням пагонів; частота регенерації для всіх експлантів становила 100 %. Збільшення концентрації БАП (1 мг/л або 2 мг/л) з тією ж концентрацією НОК (0,1 мг/л) призвело до зменшення часу, необхідного для формування пагонів; частота регенерації для всіх типів експлантів становила 100 %.

Отже, при використанні проміжної концентрації БАП (1 мг/л) разом з НОК (0,1 мг/л) спостерігалось пришвидшення регенерації та максимальний рівень ЧР. Найкращу здатність до регенерації мав корінь.

Дослідження щодо регенераційної здатності різних частин листків *T. officinalis* виявило, що через 4 тижні культивування експлантів на середовищі MS з додаванням 1 мг/л кінетину спостерігалася пряма регенерація на всіх трьох частинах листків з частотою 40 % (табл. 2). При підвищенні вмісту кінетину до 2 мг/л також спостерігали пряму регенерацію на всіх частинах листка,

Частота регенерації (%) з різних частин листків *T. officinalis*

Частини листка	Частота регенерації (%) експлантів при культивуванні на середовищі MS з регуляторами росту											
	кінетин, мг/л			БАП, мг/л			0,1 мг/л НОК +					
							БАП, мг/л			кінетин, мг/л		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Дистальна	40	40	20	80	80	100	60	60	50	20	20	0
Серединна	40	40	0	100	80	90	60	60	50	70	50	40
Проксимальна	40	60	0	40	100	20	100	100	80	70	50	40

однак з проксимальної частини пагоноутворення було більш ефективним, а частота регенерації становила 60 %. Подальше збільшення вмісту кінетину (3 мг/л) призводило до загибелі експлантів серединної і проксимальної частини листка, а ЧР дистальної частини становила лише 20 %.

Додавання 0,1 мг/л НОК до середовища MS з 1 мг/л кінетину сприяло активізації пагоноутворення. Найактивніший ріст спостерігається на проксимальній та серединній частинах листової пластинки з ЧР 70 %. На середовищі з додаванням 2 мг/л кінетину та 0,1 мг/л НОК також спостерігалася пряма регенерація на проксимальній та серединній частинах листової пластинки, ЧР дорівнювала 50 %. На середовищі з концентрацією 3 мг/л кінетину та 0,1 мг/л НОК регенерація хоча і спостерігалася, частота її була меншою, ніж при 2 мг/л кінетину 0,1 мг/л НОК та становила 40 %. Отже, одночасне додавання цитокініну кінетину та ауксину НОК призводило до збільшення кількості експлантів з утвореними пагонами, однак збільшення концентрації кінетину пригнічувало регенерацію.

Через 4 тижні культивування експлантів *T. officinalis* на середовищі MS з додаванням 1 мг/л БАП спостерігали непряму регенерацію на всіх частинах листка, причому частота регенерації на серединній частині була найбільшою та становила 100 %. При підвищенні вмісту БАП до 2 мг/л також спостерігали непряму регенерацію на всіх трьох частинах листка з найбільшою частотою регенерації на проксимальній частині (100 %). Збільшення вмісту БАП до 3 мг/л призвело до непрямой регенерації, що спостерігалась на всіх частинах листків, причому найбільша частота регенерації визначена на дистальній частині – 100 %.

При додаванні 0,1 мг/л НОК до середовища MS з 1 або 2 мг/л БАП найактивніший ріст пагонів спостерігався на проксимальній частині листової пластинки (ЧР 100 %). На середовищі з додаванням 3 мг/л БАП і 0,1 мг/л НОК також спостерігалася непряма регенерація з ростом калу-

су, особливо на проксимальній частині листових експлантів, проте частота її була меншою, ніж при попередньому випадку та становила 80 %.

Отже, найкращим типом експланта є проксимальна частина листка. При використанні цієї частини ЧР на середовищах з 2 мг/л БАП, 1 та 2 мг/л БАП з додаванням 0,1 мг/л НОК, становила 100 %. Ефективність використання кінетину була невисокою (ЧР = 20–60 %), а найбільш ефективним було використання середовища з БАП та НОК.

Висновки

Порівняння частоти регенерації *H. perforatum* з різних типів експлантів – корневих, листових, та з міжвузлів виявило, що найбільшу регенераційну здатність мають міжвузля, на яких спостерігали 100 % частоту регенерації на усіх використаних живильних середовищах. Найбільшу залежність від наявності та концентрації регуляторів росту визначено у листових експлантів *H. perforatum*. Для цих експлантів на живильних середовищах з додаванням кінетину регенерація була відсутня, а на середовищі з БАП, БАП та НОК, кінетином та НОК становила від 12,5 до 100 %.

Вивчено можливість прямого морфогенезу з різних частин листків *Taraxacum officinalis* та визначено вплив регуляторів росту на прямий морфогенез. Виявлено, що пряма регенерація пагонів відбувалася при культивуванні експлантів на середовищі, яке містило кінетин (ЧР до 40 %). Разом з тим, у більшості випадків, зокрема, при додаванні до живильного середовища БАП, спостерігалася непряма регенерація з утворенням щільного калусу, однак при використанні цього цитокініну ЧР була вищою та становила 20–100 % залежно від концентрації.

Збільшення концентрації цитокінінів у середовищі з 0,1 НОК призводило до зменшення частоти регенерації *T. officinalis* практично для усіх використаних у дослідженні експлантів (за винятком лише одного). Проксимальна, серединна та дистальна частини листків відріз-

нялися за чутливістю до регуляторів росту. Максимальну частоту регенерації 100 % спостерігали, культивуючи проксимальні ділянки листків на трьох варіантах середовищ з 12 досліджених.

При використанні серединних та дистальних частин листків 100 % експлантів формували паго-ни тільки на одному з використаних середовищ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Gleason H.A., Cronquist A. Manual of Vascular Plants of Northeastern United States and Adjacent Canada // 2nd ed. Bronx, NY: The New York Botanical Garden, 1991. – 910 p.
2. Barnes J., Anderson L.A., Phillipson J.D. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): A review of its chemistry, pharmacology, and clinical properties // J Pharm Pharmacol. – 2001. – 53. – P. 583–600.
3. Hostanska K., Reichling J., Bommer S., Weber M., Saller R. Hyperforin a constituent of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines // Eur J Pharm Biopharm. – 2003. – 56, N 1. – P. 121–132.
4. Hudson J.B., Lopez-Bazzocchi I., Towers G.H. Antiviral activities of hypericin // Antiviral Res. – 1991. – 15. – P. 101–112.
5. Yoshitake T., Iizuka R., Yoshitake S. *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort) preferentially increases extracellular dopamine levels in the rat prefrontal cortex // Br J Pharmacol. – 2004. – 142, N 3. – P. 414–418.
6. Nahrstedt A., Butterwick V. Biologically active and other chemical constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. // Pharmacopsychiatry. – 1997. – 30. – P. 129–134.
7. Кобів Ю.Й. Кульбаба лікарська // Словник українських наукових і народних назв судинних рослин (Серія «Словники України»). – К.: Наукова думка, 2004. – 800 с. – ISBN 966-00-0355-2.
8. Ahmad V.U., Yasmeen S., Ali Z., Khan M.A., Choudhary M.I., Akhtar F., Miana G.A., Zahid M. Taraxacin, a new guaianolide from *Taraxacum wallichii* // J. Nat. Prod. – 2000. – 63. – P. 1010–1011.
9. Yun S.I., Cho H.R., Choi H.S. Anticoagulant from *Taraxacum platycarpum* // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2002. – 66. – P. 1859–1864.
10. Takasaki M., Konoshima T., Tokuda H., Masuda K., Arai Y., Shiojima K., Ageta H. Anti-carcinogenic activity of *Taraxacum* plant. II // Biol. Pharm. Bull. – 1999. – 22. – P. 606–610.
11. Choi J.H., Shin K.M., Kim N.Y., Lee Y.S., Kim H.J., Park H.J., Lee K.T. Taraxinic acid, a hydrolysate of sesquiterpene lactone glycoside from the *Taraxacum coreanum* Nakai, induces the differentiation of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cell // Biol. Pharm. Bull. – 2002. – 25. – P. 1446–1450.
12. Zobayed S., Saxena P. *In vitro*-Grown Roots: A Superior Explant for Prolific Shoot Regeneration of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L. Cv 'New Stem') In a Temporary Immersion Bioreactor // Plant Sci. – 2003. – 165. – P. 463–470.
13. Hahn G. *Hypericum perforatum* (St. John's wort): A medicinal herb used in antiquity and still of interest today // J Naturopathic Med. – 1992. – 3. – P. 94–96.
14. Liu F., Pan C., Drumm P., Ang C.Y. Liquid chromatography-mass spectrometry studies of St. John's wort methanol extraction: Active constituents and their transformation // J Pharm Biomed Anal. – 2005. – 7. – P. 303–312.
15. Kirakosyan A., Hayashi H., Inoue K., Charchoglyan A., Vardapetyan H., Yamamoto H. The effect of cork pieces on pseudohypericin production in cells of *Hypericum perforatum* L. Shoots // Russian J. Plant Physiol. – 2001. – 48. – P. 816–819.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – 15. – P. 473–497.

SYDORUK O.S., SIDLYAK G.V., MATVIEIEVA N.A.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering National Academy of Science of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 148, e-mail: ksushasidoruk@ukr.net

INFLUENCE OF PLANT GROWTH REGULATORS ON THE REGENERATION OF SHOOTS OF PLANTS *HYPERICUM PERFORATUM* L. AND *TARAXACUM OFFICINALIS* L.

Aims. The aim of our work was to compare the frequency of plant regeneration of *H. perforatum* from the leaves, internodes and roots and frequency of plant regeneration *T. officinalis* using the proximal, middle and distal part of a leaf. We also determined the optimal type of an explant for maximal plant regeneration frequency. **Methods.** For induction of regeneration of *H. perforatum* and *T. officinalis* shoots we used MS culture medium added with BAP, kinetin and NAA. We used leaves, internodes and roots of the *H. perforatum* aseptic plants. We also used proximal, middle and distal parts of *T. officinalis* leaves. **Results.** MS medial supplemented by NAA and different cytokinins differed in their ability to induce plant regeneration. The presence of these growth regulators almost in all cases stimulated the formation of shoots for *H. perforatum* explants. Using of kinetin in MS medium have led to inhibition of plant regeneration from *H. perforatum* leaves and resulted in low (20–60 %) regeneration frequency of *T. officinalis*. Using of BAP and NAA was the most effective for increasing of plant regeneration frequency of *H. perforatum* and *T. officinalis* up to 100 %. **Conclusions.** *H. perforatum* internodes and proximal parts of *T. officinalis* leaves possessed the greatest regenerative ability. The proximal, medial and distal leaves parts have differed in sensitivity to growth regulators. The maximum regeneration rate of 100 % was observed cultivating proximal leaves on three different media of 12 investigated.

Keywords: *Hypericum perforatum*, *Taraxacum officinalis*, regeneration, 6-benzylaminopuryn, kinetin.