

УДК 633.81:57.085.2

DOI: 10.36305/0513-1634-2022-144-82-87

РАЗВИТИЕ ЭКСПЛАНТОВ ЧАБЕРА ГОРНОГО НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *IN VITRO*

Наталья Алексеевна Егорова, Мария Сергеевна Коваленко,
Ольга Валерьевна Якимова, Татьяна Витальевна Платонова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»,
295034, Республика Крым, город Симферополь, Киевская ул., д. 150
E-mail: yegorova.na@mail.ru, mariya_kovalenko_1992@mail.ru, olyuyakimova@yandex.ru,
tatplat@mail.ru

Satureja montana L. – ценное пряно-ароматическое и лекарственное растение, которое широко используется в кулинарии, косметике, а также в медицине, благодаря противовоспалительным, антисептическим и антиоксидантным свойствам. При проведении селекции или интродукции часто возникает необходимость быстрого размножения ценных образцов или сортов, для чего целесообразно привлечение биотехнологических методов размножения *in vitro*. Целью работы было изучение влияния гормонального состава питательной среды на развитие эксплантов *Satureja montana* L. на начальных этапах клонального микроразмножения. Подобран режим стерилизации растительного материала: последовательная обработка 70% этанолом (40 секунд) и 50% раствором «Брадофен» (6-9 мин), при котором получали 100% асептических жизнеспособных эксплантов. В качестве эксплантов использовали сегменты стебля с узлом, которые культивировали на модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением различных регуляторов роста. При введении эксплантов *in vitro* наибольшее число побегов (2,9 шт./эксплант) наблюдали на средах с 0,5 мг/л бензиламинопурина или тидиазурина, однако при этом отмечено до 23,7-58,7% оводненных побегов. Более эффективно добавление в среду МС кинетина, обеспечивающего, наряду с множественным побегообразованием, максимальную длину побегов (32,6-54,0 мм). На этапе, собственно, микроразмножения при сравнении разных цитокининов также было установлено преимущество использования кинетина. Для получения нормально развитых побегов и максимального коэффициента размножения (6,4) целесообразно культивировать экспланты на среде МС с добавлением 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л гибберелловой кислоты.

Ключевые слова: *Satureja montana* L.; клональное микроразмножение; *in vitro*; эксплант; питательная среда

Введение

Чабер горный (*Satureja montana* L.) – ценное пряно-ароматическое, эфиромасличное и лекарственное растение, которое широко используется в пищевой, косметической промышленности, медицине. Это многолетний полукустарник семейства Яснотковые (Lamiaceae), произрастающий в странах Южной Европы, Ближнего Востока, Азии, Северной Америки. Высокое содержание полифенолов и флаваноидов в сырье *Satureja montana* L., а также тимола и карвакрола в эфирном масле (до 60-80%) обуславливает его антиоксидантные, антимикробные и противовоспалительные свойства [5]. Поэтому продукты переработки чабера применяют при лечении заболеваний кожи, опорно-двигательного аппарата, верхних дыхательных путей, стоматита, цистита и других [12]. Все это способствует научному интересу к данному виду, прежде всего направленному на изучение его фитохимических свойств [5, 12]. Наряду с этим, в ФГБУН «НИИСХ Крыма» проводится селекционная работа по созданию новых высокопродуктивных сортов *Satureja montana* L. [3]. При проведении селекции или интродукции часто возникает

необходимость быстрого размножения ценных образцов или сортов, для чего целесообразно привлечение биотехнологического метода клонального микроразмножения *in vitro*, имеющего много преимуществ по сравнению с традиционными приемами размножения [4].

В литературе имеются сведения о микроразмножении разных видов чабера – *Satureja avromanica* Maroofi. [7], *Satureja thymbra* L. [11], *Satureja punctata* (Benth.) R.Br. ex Briq. [13], *Satureja abyssinica* (Benth.) Briq. [14], *Satureja hortensis* L. [8], *Satureja khuzistanica* Jamzad [9]. В основном они направлены на оптимизацию питательных сред и условий для разных этапов размножения *in vitro*. При этом авторы в качестве эксплантов чаще всего использовали верхушки побегов [7, 8, 11, 13] или сегменты стебля с узлом [9, 14]. Проводятся исследования, касающиеся анализа накопления вторичных метаболитов (флаваноидов, розмариновой кислоты) в каллусной или суспензионной культуре у видов чабера [6, 10]. Так, R. Vrancheva с соавт. [15] у *Satureja montana* выявили особенности синтеза фенольных соединений в регенерирующих *in vitro* растениях. Однако, по имеющимся данным, для чабера горного биотехнология размножения *in vitro* ранее не разрабатывалась. В связи с этим целью работы было изучение влияния гормонального состава питательной среды на развитие эксплантов *Satureja montana* на начальных этапах клонального микроразмножения (введения в культуру *in vitro* и, собственно, микроразмножения).

Материал и методика исследования

В исследованиях использовали растения двух образцов чабера горного (*Satureja montana* L.) №1 и №201-16 из коллекции эфиромасличных, пряно-ароматических и лекарственных растений ФГБУН «НИИСХ Крыма». При введении в культуру *in vitro* и субкультивировании в качестве эксплантов использовали сегменты стебля (5-7 мм) с 1 узлом. Введение в культуру эксплантов, культивирование и приготовление питательных сред выполняли согласно традиционным методам биотехнологии растений [2]. Для стерилизации растительного материала применяли 70% этанол и 50% раствор препарата «Брадофен». Экспланты культивировали в пробирках на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) [2] с добавлением гибберелловой кислоты (ГК₃), кинетина (Кин.), тидиазурона (ТДЗ), 6-бензиламинопурина (БАП) (Sigma, США). Культивирование осуществляли при 26°C, 70% влажности и 16-часовом фотопериоде с освещённостью 2-3 клк. Анализ морфометрических параметров эксплантов проводили на 30-35 сут., при этом определяли количество и длину побегов, число узлов на побеге, количество витрифицированных побегов и некоторые другие параметры. Коэффициент размножения рассчитывали, как число микрочеренков, которое можно получить за одно субкультивирование, для этого количество побегов умножали на среднее число узлов на побеге. В каждом варианте опыта анализировали не менее 20 эксплантов, повторность опыта 2-3-х кратная. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Office (Excel 2010).

Результаты и обсуждение

Одной из задач на этапе введения в культуру *in vitro* является подбор режимов стерилизации эксплантов. При анализе 8 вариантов обработки растительного материала с использованием этанола и «Брадофена» у чабера отмечено 92-100% стерильных эксплантов. Увеличение экспозиции до 18-21 мин. способствовало появлению до 41,2% некротических эксплантов. Оптимальным режимом стерилизации была последовательная обработка материала 70% этанолом (40 секунд) и 50% раствором препарата «Брадофен» (6-9 мин), обеспечившая получение 100% асептических жизнеспособных эксплантов.

Установлено, что при введении сегментов стебля с узлом на питательную среду происходило развитие побегов из пазушных почек, а также формирование адвентивных побегов. Иногда отмечали формирование аномальных бурых оводненных микропобегов. Частота этих процессов зависела от гормонального состава питательной среды. Максимальное число побегов (2,8-2,9 шт./эксплант) выявлено на средах, содержащих БАП, а минимальное (1,3-1,7 шт./эксплант) – на средах с кинетином (табл. 1). Средняя длина побега достигала максимальных значений (47,1-54,0 мм) на питательных средах, содержащих 0,5-2,0 мг/л кинетина. Следует отметить, что при введении в среду БАП или ТДЗ часто развивались витрифицированные побеги, непригодные для дальнейшего размножения. У образца №1 их число достигало 23,7%, а у №201-16 – 58,7%. Анализируя особенности морфогенеза эксплантов чабера на среде МС с различными регуляторами роста, следует отметить, что более эффективным цитокинином являлся кинетин, обеспечивший формирование хорошо развитых длинных побегов, которые можно использовать для дальнейшего черенкования. Поэтому на этапе введения в культуру *in vitro* целесообразно культивировать экспланты на среде МС с кинетином и ГК₃ (по 0,5 мг/л), на которой хотя и развивалось в среднем небольшое число побегов, однако они имели 9,0 узлов, что позволило эффективно проводить их микрочеренкование.

Таблица 1

Влияние гормонального состава питательной среды на развитие эксплантов *Satureja montana* L. при введении в культуру *in vitro*

Образец	Гормональные добавки в среде МС, мг/л	Количество побегов, шт./эксплант	Длина побега, мм	Количество узлов, шт./побег	Количество витрифицированных побегов, %
№1	б/г	1,5±0,2	17,3±1,5	2,7±0,3	0
	0,5 БАП	2,7±0,5	20,5±1,9	3,1±0,6	15,3±1,0
	0,5 Кин.	2,3±0,4	47,1±5,2	6,4±0,4	0
	0,5 ТДЗ	2,2±0,2	37,7±4,0	5,3±0,9	23,7±2,9
	0,5 БАП + 0,5 ГК ₃	2,8±0,3	11,2±2,4	3,2±0,4	17,8±2,5
	0,5 Кин. + 0,5 ГК ₃	1,7±0,3	54,0±6,9	9,0±0,8	0
	2,0 Кин. + 0,5 ГК ₃	1,3±0,2	45,8±6,4	7,3 ±0,8	0
№201-16	б/г	2,4±0,3	27,7±4,2	2,5±0,4	7,4±0,8
	0,5 БАП	2,9±0,4	20,4±3,0	2,1±0,3	42,8±4,9
	0,5 Кин.	2,6±0,4	19,3±3,1	2,0±0,4	15,7±2,1
	0,5 ТДЗ	2,9±0,3	17,7±3,4	1,5±0,2	58,7±6,2
	0,5 БАП + 0,5 ГК ₃	2,3±0,2	23,1±3,3	2,0±0,3	36,4±3,5
	0,5 Кин. + 0,5 ГК ₃	2,0±0,2	32,6±1,9	2,9±0,4	9,6±1,1
	2,0 Кин. + 0,5 ГК ₃	1,8±0,2	16,6±1,5	1,8±0,2	14,3±1,2

При сравнении развития эксплантов разных образцов *S. montana* выявлены генотипические различия. Образец №1 характеризовался лучшей способностью к размножению *in vitro* – у него отмечено меньше витрифицированных побегов, а также развитие более длинных побегов и большее число узлов/побег (табл. 1), что позволило получить больше эксплантов при дальнейшем микрочеренковании, чем у №201-16.

На следующем этапе, собственно, микроразмножения у эксплантов происходило развитие пазушных и адвентивных побегов с несколькими узлами. Это позволило использовать у чабера, также, как и у некоторых других эфиромасличных растений [1], два метода размножения *in vitro* – индукцию адвентивных побегов и микрочеренкование. При сравнении действия разных цитокининов установлено, что длина побегов и количество узлов были выше при введении в среду МС кинетина

(табл. 2). На питательных средах с БАП или ТДЗ из эксплантов развивалось больше побегов, однако повышалась и частота формирования оводненных побегов (до 53,4%). Витрификация особенно сильно проявилась на среде с ТДЗ, на которой также развивался каллус, нежелательный при размножении из-за вероятности появления соматоклональных вариантов. Добавление к кинетину ГК₃ способствовало удлинению побегов и увеличению числа узлов. При анализе влияния различных концентраций кинетина и его комбинаций с другими регуляторами роста установлено, что действие только одного кинетина дало меньший процент витрифицированных побегов. Что касается основного параметра на этапе, собственно, микроразмножения – коэффициента размножения, его максимальные значения (6,5-6,7) получены на среде с ТДЗ или с 0,2 мг/л Кин. и БАП. Однако при этом выявлено большое число витрифицированных побегов. Поэтому на данном этапе для эффективного размножения и получения полноценных побегов у чабера предпочтительно использовать среду МС с 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л ГК₃, которая обеспечивала коэффициент размножения 6,4 за одно субкультивирование (табл. 2).

Таблица 2

Влияние гормонального состава питательной среды на развитие эксплантов *Satureja montana* L. (№ 1) на этапе, собственно, микроразмножения

Гормональные добавки в среде МС, мг/л	Количество побегов, шт./эксплант	Длина побега, мм	Коэффициент размножения	Количество витрифицированных побегов, %
б/г	1,8±0,1	21,0±2,6	4,1±0,6	18,2±2,0
0,5 БАП	3,1±0,5	12,6±1,5	5,5±0,7	15,4±1,9
0,5 ТДЗ	2,6±0,2	15,4±1,9	6,7±0,9	36,9±3,2
1,0 ТДЗ	3,3±0,4	12,6±1,5	5,4±0,6	53,4±4,5
0,5 Кин.	1,6±0,2	19,6±3,5	4,8±0,6	9,8±1,0
1,0 Кин.	1,8±0,1	17,7±3,3	4,9±0,9	15,4±1,1
0,5 БАП + 0,5 Кин.	2,8±0,4	14,7±1,7	5,3±0,7	31,9±3,7
0,2 БАП + 0,2 Кин.	2,5±0,6	19,5±5,1	6,5±1,3	37,5±3,4
0,5 Кин. + 0,5 ГК ₃	2,0±0,2	20,5±2,1	6,4±0,6	11,4±0,9
1,0 Кин. + 0,5 ГК ₃	2,0±0,2	18,8±2,3	5,0±0,6	12,6±1,5
1,0 Кин. + 1,0 ГК ₃	2,4±0,3	17,8±1,7	5,9±0,7	5,4±0,9

Судя по литературным данным, для некоторых видов чабера (*S. thymbra*, *S. punctata*, *S. abyssinica*, *S. avromanica*) в качестве регулятора роста при микроразмножении использовали преимущественно БАП в концентрациях от 0,5 до 2,0 мг/л [7, 11, 13, 14]. В то же время у *S. hortensis* для множественного побегообразования рекомендовали среду МС с 2,0-3,5 мг/л НУК и БАП [8], а у *S. khuzistanica* – среду Линсмайера и Скуга с 1,5 мг/л БАП и 0,5 мг/л индолил-3-масляной кислоты [9]. При этом у многих видов чабера сообщалось о развитии при микроразмножения 3,9-6,2 побега на эксплант длиной не более 25 мм [7, 11, 13, 14]. В наших исследованиях для размножения *S. montana* более целесообразно введение в среду МС кинетина, поскольку БАП способствовал увеличению числа витрифицированных побегов. Культивирование на этой среде позволило использовать не только дополнительные побеги, но и микрочеренкование, что обеспечило коэффициент размножения 6,4. Это свидетельствует о значительной генотипической зависимости морфогенеза эксплантов и необходимости оптимизации условий размножения *in vitro* для новых генотипов, что было показано и для других видов растений [1, 4].

Заключение

Выявлены особенности морфогенеза эксплантов *S. montana* на начальных этапах размножения *in vitro* (введения в культуру и, собственно, микроразмножения) в зависимости от гормонального состава питательной среды и генотипа. Определен режим стерилизации при введении в асептическую культуру – обработка 70% этанолом (40 сек) и 50% раствором «Брадофен» (6-9 мин). Установлено, что питательная среда МС с 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л ГКЗ обеспечивала наибольший коэффициент размножения (6,4) при минимальном развитии оводненных побегов (до 11,4%). Показано, что образец №1 характеризовался лучшей способностью к размножению *in vitro* – у него было в 2-3 раза больше узлов/побег и меньше витрифицированных побегов, чем у №201-16. Полученные данные являются основой для дальнейшей разработки биотехнологии клонального микроразмножения чабера горного.

Список литературы

1. Егорова Н.А. Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение *in vitro*. – Симферополь: Автограф, 2021. – 315 с. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наук. Думка, 1980. – 488 с.
3. Платонова Т.В. Оценка перспективных клонов чабера горного (*Satureja montana* L.) в Предгорном Крыму // Инновации в науке. – 2015. – № 44. – С. 57-61.
4. Cardoso J.C. Micropropagation in the Twenty-First Century. In: Plant cell culture protocols (4th edition). – New York: Humana Press, 2018. – P. 17-46.
5. Hudz N. Phytochemical evaluation of tinctures and essential oil obtained from *Satureja montana* herb // Molecules. – 2020. – Vol. 25. DOI:10.3390/molecules25204763.
6. Khlebnikova D.A., Efanova E.M., Danilova N.A., Shcherbakova Y.V., Sidorova I.R. Flavonoid accumulation in an aseptically cultured summer savory (*Satureja hortensis* L.) // Plants. – 2022. – Vol. 11 (4). DOI:10.3390/plants11040533.
7. Mozafari A.A., Vafaei Y., Karami E. *In vitro* propagation and conservation of *Satureja avromanica* Maroofi – an indigenous threatened medicinal plant of Iran // Physiol. Mol. Biol. Plants. – 2015. – Vol. 21, No 3. – P. 433-439. DOI:10.1007/s12298-015-0313-3.
8. Navroski M.C.I. Multiplicação *in vitro* de segmentos apicais caulinares de segurelha (*Satureja hortensis* L.) // Rev. Bras. Pl. Med. – Campinas. – 2014. – Vol.16, No.1. – P. 117-121.
9. Ramak P., Sharifi M., Kazempour Osaloo S., Ebrahimzadeh H., Behmanesh M. Studies on seed germination and *in vitro* shoot multiplication of *Satureja khuzistanica* Jamzad, an important medicinal plant // African Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10 (83). – P. 19407-19414. DOI:10.5897/AJB11.1311.
10. Sahraroo A. Establishment and characterization of a *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae) cell suspension culture: a new *in vitro* source of rosmarinic acid // Cytotechnology. – 2016. – Vol. 68 (4). – P. 1415-1424. DOI:10.1007/s10616-015-9901-x.
11. Sarropoulou V., Maloupa E. *In vitro* propagation of *Satureja thymbra* L. (Lamiaceae): A valuable aromatic medicinal native plant of the Mediterranean region // GSC Biological and Pharmaceutical sciences. – 2019. – Vol. 09, No. 02. – P. 009-020. DOI: 10.30574/gscbps.2019.9.2.0190.
12. Tepe B., Cilkiz M. A pharmacological and phytochemical overview on *Satureja* // Pharmaceutical Biology. – 2016. – Vol. 54 (3). – P. 375-412. DOI:10.3109/13880209.2015.1043560.

13. Teshome I. Development of an efficient *in vitro* propagation protocol for *Satureja punctata* – A rare aromatic and medicinal plant // Taiwan. – 2016. – Vol. 61 (1). – P. 41-48. DOI:10.6165/tai.2016.61.41.
14. Teshome S., Soromessa T., Feyissa T. *In vitro* propagation of a threatened medicinal plant *Satureja abyssinica* through nodal explants – antimicrobial and antifungal herb // IJBST. – 2017. – Vol. 10 (3). – P. 20-25.
15. Vrancheva R. GC-MS-based metabolite profiling of wild and *in vitro* growing plants of *Satureja montana* L. // Доклади на Българската академия на науките. – 2022. – Vol. 75, No 1. – P. 150-158. DOI:10.7546/CRABS.2022.01.18.

Статья поступила в редакцию 08.05.2022 г.

Yegorova N.A., Kovalenko M.S., Yakimova O.V., Platonova T.V. Development of winter savory explants at the initial stages of *in vitro* micropropagation // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2022. – № 144. – P. 82-87

Satureja montana L. is a valuable spicy-aromatic and medicinal plant widely used in cooking, cosmetics, and medicine due to its anti-inflammatory, antiseptic, and antioxidant properties. The need for rapid multiplication of valuable samples or cultivars frequently arises during breeding or introduction. In this case, it is advisable to use the biotechnological methods of propagation *in vitro*. The aim of the work was to study the influence of the culture medium hormonal composition on the development of *S. montana* explants at the initial stages of clonal micropropagation. The sterilization regime of plant material was optimized: sequential treatment with 70% ethanol (40 sec.) and 50% “Bradofen” solution (6-9 min.), which ensured production of 100% aseptic viable explants. Stem segments with a node were used as explants. They were cultivated on modifications of Murashige and Skoog culture medium (MS) with the addition of various growth regulators. When the explants were introduced *in vitro*, the largest number of shoots (2.9 pieces/explant) was observed on media with 0.5 mg/l of benzylaminopurine or thidiazuron, however, up to 23.7–58.7% of them were hydrated. Addition of kinetin to MS medium was more effective; since, along with a multiple shoot formation, it provides the maximum length of shoots (32.6–54.0 mm). At the stage of micropropagation itself, when comparing different cytokinins, the advantage of kinetin was also established. To obtain normally developed shoots and maximum multiplication index (6.4), it is advisable to cultivate explants on MS medium with addition of 0.5 mg/l of kinetin and 0.5 mg/l gibberellic acid.

Key words: *Satureja montana* L.; clonal micropropagation; *in vitro*; explant; culture medium