

ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ *HYPERICUM PERFORATUM* L. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ В ОТКРЫТОМ ГРУНТЕ

© 2021

Михович Ж.Э., Эчишвили Э.Э., Портнягина Н.В., Скромная О.В.

Институт биологии Коми научного центра УрО РАН (г. Сыктывкар, Российская Федерация)

Аннотация. Показана возможность использования метода культуры клеток и ткани для микроклонального размножения зверобоя продырявленного. Получен прямой морфогенез с использованием проростков без корней в возрасте 12 суток. Установлено, что внесение БАП в низкой концентрации (0,1 мг/л) с ИУК 1,0 мг/л в питательную среду MS способствовало минимальному заложению почек с максимальным выходом морфологически нормальных побегов без необходимости фазы элонгации. На этапе ризогенеза процесс корнеобразования наблюдался во всех вариантах опыта, доля побегов, имеющих корни, высокая и составила от 88 до 90%. Максимальных значений высоты побегов, числа пар листьев на побег и длины корней растения достигали на питательной среде MS с ИУК 1,0 мг/л. Период адаптации к нестерильным условиям составлял 30 суток, при этом наблюдался высокий выход растений-регенерантов. Приживаемость адаптированных растений-регенерантов в полевых условиях была высокой (100%). Выявлено, что перед высадкой в открытый грунт растения зверобоя продырявленного, размноженные в культуре *in vitro* и прошедшие этап адаптации к нестерильным условиям в контейнерах с почвенной смесью, формировали от растений-регенерантов достаточно развитую корневую систему, с большим числом придаточных корней 6–8 см длиной. В основании побега формировалось от 2 до 5 побегов возобновления 9–12 см высотой. На 65-е сутки после пересадки число побегов возобновления увеличилось более чем в два раза и составило в среднем 7,8 шт. на особь при высоте побегов 23 см. В третьей декаде августа растения вступали в фазу бутонизации, 20 сентября – в фазу цветения. Отмечено, что к началу цветения высота растений увеличивалась до 49–54 см, а диаметр побега – до 0,4 см. На растении формировалось от 16 до 24 пар продолговато-яйцевидных стандартных листьев. Формирование флоральной части побега (соцветия) 20–27 см длиной начиналось с пазух 9–14 листа и состояло из 7–10 пар боковых осей (паракладиев). Среднее число цветков составляло 82 шт. на побег. Амплитуда изменчивости основных морфологических признаков побега изученных растений была на низком и среднем уровне. Установлено, что развитие микроклонально размноженных растений к концу первого вегетационного сезона соответствовало росту и развитию растений зверобоя продырявленного второго года жизни, выращенных рассадным способом.

Ключевые слова: *Hypericum perforatum*; зверобой продырявленный; сорт Золото долины; лекарственное растение; микроклональное размножение; коэффициент размножения; растения-регенеранты; фитогормоны; питательная среда; открытый грунт; рост; развитие; морфология побега; надземная фитомасса; Республика Коми.

PECULIARITIES OF *HYPERICUM PERFORATUM* L. REPRODUCTION *IN VITRO* CULTURE AND DEVELOPMENT OF PLANTS IN THE OPEN FIELD

© 2021

Mikhovich Zh.E., Echishvili E.E., Portnyagina N.V., Skrotskaya O.V.

Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
(Syktyvkar, Russian Federation)

Abstract. The possibility of using the method of cell and tissue culture for microclonal reproduction of St. John's wort is shown. Direct morphogenesis was obtained using seedlings without roots at the age of 12 days. It was found that the introduction of BAP in a low concentration (0,1 mg/l) with IAA 1,0 mg/l into the MS nutrient medium promoted the minimum bud formation with the maximum yield of morphologically normal shoots without the need for an elongation phase. At the stage of rhizogenesis, the process of root formation was observed in all variants of the experiment; the proportion of shoots with roots was high and ranged from 88 to 90%. The maximum height of shoots, the number of pairs of leaves per shoot, and the length of plant roots were reached on the MS nutrient medium with IAA 1,0 mg/l. The period of adaptation to non-sterile conditions was 30 days, while a high yield of regenerant plants was observed. The survival rate of the adapted regenerant plants in field conditions was high (100%). Regenerant plants developed rapidly and bloomed in the first year. It was revealed that before planting in open ground, St. John's wort plants propagated *in vitro* culture and passed the stage of adaptation to non-sterile conditions in containers with soil mixture formed a sufficiently developed root system from regenerant plants with a large number of adventitious roots 6–8 cm long. At the base of the shoot, from 2 to 5 renewal shoots 9–12 cm in height were formed. On the 65th day after transplanting, the number of renewal shoots more than doubled and averaged 7,8 pcs. per individual with a shoot height of 23 cm. In the third decade of August, the plants entered the budding phase, and on September 20, they entered the flowering phase. It was noted that by the beginning of flowering, the height of the plants increased to 49–54 cm, and the diameter of the shoot – up to 0,4 cm. From 16 to 24 pairs of oblong-ovoid standard leaves were formed on the plant. The formation of the floral part of the shoot (inflorescence) 20–27 cm long began with the axils of 9–14 leaves and consisted of 7–10 pairs of lateral axes (paraclyadia). The average number of flowers was 82. The amplitude of variability of the main morphological traits of the shoot of the studied plants was at low and medium levels. It was found that the development of microclonally propagated plants by the end of the first growing season corresponded to the growth and development of St. John's wort plants of the second year of life grown by seedlings.

Keywords: *Hypericum perforatum*; St. John's wort perforatum; grade Zolotodolinsky; medicinal plant; microclonal reproduction; reproduction factor; regenerant plants; phytohormones; nutrient medium; open ground; height; development; shoot morphology; aboveground phytomass; Komi Republic.

Введение

Hypericum perforatum L. [1, с. 531] (зверобой продырявленный) – это наиболее экономически важный вид рода *Hypericum*, который был известен как лекарственное растение еще в Древней Греции [2, с. 148]. Трава зверобоя продырявленного внесена в фармакопеи России, Чехии, Польши, Франции, Болгарии и других стран. Разностороннее применение фитопрепаратов, созданных на основе растительного сырья из зверобоя продырявленного – «Флорестин» (Чехия), «Пефлавит» (Болгария), «Новоиманин», «Гифларин», «Фитолитум» (Россия), «Деприм» (Словения), «Негрустин» (Германия) и др., – обусловлено целым комплексом биологически активных соединений, среди которых главными являются флавоноиды и антраценпроизводные (гиперицин и псевдогиперицин) [3, р. 61–70; 4, с. 23–25; 5, с. 40–42; 6, с. 46–49]. Научными исследованиями и клиническими испытаниями показано, что экстракт из травы *H. perforatum* обладает широким спектром фармакологического действия. Клиническая эффективность экстрактов *H. perforatum* доказана в терапии депрессий легкой и средней степени тяжести и подтверждена многими исследованиями [7, р. 502–505; 8, р. 501–505; 9, р. 537–539; 10, р. 40–47]. Кроме того, экстракт *H. perforatum* обладает противовирусными [11, р. 265–270], противораковыми [12, р. 221–241], нейропротекторными [13, р. 555–556], антиоксидантными [14, р. 157–167], а также ранозаживляющими свойствами [15, р. 245–328]. Показано, что применение экстрактов из *H. perforatum* в профилактике и лечении заболеваний не приводит к серьезным побочным эффектам [16, р. 303–307], поэтому использование фитопрепаратов из зверобоя продырявленного резко возросло в последние годы. Продукты из растительного сырья *H. perforatum* в настоящее время – одни из самых продаваемых во многих странах в качестве пищевых добавок, антидепрессантных средств, релаксантов и средств для повышения настроения. Высокая фармацевтическая эффективность надземной фитомассы зверобоя продырявленного и ограниченность природных ресурсов данного вида приводит к необходимости изучения возможностей размножения растений зверобоя продырявленного в культуре *in vitro*.

Наиболее широкое распространение в мире размножение растений путем введения в культуру *in vitro* получило в середине XX века. Лидирующими странами, использующими методы микрклонального размножения, являются США, Италия, Польша, Нидерланды и др. Во многих странах на государственном уровне создаются системы мер для поддержки и развития этого направления и обеспечения экспорта за границу. В последние годы активно ведутся работы по разработке протоколов микрклонального размножения видов рода *Hypericum* для различных целей (изучение морфогенеза, получение каллусной и суспензионной культур, сохранение редких видов и др.) [17, р. 107–113; 18, р. 200; 19; 20, р. 161–167]. В России культивированию *in vitro* *H. perforatum* сорта Золото долинский посвящен ряд работ. На этапе собственно микроразмножения А.А. Гуликова [21, с. 391–396] использует питательную среду по пропи-

си MS с добавлением 0,5–1,0 мкМ кинетина, 0,25 мкМ индолилмасляную кислоту и 0,05 мкМ гибберелловой кислоты. При такой схеме культивирования наблюдается не очень высокий коэффициент размножения (4 шт. на эксплант). В.Н. Овчинниковой [22, с. 223–229] показано, что совместное влияние белых светодиодных светильников и бензиламинопурина 3 мг/л увеличивало коэффициент размножения до 21 шт. на эксплант.

В связи с высокой потребностью в растительном сырье зверобоя продырявленного широко изучаются возможности его выращивания, в том числе в культуре *in vitro*. Однако единого протокола пока не получено, что связано с использованием различного генетического материала, типом экспланта, его физиологическим состоянием, соотношением фитогормонов в питательной среде и др.

Цель нашего исследования заключалась в повышении эффективности протокола размножения зверобоя продырявленного сорта Золото долинский в культуре *in vitro* путем прямого органогенеза, выявлении морфогенетических особенностей формирования микропобегов и развития растений-регенерантов в открытом грунте в условиях Севера.

Методы и объекты исследований

Работа выполнена в отделе Ботанический сад Института биологии Коми НЦ УрО РАН в 2019–2021 гг. Приготовление, стерилизацию питательных сред и инструментов проводили согласно принятым рекомендациям [23, с. 8; 24, с. 64; 25, с. 46]. Для культивирования растений использовали питательную среду по прописи Мурасиге-Скуга (MS) [26, р. 473–497]. В качестве источника углеродного питания использовали сахарозу в концентрации 3%, агар 0,8%. Значение pH в питательных средах доводили до 5,8, используя NaOH до автоклавирования. В качестве ауксинов использовали индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) и индолилмасляную кислоту (ИМК), в качестве цитокининов 6-бензиламинопурина (БАП).

Источником света послужили светодиодные лампы с интенсивностью до 3000 люкс в течение 16 часов в сутки. Относительная влажность воздуха поддерживалась в пределах 60–70%, температура воздуха $+24 \pm 2^\circ\text{C}$. Опыты закладывали два раза в трехкратной повторности по десять семян в каждой. На этапе введения в культуру учитывали всхожесть семян, на этапе размножения – коэффициент размножения, который принимали за число побегов с одного экспланта за один пассаж, а также высоту побегов и число пар листьев на микропобегах, на этапе ризогенеза учитывали процент микропобегов, образовавших корни и их длину, на этапе адаптации к нестерильным условиям – приживаемость растений после пересадки (%), развитие корневой системы, фенологические наблюдения. Морфологическое описание растений-регенерантов проводили дважды – в начале и конце вегетационного сезона.

В качестве первичных эксплантов использовали семена зверобоя продырявленного сорта Золото долинский сыктывкарской репродукции 2017 г. сбора. Исходный материал был получен из Новосибирска (Центральный сибирский ботанический сад СО РАН).

Для обеззараживания семян стерилизацию проводили в два этапа: семена замачивали на 20 минут в мыльном растворе, затем выдерживали в 10% бытовом растворе «Доместос» (3 мин.), промывали под проточной водой и в асептических условиях семена обрабатывали 70% этиловым спиртом (1 мин.) и 0,1% раствором диацета (3 мин.). При такой схеме стерилизации выход стерильных эксплантов составил 90%. Всхожесть семян зверобоя проросшего оценивали при массовом прорастании семян. Для инициации морфогенетических процессов использовали среду по прописи MS, различающуюся по концентрации БАП и ИУК. В исследовании было испытано два варианта среды. Через 12 суток после введения в культуру *in vitro* проростки с удаленными корешками вводили на новую питательную среду MS с добавлением БАП 1,0 + ИУК 0,1 и БАП 0,1 + ИУК 0,1 мг/л и культивировали в течение четырех недель. Субкультивирование проводили два раза со средней продолжительностью одного пассажа 25 суток. Для элонгации побегов зверобоя проросшего со среды MS с содержанием БАП 1,0 + ИУК 0,1 мг/л микропобеги дополнительно высаживали на безгормональную среду по прописи MS. Для стимуляции ризогенеза микропобеги вводили на среду по прописи MS с добавлением различных ауксинов и с разной концентрацией. Было испытано три варианта среды: ИУК 1,0; ИМК 1,0 и ИУК 0,5 + ИМК 0,5 мг/л. На 12–15-е сутки наблюдали начало формирования корней, через 30 суток после введения микропобега переносили в пластиковые контейнеры объемом 300 мл, заполненные на одну треть грунтом «Субстрат торфяной» с составом: почвенная смесь, речной песок, древесный уголь, торф, производства «Семена Коми». Адаптированные растения-регенеранты были перенесены в открытый грунт 25 мая 2021 г., как только позволили погодные условия вегетационного сезона и высажены в коллекцию зверобоя проросшего на гребни с междурядьем 70 см и расстоянием между особями 20 см. Почва опытного участка дерново-подзолистая глееватая, среднекультуренная, суглинистая. При проведении интродукционных исследований мы использовали методику, рекомендованную Всероссийским институтом лекарственных и ароматических растений [27, с. 2–33]. Рост растений в высоту определяли на 20 побегах. Морфологические признаки генеративного побега и сырьевую фитомассу изучали в фазу начала цветения. Для определения сырьевой фитомассы срезали флоральную часть побега (соцветие), взвешивали и измеряли ее длину. Экспериментальные данные статистически обработаны [29]. Для оценки амплитуды изменчивости морфологических признаков побега использовали шкалу С.А. Мамаева [28, с. 3–14]: очень низкий уровень – $C_v < 7\%$; низкий – $C_v = 7–12\%$; средний – $C_v = 13–20\%$; высокий – $C_v = 21–40\%$; очень высокий – $C_v > 40\%$.

Результаты и обсуждения

Выявлено, что семена зверобоя проросшего при введении в культуру *in vitro* обладают высокой всхожестью (82%). На пятые сутки наблюдали массовое прорастание семян, на седьмые – развернутые семядоли, на 12-е сутки – хорошо развитый проросток с одной парой округлых листьев. На среде MS с БАП 1,0 + ИУК 0,1 мг/л в начале образовался светло-зеленый каллус, а затем появились многочисленные мелкие побеги (рис. 1: А). На среде с БАП 0,1 +

ИУК 1,0 мг/л на гипокотиле наблюдалась прямая регенерация побегов (рис. 1: Б).

Одним из ключевых аспектов при выборе способа размножения растений в культуре *in vitro* является морфогенетическая реакция изолированной ткани, которая зависит в большей степени от типа и возраста экспланта, а также от дозы фитогормона. Согласно данным G. Fascella и др. [30, р. 543–548] на этапе собственно микроразмножения сицилийского образца зверобоя проросшего узловые сегменты, взятые от проростков в возрасте 8 недель и культивируемые на среде MS, дополненной БАП 4,44 мкМ, сформировали в среднем 14,5 побегов. Для сокращения периода выращивания зверобоя проросшего в культуре *in vitro* мы использовали проростки в возрасте 12 суток с удаленным корешком. Через 12 суток после их введения у 90% эксплантов на среде с БАП 1,0 + ИУК 0,1 мг/л начался морфогенез сопутствовал процесс каллусогенеза. На среде с концентрацией БАП 0,1 + ИУК 1 мг/л наблюдалась прямая регенерация побегов, достигавших высоты 1,6 + 0,6 см. Коэффициент размножения составил в среднем 20 побегов на эксплант. Во втором пассаже (табл. 1) реакция эксплантов на разные концентрации БАП отличалась по всем показателям. При концентрации БАП 1,0 + ИУК 0,1 мг/л формировался конгломерат очень мелких побегов, которые затем вводили на среду по прописи MS без гормонов для элонгации побегов. На среде с БАП 0,1 + ИУК 1,0 мг/л формировались нормально развитые побеги со средней высотой 4 см. Коэффициент размножения составил от 19 до 21 шт. побегов на эксплант в зависимости от гормонального состава питательной среды.

На третьем этапе микрклонального размножения зверобоя проросшего для стимуляции ризогенеза в питательную среду добавляли ауксины (ИУК, ИМК) в различной концентрации и соотношении. Согласно полученным данным G. Fascella и др. [30, р. 543–548] доля укорененных растений зверобоя проросшего на среде MS с добавлением ИУК 5,7 мкМ составляла 98%. Авторами отмечено, что растения-регенеранты достигали высоты 33,5 мм и имели корни длиной 10,9 мм. Результаты наших опытов показали, что ризогенез (рис. 2) наблюдался во всех вариантах опыта (табл. 2). Доля укорененных побегов была высокой и составляла в среднем 89%. Максимальных значений высоты побегов, числа пар листьев на побег и длины корней растения достигали на питательной среде MS с ИУК 1,0 мг/л.

Адаптация растений к нестерильным условиям является необходимым этапом для успешного завершения протокола микрклонального размножения. Массовая гибель растений-регенерантов в период адаптации снижает эффективность всего процесса микрклонального размножения. Чаще всего это связано с анатомическим или физиологическим состоянием микропобега, на которые повлияли условия культивирования (концентрация и соотношение гормонов и др.). Универсальной технологии по адаптации растений-регенерантов к новым условиям не существует, имеются только общие требования к условиям культивирования. Результаты наших опытов показали, что приживаемость растений зверобоя проросшего при переносе их на почвенный субстрат была высокой и составила 90% (рис. 3). На 30-е сутки культивирования растения можно переносить в открытый грунт.

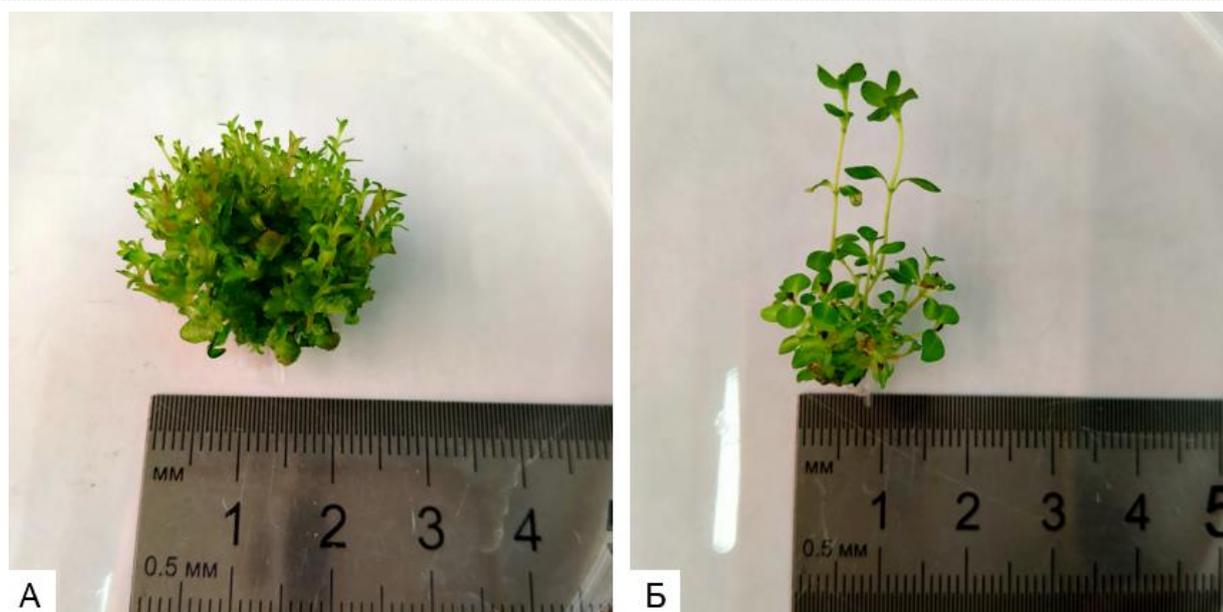


Рисунок 1 – Собственно микроразмножение зверобоя продырявленного на среде:
А – MS + БАП 1,0 + ИУК 0,1 мг/л; Б – MS + БАП 0,1 + ИУК 1,0 мг/л

Таблица 1 – Оценка пролиферативной активности растений *Hypericum perforatum* в культуре *in vitro* (второе субкультивирование, продолжительность пассажа 23 сут.)

Фитогормоны, мг/л	Число побегов, шт.		Высота побегов, см		Число пар листьев, шт.	
	h* > 1 см	h** < 1 см	h > 1 см	h < 1 см	h > 1 см	h < 1 см
БАП 0,1 + ИУК 1,0	8 + 2	13 + 2	4 + 0,5	1,0 + 0,02	5 + 0,2	1,9 + 0,1
БАП 1 + ИУК 0,1	1 + 0	18 + 1	1 + 0,1	0,6 + 0,04	1,6 + 0,2	1,6 + 0,1

Примечание: h* – при высоте микропобегов более 1 см; h** – менее 1 см.

Таблица 2 – Ризогенез *H. perforatum* (на 25-е сутки)

Фитогормоны, мг/л	Доля корнеобразования, %	Высота побегов, см	Число пар листьев, шт.	Длина корней, см
Без гормонов	89 + 6	2,8 + 0,3	4 + 0,3	1,3 + 0,1
ИМК 1,0	88 + 9	4,3 + 0,6	4 + 0,3	1,6 + 0,1
ИМК 0,5 + ИУК 0,5	88 + 10	4,1 + 0,4	4 + 0,3	1,5 + 0,1
ИУК 1,0	90 + 5	5,5 + 0,8	6 + 0,4	2,7 + 0,2



Рисунок 2 – Ризогенез зверобоя продырявленного.
А – MS + ИУК 1,0 мг/л; Б – MS без гормонов; В – MS + ИМК 1,0 мг/л



Рисунок 3 – Растения-регенеранты на 10-е сутки культивирования

Перед высадкой зверобоя продырявленного в открытый грунт было проведено морфологическое описание растений (табл. 3). Растения-регенеранты, пересаженные для адаптации к нестерильным условиям в контейнер с почвенной смесью, за 107 суток доращивания достигали в среднем 26 см высоты при диаметре побега 0,1 см и формировали достаточно разветвленную мочковатую корневую систему до 8 см длиной. На большей части растения формировалось от 2 до 5 побегов возобновления со средней высотой 10,2 см. На побеге отмечено до 26 пар небольших почти округлых листьев. Приживаемость растений на 20-е сутки после высадки в открытый грунт составила 100%. Подсчет побегов на 65-е сутки показал, что число побегов возобновления за этот период увеличилось в два раза и составляло в среднем 7,8 шт. на растение при высоте побегов 23 см. Амплитуда изменчивости морфологических признаков у высаженных растений была на низком и среднем уровнях (табл. 3). В третьей декаде августа растения зверобоя продырявленного вступили в фазу бутонизации, а в конце вегетационного сезона, 20 сентября – в фазу цветения.

Морфологическая и сырьевая характеристики надземных побегов зверобоя продырявленного вступивших в фазу цветения приведены в табл. 4. В третьей декаде сентября все вновь образовавшиеся за сезон побеги возобновления перешли в фазу начала цветения. Растения зверобоя продырявленного формировали раскидистые побеги (в среднем 8,2 шт. на особь), ветвящиеся до второго порядка высотой 49–54 см и диаметром 0,35–0,45 см. Флоральная часть побега (соцветие) 20–27 см длиной образуется с пазухи 9–14 стеблевого листа, состоит из 7–10 боковых осей (паракладиев) и занимает почти $\frac{1}{2}$ стебля (побега). Сырая фитомасса соцветия варьировала от 8,5 до 13,7 г, воздушно-сухая – от 1,4 до 3,5 г (табл. 4). Степень варьирования большинства морфологических признаков генеративного побега зверобоя про-

дырявленного характеризовалась низким ($C_v = 3,5–12\%$) и средним ($C_v = 13–17\%$) уровнем изменчивости. Очень высокий уровень изменчивости ($C_v = 41–46\%$) отмечен лишь для таких признаков как длина вегетативных и генеративных побегов (паракладиев) второго порядка. Параметры морфометрических признаков растений зверобоя продырявленного, полученных путем микроклонального размножения и выращиваемых в дальнейшем в открытом грунте, соответствовали показателям растений зверобоя продырявленного второго года жизни выращиваемых рассадным способом из семян [31, с. 47–58]. Дальнейшее исследование позволит выявить зимостойкость растений и продолжительность использования *Hypericum perforatum* в качестве лекарственного растения при выращивании исходного материала в культуре *in vitro*.

Выводы

Установлено, что растения-регенеранты зверобоя продырявленного можно получать за достаточно короткие сроки. При введении в культуру *in vitro* семена зверобоя продырявленного обладали высокой всхожестью (82%). Выяснено, что на этапе собственно микроразмножения концентрация БАП 1 мг/л + ИУК 0,1 мг/л в питательной среде по прописи Мурасиге-Скуга сдерживала рост побегов, а использование БАП в низкой концентрации, наоборот, способствовало минимальному заложению почек с максимальным выходом морфологически нормальных побегов без фазы элонгации. На этапе ризогенеза установлено, что процесс корнеобразования наблюдался во всех вариантах опыта, и доля побегов, имеющих корни, была высокой (88–90%). Период адаптации к нестерильным условиям составил 30 суток, при этом наблюдался высокий выход растений-регенерантов. Приживаемость адаптированных растений-регенерантов в полевых условиях была 100%. Растения-регенеранты развивались ускоренно и в первый год зацвели.

Таблица 3 – Морфология растений *H. perforatum* перед высадкой в открытый грунт, 25.05.2021 г.

Признак	M ± m	Lim	C _v
Высота побега, см	26 ± 3,2	16–30*	25
	10,2 ± 0,9	9–12**	16
Диаметр побега, см	0,1 ± 0,04	0,1–0,15	12
Длина листа, см	1,4 ± 0,04	1,3–1,7	7
	0,8 ± 0,04	0,6–0,95	15
Ширина листа, см	1,0 ± 0,04	0,8–1,2	14
	0,8 ± 0,02	0,7–0,85	7,5
Число пар листьев, шт./побег	15 ± 1,4	12–19	22
	22 ± 1,7	18–26	15
Длина корня, см	6,8 ± 0,4	6–8	12,5
Число побегов, шт./особь	3 ± 0,7	2–5	47
На 65-е сутки после высадки			
Высота побега, см	23 ± 1,5	14–36	30
Число вегетативных побегов, шт./особь	7,8 ± 1,0	4–15	42

Примечание. M ± m – средняя и ошибка средней, см; Lim – лимиты; C_v – коэффициент вариации, %; * – побег-регенерант; ** – новый побег возобновления.

Таблица 4 – Морфология и сырьевая продукция генеративных растений *H. perforatum*, 21.09.2021 г.

Признак	M ± m	Lim	C _v
Высота побега, см	52 ± 0,7	49–54	3,5
Диаметр побега, см	0,4 ± 0,02	0,35–0,45	10
Число пар листьев, шт./побег	20,4 ± 1,5	16–24	17
Длина листа, см	2,7 ± 0,07	2,3–3,2	9
Ширина листа, см	1,2 ± 0,04	1,0–1,4	12
Длина соцветия, см	23 ± 1,4	20–27	13
Число пар паракладиев, шт./побег	8,4 ± 0,5	7–10	13
Длина паракладиев, см	7,1 ± 0,6	2–14	46
Длина вегетативных побегов II порядка, см	9,1 ± 1,1	4–23	41
Число цветков, шт./побег	82 ± 5,2	62–106	20
Сырая фитомасса побега, г	11 ± 1,1	8,5–13,7	–
Сырая фитомасса соцветия, г	5,4 ± 0,6	4–7	–
Воздушно-сухая фитомасса соцветия, г	2,4 ± 0,6	1,4–3,5	–
Число генеративных побегов, шт./особь	8,2 ± 0,9	6–15	41

Примечание. M ± m – средняя и ошибка средней, см; Lim – лимиты; C_v – коэффициент вариации, %.

Выявлено, что перед высадкой в открытый грунт растения зверобоя продырявленного, размноженные в культуре *in vitro* и прошедшие этап адаптации к нестерильным условиям в контейнерах с почвенной смесью формировали от растений-регенерантов достаточно развитую корневую систему, состоящую из большого числа придаточных корней 6–8 см длиной. На базальной части побега формировалось от 2 до 5 побегов возобновления 9–12 см высотой. В конце июля, на 65-е сутки наблюдения, число побегов возобновления увеличилось более чем в два раза и составило в среднем 7,8 шт. на особь при высоте растений 23 см. В третьей декаде августа растения вступали в фазу бутонизации, 20 сентября – в фазу цветения. Отмечено, что к началу цветения высота растений увеличивалась до 49–54 см, а диаметр побега – до 0,4 см. На растении формировалось от 16 до 24 пар продолговато-яйцевидных стандартных листьев. Формирование флоральной части побега (со-

цветия) начиналось с пазух 9–14 листа и состояло из 7–10 пар боковых осей (паракладиев) со средней длиной 7,1 см. Среднее число цветков составляло 82 шт. на особь. Параметры морфометрических признаков растений зверобоя продырявленного полученных путем микроклонального размножения и выращиваемых в дальнейшем в открытом грунте соответствовали показателям растений зверобоя продырявленного второго года жизни выращиваемых из семян рассадным способом. Показано, что внутривидовая индивидуальная изменчивость основных морфологических признаков культивируемых растений была на низком и среднем уровнях.

Дальнейшее изучение в открытом грунте культивируемых растений зверобоя продырявленного позволит выявить зимостойкость растений, полученных путем микроклонального размножения и длительность использования посадок *Hypericum perforatum* для получения качественного лекарственного сырья.

Список литературы:

1. Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств. СПб.: Мир и семья, 1995. 990 с.
2. Махлаюк В.П. Лекарственные растения в народной медицине. Саратов: Приволжск. кн. изд-во, 1993. 544 с.
3. Patočka L. The chemistry, pharmacology and toxicology of the biologically active constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. // Journal of Applied Biomedicine. 2003. № 1. P. 61–70.
4. Куркин В.А., Правдивцева О.Е., Дубищев А.В. и др. Исследование сырья и препаратов зверобоя // Фармация. 2005. Т. 53, № 3. С. 23–25.
5. Куркин В.А., Правдивцева О.Е. Сравнительное исследование содержания суммы флавоноидов и антраценпроизводных в препаратах травы зверобоя // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42, № 10. С. 39–42.
6. Куркин В.А., Правдивцева О.Е., Зимина Л.Н., Дубищев А.В., Булачкин Д.Г., Корчагина Д.В. Актуальные аспекты создания новых нейротропных фитопрепаратов // Фармация. 2009. № 1 (6). С. 46–49.
7. 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.
8. Stevinson C., Ernst E. *Hypericum* for depression. An update of the clinical evidence // European Neuropsychopharmacology. 1999. Vol. 9 (6). P. 501–505.
9. Woelk H. Comparison of St John's wort and imipramine for treating depression: randomised controlled trial // British Medical Journal. 2000. Vol. 321 (7260). P. 536–539.
10. Bjerkenstedt L., Edman G.V., Alken R.G., Mannel M. *Hypericum* extract LI 160 and fluoxetine in mild to moderate depression a randomized, placebo-controlled multi-center study in outpatients // European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience. 2005. № 255. P. 40–47. DOI: 10.1007/s00406-004-0532-Z.
11. Schinazi R.F., Chu C.K., Babu J.R., Oswald B.J., Saalman V., Cannon D.L., Eriksson B.F.H., Nasr M. Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus // Antiviral Research. 1990. Vol. 13. P. 265–270.
12. Agostinis P., Vantighem A., Merlevede W., Witte P.A.M. *Hypericin* in cancer treatment: more light on the way // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2002. Vol. 34. P. 221–241.
13. Silva R., Tilker H.A., Cecil J.T. et al. Open-label study of dexameth-ylphenidate hydrochloride in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder // Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology. 2004. Vol. 14. P. 555–556.
14. Silva B.A., Ferreres F., Malva J.O., Dias A.C.P. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts // Food Chem. 2005. Vol. 90. P. 157–167.
15. Yadollah-Damavandi S., Chavoshi-Nejad M., Jangholi E., Nekouyian N., Hosseini S., Seifae A. et al. Topical *Hypericum perforatum* improves tissue regeneration in full-thickness excisional wounds in diabetic rat model // Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2015. Vol. 4. DOI: 10.1155/2015/245328.
16. Trautmann-Sponsel R.D., Diemel 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.
17. Pretto F.R., Santarem E.R. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* L. leaves // Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2000. Iss. 67. P. 107–113.
18. Ayan A.K., Çirak C., Kevseroglu K., Sökmen A. Effects of explant types and different concentrations of sucrose and phytohormones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforatum* L. // Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 2005. Vol. 29. P. 197–204.
19. Hou W., Shkya P., Franklin G. A perspective on *Hypericum perforatum* genetic transformation // Frontiers in Plant Science. 2016. Vol. 7 (265). P. 879. DOI: 10.3389/fpls.2016.00879.
20. Mir M.Ya., Kamili A.N., Hassan Q.P., Rafi S., Paray J.A., Jan S. *In vitro* regeneration and free radical scavenging assay of *Hypericum perforatum* // National Academy Science Letters. 2019. Vol. 42 (7260). P. 161–167. DOI: 10.1007/s40009-018-0699-x.
21. 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: мат-лы 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.
22. Овчинникова В.Н., Карсункина Н.П., Харченко П.Н. Влияние условий культивирования на морфофизиологическую активность и содержание фенольных соединений зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) в культуре *in vitro* // Химия растительного сырья. 2018. № 3. С. 223–229.
23. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1964. 42 с.
24. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микро-размножение растений. М.: Наука, 1983. 96 с.
25. Калинин В.Ф., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. Киев: Наукова Думка, 1992. 227 с.
26. 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.
27. Майсурадзе Н.И., Киселев В.П., Черкасов О.А., Нухимовский Е.Л., Тихонова В.Л., Макарова Н.В., Угнивенко В.В. Методика исследований при интродукции лекарственных растений // Лекарственное растениеводство. Вып. 3. М., 1984. С. 1–33.
28. Мамаев С.А. Основные принципы методики исследования внутривидовой изменчивости древесных растений // Индивидуальная и эколого-географическая изменчивость растений: сб. ст. Свердловск, 1975. С. 3–14.
29. Зайцев Г.Н. Методика биометрических расчетов. М.: Наука, 1973. 256 с.
30. Fascella G., Airò M., Mammano M., Giardina G., Carrubba A., Lazzara S. Rooting and acclimatization of micropropagated *Hypericum perforatum* L. native to Sicily // Acta Horticulturae. 2017. Vol. 1155. P. 543–548. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1155.80.
31. Эчишвили Э.Э., Портнягина Н.В., Пунегов В.В., Зайнуллина К.С. Зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum* L.) в культуре на европейском Северо-Востоке / отв. ред. Г.Н. Табаленкова. Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 2014. 120 с.

Исследования выполнены на базе УНУ «Научная коллекция живых растений Ботанического сада Института биологии Коми НЦ УрО РАН», регистрационный номер 507428 (г. Сыктывкар, подзона средней тайги) и в рамках государствен-

ного задания по теме «Закономерности процессов репродукции ресурсных растений в культуре на европейском Северо-Востоке» № 0414-2018-0006 (PK: AAAA-A17-117122090004-9).

Информация об авторе(-ах):	Information about the author(-s):
<p>Михович Жанна Эдуардовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела Ботанический сад; Институт биологии Коми научного центра УрО РАН (г. Сыктывкар, Российская Федерация). E-mail: mihovich@ib.komisc.ru.</p> <p>Эчишвили Эльмира Элизбаровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела Ботанический сад; Институт биологии Коми научного центра УрО РАН (г. Сыктывкар, Российская Федерация). E-mail: elmira@ib.komisc.ru.</p> <p>Портнягина Надежда Васильевна, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, старший научный сотрудник отдела Ботанический сад; Институт биологии Коми научного центра УрО РАН (г. Сыктывкар, Российская Федерация). E-mail: portniagina@ib.komisc.ru.</p> <p>Скроцкая Ольга Валерьевна, кандидат биологических наук, заведующий отделом Ботанический сад; Институт биологии Коми научного центра УрО РАН (г. Сыктывкар, Российская Федерация). E-mail: skrockaja@ib.komisc.ru.</p>	<p>Mikhovich Zhanna Eduardovna, candidate of biological sciences, senior researcher of Botanical Garden; Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Syktyvkar, Russian Federation). E-mail: mihovich@ib.komisc.ru.</p> <p>Echishvili Elmira Elizbarovna, candidate of biological sciences, researcher of Botanical Garden; Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Syktyvkar, Russian Federation). E-mail: elmira@ib.komisc.ru.</p> <p>Portnyagina Nadezhda Vasilyevna, candidate of agricultural sciences, associate professor, senior researcher of Botanical Garden; Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Syktyvkar, Russian Federation). E-mail: portniagina@ib.komisc.ru.</p> <p>Skrotskaya Olga Valerievna, candidate of biological sciences, head of Botanical Garden; Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Syktyvkar, Russian Federation). E-mail: skrockaja@ib.komisc.ru.</p>

Для цитирования:

Михович Ж.Э., Эчишвили Э.Э., Портнягина Н.В., Скроцкая О.В. Особенности размножения *Hypericum perforatum* L. в культуре *in vitro* и развитие растений в открытом грунте // Самарский научный вестник. 2021. Т. 10, № 4. С. 79–86. DOI: 10.17816/snv2021104112.