

УДК 581.527.4:57.085.2.577.19

DOI: 10.36305/0513-1634-2020-135-87-96

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО ФАКТОРА НА ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ *SILENE JAIENSIS* N.I. RUBTZOV И *CREPIS PURPUREA* (WILLD.) M. ВЕВ. И СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

**Ирина Вячеславовна Митрофанова, Наталия Николаевна Иванова,
Анфиса Евгеньевна Палий, Иван Николаевич Палий,
Ольга Владимировна Митрофанова**

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

Представлены результаты влияния температуры на регенерацию микропобегов и уровень содержания фенольных соединений в микропобегах двух видов редких растений в условиях *in vitro*. Показано, что максимальный рост основного и образование адвентивных побегов, листьев происходило при температуре 21-23°C. Проведены рекогносцировочные опыты по биохимическому исследованию органов и тканей изучаемых видов. Установлено, что листья содержат высокие концентрации фенольных веществ и характеризуются большим разнообразием компонентов. Показано, что по мере увеличения температуры возрастало содержание суммы фенольных веществ, что негативно влияло на морфогенетический потенциал исследуемых видов.

Ключевые слова: редкий эндемик; микропобег; морфогенетический потенциал; БАВ; *in vitro*

Введение

Выращивание редких и эндемических видов в условиях *in vitro* создает уникальные возможности для размножения и комплексного изучения указанных растений на клеточном и тканевом уровнях [1, 5, 13, 15, 16]. В настоящее время наряду с традиционными способами размножения и сохранения растений *in situ* и *ex situ* активно используют современные биотехнологии. Особая роль в размножении растений и изучении процессов морфогенеза *in vitro* принадлежит физическим факторам культивирования, таким как интенсивность освещения, спектральный состав света, фотопериод, температура и pH питательной среды [21, 23]. Выявлено, что в условиях *in vitro* физические факторы могут значительно влиять на процессы регенерации растений, причем это влияние может сохраняться длительный период [17]. Для большинства эксплантов декоративных, плодовых и редких дикорастущих растений температурный показатель находится в пределах 22-25°C. Однако различные генотипы растений и этапы морфогенеза в условиях *in vitro* требуют индивидуального подхода [4, 21]. Часто при клональном микроразмножении следует принимать во внимание температурный показатель, требуемый непосредственно для данного вида растений, культивируемого в условиях *in situ* и *ex situ*.

Многие из видов редких и эндемических растений являются источниками ценных биологически активных веществ (БАВ), к которым относятся и фенольные соединения. Природные фенольные соединения – перспективный класс противоопухолевых и радиопротекторных соединений [11, 20]. Фенольные соединения, являясь дыхательными пигментами, участвуют в осуществлении процессов дыхания растений, в окислительно-восстановительных реакциях и входят в состав некоторых ферментов,

играя важную роль в фотосинтезе и оказывая влияние на синтез белков. Кроме того, вещества фенольной природы проявляют выраженные рострегулирующие свойства, тормозя процесс прорастания семян, удлинение стеблей и корней. В то же время они обладают фитоцидными свойствами и обеспечивают иммунитет растений к грибной, а особенно, к бактериальной инфекции. В литературе не раз сообщалось, что многие лекарственные растения в условиях *in vitro* сохраняют способность к синтезу вторичных веществ, в том числе и фенольных соединений. В связи с этим большое практическое значение приобретает инициация из них каллусных культур, а также культур тканей и органов, как возможных источников биологически активных соединений [1, 2, 9, 10]. Однако, накопление продуктов окисления фенолов в условиях *in vitro* приводит к ингибированию деления и роста клеток, что ведет к гибели как первичного экспланта, так и самого растения или к уменьшению способности тканей к регенерации [3]. Актуальным является определение особенностей накопления как суммы фенольных веществ, так и индивидуальных компонентов в тканях растений, культивируемых *in vitro*.

Цель исследований – оценка влияния температуры на клональное микроразмножение и уровень содержания фенольных соединений в регенерантах *Crepis purpurea* (Willd.) M. Bieb. и *Silene jailensis* N.I. Rubtzov в условиях *in vitro*.

Объекты и методы исследования

Исследования выполняли в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений отдела биологии развития растений, биотехнологии и биобезопасности ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН» на базе уникальной научной установки «ФИТОБИОГЕН». В работе придерживались как общепринятых, так и разработанных в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений методов [4, 6].

В качестве исходного материала использовали регенеранты редких исчезающих видов флоры Крыма: *Crepis purpurea* (Willd.) M. Bieb., *Silene jailensis* N.I. Rubtzov, полученные в условиях *in vitro*.

S. jailensis по своей экологической природе относится к облигатным хазмофитам – «растениям трещин», многолетний полукустарничек с моноподиальными побегами. *C. purpurea* является видом двойной экологической природы, способным к развитию как на покрытых трещинами скальных поверхностях, так и на коллювии осыпных чехлов. Это многолетние травянистые поликарпики [7]. Изучаемые нами виды внесены в Красные книги РФ и Республики Крым и относятся к 3 категории редкости [3].

Для изучения процессов морфогенеза и регенерации растений применяли агаризованные питательные среды на основе базовой среды Мурасиге и Скуга (МС) [17], которые были дополнены регуляторами роста БАП (6–бензиламинопурин, Sigma, США) в концентрации 0,1–0,3 мг/л, ИМК (индолил-3-масляная кислота, Sigma, США) – 0,1–0,3 мг/л и ГКз (гибберелловая кислота, Sigma, США) – 0,1–0,5 мг/л. Все варианты сред содержали 30 г/л сахарозы и 9 г/л агара (PanReac, Испания). Контролем служила среда без регуляторов роста. рН среды доводили до 5,7–5,8 1 н. раствором NaOH или HCl.

Питательные среды автоклавировали при 120°C в течение 5–12 мин в паровом стерилизаторе LAC 5060S («DAIHAN LABTECH», Южная Корея). Регуляторы роста и витамины вводили в среды после автоклавирования в стерильных условиях бокса биологической безопасности SC2 («ESCO», Сингапур). Субкультивирование эксплантов осуществляли через каждые 3 недели.

Для изучения влияния температуры в качестве исходных эксплантов использовали укороченные побеги без листьев *C. purpurea* длиной 0,6 см и сегменты

побегов без листьев длиной 1,0 см у *S. jailensis*, полученные ранее в условиях *in vitro*. Культуральные сосуды помещали на стеллажи в фитокапсулах «БИОТРОНа» при температуре от 21 до 24°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности 2,5 клк. Субкультивирование эксплантов осуществляли через каждые 10, 20 и 30 суток. Учитывали длину побега, количество листьев, количество адвентивных побегов после 10, 20 и 30 суток культивирования.

Для изучения БАВ различных органов и тканей были приготовлены этанольные экстракты из регенерантов. Экстракцию проводили 96% этиловым спиртом (при соотношении сырья и экстрагента 1:10) настаиванием в течение 10 сут при комнатной температуре. Содержание суммы фенольных веществ определяли спектрофотометрически по методу Фолина-Чиокальтео, в пересчете на галловую кислоту (Sigma-Aldrich, Германия) [2].

Компонентный состав фенольных соединений определяли на хроматографе Ultimate 3000 Dionex Thermo Scientific, укомплектованном 4-канальным градиентным насосом LPG-3400SD, со встроенным дегазатором, автоматическим инжектором WPS-3000SL, термостатом колонок TCC-3000SD, диодноматричным детектором DAD-3000. Для проведения анализа была использована аналитическая хроматографическая колонка Eclipse Plus C18, 4.6 на 250 мм, размер частиц 5 мкм. Применяли градиентный режим элюирования. Подвижная фаза В – ацетонитрил, С – 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде: 0-5 мин 5% В, 5-35 мин – подъем от 5 до 30% В, 35-40 мин подъем от 30 до 90 % В, 40-41 мин подъем до 100% В, 41-46 мин – 100% В, 46-51 мин снижение от 100% В до 5% В, 51-55 мин 5% В. Скорость потока 0,7 мл/мин. Температура термостата колонок 40°C. Объем пробы 7 мкл. Для количественного анализа применяли аналитическую колонку Eclipse Plus C18, диаметром 4,6 мм, длиной 250 мм, размером частиц сорбента 5 мкм. Идентификацию пиков производили на основании совпадения времени удерживания аналита и стандартного образца, а также совпадения УФ-спектров.

Статистическая обработка данных была проведена согласно общепринятым методам математической статистики при помощи стандартного пакета документов Microsoft Office Excel (2010).

Результаты и обсуждение

Для получения проростков использовали семена растений *S. purpurea* и *S. jailensis*, прошедшие холодовую обработку. Апикальные части полученных в условиях *in vitro* проростков культивировали на среде Мурасиге и Скуга, дополненной регуляторами роста. Для индукции развития адвентивных почек и микропобегов наиболее эффективным оказалось введение в питательную среду 0,1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК совместно с 0,1 мг/л ГКз. После 3-го субкультивирования частота регенерации у всех исследуемых видов достигала 90-100%. Для дальнейшего размножения использовали микрочеренкование полученных *in vitro* микропобегов и микророзеток на среде МС, дополненной 0,1 мг/л БАП или 0,1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИМК + 0,1 мг/л ГКз [5]. При этом кроме развития основного побега происходило образование 4-7 адвентивных побегов или микророзеток.

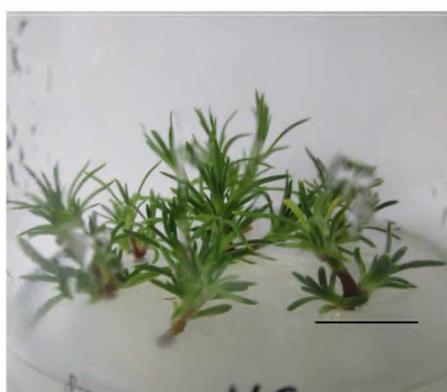
При изучении морфогенеза и регенерации микропобегов и микророзеток *in vitro* двух видов реликтовых эндемиков экспланты находились под воздействием различных температур в диапазоне 21-24°C. При этом была отмечена видоспецифичная реакция. Так, у вида *S. jailensis* после 30 суток культивирования положительные результаты получены при 21-22°C. Микропобеги компактные с укороченными междоузлиями, одинаковой длины (1,7-1,9 см); количество дополнительных побегов составило 1,8-2,0

шт. Листья темно-зеленые, нормального размера; общее количество – 22,3-24,0 шт., вес экспланта 89,0-220,0 мг (табл.1, рис. 1А).

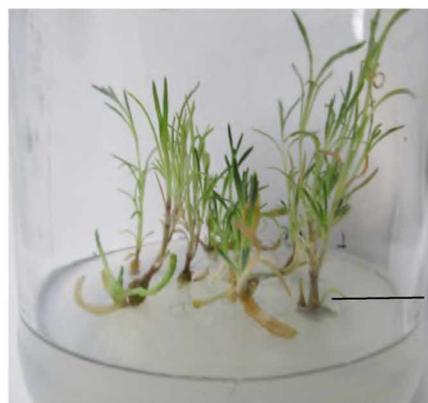
Таблица 1
Морфометрические показатели микропобегов *Silene jailensis* N.I. Rubtsov в культуре *in vitro* через 30 суток культивирования при различной температуре

Температура °С	Размер исх. эксп.см	Вес исходного экспланта, мг	Размер экспланта через 30 сут., см	Вес экспланта через 30 сут., мг	Общее кол-во листьев, шт.	Кол-во дополнит. побегов, шт.
21	1,0	16,6±0,92	1,70±0,90	89,0±0,73	22,9±1,97	2,0±0,19
22	1,0	16,6±0,92	1,90±0,05	220,0±0,73	24,0±2,29	1,8±0,31
23	1,0	16,7±0,92	2,9±0,27	229,3±0,75	18,5±1,19	2,3±0,21
24	1,0	16,7±0,92	2,9±0,19	220,0±0,74	17,1±1,8	2,0±0,37

Интенсивный рост и последующее угнетение развития микропобегов *S. jailensis* наблюдали при температуре 23-24°C, при этом с ростом температуры отмечали изменение морфологии побега, уменьшение размеров в радиальном направлении, наличие удлиненных междоузлий и листьев разного размера (рис. 1Б).



А



Б

Рис. 1 Экспланты *Silene jailensis* N.I. Rubtsov после 30 суток культивирования при температуре 21°C (А) и 24°C (Б). Масштаб 1 см

Через 30 суток культивирования побеги достигали 2,9 см, количество дополнительных побегов составило 2,0-2,3 шт./эксплант, общее количество листьев – 17,1-18,5 шт./микропобег, вес экспланта – 220,0-229,3 мг (табл. 1). Культивирование при температуре 24°C способствовало формированию рыхлого каллуса в основании побегов, что угнетало дальнейшее развитие микропобегов и приводило к их гибели.

Для эксплантов *S. purpurea* также прослеживалась зависимость их морфогенетического потенциала от температуры культивирования. Так при температуре 21°C длина побега составила 0,91 см, количество дополнительных побегов – 1,8 шт./эксплант, общее количество листьев на коротких черешках – 22,05 шт./микропобег и вес экспланта через 30 суток культивирования составил 726,0 мг (табл. 2, рис. 2 А). Наряду с этим наблюдали некроз листьев, замедление формирования дополнительных побегов и впоследствии угнетение развития.

Таблица 2

Морфометрические показатели микропобегов *Crepis purpurea* (Willd.) M. Bieb. в культуре *in vitro* через 30 суток культивирования при различной температуре

Температура ^о С	Размер исх. экспл., см	Вес исходного экспланта, мг	Размер экспланта через 30 сут., см	Вес экспланта через 30 сут., мг	Общее количество листьев, шт.	Количество дополнитель- ных побегов, шт.
21	0,6	69,6±0,64	0,91±0,01	726,0±7,02	22,5±2,26	1,8±0,40
22	0,6	69,6±0,64	0,95±0,02	1075±14,9	25,0±2,36	2,4±0,43
23	0,6	70,1±0,68	0,93±0,03	791,6±4,40	26,8±2,73	2,3±0,16
24	0,6	69,5±0,65	0,95±0,02	750±2,86	26,8±1,96	2,6±0,40

Оптимальной для роста и развития микророзеток была температура 22-23°C. Через 30 суток культивирования длина укороченного побега достигала в среднем 0,94 см, количество адвентивных микророзеток – 2,4 шт./эксплант, общее количество листьев – 25,0-26,8 шт./микропобег, вес конгломератов микророзеток достигал 791,0-1075 мг (табл. 2, рис. 2 Б). При температуре 22°C черешки листьев были удлиненные, тогда как при температуре 23°C – конгломераты микророзеток более компактные и однородные.



Рис. 2 Экспланты *Crepis purpurea* (Willd.) M. Bieb. после 30 сут культивирования при температуре 21°C (А) и 23°C (Б). Масштаб 1 см

Повышение температуры до 24°C снижало морфогенетический потенциал растений *C. purpurea*. При этом отмечали некроз отдельных листьев, в процессе развития эксплантов в питательную среду интенсивно выделялись фенолы, что способствовало изменению ее окраски (от светло-зеленой до темно-коричневой). В результате происходило ингибирование дальнейшего развития микророзеток и приводило к их гибели.

Проведенные эксперименты подтвердили видоспецифичность редких дикорастущих растений к температуре культивирования в условиях *in vitro*, что характерно для многих других видов растений. Так каллус *Begonia venosa* Skan., который удалось индуцировать из эксплатов соцветий на питательной среде, дополненной 0,5 мг/л БАП и 0,5 мг/л НУК, культивировали при температуре 21°C. Снижение температуры до 17°C замедляло индукцию и рост каллуса, тогда как повышение до 25°C вызывало его некроз [21]. Экспланты из чешуй луковиц гиацинта, культивируемые при температуре 15-20°C, формировали многочисленные микропобеги *in vitro*, тогда как экспланты, культивируемые при 25°C формировали единичные побеги [3].

Для большинства древесных и некоторых травянистых растений окисление фенольных соединений является серьезной проблемой в культуре *in vitro*. Фенольные соединения, как правило, образуются в ответ на стресс, вызванный изменением физических факторов культивирования, в частности температуры [9, 12]. В процессе клонального микроразмножения при окислении фенолов затрудняется поступление питательных веществ к эксплантам, что может вызвать их гибель. Частые пассажи на свежую среду, использование древесного угля, аскорбиновой кислоты позволяет уменьшить негативное влияние процесса окисления фенолов в условиях *in vitro*.

В результате проведенных рекогносцировочных опытов по биохимическому исследованию органов и тканей установлено, что листья содержат высокие концентрации фенольных веществ и характеризуются большим разнообразием компонентов. Для определения участия веществ фенольной природы в процессах роста и развития растений в условиях *in vitro* проведены исследования компонентного состава и содержания фенольных соединений в этанольных экстрактах из регенерантов *C. purpurea*, которые культивировались при различных температурах. Среди фенольных веществ *C. purpurea* с помощью метода ВЭЖХ идентифицированы флавоноиды (кверцетин, рутин, а также производные кемпферола) и гидроксикоричные кислоты (кофейная, дикофеилхинная, розмариновые кислоты) (табл. 3, рис.3). Наибольшим разнообразием компонентного состава фенольных соединений отличался экстракт из регенерантов *C. purpurea*, которые развивались при температуре 21°C. Минимальные содержания суммы фенольных соединений и индивидуальных компонентов выявлено в регенерантах, культивируемых при температуре 23°C, максимальное – при 24°C. В экстракте *C. purpurea* при температуре 24°C обнаружена дикофеилхинная кислота в достаточно высокой концентрации, которая отсутствовала в эксплантах, выращенных при других температурах.

Таким образом, повышение температуры культивирования до 24°C вызывало интенсификацию процессов биосинтеза фенольных соединений в тканях *C. purpurea*, что приводило к значительному увеличению их содержания, в основном, за счет гидроксикоричных кислот. При температуре 24°C наблюдали интенсивное окрашивание питательной среды сначала в зеленый, а потом в коричневый цвет. Высокие концентрации фенольных веществ вызывали снижение морфогенетического потенциала вида, вплоть до гибели эксплантов.

Таблица 3

Содержание фенольных соединений в эксплантах *Crepis purpurea* (Willd.) M. Bieb. при различных температурах культивирования

Соединение	Содержание, мг/100 г (в пересчете на сырой вес)			
	21°C	22°C	23°C	24°C
<i>транс</i> -Кофейная кислота	38,0±3,8	64,0±6,4	55,0±5,5	110±11
Рутин	30,0±3,0	152±15	52,0±5,2	340±34
Дикофеилхинная кислота	-	-	-	443±44
Розмариновая кислота	87,0±8,7	-	-	-
Кверцетин	13,2±1,3	-	-	-
Сумма фенольных соединений (в пересчете на галловую кислоту)	270±8	286±9	218±7	1020±30

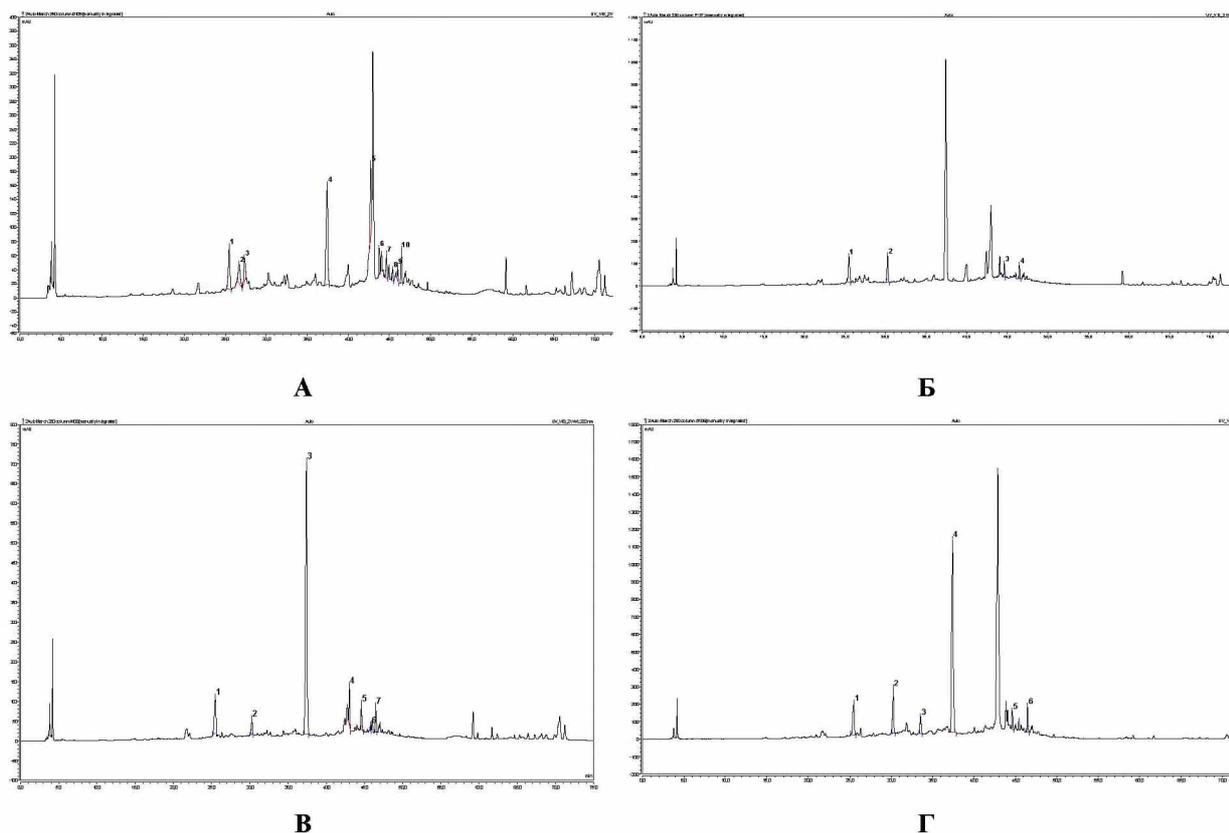


Рис. 3 Хроматограммы этанольных экстрактов из эксплантов *Crepis purpurea* (Willd.) M. Bieb. при различной температуре культивирования в условиях *in vitro*: А – 21°C; Б – 22°C; В – 23°C; Г – 24°C

Аналогично был изучен компонентный состав и содержание фенольных соединений в этанольных экстрактах из регенерантов *S. jaiensis*. Установлено, что при всех температурах культивирования в тканях *S. jaiensis* присутствуют рутин, кемпферол, кофейная и дикофеилхинная кислоты (рис.4, табл. 4).

Таблица 4

Содержание фенольных соединений в эксплантах *Silene jaiensis* N.I. Rubtsov при различных температурах культивирования

Соединение	Содержание, мг/100 г (в пересчете на сырой вес)			
	21°C	22°C	23°C	24°C
<i>транс</i> -Кофейная кислота	104±10	103±10	127±12	202±20
Рутин	540±54	448±45	310±31	282±28
Кемпферол	63,0±6,3	77,0±7,7	53,0±5,3	53,0±5,3
Дикофеилхинная кислота	470±47	702±70	840±84	850±85
Сумма фенольных соединений (в пересчете на галловую кислоту)	1320±40	1470±44,1	1592±48	1715±51

По мере увеличения температуры возрастало и содержание суммы фенольных веществ. Однако концентрации отдельных компонентов изменялись разнонаправленно.

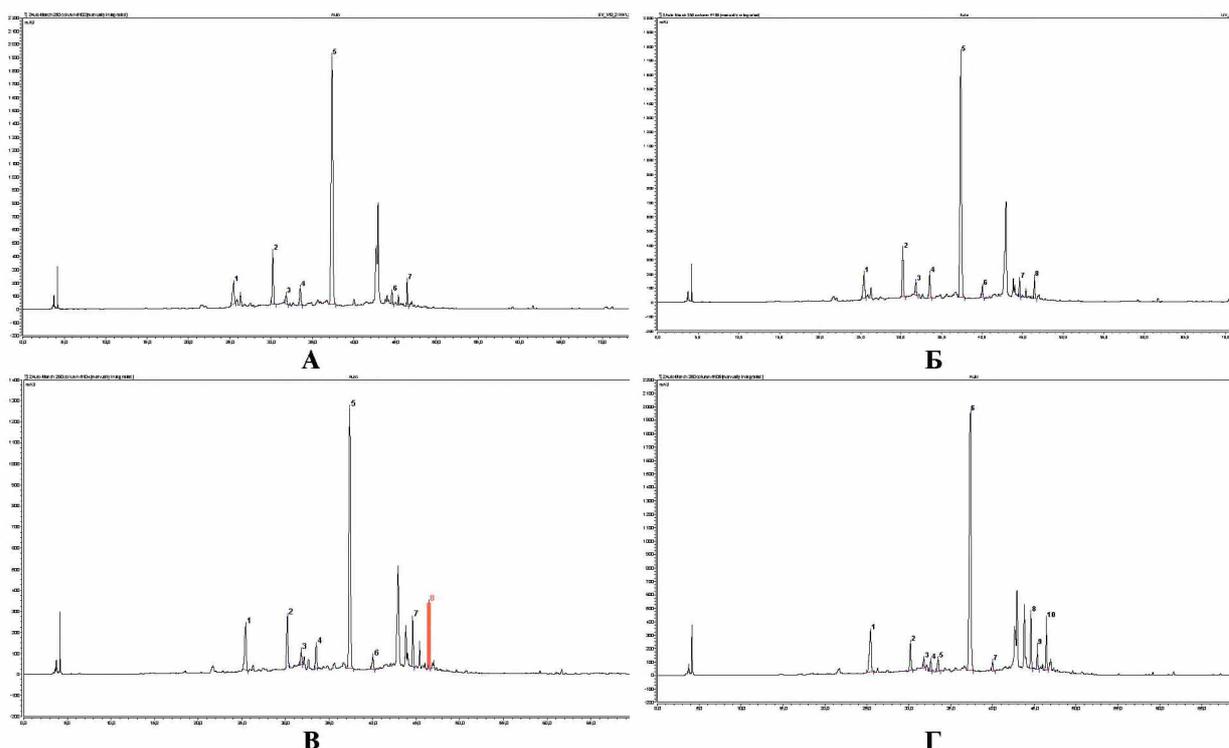


Рис. 4 Хроматограммы этанольных экстрактов из эксплантов *Silene jailensis* N.I. Rubtsov при различной температуре культивирования в условиях *in vitro*: А – 21°C; Б – 22°C; В – 23°C; Г – 24°C

Так, содержание гидроксикоричных кислот (кофейной и дикофеилхинной) возрастало, достигая максимума при температуре 24°C. Максимальное содержание рутина выявлено в растениях, выращенных при температуре 21°C, затем его концентрация постепенно снижалась. Для кемпферола максимальное содержание выявлено при 22°C, минимальное – при 23°C и 24°C.

Выводы

В результате проведенных исследований установлено, что морфогенетический потенциал в условиях *in vitro*, компонентный состав и содержание фенольных соединений в тканях регенерантов *S. purpurea* и *S. jailensis* в значительной степени зависят от температуры культивирования эксплантов. Выявлена видоспецифичность эндемичных видов по отношению к температуре культивирования. Показано, что оптимальная температура для роста и развития микророзеток *S. purpurea* находилась в интервале 22-23°C, а для *S. jailensis* – 21-22°C. Полученные микропобеги не имели морфологических отклонений, были жизнеспособными и активно образовывали адвентивные побеги и новые листья.

При температуре 21-23°C содержание фенольных веществ в регенерантах *S. purpurea* находится на одном уровне, который не оказывает угнетающего действие на рост и развитие регенерантов. Увеличение температуры культивирования до 24°C приводит к резкому росту концентрации фенольных веществ (более чем в 4 раза), в результате которого происходит гибель растений. В регенерантах *S. jailensis* увеличение температуры культивирования приводит к росту суммарного содержания фенольных соединений, *транс*-кофейной и дикофеилхинной кислот. При температурах 23°C и 24°C содержание этих веществ превышает сумму фенольных соединений в 1470 мг/ 100 г, что критично для последующего развития регенерантов, приводя к различным морфобиологическим изменениям у полученных растений *S. jailensis*.

Анализ полученных данных позволяет предположить, что интенсификация образования дикофеилхинной кислоты может играть важную роль в снижении и утрате жизнеспособности у растений *S. purpurea* в культуре *in vitro*.

Работа была выполнена в рамках Госзадания № 0829-2019-0038 ФГБУН «НБС-ННЦ»

Благодарность

Благодарим старшего научного сотрудника ФГБУН «НБС-ННЦ», к.б.н. Никифорова А.Р. за предоставленные семена редких эндемиков.

Список литературы

1. Амброс Е.В., Коцун О.В., Новикова Т. И., Высочина Г.И. Клональное микроразмножение редкого вида *Astragalus sericeocanus* Gontsch. и содержание фенольных соединений в условиях *in vitro* // Turczaninowia. – 2018. – Т. 21, № 4. – С. 87–99 DOI: 10.14258/turczaninowia.21.4.10 <http://turczaninowia.asu.ru>
2. Запрометов М.Г. Вторичный метаболизм и его регуляция в культурах клеток и тканей растений // Культура клеток растений. – М., 1981. – С. 37-50.
3. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / Министерство природных ресурсов и экологии РФ; Федеральная служба по надзору в сфере природопользования; РАН; Российское ботаническое общество; МГУ им. М.В. Ломоносова; Гл. редколл.: Ю.П. Трутнев и др.; Сост. Р.В. Камелин и др. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 885 с.
4. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – К: Аграрна наука, 2011. – 344 с.
5. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Иванова Н.Н., Жданова И.В., Челомбит С.В., Кузьмина Т.Н., А.Р. Никифоров, Руденко М.В. Биотехнологические приемы размножения некоторых представителей редких и эндемичных видов флоры Крыма: Методические рекомендации. Под общей редакцией И.В. Митрофановой. – ИТ "АРИАЛ": Симферополь, 2019. – 49 с.
6. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Иванова Н.Н., Егорова Н.А., Кузьмина Т.Н., Лесникова-Седошенко Н.П., Тевфик А.Ш., Челомбит С.В. Этапы регенерации *in vitro* декоративных, ароматических и плодовых культур / Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур. Под общей редакцией И.В. Митрофановой. – ИТ "АРИАЛ": Симферополь, 2018. – С. 27-126.
7. Никифоров А. Р. Реликтовые эндемики флоры Горного Крыма в составе петрофитона и гляреофитона // Ботан. журн. – 2016. – Т. 101, № 9. – С. 1008–1024.
8. Носов А. М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений // Под ред. Р. Г. Бутенко. – М.: Наука, 1991. - С. 5–12.
9. Baskaran P., Moyo M., Van Staden J. *In vitro* plant regeneration, phenolic compound production and pharmacological activities of *Coleonema pulchellum* // South African Journal of Botany. – 2014. – Vol. 90. – P. 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.10.005>
10. Diasab M.I., Sousaa M. J., Alvesb R.C., Ferreira I.C. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review // Industrial Crops and Products. 2016. – Vol. 82. – P. 9-22. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.016>
11. Huang M., Xie Y., Chen L., Chu K., Wu S., Lu J., Chen X., Wang Y., Lai X. Antidiabetic effect of the total polyphenolic acids fraction from *Salvia miltiorrhiza* Bunge in

diabetic rats // *Phytother Res.* – 2012. – Vol. 26, N 6. – P. 944-948
<https://doi.org/10.1002/ptr.3654>

12. *Isah T.* Stress and defense responses in plant secondary metabolites production // *Biological Research.* – 2019. – Vol. 52: 39 <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>

13. *Ivanova N., Mitrofanova O., Lesnikova-Sedoshenko N., Mitrofanova I.* Biotechnology Features of *Lamium glaberrimum* (K. Koch.) Taliev (Lamiaceae) Direct Regeneration // *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant.* – 2018. – Vol. 58, Suppl. 1. – P. 44. IF 1.057 <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9929-7>

14. *Lambardi M.* Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants / M. Lambardi, E.A. Ozudogru, S.M. Jain (eds.). - New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer. 2013. – 490 p. DOI 10.1007/978-1-62703-074-8

15. *Mitrofanova O., Kuzmina T., Mitrofanova I., Rudenko M.* In vitro organogenesis and somatic embryogenesis in *Seseli lehmannii* Degen inflorescence culture // *Journal of Biotechnology.* – 2019. – Vol. 305, № 5. – P. S29-S30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.111>

16. *Molkanova O., Shirnina I., Mitrofanova I.* Conservation and micropropagation of rare and endemic species in genpool collection of the Russian Federation // *Journal of Biotechnology.* – 2018. – Vol. 280S. – P. 83-84 <https://doi.org/10.1016/j.biotech.2018.06.274>

17. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, N 3. – P. 473-497. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

18. *Pierik R.L.M., Tetteroo T.A.A.* Vegetative propagation of *Begonia venosa* Skan *in vitro* from inflorescence explants // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 1987. – N 10. – P. 135–142.

19. *Ramirez-Mosqueda M.A.* The effect of light quality on growth and development of *in vitro* plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. / M.A. Ramirez-Mosqueda, L.G. Iglesias-Andreu, J.R. Bautista-Aguilar // *Sugar Tech.* – 2017. – Vol. 19, N 3. –P. 331-336 <https://doi.org/10.1007/s12355-016-0459-5>

20. *Ohno N., E. Yoshigai, T. Okuyama, T. Yamamoto, K. Sato, Y. Ikeya, M. Nishizawa* Chlorogenic acid from the Japanese herbal medicine Kinginka (Flos *Lonicerae japonicae*) suppresses the expression of inducible nitric oxide synthase in rat hepatocytes // *HOAJ Biology.* – 2012. – Vol. 1. – P. 1-10 <https://doi.org/10.7243/2050-0874>

21. *Yaacob J.S., Mahmud N., Taha R.M., Mohamed N., Yusoff A.I.M., Saleh A.* Optimization of culture condition (sucrose, pH, and photoperiod) for *in vitro* regeneration and early detection of somaclonal variation in ginger lime (*Citrus assamensis*) // *The Scientific Word Journal.* – 2014 – Vol. 2014. Article ID 262710, 9 pp. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/262710>

Статья поступила в редакцию 21.05.2020 г.

Mitrofanova I.V., Ivanova N.N., Paliy A.E., Paliy I.N., Mitrofanova O.V. Influence of the temperature factor on regeneration features of *Silene Jailsensis* N.I. Rubtzov and *Crepis Purpurea* (Willd.) M. Bieb. and the content of phenolic substances *in vitro* // *Bull. of the State Nikita Botan. Gard.* – 2020. – № 135. – P. 87-96.

The results of temperature influence on the regeneration of microshoots and the level of phenolic compounds in microshoots of two rare plant species under *in vitro* conditions are presented. It is shown that the maximum growth of the main and the formation of adventitious shoots, leaves occurred at a temperature of 21-23°C. Reconnaissance experiments on the biochemical study of organs and tissues of the studied species were conducted. It was found that the leaves contain high concentrations of phenolic substances and are characterized by a wide variety of components. It is shown that as the temperature increased, the content of the sum of phenolic substances increased, which negatively affected the morphogenetic potential of the studied species.

Keywords: rare endemic; microshoot; morphogenetic potential of biologically active substances; *in vitro*