

УДК 633.81:58.085

СТРУКТУРНАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ, КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ ЭФИРНОГО МАСЛА ФОРМ *HYSSOPUS OFFICINALIS* *IN VITRO* И *EX SITU*

**И.В. Булавин, Н.Н. Мирошниченко, Н.М. Саплев, С.А. Феськов, Д.К. Солдатов,
В.Д. Конобеев, Д.И. Калмыкова, Н.Н. Иванова**

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Ялта, Россия

В работе представлены результаты структурных исследований, анализа уровня ploidy, генетического сходства *Hyssopus officinalis in vitro* в сравнении с растениями *ex situ*, а также данные о компонентном составе эфирного масла регенерантов *ex vitro*. Установлены вариации количества поверхностных структур листовых пластинок, качественные и количественные анатомические изменения органов, а также структурные перестройки при повышенных концентрациях 6-бензиламинопурина. Показано отсутствие геномных и генетических изменений, вариаций в компонентном составе эфирного масла.

Ключевые слова: иссоп лекарственный, культура *in vitro*, анатомия, ploidy, ПЦР-анализ, газовая хроматография.

STRUCTURAL AND GENETIC STABILITY, ESSENTIAL OIL COMPONENT COMPOSITION OF THE *HYSSOPUS OFFICINALIS* FORMS *IN VITRO* AND *EX SITU*

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

Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS, Yalta, Russia

The paper presents the results of the structural investigation, ploidy level, and genetic similarity analysis of *Hyssopus officinalis in vitro* compared with *ex situ* plants, as well as data on the component composition of the essential oil of regenerants *ex vitro*. Variations in the number of leaf surface structures, qualitative and quantitative anatomical changes in organs, and structural changes at 6-benzylaminopurine elevated concentrations were established. The absence of genomic and genetic changes and variations in the component composition of the essential oil was shown.

Keywords: common hyssop, *in vitro* culture, anatomy, ploidy level, PCR-analysis, gas chromatography.

Иссоп лекарственный (*Hyssopus officinalis* L.) является перспективным эфиромасличным, пряно-ароматическим, лекарственным растением-интродуцентом, родина которого – Средиземноморье. В культуре и природе растение встречается в Западной Европе, Северной Америке, Европейской части России, предгорье Алтая. Растительное сырье и эфирное масло иссопа используют в фармации, парфюмерии и пищевой отрасли [10]. *H. officinalis* обладает превосходными фитонцидными свойствами, является ценным медоносом. Это растение используется в народной медицине для лечения различных заболеваний, таких как бактериальные и грибковые инфекции, астма, а также кашле, потере аппетита, спазмах и поранениях. Во Франции, Португалии, Румынии, Швеции и Германии *H. officinalis* включен в официальные фармакопеи и также активно используется в пищевой промышленности [8].

Производство лекарственных растений с использованием технологии *in vitro* стало популярным из-за их востребованности, возможности обеспечить необходимый выход материала за короткий период времени, стабильности получения здоровых элитных генотипов,

а также сохранению растений [12]. Тем не менее, при размножении растений в культуре *in vitro* могут наблюдаться структурные [11-13], геномные и генетические изменения [2, 14, 16]. Более того, отмечается важность неизменного состава вторичных метаболитов после клонального микроразмножения для лекарственных растений как источника биологически активных веществ [16]. Поэтому целью работы было исследование анатомического строения *H. officinalis in vitro*, уровня плоидности, генетического сходства с материнскими растениями и компонентного состава эфирного масла регенерантов *ex vitro*.

Культивирование микропобегов *H. officinalis* ‘Никитский Белый’ (f. *albus*), f. *ruber* и f. *cyaneus*, индукцию ризогенеза и адаптацию регенерантов *ex vitro* проводили согласно опубликованным методам [6, 7]. Подготовку растительного материала к анатомическим исследованиям выполняли общепринятым способом [3], а также согласно методике, разработанной ранее [7]. Анализ уровня плоидности проводили на свежем материале [15]. Тотальную ДНК выделяли из молодых неповрежденных листьев растений *ex situ* и микропобегов *in vitro* классическим способом [4]. ПЦР выполняли с применением набора БиоМастер HS-Таг ПЦР (2×) (Биолабмикс, РФ), RAPD,- ISSR-, SRAP-праймерами [6, 17] 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 [6, 17]. Массовую долю эфирного масла определяли методом гидродистилляции на аппаратах Гинзберга [1] в свежесобранном сырье материнских растений *ex situ* и регенерантов *ex vitro* после 6 месяцев 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», оснащенного масс-спектрометрическим детектором [15].

Лист является основным вегетативным органом растения, обеспечивающим образование ассимилятов, способствующих дальнейшему росту и развитию организма. Поскольку давно известна связь структуры органа с выполняемыми им функциями, можно предположить, что изменения анатомии листовой пластинки могут влиять и на ее функциональность.

Исследования поверхности листовых пластинок *H. officinalis* f. *albus*, f. *ruber* и f. *cyaneus ex situ* показали, что листья амфистоматические, при этом на абаксиальной поверхности количество устьиц больше. Кроющие, железистые трихомы и пельтатные железки обнаруживали как на адаксиальной, так и на абаксиальной сторонах.

При культивировании микропобегов *H. officinalis* ‘Никитский Белый’ и двух форм *in vitro* листья остаются амфистоматическими, на абаксиальной поверхности сохраняется преобладающее количество устьиц, большая часть которых открыты. Следует отметить тенденцию к снижению их количества, в сравнении с таковым на поверхности листовых пластинок микропобегов *ex situ*. Количество кроющих трихом увеличивается, в то время как число пельтатных железок уменьшается.

При адаптации амфистоматичность, соотношение устьиц, а также формирование разного типа кроющих и железистых структур на поверхности листовых пластинок также сохраняется. Количественный анализ (данные не представлены) выявил снижение числа устьиц, в сравнении с таковым листовых пластинок побегов и микропобегов *ex situ* и *in vitro*, соответственно. На данном этапе клонального микроразмножения отмечается большая закрытость устьичного аппарата. Количество кроющих трихом меньше, чем на поверхности листовых пластинок микропобегов *in vitro*, однако сравнительно больше, чем на поверхности листьев побегов *ex situ*. Число пельтатных железок увеличивается, сравнительно с материалом *in vitro*, однако ниже, чем у листьев *ex situ*.

При анализе структуры листовых пластинок *H. officinalis* ‘Никитский Белый’ и f. *cyaneus ex situ* на поперечных срезах в области центральной жилки (рис. 1, А) выделяли эпидерму, клетки которой на внешней тангентальной стороне были покрыты кутикулой, несколько субэпидермальных слоев колленхимы в верхней и нижней частях, овальный проводящий пучок,

состоящий из ксилемы и флоэмы, клетки паренхимы. В боковой части листа (рис. 1, Б) различали эпидерму, также покрытую кутикулой, столбчатый и губчатый мезофилл. Листья микропобегов *in vitro* при введении оптимальных концентраций регулятора роста (0,3-0,5 мг/л 6-БАП) имели сходное строение (рис. 1, В, Г). При этом отмечены некоторые качественные изменения: меньшее развитие кутикулярного слоя, колленхимы, проводящего пучка, в частности количества элементов ксилемы и флоэмы. Исследования количественных показателей *H. officinalis* f. *cyaneus ex situ* и *in vitro* (данные не представлены) показали статистически достоверное уменьшение высоты среза листа в области центральной жилки и боковой части, высоты и ширины клеток верхней эпидермы, столбчатого и губчатого мезофилла.

При культивировании *H. officinalis* f. *cyaneus* на питательной среде с 0,8 мг/л 6-БАП (рис. 1, Д, Е) отмечали слабое развитие колленхимы, варианты с тангентально вытянутой центральной жилкой, увеличение количества слоев губчатого мезофилла. Исследования количественных анатомических показателей на поперечных срезах листовых пластинок (данные не представлены) выявили статистически достоверное увеличение линейных значений исследованных показателей на среде, содержащей 0,8 мг/л 6-БАП, сравнительно с таковой, дополненной 0,4 мг/л 6-БАП, а также листьев побегов *ex situ*.

Строение листьев регенерантов *ex vitro* рассмотрено нами на примере *H. officinalis* f. *ruber*. Показано, что общий план строения листовых пластинок *ex vitro* был подобен таковому *ex situ* (рис. 1, Ж, З). При этом отмечали снижение степени развития кутикулярного слоя и клеток колленхимы. Исследования количественных анатомических показателей на поперечных срезах листовых пластинок (данные не представлены) выявили статистически достоверное уменьшение высоты листа в области центральной жилки и его боковой части, размеров клеток верхней и нижней эпидермы, проводящего пучка, высоты губчатого и столбчатого мезофилла.

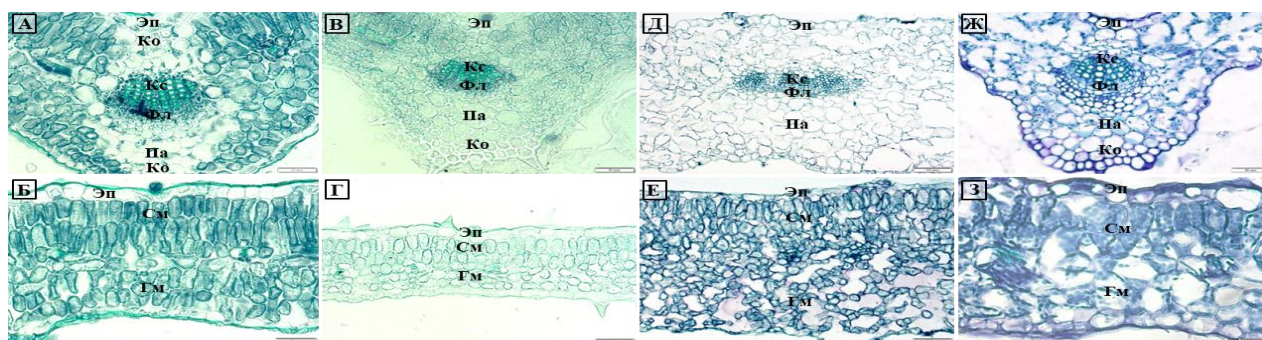


Рис. 1. Поперечные срезы листовых пластинок *Hyssopus officinalis ex situ* (А, Б) *in vitro* (В-Е) и *ex vitro* (Ж, З). Гм – губчатый мезофилл, Ко – колленхима, Кс – ксилема, Па – паренхима, См – столбчатый мезофилл, Фл – флоэма, Эп – эпидерма.

В культуре *in vitro* влиянию может подвергаться геном растительного материала, т.е. происходить соматональная изменчивость – спонтанный мутагенез [14]. На уровень плоидности материала, в определенной степени влияют различные факторы: способ индукции морфогенеза (прямой/непрямой), тип экспланта (семядоли, гипокотили, настоящие листья, корни) [9], тип/ы регулятора/ов роста, его/их концентрация и соотношения [5], а также срок культивирования [15].

Нами показано, что при непродолжительном культивировании микропобегов *H. officinalis* ‘Никитский Белый’ на модифицированной питательной среде МС с оптимальной концентрацией 6-БАП изменения уровня плоидности выявлены не были. Подобные результаты также получены для микропобегов *H. officinalis* f. *cyaneus*, субкультивируемых *in vitro* в течение пяти месяцев на среде того же состава, дополненной 6-БАП в концентрации 0,3 мг/л. При анализе ядер из образцов листьев витрифицированного материала *H. officinalis* f. *cyaneus in vitro* на питательной среде МС с повышенной концентрацией 6-БАП (0,8 мг/л), изменения искомого параметра в

сравнении с образцами, полученными от растений *ex situ*, не выявлены. У *H. officinalis* f. *ruber ex vitro* и внешнего контроля *Ficus benjamina* на гистограммах, при исследовании образцов ядер выделяли основной пик флюоресценции, соответствующий фазам G0/G1 (2C), и следующий за ним малый – G2 (4C). Материал оставался диплоидным. Анализ плоидности ядер тканей листовых пластинок микропобегов *H. officinalis* ‘Никитский Белый’ после 12 месяцев культивирования *in vitro* также не выявил изменений. 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* (рис. 2).

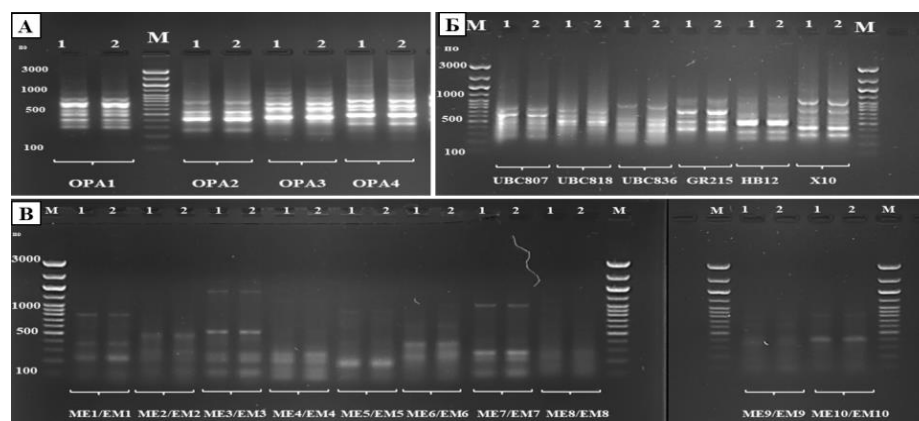


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации с праймерами RAPD (А), ISSR (Б), SRAP (В) и ДНК, выделенной из листьев растений *Hyssopus officinalis* ‘Никитский Белый’ *ex situ* (1) и микропобегов *in vitro*, после 12 месяцев культивирования (2). М – маркер, по – пары оснований.

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%), бициклогермакрен (4,60 и 3,66%), варьировали незначительно.

Результаты исследований показали, что при культивировании микропобегов *H. officinalis* на питательных средах МС с оптимальным содержанием 6-БАП на листовых пластинках происходит формирование всех поверхностных структур, при этом их количество может меняться в зависимости от этапа клонального микроразмножения. Структура листовой пластинки *in vitro* и *ex vitro* имеет общность строения, сравнительно с таковой *ex situ*, однако у первых двух обнаруживаются качественные и количественные вариации линейных показателей. Увеличенные концентрации 6-БАП способствуют развитию витрификации и структурных перестроек листового аппарата. Вне зависимости от концентрации регулятора роста материал *in vitro* остается диплоидным. При оптимальных значениях 6-БАП генетические изменения с использованием RAPD-, ISSR-, и SRAP-ПЦР не выявлены. Выход и компонентный состав эфирного масла регенерантов *ex vitro* остается подобным материнским организмам. Полученные результаты демонстрируют эффективность разработанного протокола для клонального микроразмножения *H. officinalis*.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках Государственного задания НБС-ННЦ №1023041300067-1-4.1.1 (FNNS 2024-0004).

Библиографический список

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–НИЦ, 2009. 110 с.
2. Крицкая Т.А., Кашин А.С., Касаткин М.Ю. Микроразмножение и соматклональная изменчивость *Tulipa suaveolens* (Liliaceae) *in vitro* // Онтогенез. 2019. Т. 50. № 4. С. 270–277.
3. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. М.: Изд-во МГУ, 2004. 312 с.
4. 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.
5. Bairu M.W., Aremu A.O., Van Staden J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods // Plant Growth Regulation. 2011. V. 63. P. 147–173.
6. 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.
7. 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 Belyi’ *in vitro* and *ex situ* // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2023. V. 184. № 4. P. 21–30.
8. Eshboev F., Karakozova M., Abdurakhmanov J., Bobakulov K., Dolimov K., Abdurashidov A., Baymirzaev A., Makhnyov A., Terenteva E., Sasmakov S., Piyakina G., Egamberdieva D., Nazarov P.A., Azimova S. Antimicrobial and cytotoxic activities of the secondary metabolites of endophytic fungi isolated from the medicinal plant *Hyssopus officinalis* // Antibiotics. 2023. V. 12. № 7. 1201.
9. Galán-Ávila A., García-Forteza E., Prohens J., Herraiz F.J. Development of a direct *in vitro* plant regeneration protocol from *Cannabis sativa* L. seedling explants: developmental morphology of shoot regeneration and ploidy level of regenerated plants // Frontiers in Plant Science. 2020. V. 11. Art. 645.
10. Kotyuk L.A. Features of micromorphological structure of medicinal hyssop // Modern Phytomorphology. 2016. V. 10. P. 59–67.
11. Manokari M., Priyadharshini S., Shekhawat M.S. Micro-structural stability of micropropagated plants of *Vitex negundo* L. // Microscopy and Microanalysis. 2021. V. 27. № 3. P. 626–634.
12. 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.
13. Mitrofanova I., Tsyupka V., Jain S.M. Morpho-anatomical characterization of *in vitro* regenerated plants // Advances in Plant Tissue Culture. Current Developments and Future Trends / Eds. A.C. Rai, A. Kumar, A. Modi, M. Singh. Cambridge, MA: Academic Press, 2022. P.175–204
14. Neelakandan A.K., Wang K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications // Plant Cell Rep. 2012. V. 31. № 4. P. 597–620.
15. 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.
16. Sliwinska E., Thiem B. Genome size stability in six medicinal plant species propagated *in vitro* // Biologia Plantarum. 2007. V. 51. № 3. P. 556–558.
17. 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.