УДК 58.085:57.577.2 DOI: 10.14258/pbssm.2026054

Молекулярно-генетические и биотехнологические подходы для идентификации и сохранения *Tabebuia rosea* (Bertol.) Bertero ex A. DC. *in vitro*

Molecular genetic and biotechnological approaches for the identification and conservation of *Tabebuia rosea* (Bertol.) Bertero ex A. DC. *in vitro*

Криницына А. А., Чурикова О. А.

Krinitsina A. A., Churikova O. A.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, г. Москва, Россия
E-mail: ankrina@gmail.com, ochurikova@yandex.ru
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Реферат. Разработка протоколов размножения и поддержания табебуйи в коллекциях *in vitro* имеет важное значение для лесовосстановления и городского озеленения, поскольку неконтролируемая вырубка лесов и изъятие растений из естественных местообитаний вызывают экологические проблемы и снижают генетическое разнообразие. Восстановление лесов способствует регуляции водного баланса, улучшению качества почвы и созданию среды для обитания многих видов флоры и фауны. Интерес к представителям растений группы *Tabebuia* s. l. также связан с увеличением внимания к видам растений, в тканях которых содержатся вещества с высокой биологической активностью, которые являются хорошими источниками для разработки лекарств. В нашей работе предложен альтернативный протокол микроклонального размножения табебуйи на питательной среде MS с добавлением 2iP. Для поверхностной стерилизации семян вместо гипохлорита натрия можно использовать «Лизоформин 3000», который также позволяет получить большое количество стерильных проростков. Сравнение двух типов сред (WPM с добавлением 4,5 мг/л BAP и 0,2 мг/л IBA и MS с добавлением 1,5 мг/л 2iP) показало, что универсальная среда с добавлением цитокинина позволяет получать нормально развитые микропобеги и осуществлять их укоренение на той же среде, тогда как альтернативная среда с комбинацией регуляторов роста иногда приводила к утолщению базальной части побегов. Для адаптации укоренённых растений к условиям *in vivo* предпочтительным оказался питательный грунт, обеспечивающий высокую приживаемость, в отличие от обеднённых смесей. Молекулярно-генетический анализ с использованием ядерных и пластидных маркеров подтвердил генетическую стабильность культуры в течение нескольких пассажей и высокую степень сходства с референтными последовательностями вида, что позволяет уверенно отличать его от близких таксонов. Предложенный протокол перспективен для массового размножения и сохранения, а используемые маркеры могут быть рекомендованы для рутинной видовой идентификации представителей рода *Tabebuia*.

Ключевые слова. Биологически активные вещества, биоресурсные виды, генетическое разнообразие, живые коллекции *in vitro*, молекулярно-генетический анализ, табебуйя.

Summary. Developing protocols for propagating and maintaining *Tabebuia* in collections *in vitro* is important for reforestation and urban greening, as uncontrolled deforestation and the removal of plants from natural habitats cause environmental problems and reduce genetic diversity. Forest restoration helps regulate water balance, improve soil quality, and create habitats for many species of flora and fauna. Interest in representatives of the *Tabebuia* s. l. group of plants is also driven by increased attention to plant species whose tissues contain highly biologically active substances, which are good sources for drug development. In our study, we propose an alternative protocol for micropropagation of *Tabebuia* on MS nutrient medium supplemented with 2iP. For surface sterilization of seeds, Lysoformin 3000 can be used instead of sodium hypochlorite, which also allows for the production of a large number of sterile seedlings. A comparison of two types of media (WPM supplemented with 4.5 mg/L BAP and 0.2 mg/L IBA and MS supplemented with 1.5 mg/L 2iP) showed that the universal medium supplemented with cytokinin produced normally developed microshoots and allowed them to root on the same medium, while an alternative medium containing a combination of growth regulators sometimes resulted in thickening of the basal portion of the shoots. For the adaptation of rooted plants to *in vivo* conditions, a nutritious soil proved preferable, ensuring high survival rates, compared to depleted mixtures. Molecular genetic analysis using nuclear and plastid markers confirmed the genetic stability of the culture over several passages and a high degree of similarity to the reference sequences of the species, allowing for confident distinction from closely related taxa. The proposed protocol is promising for mass propagation and conservation, and the markers used can be recommended for routine species identification of representatives of the genus *Tabebuia*.

Key words. Biologically active substances, bioresource species, genetic diversity, living collections *in vitro*, molecular genetic analysis, *Tabebuia*.

Введение. Виды рода *Tabebuia* (Bignoniaceae Juss.) – высокодекоративные растения, которые активно применяют в озеленении. Однако они так же являются источником ценной древесины, а в последнее время их рассматривают как перспективные объекты для поиска новых биологически активных соединений (Hamed et al., 2020). *Tabebuia rosea* (Bertol.) Bertero ex A. DC. – дерево, произрастающее в тропической Америке, от Бразилии до Мексики, включая Центральную Америку и Антильские острова. Эти растения предпочитают теплый климат. Их выращивают на коммерческих плантациях для получения посадочного материала, который в тропических и субтропических регионах планеты широко используется в озеленении благодаря эффектному цветению и ярким изящным цветам (рис. 1А, Б). На базе этого вида выводят большое количество сортов и культиваров. Для получения высококачественной древесины используют как культивируемые формы, так и растения из природных популяций, произрастающие в естественных местообитаниях. Экстракты листьев и коры *T. rosea* обладают различной биологической активностью, включая антибактериальную, фунгицидную, противораковую, анальгетическую, антиоксидантную и гипогликемическую (Ramalakshmi, Muthuchelian, 2011; Hemamalini et al., 2012; Jiménez-González et al., 2013, 2018; Garzón-Castaño et al., 2019; Cardona-Trujillo et al., 2024), могут быть использованы для лечения ожирения, провоцирующего развитие различных тяжелых хронических заболеваний (Pagaza-Straffon et al., 2021). В России эта культура используется в озеленении закрытого грунта (зимние сады, оранжереи), а также она может рассматриваться как источник растительного материала для фундаментальных исследований вторичных метаболитов.

Вместе с тем, род *Tabebuia* представляет собой сложную таксономическую группу. В результате проведенных таксономических ревизий бывший род *Tabebuia* sensu lato был разделен на три самостоятельных рода: *Tabebuia*, *Handroanthus* и *Roseodendron* (Grose, Olmstead, 2007). Это привело к возникновению дополнительных вопросов, связанных с точной идентификацией конкретных растений, поскольку морфологические признаки часто оказываются недостаточно надежными для разграничения этих таксонов, особенно вне периода цветения. Поэтому дополнительно для видовой идентификации применяются локусы ядерного (ITS) и пластидного (*rbc*L, *mat*K) геномов, рекомендованные Consortium for the Barcode of Life (CBOL. URL: https://barcodeofwildlife.org/cbol.html).

Многие виды, относящиеся к этим родам, на сегодняшний день находятся под угрозой исчезновения из-за неконтролируемой вырубки лесов и изъятия растений из естественных местообитаний, что вызывает значительные экологические проблемы – нарушение водного баланса, деградацию почв и снижение генетического разнообразия, а также ставит под угрозу восстановительные программы и городское озеленение. В связи с этим сохранение табебуйи в коллекциях *in vitro* приобретает несомненный интерес и практическую значимость. В процессе проведения работ по введению растений в асептическую культуру и последующего их размножения необходимо не только анализировать специфические черты онтоморфогенеза и жизненных форм отобранных видов, их биологические особенности, но и проверять идентичность получаемых регенерантов исходным генотипам. Особенно важным это оказывается для видов с географически отдаленными ареалами и со сложной таксономией.

Целью нашей работы являлось отработать протокол клонального микроразмножения для *T. rosea* и провести молекулярно-генетическую аутентификацию полученных растений-регенерантов с целью подтверждения их видовой принадлежности и генетической стабильности.

Материалы и методы. Для введения в асептическую культуру *T. rosea* использовали зрелые семена, собранные в Абу-Даби, ОАЭ. Предварительно выдержанные в 1%-й суспензии (по действующему веществу) противогрибкового препарата «Фундазол» семена замачивали сначала в 70%-м спирте на 1–2 минуты, а затем – в 3%-м стерилизующем растворе «Лизоформин-3000». После стерилизации семена промывали в трех сменах стерильной дистиллированной воды и помещали на питательную среду MS без добавления регуляторов роста, на которой они прорастали и формировали микропобеги. Для размножения использовали верхушки полученных микропобегов с 2–3 междоузлиями или разделяли их на отдельные микрочеренки (узлы с пазушными почками), затем высаживали на питательные среды: по прописи Мурасиге и Скуга (MS) (Murashige, Skoog, 1962), с добавлением 1,5 мг/л 2iP или Woody Plant Medium (WPM) (*McCown, Lloyd,* 2018) с 4,5 мг/л BAP и 0,2 мг/л IBA (соответственно) и инкубировали при фотопериоде 16 часов день / 8 часов ночь при температуре 21–23 °C, согласно отработанной ранее

методике (Чурикова, Мурашев, 2022). Микропобеги укоренялись на той же среде, спустя 6–7 пассажей. Для адаптации к условиям *in vivo* полученные укорененные микропобеги высаживали в грунт, состоящий из садовой земли, торфа и песка (2 : 1 : 1).

Для подтверждения видовой принадлежности из листьев выделяли тотальную ДНК CTAB-методом. Листья отбирали у растений из стерильной культуры на 3 и на 10 пассаж. Полученные образцы ДНК использовали в качестве матрицы для постановки ПЦР с праймерами ITS1F 5'-GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3' / ITS2R 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGCT-3'; rbcL4F 5'-TCACCACAAACAGARACTAAAGC-3' / rbcL760R 5'-CAAYTCTCTRGCAAATACAGC-3' и rpL16F(71) 5'-GCTATGCTTAGTGTGTGACTCGTTG-3' / rpL16R(1516) 5'-CCCTTCATTCTTCCTCTATGTTG-3'. Реакцию проводили с использованием набора для проведения ПЦР с HS-Taq (Биолабмикс, Россия) согласно инструкции производителя. Визуализацию продуктов амплификации осуществляли при помощи электрофореза в 1,5%-м агарозном геле на TAE-буфере с окрашиванием бромистым этидием, очистку продуктов амплификации – при помощи набора реагентов Cleanup Mini (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Секвенирование проводили в компании Евроген (Россия). Анализ полученных хроматограмм и построение филогенетических деревьев проводили с использованием пакета программ MEGA12 (Kumar et al., 2024). Сравнение – с использованием BLASTn (Nucleotide BLAST, NCBI) (Altschul et al., 1990).

Результаты и обсуждение. Предложенный протокол стерилизации семян так же, как протокол, предполагающий применение гипохлорита натрия (Padron, Avila, 2006, Hector et al., 2024), показал хорошие результаты. После поверхностной стерилизации 87 % семян были без признаков бактериальной и грибной контаминации. Верхушки полученных проростков, содержащие 3 узла, после переноса на свежую среду MS вытягивались, наращивали новые метамеры, которые после разделения на узлы высаживали на два типа среды. Пазушные почки одноузловых микрочеренков, высаженные на среду WPM с добавлением 4,5 мг/л BAP и 0,2 мг/л IBA, трогались в рост и формировали микропобеги, которые, впоследствии, также могли быть отделены и использованы для размножения (Рис. 1В).

Однако, такое сочетание регуляторов роста приводило к разрастанию стеблевой части микрочеренков. Похожую картину на среде WPM наблюдали и в отсутствии ауксинов (Hector et al., 2024), в

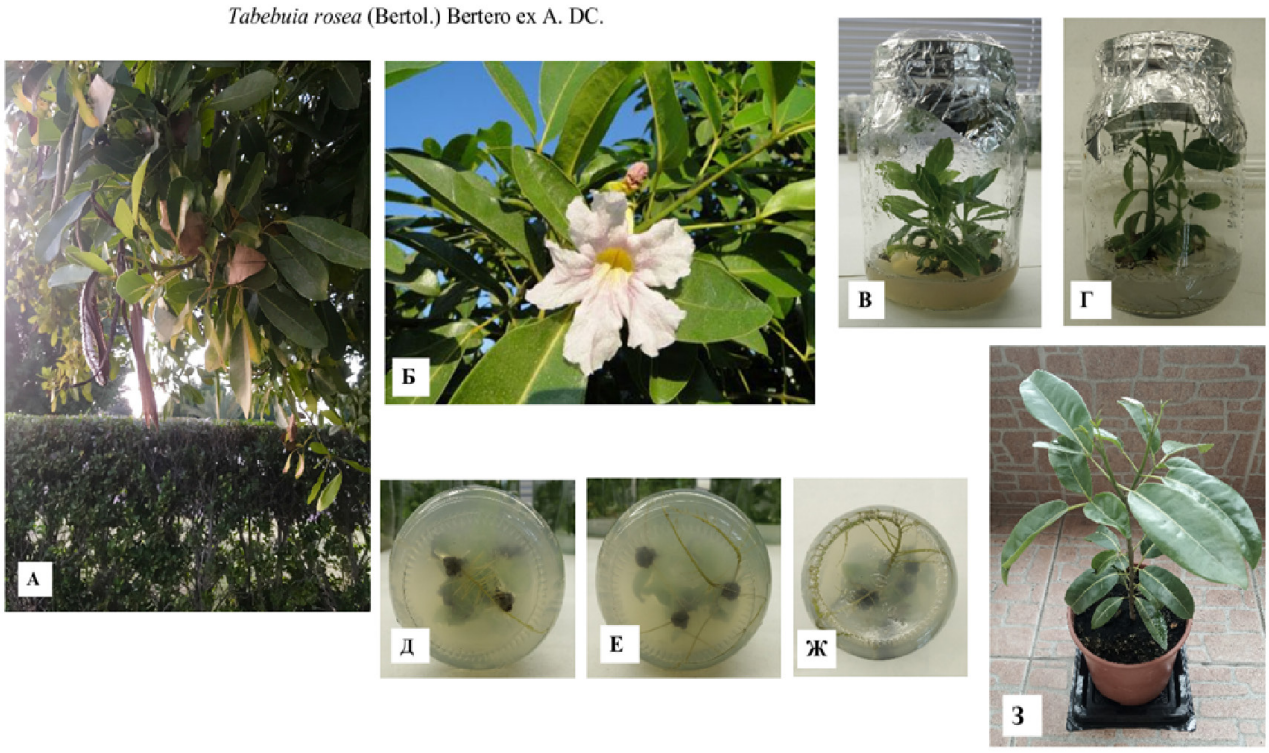


Рис. 1. Внешний вид растения (А), цветка (Б), стадия размножения (В), укоренения (Г–Ж) *in vitro* и адаптированное растение-регенерант (З).

результате была предложена схема микроклонального размножения *T. rosea* на среде WPM без использования регуляторов роста на этапе размножения. Тогда как для инициации ризогенеза в питательной среде было необходимо наличие ИМК (Hector et al., 2024).

При культивировании микропобегов на питательной среде MS с добавлением 2 iP такого разрастания базальной части микропобега не наблюдали. Морфология регенерантов не менялась, на ней же происходило и последующее укоренение полученных микропобегов (рис. 1 Г–Ж), что в ряде случаев оказывается предпочтительнее, особенно в свете разработки протоколов получения и поддержания медленно растущей культуры *in vitro*. Таким образом, для успешного микроклонального размножения *T. rosea* наряду с использованием питательной среды со сниженным содержанием азота (WPM) без регуляторов роста с последующим укоренением с использованием ИМК возможно использовать более богатую питательную среду MS с добавлением 2iP и для размножения, и для укоренения регенерантов.

Использование для адаптации укорененных растений составного грунта из садовой земли, торфа и песка (2 : 1 : 1) позволило получить 93 % адаптированных к условиям окружающей среды растений-регенерантов (Рис. 1, З), в то время как с применением стерильной смеси из песка, рисовой шелухи и почвы (1 : 1 : 1) (Padron, Avila, 2006) были успешно адаптированы всего лишь 12 % растений. Вероятно, это связано с тем, что данный вид весьма требователен к содержанию питательных веществ для правильного роста и развития проростков (Gálvez-López et al., 2018), которых оказалось недостаточно в смеси с содержанием рисовой шелухи (Padron, Avila, 2006).

Сравнение участков ядерного (ITS) и пластидного (*rbc*L и *rps*16) геномов растений, введенных в стерильную культуру и прошедших 3 и 10 пассажей, показало, что они на 100 % идентичны между собой. Для подтверждения систематической принадлежности полученные данные по строению участков ITS, *rbc*L и *rps*16 сравнили с имеющимися в базе данных NCBI. Последовательность ITS растений из стерильной культуры оказалась на 99,76 % идентична *Tabebuia rosea* [PQ550046.1] из Египта и на 99,28 % ITS образца *T. rosea* [PX404670.1] из Панамы. С остальными видами этого рода (*T. autea*, *T. chrysostichia*), а так же с другими родами этой группы – *Handroanthus*, *Crescentia*, *Amphitecna* сходство этого участка не превышало 95 %. Полученные нами участки пластома *rbc*L и *rps*16 оказались на 99,81 и 99,54 % идентичны фрагментам пластидного генома *Tabebuia rosea* [NC_088770.1] из Панамы. Сходство с последовательностями *T. nodosa* оказалось около 97 %. С этими же участками пластомов близкого рода *Handroanthus chrisanthus* сходство составило 96,38 %. При филогенетическом анализе образец из культуры *in vitro* по всем участкам формировал уверенную кладу с теми же последовательностями.

Из-за высокого генетического сходства родов, выделенных из группы *Tabebuia* s. l., для определения происхождения того или иного сорта, а также для уверенного разделения видов между собой были предложены паттерны SNP, получаемые на основании данных полногеномного секвенирования (Meng et al., 2023). Однако, как показано в нашей работе, для рутинного анализа видовой принадлежности можно оценивать сходство по последовательностям, которые CBOL рекомендует использовать для идентификации видов. Использование дополнительного участка пластома делает оценку принадлежности образца к конкретному виду более уверенной – более 99 % сходства сравниваемых последовательностей можно считать порогом для определения видовой принадлежности.

Таким образом, для успешного размножения и укоренения растений *Tabebuia rosea* в асептической культуре оптимальным оказался протокол с использованием среды MS с добавлением 2iP и адаптацией в составном грунте из садовой земли, торфа и песка (2 : 1 : 1). Молекулярно-генетический анализ по ядерному (ITS) и пластидным (*rbc*L, *rps*16) маркерам показал 100 % идентичность образцов, отобранных после разного количества пассажей и более 99 % сходства с последовательностями *T. rosea* из базы данных NCBI, что подтверждает генетическую стабильность культуры *in vitro* и видовую принадлежность полученных растений-регенерантов, а также позволяет рекомендовать эти маркеры для подтверждения таксономической принадлежности растений из группы *Tabebuia* s. l.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ им. М. В. Ломоносова.

ЛИТЕРАТУРА

Чурикова О. А., Мурашев В. В. Микроклональное размножение декоративных культур: яблоня (*Malus* Mill.). – М.: Династия, 2022. – 76 с.

Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool // Journal of Molecular Biology, 1990. – Vol. 215, № 3. – P. 403–410.

Cardona-Trujillo M. C., Jiménez-González F. J., Veloza L. A., Sepúlveda-Arias J. C. *In vitro* anti-toxoplasma activity of extracts obtained from *Tabebuia rosea* and *Tabebuia chrysantha*: The role of β-Amyrin // Molecules, 2024. – Vol. 29, № 5. – P. 920. https://doi.org/10.3390/molecules29050920. PMID: 38474432; PMCID: PMC10933876.

Gálvez-López L., Jasso-Mata J., Espinosa-Zaragoza S., Jiménez-Casas M., Ramírez-Valverde B., Rangel-Zaragoza J. L. Seed quality of select trees of *Tabebuia rosea* (Bertol) DC. in the Soconusco region, Chiapas, México // Agroproductividad, 2018. – Vol. 11, № 3. – P. 90–97.

Garzón-Castaño S. C., Lopera-Castrillón I. A., Jiménez-González F. J., Siller-López F., Veloza L. A., Sepúlveda-Arias J. C. Nrf2-Mediated Antioxidant Activity of the inner bark extracts obtained from *Tabebuia rosea* (Bertol) DC. and *Tabebuia chrysantha* (Jacq.) G.Nicholson // F1000Res., 2019. – Vol. 12, № 7. – P. 1937.

Grose S. O., Olmstead R. G. Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* s. l. (Bignoniaceae) // Systematic Botany, 2007. – Vol. 32, № 3. – P. 660–670. https://doi.org/10.1600/036364407782250652

Consortium for the Barcode of Life (CBOL). URL: https://barcodeofwildlife.org/cbol.html (Accessed 01 July 2026)

Hamed A. N. E., Mahmoud B. K., Samy M. N., Kamel M. S. An extensive review on genus "*Tabebuia*", family Bignoniaceae: Phytochemistry and biological activities (1967 to 2018) // J. Herb. Med., 2020. – Vol. 24: 100410. https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100410.

Héctor E., Cevallos D., Corozo L. Macias F., Fosado O. Development of a protocol for the micropropagation of two forest species threatened with extinction in Ecuador // Plant Cell Tiss. Organ Cult., 2024. – Vol. 159(2). https://doi.org/10.1007/s11240-024-02864-9

Hemamalini K., Soujanya G.L., Bhargav A., Vasireddy U. *In-vivo* anticancer activity of *Tabebuia rosea* (Bertol) DC. leaves on Dalton's ascetic lymphoma in mice // Int. J. Pharm. Sci. Res., 2012. – Vol. 3, № 11. – P. 4496–4502.

Jiménez-González F. J., Vélez-Gómez J. M., Melchor-Moncada J. J., Veloza L. A., Sepúlveda-Arias J. C. Antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative activity of extracts obtained from *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. Phcog. Mag., 2018. – Vol. 14, № 55 – P. 25–31.

Jiménez-González F. J., Veloza L. A., Sepúlveda-Arias J. C. Anti-infectious activity in plants of the genus *Tabebuia* // Univ. Sci., 2013. – Vol. 18. – P. 257–267. https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC18-3.aapg.

Kumar S., Stecher G., Suleski M., Sanderford M., Sharma S., Tamura K. MEGA12: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 12 for adaptive and green computing // Molecular Biology and Evolution, 2024. – Vol. 41, № 12. – P. 1–9.

McCown B. H., Lloyd G. Woody Plant Medium (WPM) – a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species // HortScience, 2018. – Vol. 16. – P. 453–453. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.16.3S.365.

Meng J., Zhang Y., Wei Y., Li R., Li Z., Zhong C. Identification of commercial cultivars in the *Tabebuia* alliance using genotyping-by-sequencing // Forests, 2023. – Vol. 14, № 2. – P. 271. https://doi.org/10.3390/f14020271

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant., 1962. – Vol. 15. – P. 473– 497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Padron I.E.S., Avila M. Desarrollo de un protocolo para propagación in vitro de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC) // Temas Agrarios, 2006. – Vol. 11, № 2. – P. 52–62.

Pagaza-Straffon E. C., Mezo-González C. E., Chavaro-Pérez D. A., Cornejo-Garrido J., Marchat L. A., Benítez-Cardoza C. G., Anaya-Reyes M., Ordaz-Pichardo C. *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. ethanol extract attenuates body weight gain by activation of molecular mediators associated with browning // Journal of Functional Foods, 2021. – Vol. 86: 104740. https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104740

Ramalakshmi S., Muthuchelian K. Analysis of bioactive constituents from the ethanolic leaf extract of *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. by Gas Chromatography – MassSpectrometry // Int. J. ChemTech Res., 2011. – Vol. 3, № 3. – P. 1054–1059.