

***Hyssopus officinalis* in vitro: анатомия, плоидность,
генетическое сходство, компонентный состав эфирного масла**

Булавин И.В.* , к.б.н., с.н.с., зав. лабораторией; Иванова Н.Н., к.б.н., с.н.с.;
Мирошниченко Н.Н., к.б.н., н.с.; Саплев Н.М., м.н.с.; Феськов С.А., н.с.;
Пономаренко А.В., инж.-исслед.; Солдатов Д.К., лаб.-исслед.; Калмыкова Д.И.,
лаб.-исслед.; Конобеев В.Д., лаб.-исслед.

ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр РАН», Ялта, Россия

*email: cellbiolnbs@yandex.ru

В работе исследованы анатомия, плоидность, генетическое сходство и компонентный состав эфирного масла *Hyssopus officinalis* 'Никитский Белый' *in vitro* в сравнении с растениями *ex situ*. Показано, что культивирование микропобегов на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга при введении оптимальных концентрации 6-бензиламинопурина способствует их нормальному развитию при наличии структурных изменений, связанных со специфическими условиями *in vitro*. Изменения уровня плоидности выявлены не были. Применение молекулярных маркеров показало генетическую идентичность микропобегов *in vitro* после 12 месяцев культивирования в сравнении с растениями *ex situ*. Выход эфирного масла и его компонентный состав у регенерантов и материнских растений был сходен. Разработанный протокол для клонального микроразмножения *Hyssopus officinalis* 'Никитский Белый' обеспечивает получение клонов, идентичных растениям *ex situ*.

Ключевые слова: световая микроскопия, проточная цитометрия, молекулярные маркеры, гидродистилляция, газовая хроматография.

***Hyssopus officinalis* in vitro: anatomy, ploidy level, genetic identity,
and essential oil component composition**

Bulavin I.V., Ivanova N.N., Moroshnichenko N.N., Saplev N.M., Feskov S.A.,
Ponomarenko A.V., Soldatov D.K., Kalmykova D.I., Konobeev V.D.

Federal State Funded Institution of Science "The Labor Red Banner Order Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS", Yalta, Russia

*email: cellbiolnbs@yandex.ru

An anatomy, ploidy level, genetic identity, and component composition of the essential oil of *Hyssopus officinalis* 'Nikitskiy Beliy' *in vitro* in comparison with *ex situ* plants are described in the work. It has been shown that the cultivation of microshoots on the modified Murashige-Skoog nutrient medium with the optimal concentrations of

6-benzylaminopurine promoted their normal development in the presence of structural changes associated with specific in vitro conditions. No changes in ploidy level were detected. The use of molecular markers showed the genetic identity of microshoots in vitro after 12 months of cultivation in comparison with ex situ plants. The yield of essential oil and its component composition in regenerants and mother plants was similar. The developed protocol for clonal micropropagation of Hyssopus officinalis 'Nikitskiy Beliy' promotes the production of clones identical to ex situ plants.

Keywords: light microscopy, flow cytometry, molecular markers, hydrodistillation, gas chromatography.

Производство лекарственных растений с использованием технологии *in vitro* стало популярным благодаря потребительскому спросу, подготовке значительного количества материала за короткий период времени, стабильному обеспечению здоровыми элитными генотипами, а также сохранению растений [7]. Иссоп лекарственный (*Hyssopus officinalis* L.) широко используется как ароматическое и лекарственное растение [10]. К настоящему времени имеются данные о различных способах клонального микроразмножения *H. officinalis*. При этом подчеркивается актуальность подобных исследований для дальнейшей оптимизации процесса [8]. При размножении растений в культуре *in vitro* могут наблюдаться структурные [9, 10, 12] и генетические изменения [4, 11, 13]. Также отмечается важность неизменного состава вторичных метаболитов после клонального микроразмножения для лекарственных растений как источника биологически активных веществ [4]. Поэтому целью работы было исследование анатомического строения материала *in vitro*, уровня плоидности, генетического сходства с материнскими растениями и компонентного состава эфирного масла регенерантов *ex vitro*.

Культивирование микропобегов *H. officinalis* 'Никитский Белый', индукцию ризогенеза и адаптацию регенерантов *ex vitro* проводили согласно опубликованным методам [5, 6]. Подготовку листьев и стеблей к анатомическим исследованиям, а также изготовление срезов, их окрашивание, заключение и исследование выполняли общепринятым способом [2], и методике, разработанной ранее [6]. Исследование уровня плоидности проводили на свежем материале как указано в работе Yu.V. Plugatar с соавторами [10]. Тотальную ДНК выделяли из молодых неповрежденных листьев растений *ex situ* и микропобегов *in vitro* классическим способом [3, 5]. ПЦР выполняли с применением набора БиоМастер HS-Taq ПЦР (2×) (Биолабмикс, РФ) [5], RAPD,- ISSR-, SRAP-праймерами [5, 14] и ДНК в концентрации 20 нг. Амплификацию проводили в термоциклере C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Сингапур). Условия для RAPD,- ISSR-, SRAP-ПЦР были аналогичны опубликованным ранее [5, 14]. Массовую долю эфирного

масла определяли методом гидродистилляции на аппаратах Гинзберга [1] в свежесобранном сырье материнских растений *ex situ* и регенерантов *ex vitro* после 6 мес культивирования *in vitro*, адаптации и трех лет культивирования в условиях открытого грунта. Компонентный состав эфирных масел устанавливали с помощью аппаратно-программного комплекса на базе хроматографа «Хроматэк-Кристалл 5000.2», оснащённого масс-спектрометрическим детектором [10].

Исследована структура листовых пластинок побегов *H. officinalis* ‘Никитский Белый’ *ex situ* и микропобегов *in vitro*. Согласно полученным данным на поперечных срезах листьев *ex situ* в области центральной жилки (рис. 1, А) дифференцировали эпидерму с кутикулой, несколько субэпидермальных слоев колленхимы в верхней и нижней частях, овальный проводящий пучок, состоящий из ксилемы и флоэмы, клетки паренхимы. В боковой части листа (см. рис. 1, В) различали эпидерму с кутикулой, столбчатый и губчатый мезофилл, в котором выделяли боковые жилки. Листья микропобегов *in vitro* имели сходное строение (см. рис. 1, Б, Г). При этом отмечены некоторые качественные изменения: меньшее развитие кутикулярного слоя, колленхимы, проводящего пучка, в частности количества элементов ксилемы и флоэмы.

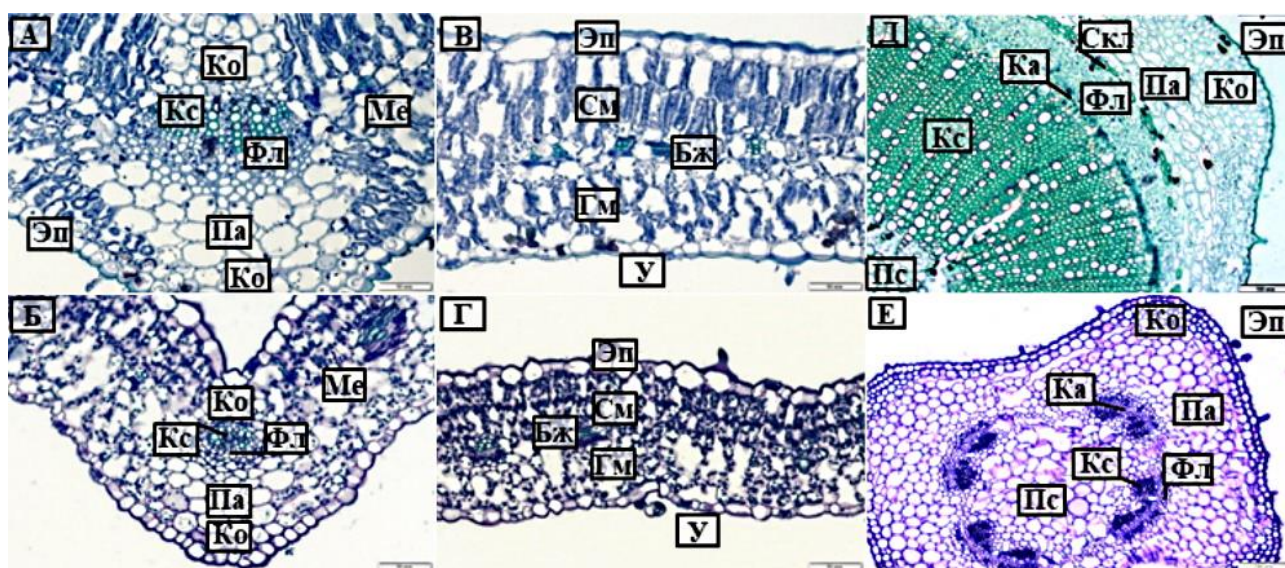


Рис. 1. Поперечные срезы вегетативных органов *Hyssopus officinalis* ‘Никитский Белый’ *ex situ* (А, В, Д) и *in vitro* (Б, Г, Е): Бж – боковая жилка, Гм – губчатый мезофилл, Ко – колленхима, Ка – камбий, Кс – ксилема, Ме – мезофилл, Па – паренхима, Пс – паренхима сердцевины, Скл – склеренхима, См – столбчатый мезофилл, У – устьице, Фл – флоэма, Эп – эпидерма (световая микроскопия)

Молодые стебли растений *ex situ* *H. officinalis* ‘Никитский Белый’ имели непучковый тип строения, на поперечных срезах были прямоугольной формы (рис. 1, Д). На поверхности имелись кроющие и железистые трихомы. Снаружи стебли были покрыты однорядной эпидермой, представленной плотно сомкнутыми клетками овальной или округлой формы, с утолщенными тангентальными

клеточными стенками, покрытыми кутикулой. Первичная кора состояла из колленхимы, паренхимы и эндодермы. Между ребрами было 2–3 слоя колленхима, в ребрах – 5–6 слоев. Паренхимные клетки имели овальную форму (3–5 слоев). Эндодерма была представлена овальными тонкостенными клетками. Центральный цилиндр состоял из перицикла, в котором наблюдали участки склеренхимы, первичной и вторичной флоэмы, камбиальной прослойки, первичной и вторичной ксилемы, паренхимы сердцевины с большими округлыми и овальными клетками (рис. 2, А).

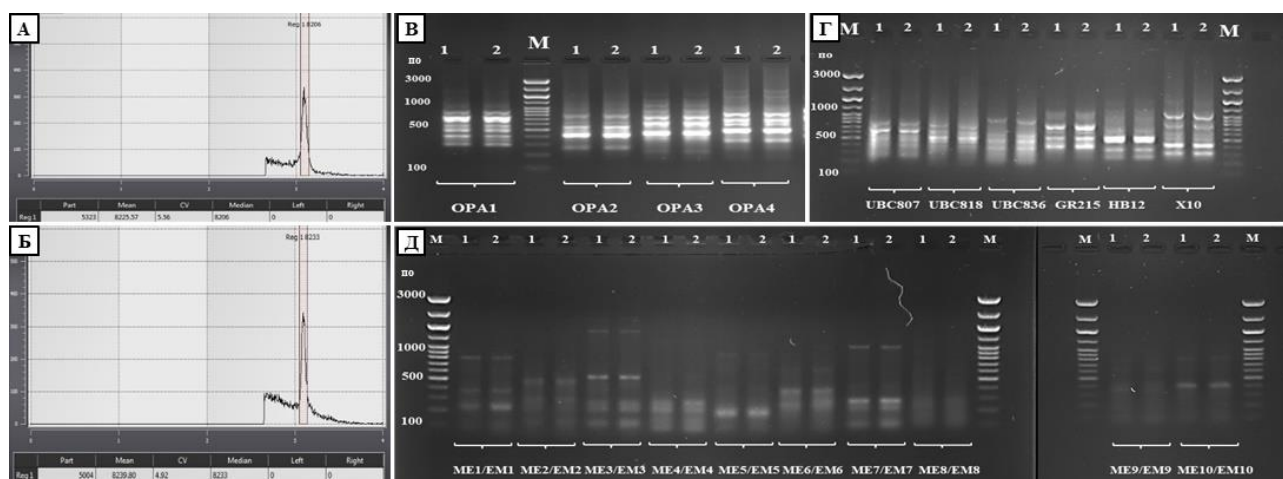


Рис. 2. Гистограммы плоидности ядер (А – внешний контроль, Б – *Hyssopus officinalis*) и электрофореграммы продуктов амплификации с праймерами RAPD (В), ISSR (Г), SRAP (Д) и ДНК, выделенной из листьев растений *Hyssopus officinalis* ‘Никитский Белый’ *ex situ* (1) и микропобегов *in vitro*, после 12 месяцев культивирования (2). М – маркер, по – пары оснований

В отличие от стеблей *ex situ*, у микростеблей *in vitro* выявлен пучковый и непучковый тип строения, что зависило от времени формирования органов. Эпидерма характеризовалась меньшим развитием кутикулярного слоя, колленхима в первичной коре между ребрами формировала один слой клеток в ребрах – 2–3 слоя. При пучковом строении под перициклом наблюдали открытые коллатеральные проводящие пучки, состоящие из элементов флоэмы и ксилемы, межпучковая зона и сердцевина были представлены паренхимой (см. рис. 1, Е). При непучковом типе строения в области перицикла наблюдали отдельные группы склеренхимы, затем проводящие ткани (первичную и вторичную флоэму и ксилему), которые формировали кольцо. Отмечали образцы микростеблей, в центре которых формировалась полость.

Анализ плоидности ядер тканей листовых пластинок микропобегов *H. officinalis* ‘Никитский Белый’ (см. рис. 2, Б) после 12 месяцев культивирования *in vitro* не выявил изменений. Согласно полученным данным, пики на гистограммах, сформированные на основе интенсивности флюоресценции соответствовали диплоидному материалу.

При амплификации участков ДНК, выделенной из листьев микропобегов *H. officinalis* 'Никитский Белый' после одного года культивирования *in vitro* с применением RAPD-, ISSR-, и SRAP-праймеров показана мономорфность полос, генетические несоответствия выявлены не были, в сравнении с образцами ДНК, полученными от растений *ex situ* (см. рис. 2, В, Г, Д).

Проведен анализ эфирного масла растений *ex situ* и регенерантов *ex vitro*. Согласно полученным данным, массовая доля эфирного масла в материнских растениях и регенерантах *ex vitro* составила 0,33 и 0,30 % соответственно от сырой массы. Доминирующими компонентами в образцах были бициклические монотерпеновые кетоны, такие как пинокамфон (43,72 и 43,30 %) и изопинокамфон (24,97 и 25,88 %). Минорные компоненты, включая миртенол (5,24 и 5,09 %), β-пинен (4,20 и 4,70 %), элемол (4,57 и 4,40 %), бициклогермакрин (4,60 и 3,66 %), варьировали незначительно.

Исследования показали наличие структурных изменений в микропобегах *Hyssopus officinalis* 'Никитский Белый', связанных с особенностями культивирования и омоложением *in vitro*. Материал остается диплоидным и генетически идентичным растениям *ex situ*. Выход и компонентный состав эфирного масла регенерантов *ex vitro* остается подобным материнским организмам. Полученные результаты демонстрируют эффективность разработанного протокола для клонального микроразмножения *Hyssopus officinalis* 'Никитский Белый'.

Финансирование: исследование выполнено в рамках Государственного задания НБС-ННЦ № 1023041300067-1-4.1.1 (FNNS 2024-0004).

Список литературы

- 1 Интродукция и селекция ароматических и лекарственных растений (Методологические и методические аспекты) / В.П. Исиков, В.Д. Работягов, Л.А. Хлыпенко, И.Е. Логвиненко, Л.А. Логвиненко, С.П. Кутько, Н.Н. Бакова, Н.В. Марко. Ялта: НБС–ННЦ, 2009. 110 с.
- 2 Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятое А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. М.: Изд-во МГУ, 2004. 312 с.
- 3 Супрун И.И., Маляровская В.И., Степанов И.В., Самарина Л.С. IRAP-анализ для оценки генетической стабильности эндемичных и исчезающих видов флоры Западного Кавказа в коллекции *in vitro* // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23. № 1. С. 8–14.
- 4 Abdolinejad R., Shekafandeh A., Jowkar A., Gharaghani A., Alemzadeh A. Indirect regeneration of *Ficus carica* by the TCL technique and genetic fidelity evaluation of the regenerated plants using flow cytometry and ISSR // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2020. V. 143. № 1. P. 131–144.
- 5 Bulavin I.V., Ivanova N.N., Mitrofanova I.V. *In vitro* regeneration of *Hyssopus officinalis* L. and plant genetic similarity // Doklady Biological Sciences. 2021. V. 499. № 1. P. 109–112.

- 6 Bulavin I.V., Ivanova N.N., Miroshnichenko N.N., Saplev N.M., Feskov S.A. Anatomy, ploidy level, and essential oil composition of *Hyssopus officinalis* 'Nikitskiy Beliy' *in vitro* and *ex situ* // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2023. V. 184. № 4. P. 21–30.
- 7 Martins J.P.R., Rodrigues L.C.D.A., Conde L.T., Gontijo A.B.P.L., Falqueto A.R. Anatomical and physiological changes of *in vitro*-propagated *Vriesea imperialis* (Bromeliaceae) in the function of sucrose and ventilated containers // Plant Biosystems. 2020. V. 154. № 1. P. 87–99.
- 8 Maslova E., Gulya N., Perelugina T., Semykina V., Kalashnikova E. Introduction of *Hyssopus officinalis* L. into *in vitro* culture to optimize the conditions for obtaining callus tissues and microclonal propagation as a promising method of innovative agrobiotechnologies // BIO Web of Conferences. 2021. V. 30. 05006.
- 9 Mishra M.K., Pandey S., Misra P., Niranjana A. *In vitro* propagation, genetic stability and alkaloids analysis of acclimatized plantlets of *Thalictrum foliolosum* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2020. V. 142. № 3. P. 441–446.
- 10 Plugatar Y.V., Bulavin I.V., Ivanova N.N., Miroshnichenko N.N., Saplev N.M., Shevchuk O.M., Feskov S.A., Naumenko T.S. Study of the component composition of essential oil, morphology, anatomy and ploidy level of *Hyssopus officinalis* f. *cyaneus* Alef // Horticulturae. 2023. V. 9. № 4. 480.
- 11 Raji M.R., Farajpour M. Genetic fidelity of regenerated plants via shoot regeneration of muskmelon by inter simple sequence repeat and flow cytometry. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 2021. V. 20. № 2. P. 88–93.
- 12 Rohela G.K., Saini P. Molecular techniques for the detection of ploidy level and genetic fidelity of regenerated plantlets // Genome size and genetic homogeneity of regenerated plants: methods and applications / Mujib A. (eds.) – Sharjah: Bentham Science, 2023. P. 294–326.
- 13 Sliwinska E., Thiem B. Genome size stability in six medicinal plant species propagated *in vitro* // Biologia Plantarum. 2007. V. 51. № 3. P. 556–558.
- 14 Zagorcheva T., Rusanov K., Rusanova M., Aneva I., Stancheva I., Atanasov I. Genetic and flower volatile diversity in two natural populations of *Hyssopus officinalis* L. in Bulgaria // Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2020. V. 34. № 1. P. 1265–1272.

DOI 10.18699/GPB2024-20

Множественные источники геномов органелл культурного гороха (*Pisum sativum* L. subsp. *sativum* s.l.)

Булгакова В.С., д.б.н., Шацкая Н.В., к.б.н., Костерин О.Э.*, д.б.н., Васильев Г.В., к.б.н.

ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

*email: kosterin@bionet.nsc.ru

Ранее мы обнаружили, что образцы дикого гороха, наиболее родственные сорту Сатеор в отношении пластидных и митохондриальных геномов, представляют собой два разных набора образцов, происходящих из разных регионов, а филогенетические паттерны геномов пластид и митохондрий дикого гороха не совпадают. В данной работе мы просеквенировали эти геномы у 91 образца