

УДК 633.81:57.085.23:575

## РЕГЕНЕРАЦИЯ *in vitro* И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ БЛИЗОСТЬ РАСТЕНИЙ *Hyssopus officinalis* L.

© 2021 г. И. В. Булавин<sup>1,\*</sup>, Н. Н. Иванова<sup>1</sup>, член-корреспондент РАН И. В. Митрофанова<sup>1</sup>

Поступило 14.04.2021 г.

После доработки 23.04.2021 г.

Принято к публикации 23.04.2021 г.

Биотехнологические методы являются важным компонентом исследования генетических ресурсов растений и позволяют сохранять как редкие природные экземпляры, так и полезные селекционные генотипы, в том числе эфиромасличных растений, используемых в медицине, парфюмерии, кулинарии и т.д. Для клонального микроразмножения *in vitro* ключевым моментом является сохранение генетической стабильности материала. Считается, что регенерация растений *in vitro* из меристем или вегетативных почек дает идентичные клоны, при этом обсуждается влияние регуляторов роста в составе питательной среды на генетическую стабильность введенного в культуру *in vitro* растительного материала. В связи с этим целью нашей работы являлось определение генетической близости между растениями, культивируемыми *ex situ* и *in vitro*. В качестве исходного материала использовали растения *Hyssopus officinalis* L. сорта Никитский Белый (селекция НБС). Регенерацию из сегментов побега с узлом осуществляли на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга (МС), дополненной 6-бензиламинопурином (БАП) в концентрациях 0.3–0.9 мг/л и 0.1 мг/л индолил-3-масляной кислоты (ИМК). Установлено, что внесение 0.5 мг/л БАП являлось достаточным для формирования и развития морфологически нормальных органов. Генетический анализ на основе RAPD и ISSR-метода показал полное генетическое сходство между исследованными растениями *ex situ* и *in vitro*.

**Ключевые слова:** *Hyssopus officinalis* L., растения *ex situ*, регенерация *in vitro*, RAPD, ISSR, генетическая близость

**DOI:** 10.31857/S2686738921040065

*Hyssopus* L. – род многолетних трав или полукустарников [1], включающий, согласно “The Plant List” 7 видов и 3 подвида [2], которые естественным образом распространены в Южной Европе, Центральной Азии и Северной Африке [3]. В коллекциях *ex situ* иссоп (*Hyssopus officinalis* L.) в основном широко используется как ароматическое растение. Кроме того, благодаря ветрогонному, месячогонному, стимулирующему, дигестивному и тонизирующему действию растения иссопа используются в медицине. Компоненты, которые способствуют его целебным свойствам, включают: эфирное масло, состоящее в основном из пинокамфона, изопинокамфона, пиненов, камфена и терпенина; гликозид иссопин, дубильные вещества, флавоноиды, изолиновою кислоту, олеоноловую кислоту, маррубин, а также смо-

лу и камедь [4]. Иссоп является декоративным компонентом и, имея длительный период цветения и разнообразие окраски лепестков, применяется в ландшафтном дизайне [5, 6].

Традиционно иссоп размножают семенами [7], однако этот способ имеет некоторые ограничения для перспективных форм и сортов [8]. Увеличение количества клонов путем вегетативного размножения ограничивается слабым развитием корневой системы и высокой травматичностью полукустарников при разделении [9]. Размножение зелеными черенками, в зависимости от генотипа, также имеет определенные трудности при укоренении. Но данный тип размножения важен для сохранения продуктивных форм и сортов, а также для интенсификации производства необходимого количества посадочного материала. Биотехнологические методы в настоящее время позволяют массово размножить, изучить и сохранить полученные ценные единичные селекционные формы [10]. В Никитском ботаническом саду разработан эффективный метод регенерации *in vitro* растений иссопа и его форм из вегетативных органов и тканей, исключаящий этап каллусоге-

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН”, Ялта, Россия

\*e-mail: labgennbs@yandex.ru

неза [11]. Считается, что размножение растений *in vitro* указанным выше способом позволяет получить регенеранты, которые генетически идентичны материнским растениям [12]. Однако, согласно литературным данным, использование определенных концентраций регуляторов роста в питательной среде может привести к возникновению мутаций и генетической нестабильности [13]. Следовательно, для размножаемого ценного посадочного материала *in vitro* очень полезна оценка генетической близости [14].

Для исследования были взяты растения *Hyssopus officinalis* L. (сорт Никитский Белый), культивируемые *ex situ* на коллекционном участке Никитского ботанического сада. В качестве эксплантов использовали сегменты побега с узлом, которые стерилизовали последовательно в 70%-ном растворе этанола (1 мин), 1%-ном растворе тимеросала (10 мин), 0.3% растворе препарата “Дез ТАБ” (15 мин) и переносили на модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) [15], содержащую половинный набор макро-, и микроэлементов, полный состав витаминов, 30 г/л сахарозы, 9.0 г/л агара, 0.5–1.0 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0.1 мг/л  $\beta$ -индолилмасляной кислоты (ИМК). Контрольной была среда МС без регуляторов роста. Последующие субкультивирования проводили на питательной среде МС того же состава с 0.3–0.9 мг/л БАП. Питательные среды автоклавировали в паровом стерилизаторе LAC 5060S (Daihan Labtech, Южная Корея) при 120°C в течение 10 мин. Регуляторы роста, витамины пропускали через шприцевой фильтр (TRP, Switzerland) с диаметром пор 0.22 мкм и добавляли в питательные среды после автоклавирования. Субкультивирование на свежие питательные среды проводили каждые 3 нед. Экспланты в культуральных сосудах содержали в фитокапсуле Уникальной научной установки “ФИТОБИОГЕН” ФГБУН “НБС-ННЦ” или климатической камере MLR-352-PE (Panasonic, Япония) при температуре  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 16-часовом фотопериоде и интенсивности освещения  $37.5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$  под холодным белым светом люминесцентных ламп (Philips TL, Япония). Весь срок культивирования *in vitro* составил 6 мес.

ДНК выделяли из листьев 5 побегов растений *ex situ* и адвентивных микропобегов *in vitro* на образцах с применением одного из классических способов с цетилтриметиламмоний бромидом ( $2 \times$  ЦТАБ) [16] и 2%-м поливинилпирролидоном (ПВП). ПЦР проводили с использованием праймеров OPA1 5'-CAGGCCCTTC-3', OPA2 5'-TGC-CGAGCTG-3', OPA3 5'-AGTCAGCCAC-3', OPA4 5'-AATCGGGCTG-3' (RAPD-анализ) и UBC807 5'-(AG)<sub>8</sub>T-3', UBC818 5'-(CA)<sub>8</sub>G-3', UBC836 5'-(AG)<sub>8</sub>YA-3', GR215 5'-(CA)<sub>6</sub>GT-3', HB12 5'-(CAC)<sub>3</sub>GC-3', X10 5'-AGC(ACG)<sub>5</sub>C-3' (ISSR-ана-

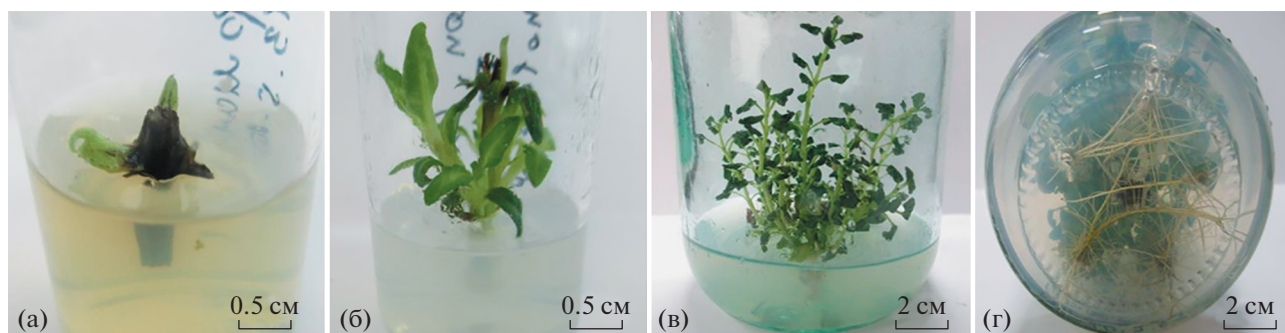
лиз) в термоциклере C1000™ (Bio-Rad, Сингапур). Условия реакции были следующими: начальная денатурация – 95°C – 5 мин, денатурация – 95°C – 15 с, отжиг – 36 и 45°C (RAPD и ISSR-анализ) – 20 с, элонгация – 72°C – 1 мин, итоговая элонгация – 72°C – 10 мин (40 и 45 циклов соответственно). В качестве молекулярного маркера использовали Step 100 Long (Биолаб-микс, РФ). Амплифицированные фрагменты анализировали при помощи горизонтального электрофореза в 1.7% агарозном геле с буфером 0.5  $\times$  TBE при 85 В в течение 1 ч с использованием универсального источника питания PowerPac™ (BioRad, Сингапур). Гель визуализировали с помощью системы документации E-box (Vilber Lourmat, Франция) и обрабатывали в программном обеспечении Image Lab™ версии 6.0 (BioRad, США). Эксперимент повторяли дважды, анализировали воспроизводимые полосы. Данные обрабатывали статистически с применением программного обеспечения Past [17].

Индущивными факторами развития эксплантов при культивировании *in vitro* являются тип и концентрация регуляторов роста в питательной среде [18]. Инициацию развития вегетативных почек иссопа *in vitro* на среде МС, дополненной 0.5–1.0 мг/л БАП и 0.1 мг/л ИМК, наблюдали на 8–10-е сутки культивирования (рис. 1).

Через 15 сут отмечали образование первых листьев. Через 21 сут культивирования формировался микропобег, в листовых пазухах которого закладывались аксиллярные почки. Наличие в среде БАП способствовало их развитию и образованию микропобегов второго порядка, которые отделяли и субкультивировали на среде МС, дополненной 0.3–0.9 мг/л БАП. Для оценки регенерационного потенциала микропобегов иссопа в культуре *in vitro* было проанализировано их число на эксплант (рис. 2).

Оптимальная концентрация БАП установлена на уровне 0.5 мг/л, при этом получено  $3.3 \pm 0.16$  нормально сформированных микропобегов на эксплант. Присутствие в среде 0.7–0.9 мг/л БАП способствовало увеличению количества микропобегов до  $4.5 \pm 0.18$  штук, при этом среди нормально сформированных органов и их структурных частей отмечали наличие различных морфологических изменений, таких как деформация, утолщение, срастание микропобегов, образование единичных непропорциональных листьев. Наличие в среде 0.3–0.4 мг/л БАП способствовало росту и удлинению микропобегов, их спонтанному укоренению, однако отмечали снижение интенсивности побегообразования.

Исследование генетической близости проводили между растениями, культивируемыми *ex situ* и регенерантами *in vitro*. Для скрининга использо-



**Рис. 1.** Этапы регенерации *in vitro* иссопа из сегментов узла на модифицированной среде МС, дополненной БАП: а – инициация развития микропобега на первичном экспланте; б – формирование микропобегов; в – множественное образование микропобегов; г – спонтанный ризогенез.

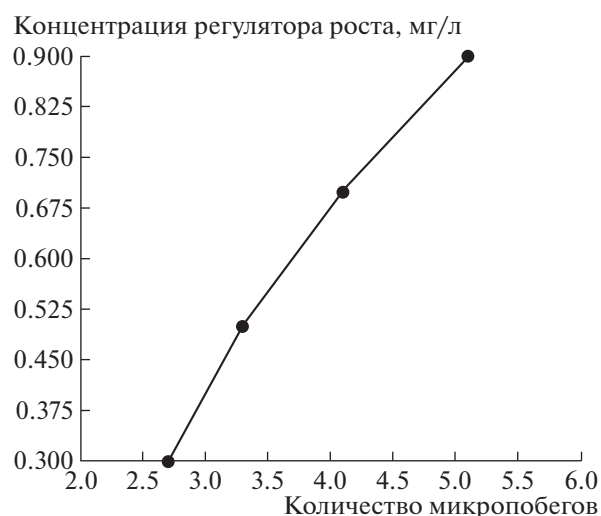
вали 4 праймера RAPD и 6 праймеров ISSR (рис. 3).

Все исследованные праймеры давали воспроизводимые полосы. Количество последних для RAPD и ISSR-маркеров варьировало от 6 (ОРА3) до 10 (ОРА1) и от 2 (UBC807) до 8 (GR215) соответственно. RAPD праймеры образовывали ампликоны в диапазоне от 260 пн (ОРА2) до 3000 и более пн (ОРА2), при этом длина продуктов амплификации в ISSR-PCR была меньше и варьировала в пределах от 250 по (НВ12) до 1750 по (Х10). Наши результаты показали, что праймеры продуцировали ампликоны, которые были мноморфными для всех исследованных растений *ex situ* и *in vitro*, полиморфизм между ними не обнаружен.

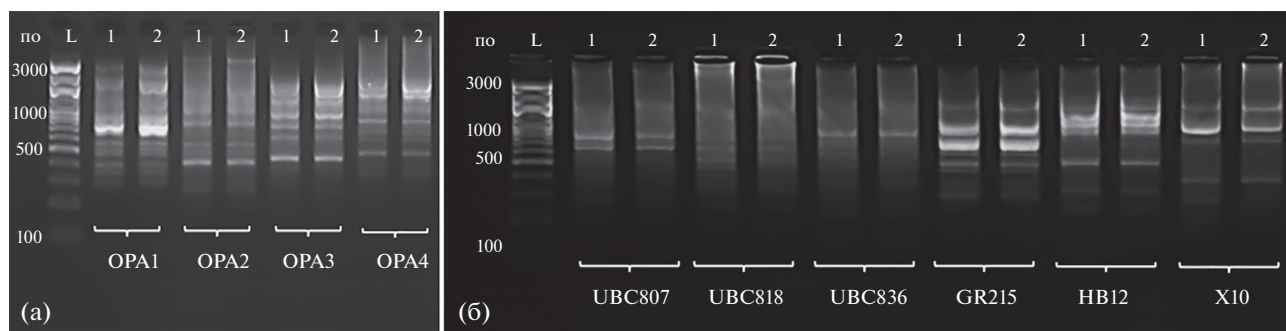
Процессы, протекающие при культивировании тканей *in vitro*, во многом регулируются компонентами питательной среды, их концентрацией и соотношением, а также другими механическими, физическими и химическими факторами [19, 20]. Регуляция процесса морфогенеза *in vitro* с помощью цитокининов и ауксинов лежит в основе клонального микроразмножения растений [18, 19]. На этапе множественного побегообразования необходимо стимулировать активно протекающие процессы дифференцировки вновь образуемых морфогенных структур. Чаще всего для этих целей используют питательные среды одного состава, изменяя концентрацию регуляторов роста. Наши результаты показали, что культивирование *in vitro* эксплантов иссопа на среде МС с добавлением 0.5 мг/л БАП способствовало формированию побегов без визуальных морфологических изменений, а также спонтанному укоренению, что исключало отдельный этап ризогенеза. Увеличение концентрации БАП наряду с ростом числа микропобегов способствовало появлению аномалий у органов растений, что может быть вызвано составом питательной среды, и ее влиянием на гистологию и анатомию образованных структур. Это вполне согласуется с данными литературы [4].

Сходство регенерантов, полученных *in vitro*, в первую очередь оценивается по морфологическим и анатомическим признакам, однако важнейшим является их генетический анализ. Наши исследования подтвердили, что клоны иссопа, полученные из пазушных почек, были идентичны материнским растениям, что согласуется с литературой [14], и свидетельствует об определенной генетической стабильности данного материала при субкультивировании *in vitro* на питательных средах с регуляторами роста.

Таким образом, полученные результаты четко показали, что регенерация *in vitro* *H. officinalis* сорта Никитский Белый из сегментов побега с узлом на модифицированной среде МС с добавлением 0.5 мг/л БАП и 0.1 мг/л ИМК позволила получить регенеранты/клоны с нормальной морфологией, генетически идентичные материнским растениям *ex situ*, что очень важно для разработки



**Рис. 2.** Влияние различных концентраций БАП в питательной среде МС на регенерацию микропобегов *Hyssopus officinalis* сорта Никитский Белый *in vitro*.



**Рис. 3.** Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами RAPD (а), ISSR (б) и ДНК, выделенной из листьев растений *Hyssopus officinalis* сорта Никитский Белый, культивируемых *ex situ* (1) и *in vitro* (2). М – маркер, по – пары оснований.

биотехнологических приемов массового тиражирования ценных генотипов, сортов и селекционных форм растений.

#### БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность заведующей Лабораторией ароматических и лекарственных растений ФГБУН “НБС-ННЦ”, главному научному сотруднику, д.б.н., О.М. Шевчук и научному сотруднику С.А. Феськову за предоставленный растительный материал *H. officinalis* сорта Никитский Белый *ex situ*.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования выполнены в рамках Государственного задания № 0829-2019-0038 ФГБУН “НБС-ННЦ” на базе Уникальной научной установки “Научный центр биотехнологии, геномики и депонирования растений” (УНУ “ФИТОБИОГЕН”).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей работы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mutu A., Clapco S., Martea R., et al. // Analele Științifice ale Universității “Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară. 2014. V. 15. P. 1–8.
- The Plant List. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Hyssopus>
- Ablizl P., Cong Y., Musa M., et al. // Chemistry of Natural Compounds. 2009. V. 45. № 3. P. 445.
- Toma I., Toma C., Ghiorghita G. // Acta Bot. Croat. 2004. V. 63. № 1. P. 59–68.
- Калиниченко Л.В. // Цветоводство. 2012. № 6. С. 2–3.
- Чернявских В.И. // Таврический вестник аграрной науки. 2018. Вып. 3. № 15. С. 137–146.
- Nanova Z., Slavova Y., Nenkova D., et al. // Bulg. J. Agric. Sci. 2007. V. 13. P. 213–219.
- Калиниченко Л.В., Маланкина Е.Л., Пржевальский Н.М., и др. // Картофель и овощи. 2013. № 8. С. 18–19.
- Беспалько Л.В., Харченко В.А., Шевченко Ю.П., и др. // Овощи России. 2016. Т. 2. № 31. P. 60–63.
- Mitrofanova I.V., Brailko V.A., Grebennikova O.A., et al. // Acta Horticulturae. 2018. V. 1224. P. 101–107.
- Митрофанова И.В., Иванова Н.Н., Митрофанова О.В. Способ регенерации микропобегов *Hyssopus officinalis* L. в условиях *in vitro*. Патент РФ на изобретение № 0002529837. 27.09.2014. Бюл. № 27. Режим доступа: <https://edrid.ru/rid/216.012.fa00.html>.
- Pugliesi C., Cecconi F., Mandolfo A., et al. // Plant Breeding. 1991. V. 106. № 2. P. 114–121.
- Al-Qurainy F., Nadeem M., Khan S. // Saudi J. Biol. Sci. 2018. V. 25. № 1. P. 111–116.
- Tiwari J.K., Chandel P., Gupta S., et al. // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2013. V. 19. № 4. P. 587–595.
- Murashige T., Skoog F. // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473–497.
- Супрун И.И., Токмаков С.В., Степанов И.В., и др. // Научные Труды СКФНЦСВВ. 2019. Т. 23. С. 31–39.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. // Palaeontol. Electron. 2001. V. 4. № 1. P. 1–9.
- Бутенко П.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964.
- Bhojwani S.S., Dantu P.K. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. – New Delhi, Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer, 2013.
- Bulavin I.V., Brailko V.A., Zhdanova I.V. // BIO Web of Conferences. 2020. V. 24. 00017.

***In vitro* REGENERATION OF *Hyssopus officinalis* L.  
AND PLANT GENETIC SIMILARITY****I. V. Bulavin<sup>a, #</sup>, N. N. Ivanova<sup>a</sup>, and Corresponding Member of the RAS I. V. Mitrofanova<sup>a</sup>**<sup>a</sup> *Federal State Funded Institution of Science "The Labor Red Banner Order Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS", Yalta, Russian Federation*<sup>#</sup> *e-mail: labgennbs@yandex.ru*

Biotechnological methods are an essential component of plant genetic resources investigation that allow both to preserve a rare natural plant and useful selection genotypes, especially essential oil bearing plants used in medicine, perfume, food etc. In the clonal micropropagation *in vitro*, the key moment is to retain genetic stability of *in vitro* material. It is considered that plant regeneration *in vitro* from meristem or vegetative buds gives identical clones, but the effect of the medium growth regulators on the genetic stability of *in vitro* plant material is discussed. Therefore, the objective of our work was to evaluate the genetic similarity of *ex situ* and *in vitro* plants. Investigation was performed on *Hyssopus officinalis* L. cv. Nikitskiy Belyi (NBG selection). Regeneration from the shoot single-node segments on the modified Murashige and Skoog culture medium (MS) supplemented with 6-Benzylaminopurine (BAP) in concentration 0.3–0.9 mg/L and 0.1 mg/L Indole-3-butyric acid (IBA) was carried out. It was established, that application of 0.5 mg/L BAP was sufficient for the organ formation and development without morphological deviations. Genetic analysis based on RAPD and ISSR-PCR had shown full genetic similarity of the investigated *ex situ* and *in vitro* plants.

*Keywords: Hyssopus officinalis* L., *ex situ* plants, *in vitro* regeneration, RAPD, ISSR, genetic similarity