

Научная статья
УДК 581.1:630.177.722

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ IN VITRO *HYPERICUM PERFORATUM L.*

Елена Геннадьевна Мартюшова¹, Павел Александрович Мартюшов²,
Анастасия Николаевна Марковская³

^{1, 2, 3} Уральский государственный лесотехнический университет,
Екатеринбург, Россия

¹ martyushovaeg@m.usfeu.ru

² martyushovpa@m.usfeu.ru

³ markovskayaan@m.usfeu.ru

Аннотация. Зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum L.*) – ценное лекарственное сырье для фармакологической промышленности. В статье описан метод in vitro для микрклонального размножения *Hypericum perforatum L.* В процессе прямого органогенеза получены растения – регенеранты.

Ключевые слова: in vitro, *Hypericum perforatum L.*, фитогормоны, питательная среда, растения-регенеранты

Scientific article

INTRODUCTION TO IN VITRO CULTURE OF *HYPERICUM PERFORATUM L.*

Elena G. Martyushova¹, Pavel A. Martyushov², Anastasia N. Markovskaya³

^{1, 2, 3} Ural State Forest Engineering University, Yekaterinburg, Russia

¹ martyushovaeg@m.usfeu.ru

² martyushovpa@m.usfeu.ru

³ markovskayaan@m.usfeu.ru

Abstract. St. John's wort (*Hypericum perforatum L.*) is a valuable medicinal raw material for the pharmacological industry. An in vitro method for microclonal reproduction of *Hypericum perforatum L.* is described in the article. Regenerating plants were obtained in the process of direct organogenesis.

Keywords: in vitro, *Hypericum perforatum L.*, phytohormones, nutrient medium, regenerated plants

Введение

В современной медицинской практике наблюдается устойчивое увеличение использования препаратов растительного происхождения для лечения и профилактики заболеваний. По данным ВОЗ, не менее 80 % населения планеты используют общепринятые медицинские средства, в основном состоящие из растительных экстрактов и биологически активных веществ. В РФ практически 40 % всего многообразия медицинских препаратов содержат в себе растительное лекарственное сырье [1].

Зверобой – лекарственное растение с многовековой историей. В медицинских целях использовался уже в Древней Греции. Наземная часть растения содержит до 140 мг витамина С, до 55 мг каротина, до 13 мг дубильных веществ, флавоноидные соединения, эфирное масло, никотиновую кислоту, антоциан [2]. Благодаря своему составу трава зверобоя внесена в фармакопеи России и многих европейских стран. Эффективность экстрактов зверобоя продырявленного (*H. Perforatum* L.) в терапии депрессий средней и легкой степени доказана клиническими испытаниями [6]. Помимо этого, экстракты *H. perforatum* L. имеют противовирусные, противораковые, антиоксидантные, нейропротекторные свойства [8], способствуют быстрому заживлению ран [10]. При ярко выраженных лечебных свойствах, экстракты *H. perforatum* L. не дают серьезных побочных негативных воздействий [9], это способствует увеличению спроса на фитопрепараты из зверобоя.

Несмотря на то что семена хорошо прорастают, всходы и молодые растения зверобоя растут медленно, в массе гибнут в первые недели жизни (Губанов, 2003). В ценозах встречается периодически, редко образуют куртины [1].

Современные методы вегетативного размножения *in vitro* позволяют ускоренными темпами в необходимом количестве получать качественный посадочный материал для дальнейшего плантационного выращивания в открытом грунте.

В настоящее время в России ведутся работы по введению зверобоя продырявленного в культуру *in vitro* семенами и проростками [3, 5].

Цель, методика и объекты исследования

Объект исследования – зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum* L.), многолетнее травянистое растение семейства зверобоевых (Hypericaceae) [2].

Цель работы – изучение использования летних, вегетативных побегов зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) для введения в культуру *in vitro*. Получение микропобегов прямым органогенезом и адаптация растений-регенерантов к условиям *ex vitro*.

Работа проводилась в учебно-производственной лаборатории микрорепродуктивного размножения древесных и кустарниковых растений Уральского лесотехнического университета в 2022 г.

Для культивирования растений использовали питательную среду Мурашиге – Скуга (MS) [7] с использованием сахарозы, агара, хелата железа, витаминов группы В, с добавлением цитокининов (6-БАП) и ауксинов (ИМК) в разных концентрациях. Стерилизацию питательной среды, инструментов осуществляли по принятым рекомендациям [4].

Растения культивировались в условия 16-часового светового дня, с температурой +24 °С, относительной влажностью 60–70 %.

Опыты закладывали с трехкратной повторностью, по 20 эксплантов в каждой.

В качестве первичных эксплантов использовались сегменты летних, вегетативных побегов зверобоя продырявленного. Стерилизация проводилась в два этапа – предварительная и основная. Предварительная стерилизация была общей для обеих схем – сегменты побегов замачивали в синтетическом мыльном растворе, промывали проточной водой и стерильным дистиллятом.

В условиях ламинара-бокса использовали две схемы стерилизации:

Схема 1. Последовательно выдерживали в 96 %-ном этиловом спирте (1 мин), гипохлорите натрия 5–15 %-ном (10 мин), промывали стерильным дистиллятом.

Схема 2. Последовательно выдерживали в 96 %-ном этиловом спирте (1 мин), гипохлорите натрия 5–15 %-ном с добавлением тимерозала (0,025 г/л) (10 мин), промывали стерильным дистиллятом.

Для инициации использовали питательную среду по прописи Мурашиге-Скуга (MS) с добавлением 6-БАП 0,1 мл/л и ИМК 0,01мл/л. Через 14 дней экспланты пассировали на новую среду с увеличением концентрации 6-БАП до 0,5 мл/л, культивировали в течение 4 недель. Субкультивирование проводили 2 раза с длительностью пассажа 30 суток. Для индукции пролиферации побегов 6-БАП увеличили до 1,5 мл/л.

Ризогенез микрочеренков стимулировали добавлением в питательную среду MS 1 мл/л ИМК, цитокинины были полностью исключены.

Результаты

Первые признаки роста отмечены на 5-е сутки. На 14-е сутки наблюдались побеги 1,5–2 см с 2 парами листьев.

В ходе эксперимента было установлено, что применение тимерозала в качестве усилителя стерилизатора значительно повышает стерильность эксплантов (таблица).

Количество стерильных эксплантов, полученных при применении разных схем стерилизации

Схема стерилизации	Количество эксплантов, шт.	Инфицированные экспланты %	Стерильные экспланты %
Схема 1 (гипохлорит натрия 5–15 %)	30	70	30
Схема 2 (гипохлорит натрия 5–15 % с добавлением тимерозала 0,025 г/л)	30	15	85

Цитокинин 6-БАП в количестве 1,5 мл/л подавил апикальное доминирование и стимулировал развитие боковых почек, в результате сформировались конгломераты укороченных побегов (рис. 1). Коэффициент размножения составил 1/40. Для элонгации побеги зверобоя пассировали на среде MS без гормонов.

Черенки для укоренения нарезали при достижении побегами длины в 5 см (рис. 2).

На среде MS с 1,0 ИМК формирование корневой системы было отмечено на 10–12-е сутки. На 21-е сутки растения пересажены в почво-грунт, содержащий 3 части почвенной смеси, 1 часть песка (рис. 3). Период адаптации к почвенным условиям составил 3 недели.

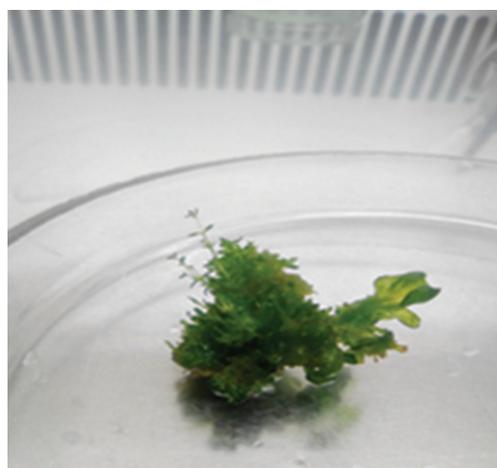


Рис. 1. Конгломерат укороченных побегов *H. Perforatum* L.

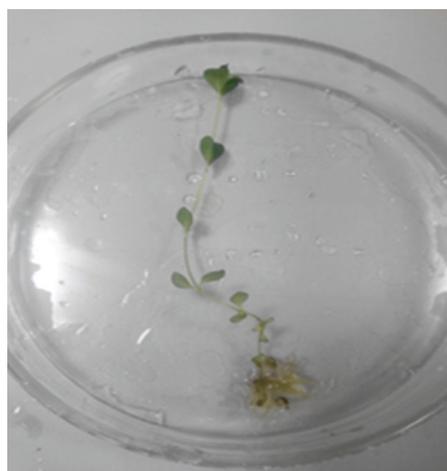


Рис. 2. Укорененный черенок *H. Perforatum* L.



Рис. 3. Растения, адаптированные к условиям ex vitro

Выводы

Установлено, что летние вегетативные побеги *H. Perforatum* L. могут успешно служить материалом для введения в культуру *in vitro*.

Метод вегетативного размножения *in vitro* позволяет быстро получить большое количество растений-регенерантов *H. Perforatum* L.

На этапе собственно микроразмножения концентрация 6-БАП 1,5 мл/л стимулировала развитие максимально большого количества укороченных побегов.

Поскольку укороченные побеги для черенкования непригодны, им требуется пролонгация на среде, не содержащей гормонов.

Список источников

1. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР. М. : ГУГК, 1983. 340 с.

2. 904. *Hypericum perforatum* L. Зверобой продырявленный // Иллюстрированный определитель растений Средней России: в 3 т. / И. А. Губанов, К. В. Киселева, В. С. Новиков, В. Н. Тихомиров. М. : Товарищество науч. изд. КМК : Ин-т технол. исслед., 2003. Т. 2 : Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные). С. 559. 666 с.

3. Гуликова А. А., Тихомирова Л. И., Кушнир Е. Ю. Особенности культивирования *in vitro* зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) и фитохимический состав его экстрактов // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности : матер. XII всерос. науч.-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых с междунар. участием. Бийск, 22–24 мая 2019 г. Бийск : Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова, 2019. С. 391–396.

4. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев : Наукова думка, 1980. 407 с.

5. Особенности размножения *Hypericum perforatum* L. в культуре *in vitro* и развитие растений в открытом грунте / Ж. Э. Михович, Э. Э. Эчишвили, Н. В. Портнягина., О. В. Скроцкая // Самарский научный вестник. 2021. Т. 10, № 4. С. 79–86.

6. Butterweck V., Petereit F., Winterhoff H. et al. Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test // *Planta Medica*. 1998. Vol. 64, № 4. P. 291–294.

7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15 (3).

P. 473–497., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15 (3). P. 473–497.

8. Silva R., Tilker H.A., Cecil J.T. et al. Open-label study of dexamethylphenidate hydrochloride in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder // *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*. 2004. Vol. 14. P. 555–556.

9. Trautmann-Sponsel R.D., Dienel A. Safety of Hypericum extract in mildly to moderately depressed outpatients – a review based on data from three randomized, placebo-controlled trials // *Journal of Affective Disorders*. 2004. Vol. 82. P. 303–307. DOI: 10.1016/j.jad.2003.12.017.

10. Topical Hypericum perforatum improves tissue regeneration in full-thickness excisional wounds in diabetic rat model / Yadollah-Damavandi S., Chavoshi-Nejad M., Jangholi E., Nekouyian N., Hosseini S., Seifae A. et al. // *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2015. Vol. 4. DOI: 10.1155/2015/245328.