

УДК 581.527.4:57.085.2:58.086

DOI: 10.25684/NBG.boolt.129.2018.03

**РЕГЕНЕРАЦИЯ *LAMIUM GLABERRIMUM* (К. КОСН) TALIEV ЧЕРЕЗ ПРЯМОЙ И НЕПРЯМОЙ ОРГАНОГЕНЕЗ *IN VITRO*****Ирина Вячеславовна Митрофанова, Ольга Владимировна Митрофанова,  
Татьяна Николаевна Кузьмина, Александр Ростиславович Никифоров,  
Наталья Николаевна Иванова, Нина Павловна Лесникова-Седошенко**

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН  
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита, Никитский спуск, 52  
E-mail: invitro\_plant@mail.ru

В результате проведенных комплексных биотехнологических и гистологических исследований выявлены особенности морфогенеза *in vitro* реликтового эндемика флоры Горного Крыма *Lamium glaberrimum* (K. Koch) Taliev (Lamiaceae). Впервые показано, что в условиях *in vitro* морфогенез исследуемого вида реализуется двумя путями: через прямой и непрямой органогенез. Определены трофические, гормональные и физические факторы, влияющие на микроразмножение растений. Получены регенеранты для сохранения в генобанке *in vitro*.

**Ключевые слова:** редкий вид; морфогенез; питательная среда; регуляторы роста; регенерация микропобегов

**Введение**

Род *Lamium* из семейства Lamiaceae насчитывает около 30 видов. Некоторые виды рода *Lamium* являются природными источниками биологически активных веществ [4, 13, 19]. В Крыму произрастает 5 видов: *Lamium album* L., *L. amplexicaule* L., *L. glaberrimum* (K. Koch) Taliev, *L. maculatum* (L.) L. и *L. purpureum* L. Среди этих видов *L. glaberrimum* является редким эндемиком флоры Горного Крыма и представляет собой облигатный гляреофит – «растение осыпей», двулетник, цветущий с первого года жизни [10, 11]. Распространение *L. glaberrimum* лимитировано узкой экологией облигатного гляреофита (рис. 1). Вид встречается в пяти локальных популяциях на осыпях южного склона Главной гряды Крымских гор и северном склоне Бабуган-Яйлы на высоте 1100-1400 м над уровнем моря [10, 12]. Способ диссеминации – барохория, в связи с этим сохранение *L. glaberrimum* в природных условиях путем семенного размножения малоэффективно и требует длительного времени. В условиях *ex situ* прорастающие семена дают мизерный процент проростков, при этом большинство выращиваемых растений гибнет в первый год развития [9, 10]. Длительное возобновление реликтовых эндемиков, трудности их размножения, влияние антропогенного фактора обедняют видовой состав флоры и сокращают ареалы распространения, прежде всего, *L. glaberrimum*. Вид внесен в Европейский Красный список животных и растений, которые находятся под угрозой исчезновения в мировом масштабе (1991) и Красную книгу Республики Крым и относится к 3 категории редкости [5]. Согласно «Global Strategy Plant Conservation: 2011-2020» виды растений необходимо сохранять в условиях *in situ*, *ex situ* и *in vitro* [16]. В последние годы для сохранения растительного биоразнообразия все чаще используются методы клеточной инженерии [7, 14, 17].

Цель данного исследования – изучить пути реализации морфогенетического потенциала *Lamium glaberrimum* в условиях *in vitro*.

**Объекты и методы исследования**

Исследования выполняли в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений отдела биологии развития растений, биотехнологии и биобезопасности ФГБУН «НБС–

ННЦ» РАН. Объектом исследований служили проростки *L. glaberrimum*, полученные в условиях *in vitro* из семян, собранных с растений *in situ*. Семена с растений изучаемого вида собирали в июле-августе на осыпных склонах скалы Шаган-Кая [1200-1300 м над уровнем моря (Гурзуфская яйла)] Крымского природного заповедника.

Биотехнологические эксперименты проводили согласно методикам Р.Г. Бутенко [1], Ф.Л. Калинина с соавторами [3], И.В. Митрофановой [7]. В качестве первичных эксплантов при введении на питательные среды служили апикальные части, сегменты побега и листья проростков, полученных из семян в условиях *in vitro*. Семена стерилизовали растворами 70% этанола, 0,5% ДезТаб, 0,4% цефотаксима по ранее разработанной нами методике [8]. Для изучения процессов морфогенеза и регенерации микропобегов *L. glaberrimum*, в условиях *in vitro* применяли питательные среды на основе базовой среды Мурасиге и Скуга (1962) (МС) [18], дополненные регуляторами роста: 0,1–1,5 мг/л БАП (Sigma, США), 1,3 мг/л ТДЗ (Duchefa Biochemie, Голландия), 0,1–0,15 мг/л ИМК (Duchefa Biochemie, Голландия), 1,5 мг/л ИУК (Duchefa Biochemie, Голландия) и 0,1–0,15 мг/л гибберелловой кислоты (Duchefa Biochemie, Голландия) в различных концентрациях и сочетаниях. В среды вводили 30 г/л сахарозы и 9 г/л агара (Panreac, Испания). Контролем была среда без регуляторов роста. pH питательной среды 5,7–5,8. Автоклавирование осуществляли при 120°C в течение 5–15 минут в стерилизаторе LAC 5060S («DAIHAN LABTECH», Южная Корея). Регуляторы роста и витамины стерилизовали холодным фильтрованием через фильтры MILLEX® GP и добавляли в питательные среды в стерильных условиях бокса биологической безопасности SC2 («ESCO», Сингапур) после автоклавирования. Субкультивирование эксплантов проводили через 3–4 недели. Культуральные сосуды с эксплантами помещали в фитокапсулы Биотрона с температурой  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 16-часовым фотопериодом при интенсивности освещения  $37,5\text{--}42,0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  люминесцентными лампами Philips TL (40W) с белым спектром света. Органогенез в тканях и высечках листа изучали под стереоскопическим микроскопом Nikon SMZ745T (Япония).

Для гистологического анализа калусных структур готовили постоянные препараты. В качестве фиксатора использовали смесь Ф.А.А. (formalin:acetic acid:alcohol 70% в соотношении 7:7:100), в которой выдерживали объекты в течение 4 часов. После фиксации материал переводили в 70% водный раствор этилового спирта. Для обезвоживания применяли изопропиловый спирт и ксилол [6]. Инфильтрация каллусов парафином длилась в течение 7 суток. Серийные срезы толщиной 5–10  $\mu\text{m}$  делали на ротационном полуавтоматическом микротоме RMD-3000 (Россия). Окраску препаратов проводили гематоксилином и алциановым синим [2]. Анализ гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа AxioScope A.1 (Германия). Микрофотографии получены системой анализа изображения AxioCamERc5s (Германия) с использованием программного приложения AxioVision Rel. 4.8.2.

Опыты проводили трижды в десятикратной повторности. При этом учитывали морфометрические показатели развития эксплантов в процессе культивирования *in vitro*. Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программы STATISTICA for Windows 10.0 (StatSoft, Inc.) и многогрангового теста Дункана ( $P < 0,05$ ).

### Результаты и обсуждение

Известно, что индукция морфогенеза и пути реализации морфогенетического потенциала зависят от происхождения, типа исходного экспланта и условий культивирования [7, 15]. Проведенные нами исследования показывают, что реализация морфогенетического потенциала реликтового эндемика *L. glaberrimum* в условиях *in vitro* проходила двумя путями: 1) прямым органогенезом через адвентивное

побегообразование из пазушных почек и тканей листа; 2) непрямой – через каллусообразование из высечек листа и последующего геммогенеза.

### Регенерация через прямой органогенез

Результаты, полученные нами в опытах по прямой регенерации *L. glaberrimum*, показали, что среда МС, дополненная регуляторами роста, являлась оптимальной для субкультивирования и регенерации микропобегов. Инициация развития пазушных почек и микропобегов отмечена через 12-28 суток на среде МС с низкой концентрацией регуляторов роста: 0,1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК и 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub>. По сравнению с контролем (среда без регуляторов роста) применение регуляторов роста индуцировало процессы морфогенеза и регенерации эксплантов (табл. 1). Скрининг регуляторов роста и их концентраций продемонстрировал высокую эффективность БАП в среде МС на этапе индукции морфогенеза *in vitro*. Выявлено, что 0,1-0,5 мг/л БАП и 0,1-0,15 мг/л ИМК активизировали адвентивное побегообразование *L. glaberrimum* (табл. 1, рис. 1). Показано, что после третьего субкультивирования (85-90 суток) частота регенерации у *L. glaberrimum* составила 90%.

Таблица 1

Регенерационный потенциал *Lamium glaberrimum* в условиях *in vitro* при различных сроках культивирования на питательной среде МС, дополненной регуляторами роста

Регулятор роста и его концентрация, мг/л	Количество микропобегов/эксплант			Длина микропобега, см			Количество листьев/микропобег, шт.		
	1*	3	6	1	3	6	1	3	6
0 (контроль)	1,0 e	1,4 f	2,7 e	0,8 e	2,1 d	2,7 e	1,8 e	1,9 e	2,0 e
БАП 0,1	1,2 cd	4,5 e	15,4 ab	1,3 b	2,7 b	5,1 cd	2,1 cd	4,5 de	8,0 b
БАП 0,5	1,7 b	5,0 de	14,6 bc	1,2 b	2,8 b	4,9 d	2,0 d	4,8 d	6,8 cd
БАП 1,0	2,1 ab	7,4 cd	12,2 d	1,0 cd	2,6 bc	5,0 cd	2,2 cd	4,8 d	6,9 cd
БАП 0,1 + ИМК 0,1	1,8 b	8,9 ab	15,4 ab	1,9 ab	3,0 ab	6,0 ab	3,0 b	5,7 ab	8,3 ab
БАП 0,5 + ИМК 0,1	2,2 ab	9,0 ab	12,5 cd	1,9 ab	3,1 ab	6,2 ab	2,8 b	5,4 bc	8,1 b
БАП 0,1 + ИМК 0,1 + ГК <sub>3</sub> 0,1	2,4 a	10,1 a	25,5 a	2,3 a	3,7 a	6,8 a	4,2 a	6,2 a	10,8 a

Примечание:

\* количество субкультивирований.

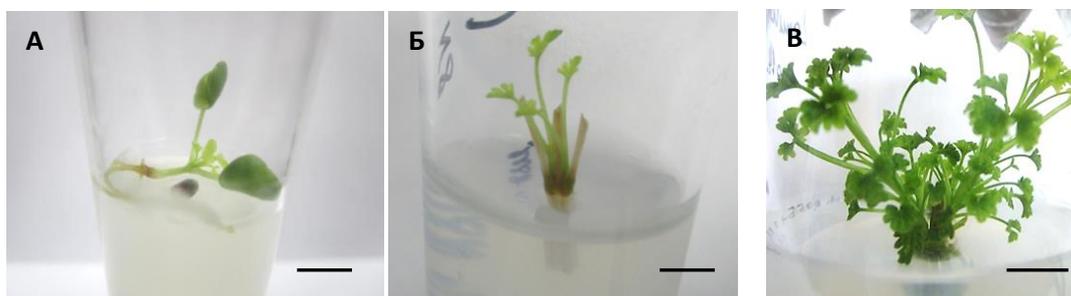


Рис. 1 Прямая регенерация *Lamium glaberrimum*: А – из семени; Б – из пазушных почек; В – адвентивное побегообразование из основания побегов (масштаб 1 см)

В процессе изучения особенностей регенерации микропобегов из листа *L. glaberrimum* было отмечено, что на варианте питательной среды МС, дополненной 1,3 мг/л ТДЗ (RG 7), регенерационный потенциал реализовывался через прямой

органогенез рис. (2 А-Г). При этом были выявлены зоны меристематической активности, из которых формировались адвентивные почки и микропобеги (рис. 2Г).

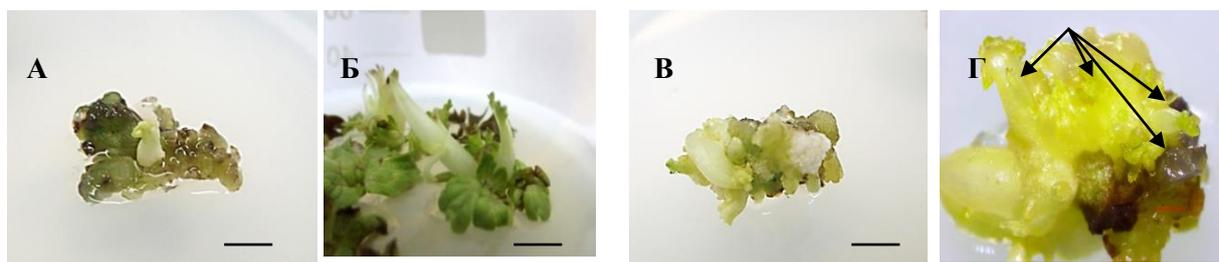


Рис. 2 Прямая регенерация микропобегов из листа *Lamium glaberrimum* на питательной среде МС с 1,3 мг/л ТДЗ (масштаб: А-В – 1 см, Г – 1  $\mu$ м)

Регенерацию 2-3 микропобегов из тканей листа наблюдали на 20-27 сутки культивирования. После первого субкультивирования количество микропобегов составило 7-10 штук на эксплант. Частота регенерации микропобегов зависела от количества субкультивирований и к восьмому пасажу достигала 100% (рис. 3).

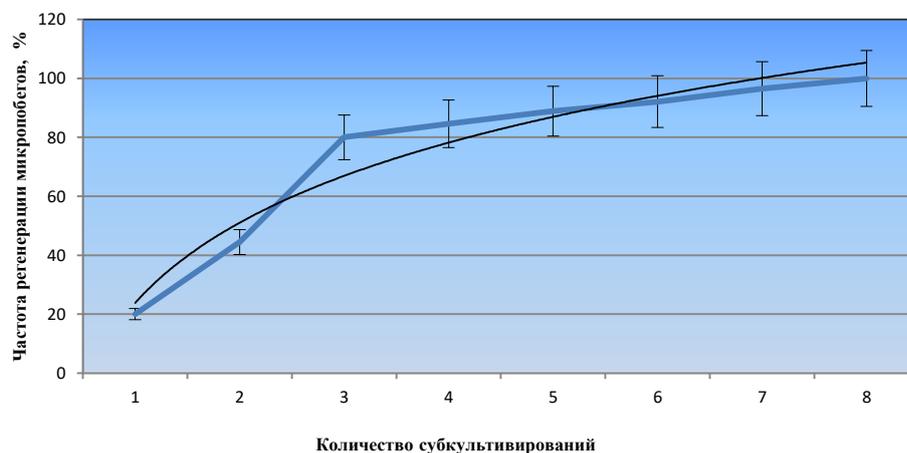


Рис. 3 Зависимость регенерации микропобегов из тканей листа *Lamium glaberrimum* от количества субкультивирований

### Регенерация через непрямой органогенез

Исследования по изучению регенерационного потенциала морфогенного каллуса *L. glaberrimum* были проведены нами впервые. Так, эффективным путем реализации морфогенеза оказался непрямой органогенез, индуцированный из высечек листа ювенильных растений изучаемого вида. В контрольном варианте опыта на питательной среде МС без регуляторов роста каллус не формировался. Индукцию морфогенного каллуса отмечали из высечек листа на питательной среде, дополненной 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК (RG 2) через 20-28 суток культивирования. После дедифференциации тканей высечек листа и образования каллуса морфогенетический потенциал исследуемого вида реализовался через непрямой органогенез (геммогенез) (рис. 4А). Частота каллусообразования составила 62,4% и увеличивалась до шестого субкультивирования (72,8%), затем постепенно снижалась и к восьмому пасажу составила 69,9%.

Микропобеги регенерировали через 10-14 суток непосредственно из адвентивных почек, сформировавшихся в каллусе. При субкультивированиях количество микропобегов увеличивалось и после шестого пасажа достигло более 74,5 шт./эксплант (рис. 4Б). Таким

образом, наши опыты показали, что использование цитокинина БАП в концентрации 1,5 мг/л в сочетании с ауксином ИУК в концентрации 1,5 мг/л являлось триггером формирования каллуса. Каллусы *L. glaberrimum* имели все признаки морфогенетической активности (рис. 5А, Б).

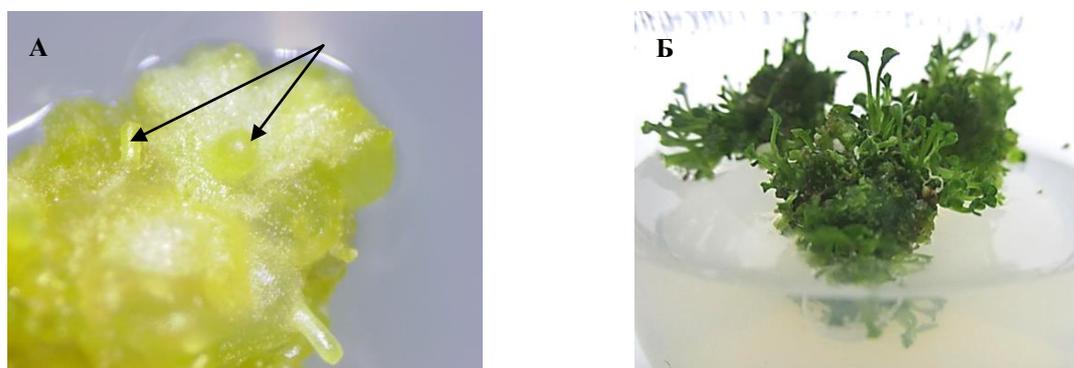


Рис. 4 Геммогенез (А) (формирующиеся адвентивные почки указаны стрелками) и регенерация адвентивных почек и микропобегов из каллуса после 6 субкультивирования (Б) *L. glaberrimum in vitro*

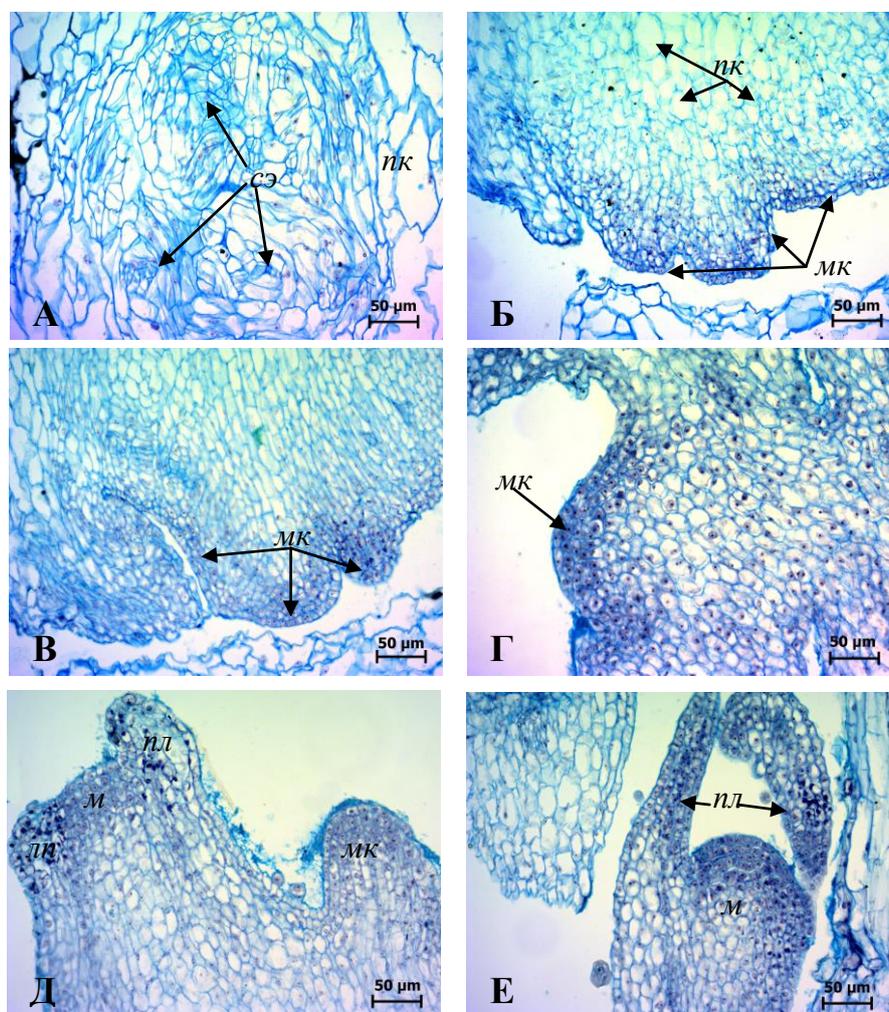


Рис. 5 Фрагменты срезов каллусных структур *L. glaberrimum*: А – паренхимные клетки (пк) с очагами сосудистых элементов (сэ); Б, В – периферическая область каллуса с меристематическими клетками (мк); Г – область закладки меристемы; Д – апикальная меристема (м) с примордиальными листьями (пл); Е – апикальная область микропобега с примордиальными листьями

Гистологический анализ показал, что каллусные структуры, полученные при культивировании на питательной среде МС высечек листа *L. glaberrimum*, образованы крупными паренхимными клетками и небольшими очагами проводящих элементов, локализованными в толще паренхимы (рис. 5А). Периферические слои каллусов были сформированы более мелкими клетками, имеющими густую цитоплазму и относительно крупные ядра, что свойственно для меристематически активных клеток. За счет этих групп клеток происходило разрастание структуры (рис. 5Б, В).

Отдельные участки клеток, обладающих пролиферативной активностью, формировали апикальные меристемы с примордиальными листьями (рис. 5Г), из которых затем развивались микропобеги (рис. 5Д, Е), что позволяет рассматривать непрямой органогенез как один из эффективных путей реализации морфогенеза *L. glaberrimum*.

### Выводы

Таким образом, наши исследования продемонстрировали, что в качестве эксплантов могут быть использованы сегменты побега, листья и другие органы, полученные из проростков и микропобегов *Lamium glaberrimum*, культивируемых в условиях *in vitro*. Впервые показано, что морфогенетический потенциал изучаемого вида реализуется путем прямой и непрямой регенерации, что обеспечивает высокую эффективность микроразмножения. Оптимальной питательной средой для прямой регенерации микропобегов *L. glaberrimum* из тканей листа является среда Мурасиге и Скуга, дополненная 1,3 мг/л ТДЗ; для регенерации из сегментов побегов и микроразмножения – среда МС, дополненная 0,1 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИМК совместно с 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub>. Непрямой органогенез индуцирован из высечек листа через каллусогенез на питательной среде МС, дополненной 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК, что значительно повышает частоту регенерации *L. glaberrimum* в культуре *in vitro*. Оба пути реализации морфогенеза как повышают степень сохранения данного вида в культуре *in vitro*, так и обеспечивают возможность дальнейшей репатриации их в природные условия обитания.

### Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
2. Жинкина Н.А., Воронова О.Н. К методике окраски эмбриологических препаратов // Ботан. журн. – 2000. – Т. 85, № 6. – С. 168–171.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
4. Колесник Я.С., Ковалева А.М., Ильина Т.В. Исследование компонентного состава эфирного масла листьев *Lamium album* // GISAP. Medical science, pharmacology. – 2013. – N 1. – P. 80-82 [https://nbuv.gov.ua/UJRN/msph\\_2013\\_1\\_27](https://nbuv.gov.ua/UJRN/msph_2013_1_27)
5. Красная книга Республики Крым. Растения, водоросли и грибы / Отв. ред. А.В. Ена и А.В. Фатерыга. – Симферополь: ООО «ИТ «АРИАЛ», 2016. – 480 с.
6. Кузьмина Т. Н. Генезис микроспорангия *Jasminum officinale* L. (Oleaceae). // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2017. – Вып. 124. – С. 103–109.
7. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – К.: Аграрна наука, 2011. – 344 с.
8. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Никифоров А.Р., Лесникова-Седошенко Н.П., Иванова Н.Н., Челомбит С.В., Жданова И.В. Особенности введения в

условия *in vitro* некоторых реликтовых эндемиков флоры горного Крыма // Бюллетень ГНБС. – 2016. – Вып. 121. – С. 62–69.

9. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Никифоров А.Р., Лесникова-Седошенко Н.П., Челомбит С.В. Биотехнологические подходы в размножении редкого эндемика флоры Горного Крыма *Scrophularia exilis* Popl. // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2018. – Вып. 127. – С. 59–67 <http://dx.doi.org/10.25684/NBG.boolt.127.2018.08>

10. Никифоров А.Р. Реликтовые эндемики флоры Горного Крыма в составе петрофитона и гляреофитона // Ботан. журн. – 2016. – Т. 101, № 9. – С. 1008–1024.

11. Никифоров А.Р., Корженевский В.В. Типы побегообразования у растений в составе гляреофитона верхнего пояса Горного Крыма // Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада. – 2014. – Т. 139. – С. 67–72.

12. Рыфф Л.Э. Редкие растения осыпей Крыма // Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада. – 2001. – Т. 120. – С. 58–63.

13. Chipeva V.A., Petrova D.C., Geneva M.E., Dimitrova M.A., Moncheva P.A., Karchina-Toteva V.M. Antimicrobial activity of extracts from *in vivo* and *in vitro* propagated *Lamium album* L. plants // Afr J Tradit Complement Altern Med. – 2013. – Vol. 10, N 6. – P. 559-562 <http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v10i6.30>

14. Engelmann F. Use Biotechnologies and Conserving Plant Biodiversity // Acta Horticulturae. – 2009. – Vol. 122. – P. 63-82 <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.812.3>

15. George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J. (eds.) Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd edition. – Dordrecht, The Netherlands: Springer. – 2008. – Vol. 1. – P. 50.

16. Global Strategy Plant Conservation – [www.botanicgardens/ie/gspc/pdfs/gspc.pdf](http://www.botanicgardens/ie/gspc/pdfs/gspc.pdf)

17. Mitrofanova I., Lesnikova-Sedoshenko N., Mitrofanova O. *In Vitro* Somatic Embryogenesis of Relict Endemic Species *Heracleum ligusticifolium* // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. – 2018. – Vol. 54, N 1. – P. 44 <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9927-9>

18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiologia Plantarum. – 1962. – Vol. 15, N 3. – P. 473–497 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

19. Nugroho A., Choi J.-K., Park J.-H., Lee K.-T., Cha B. Ch., Park H.-J. Two new flavonol glycosides from *Lamium amplexicaule* L. and their *in vitro* free radical scavenging and tyrosinase inhibitory activities // Planta Med. – 2009. – Vol. 75. – P. 364–366 <https://dx.doi.org/10.1055/s-0028-1112216>

Статья поступила в редакцию 20.09.2018 г.

Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Kuzmina T.N., Nikiforov A.R., Ivanova N.N., Lesnikova-Sedoshenko N.P. Regeneration of the *Lamium glaberrimum* (K. Koch.) via direct and indirect organogenesis *in vitro* // Bull. Of the State Nikit. Botan. Gard. – 2018. – № 129. – P. 23-29.

As a result of complex biotechnological and histological studies, the *in vitro* morphogenesis features of the relict endemic species of the Mountain Crimea *Lamium glaberrimum* (Koch) Taliev (Lamiaceae) have been revealed. It has been shown for the first time that *in vitro* morphogenesis of the studied species is realized in two ways: through direct and indirect organogenesis. Trophic, hormonal and physical factors affecting micro-multiplication of plants have been determined. The regenerants for conservation in *in vitro* gene bank have been obtained.

**Key words:** rare species; morphogenesis; culture medium; plant growth regulators; microshoot regeneration