

Е. В. Кучарова, Ж. М. Охлопкова

Получение первичных каллусов *Dracocephalum Palmatum* Steph.

СВФУ им. М.К. Аммосова, г. Якутск, Россия

Аннотация. Еще совсем недавно культуру клеток высших растений рассматривали как удобную и простую модель для изучения разнообразных процессов в клетках интактного растения. Представлялась очевидной большая сложность фундаментальных исследований организменных клеток, находящихся под сложным контролем соседних клеток, тканей, органов и растения в целом. Однако за последнее время многое меняется при изучении клеток человека, животных, растений. Несомненно, происходят изменения в парадигме, связанной с культивируемыми клетками и каллусными тканями растений *in vitro*. Становится ясно, что культура клеток растений – не просто удобная модель, а своеобразная, экспериментально созданная биологическая система. Эта система представляет собой неполую популяцию клеток *in vitro*, для которой характерны асинхронность клеточных делений, генетическая, физиологическая и морфологическая гетерогенность. Выясняется, что клетки *in vitro* не проще, а зачастую сложнее, чем тканевые клетки растения. Очень важно, что в условиях *in vitro* сохраняется тотипотентность клеток. Это позволяет изучать и моделировать на них уникальные процессы дифференцировки, морфогенеза, соматического эмбриогенеза. Целью настоящей работы является получение первичных каллусов растений *Dracocephalum palmatum* Steph. путем оптимизации гормонального состава питательной среды для культивирования. Объектом для исследования был выбран представитель *Dracocephalum palmatum* Steph. из семейства *Lamiaceae*. В качестве питательной среды использовали среду Мурасиге и Скуга с различным соотношением фитогормонов. При ходе экспериментальных работ были соблюдены стандартные правила соблюдения стерильных условий. В качестве эксплантов использованы листья растений *Dracocephalum palmatum*, выращенные в контролируемых условиях климатической камеры из семян дикорастущего растения, собранных на территории Полюса холода – Оймякона. Впервые были получены первичные каллусы из эксплантов растения *Dracocephalum palmatum* Steph. В результате культивирования первичный рост биомассы наблюдался на второй неделе посадки. Выполнен анализ клеток полученных каллусов на жизнеспособность и их морфологической структуры.

Ключевые слова: *Dracocephalum palmatum* Steph., Полюс холода – Оймякон, уникальный химический состав, *in vitro*, листовые экспланты, контролируемые условия, климатическая камера, МС, первичный каллус, каллусообразование.

КУЧАРОВА Елена Валериевна – ведущий инженер учебно-научной лаборатории «Молекулярно-генетические и клеточные технологии» ИЕН Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова.

E-mail: oleneek@mail.ru

KUCHAROVA Elena Valerievna – Lead Engineer of the “Molecular-Genetic and Cell Technologies” Laboratory of the Department of Biology, Institute of Natural Sciences, M.K. Ammosov North-Eastern Federal University.

ОХЛОПКОВА Жанна Михайловна – к. б. н., доцент, научный руководитель, в. н. с. учебно-научной лаборатории «Молекулярно-генетические и клеточные технологии» ИЕН СВФУ им. М.К. Аммосова.

E-mail: zhm.okhlopkova@s-vfu.ru

OKHLOPKOVA Zhanna Mikhailovna – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Head and Lead Researcher of the “Molecular-genetic and cell technologies” Laboratory of the Department of Biology, Institute of Natural Sciences, M.K. Ammosov North-Eastern Federal University.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке в рамках НИР ВТК (временный творческий коллектив) «Внедрение подходов молекулярной биотехнологии растений для исследования дикоросов Севера по выявлению стресс-адаптивных генов» согласно договору №2.37.4 от 20 ноября 2012 г. (этап работ 2015-2016 гг.).

DOI

E. V. Kucharova, Zh. M. Okhlopkova

Obtaining the Primary Callus of *Dracocephalum Palmatum* Steph.

M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia

Abstract. The culture of higher plants cells was considered a convenient and simple model for studying various processes in cells of an intact plant. The difficulty of studying the organism cells, which are involved in complex connections with neighboring cells, tissues, organs, and the plant as a whole, seemed obvious. However, recently many things have changed in the area of study of human, animal, and plant cells. Undoubtedly, there are changes in the paradigm associated with cultured cells and callus plant tissues *in vitro*. The culture of plant cells reveals its potential as not only that of a convenient model, but as an original, experimentally created biological system. This system is an asexual population of cells *in vitro*, which are characterized by asynchronous cell division, genetic, physiological, and morphological heterogeneity. *In vitro* cells often more complex than tissue cells of a plant. It is very important that in the state of *in vitro* the totipotency of the cells is preserved. This allows us to study and model on them unique processes of differentiation, morphogenesis, and somatic embryogenesis. The main objective of this work is to obtain the primary callus of *Dracocephalum palmatum* Steph. by optimization of the hormonal composition in the nutrient medium for cultivation. *Dracocephalum palmatum* Steph. of the *Lamiaceae* family was chosen as the study object. We used the Murashige and Skoog medium with various phytohormones ratio. During the course of experimental work, the standard rules for keeping sterile conditions were met. The leaves of *Dracocephalum palmatum* plants, grown under controlled conditions of the climatic chamber out of the seeds of a wild plant harvested in the Pole of Cold - Oymyakon, were used as explants. Primary calli from the explants of *Dracocephalum palmatum* Steph have been obtained for the first time. As a result of cultivation, the primary growth of biomass was observed during the second week of planting. The viability and morphological structure analysis of the cells of callus received was performed.

Keywords: *Dracocephalum palmatum* Steph., Pole of Cold – Oymyakon, unique chemical composition, *in vitro*, leaf explants, controlled conditions, climatic chamber, MS, primary callus, callus formation.

The study has been conducted with financial support of the Multidisciplinary Team Research Project "Implementation of the approaches of plants' molecular bio-technology in the study of the Northern wild crops aimed at identifying the stress-adaptive genes" in accordance with the agreement # 2.37.4 from November 20th 2012 (stage 2015-2016).

Введение

Змееголовники известны как эфирномасличные растения, содержащие антиоксидантные свойства [1], находящие применение в народной медицине при болезнях дыхательных путей, в качестве жаропонижающего средства, при астении как средство, повышающее потенцию. Лекарственные свойства их обусловлены также содержанием в надземной части растений биологически активных веществ – карденолидов, алкалоидов, дубильных веществ, кумаринов, флавоноидов [2]. Исследования лекарственных свойств рода *Dracocephalum* показали, что *D. Kotschy* Boiss имеет антиоцептивный эффект, а

эфирные масла *D. Surmandinum* ингибируют рост клеток в аденокарциноме молочной железы человека [3]. *Dracocephalum moldavica* используется в качестве кардиотонического агента и имеет антиаритмические и противоишемические свойства [4]. Довольно интересным видом из данного рода является *D. Kotschyii*, который содержит в листьях противоопухолевый компонент ксантомитрол. По результатам экспериментов *in vivo* *D. Kotschyii* был более эффективным в ингибировании темпа роста опухоли [5]. Также *D. Kotschyii* входит в состав экстракта *Spinal-Z*, состоящий из двух растений: *Peganum harmala* L. и листьев *D. Kotschyii* [6-8]. Таким образом, род *Dracocephalum* привлекает внимание исследователей в изучении химического состава и выявлении полезных свойств.

Есть множество исследований *in vitro*, которые были проведены по семейству *Lamiaceae* с использованием различных эксплантов: узловых сегментов, эксплантов листьев и подмышечных почек [9].

Из-за редкой встречаемости и малого количества некоторых видов *Dracocephalum* для исследований используют культуры клеток по таким видам, как *Dracocephalum argunense* Fisch., *D. kotschyii* [10, 11].

Первые волосистые корни *D. kotschyii* были получены иранскими исследователями для дальнейшей коммерциализации крупномасштабного производства противоопухолевого соединения путем разработки экономически эффективного биореактора [12].

В исследовании микропропагации *D. kotschyii* показана процедура с использованием узловых сегментов из *in vitro* проросших растений. Были разработаны многообещающие методы с эффективной регенерацией из узловых эксплантов *Dracocephalum kotschyii* Boiss. с использованием ВАР и НАА [13].

Одним из свежих результатов можно назвать исследования польских ученых по накоплению розмариновой кислоты и антиоксидантного потенциала *Dracocephalum moldavica* L. в суспензионной культуре. Результат исследований показал, что культура клеточной суспензии является хорошим кандидатом на производство в пробирке. В дополнение АБТС-анализ метанольного экстракта клетки *D. moldavica* было обнаружено, что суспензионная культура имеет значительный радикал *in vitro* потенциала и может иметь ценность в устранении свободных радикалов [14].

В Республике Саха (Якутия) род *Dracocephalum* представлен пятью видами. Наше внимание как объект изучения привлек *Dracocephalum palmatum* Steph., многолетнее вечнозеленое растение с ползучими побегами, образующее очень плотную дернину. Листья и побеги опушены. Цветоносы приподнимаются над дерниной на 10-15 см. Цветки фиолетовые, сидят в мутовках. Семена созревают в июле. Зимует с зелеными листьями. Встречается в северо-восточных районах Якутии (рис. 1). Растет на сухих каменисто-щебнистых склонах, скалах, в каменистых тундрах, горных степях [15].

При изучении химического состава спиртового экстракта, полученного из надземной фитомассы *Dracocephalum palmatum* Steph., произрастающей на территории Оймякона, было выделено 23 соединения (фенилпропаноиды, кумарины, флавоноиды и тритерпены). Среди них восемь соединений (сальвионоловая кислота В, кафтаровая кислота, цихориновая кислота, умбеллиферон, эскулетин, апигенин-7-0-β-D-глюкуронопиранозид, изооргофоллин и лютеолин-4'-0-β-D-глюкопиранозид) были обнаружены для представителя рода *Dracocephalum* впервые [16].

Приспособление к условиям Крайнего Севера, высокая скорость роста, а также уникальный химический состав делают эту культуру удачной и для клеточных культур. Реализация данного подхода возможна только при разработанных оптимальных условиях культивирования *in vitro*, начиная от получения асептических культур и заканчивая регенерацией растений [17].

Целью настоящей работы является получение первичного каллуса растения *Dracocephalum palmatum* Steph., произрастающего в условиях Полюса холода – Оймякона. Решались следующие задачи:



Рис. 1. Внешний вид растений *Dracocephalum palmatum* Steph. в фитоценозах на территории Оймяконского района

1. получение растений *Dracocephalum palmatum* Steph. в контролируемых условиях климатической камеры из семян интактных растений, собранных на территории Оймякона;
2. подготовка листовых эксплантов *Dracocephalum palmatum* Steph. и введение их в культуру с оптимизацией состава питательной среды;
3. получение первичных каллусов *Dracocephalum palmatum* Steph с изучением некоторых физиологических и морфологических показателей.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования является дикорастущее растение *Dracocephalum palmatum* Steph., произрастающее на территории Оймякона. Сбор интактных растений (рис. 1) был осуществлен во время стационарно-маршрутных работ международной школы-экспедиции «Эколого-ресурсный и молекулярно-генетический мониторинг биологических ресурсов на Севере», организованной и проведенной на территории Оймяконского района Республики Саха (Якутия).

Растительный материал был подвержен камеральной обработке в условиях лаборатории «Клеточные технологии» Института естественных наук СВФУ: выложен на горизонтальную поверхность в помещении с потоком рециркуляции без прямого воздействия солнечных лучей, очищен от механической и другой примеси, из соцветий вылущены семена. Семенной материал был упакован в криобирки, этикетирован и заложен на хранение в условиях +4-+6 °С.

Из семян в контролируемых условиях климатической камеры MLR-352H (Sanyo, Japan) были получены растения *Dracocephalum palmatum*. При этом отобранные семена растения промывали водопроводной водой в течение 5-10 минут для удаления поверхностного загрязнения, подвергали стерилизации путем погружения в 70%-ный этанол в течение 1 мин при горизонтальном перемешивании на шейкере, в 1%-ный раствор гипохлорида натрия в течение 15 мин. Между погружениями в стерилизаторы семена 4-5 раз промывались стерильной дистиллированной водой. Подготовленные семена подсушивались в потоке воздуха в условиях ламинарного бокса. Посадку семенного материала производили в питательные среды в чашках Петри (в 5-кратной биологической повторности). В качестве питательной среды для прорастания семян была взята стандартная безгормональная среда (Murashige и Skoog, 1962) [18], содержащая 3 % (м/об) сахарозы и 0,6 % (м/об) агара. Прорастание семян инкубировали в климатической камере при температуре +24 °С в 16-часовом световом периоде. После трех недель семена дали проростки растений с 3-5 настоящими листьями.

Таблица 1

Состав питательной среды на основе Мурасиге и Скуга при получении культур клеток *Dracocephalum palmatum* Steph.

Вариант	Тип и концентрация фитогормонов, мл/л		
	2,4-Д	БАП	Кинетин
МС-1	1	2	-
МС-2	1	-	2
МС-3	2	2	-
МС-4	2	-	2

Из полученных 3-недельных растений *Dracocephalum palmatum* были отобраны и подготовлены листовые экспланты. Первичный эксплант должен быть полностью освобожден от всех микроорганизмов, его дальнейшее существование *in vitro* требует поддержания абсолютной асептики, так как грибная и бактериальная инфекции ингибируют рост клеток, что приводит к гибели культуры. Перед стерилизацией экспланта фрагмент растения тщательно многократно промывается водопроводной водой с мылом, затем следует процедура поверхностной стерилизации эксплантов в растворах дезинфицирующих средств. В нашем случае были применены соответствующие растворы этанолового спирта, гипохлорида натрия и перманганата калия. После инкубации эксплантов в стерилизующем растворе их промывают тремя порциями стерильной воды по 10 минут в каждой.

Эффективность проведения экспериментов *in vitro* зависит от подобранных условий, в том числе от используемого типа питательной среды. Были протестированы питательные среды Мурасиге и Скуга с разной концентрацией регуляторов роста для выявления наиболее оптимального состава среды, позволяющего получить первичный каллус. Листовые экспланты культивировали в питательных средах Мурасиге и Скуга в 4 вариантах с разными концентрациями БАП, 2,4-Д, кинетина (табл. 1). Для культивирования использовали стеклянные пробирки (16x150 мм). В одну пробирку помещали по одному экспланту. Пробирки с эксплантами культивировали в климатической камере при температуре +23-25 °С в 12-часовом световом периоде.

После получения первичных каллусов нами были проведены гистологические исследования размеров и жизнеспособности клеток. Каллусы рассматривали с помощью анализатора клеток Countess (Invitrogen), а формы клеток анализировали под микроскопом Primo Star Zeiss со встроенной камерой Axio Cam 5s.

Анализатор клеток Countess (Invitrogen) позволяет определить плотность культуры, средний диаметр клеток, концентрацию живых и мертвых клеток, производит подсчет доли живых клеток. Подход работы на анализаторе клеток следующий: 5 мкл суспензии клеток смешиваются с 0,4%-ным раствором трипанового синего, который полностью прокрашивает только мёртвые клетки. Полученный образец заливается в камеру рабочего слайда (толщина 100 мкм). Слайд вставляется в гнездо прибора. Прибор выводит увеличенное изображение образца на экран, обрабатывает его и отображает на экране результаты, которые можно сохранить в удобном виде. Микроскоп Primo Star Zeiss со встроенной камерой Axio Cam 5s дает возможность получать качественные снимки микропрепаратов при желаемом разрешении.

Результаты и обсуждение

Из семян *Dracocephalum palmatum* в контролируемых условиях были получены растения *in vitro*, которые в дальнейшем использовали в качестве эксплантов. Такой метод проращивания семян при получении ростков был использован и при работе с другими видами *Dracocephalum*. Например, для получения волосатых корней *Dracocephalum*

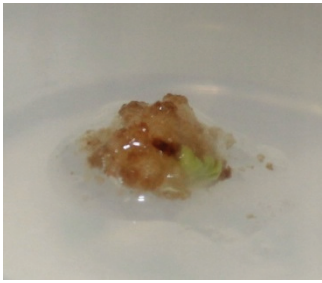


Рис. 2. Первичные каллусы (14 сутки), полученные в среде МС-1

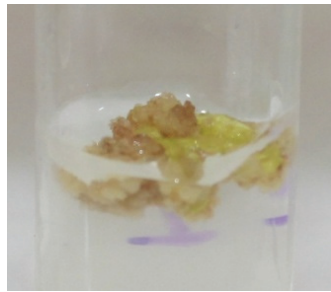
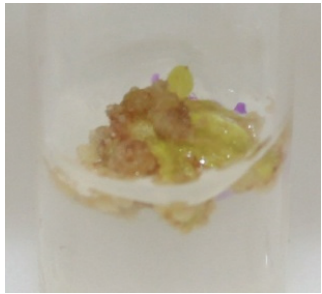


Рис. 3. Первичные каллусы (14 сутки), полученные в среде МС-2

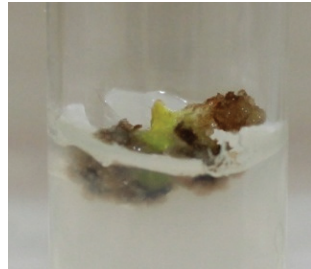


Рис. 4. Первичные каллусы (14 сутки), полученные в среде МС-3

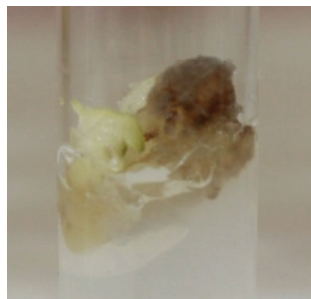
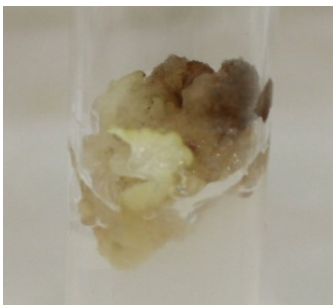


Рис. 5. Первичные каллусы (14 сутки), полученные в среде МС-4

moldavica после стерилизации семени прорастивали в темноте при +26 °С на МС (Murashige и Skoog 1962) с агаром (0,7 %), дополненной 0,02 мг L-1 кинетином и 1,0 мг L-1 гиббереллиновой кислотой. После прорастания проростки переносили в условия дня и ночи (16 часов света / 8 часов темноты, прохладные люминесцентные лампы; 40 лм м-2 с -1) [19].

Листовые экспланты *Dracocephalum palmatum* Steph. в питательной среде развивались посредством каллусогенеза. Первые каллусы в средах МС-2, МС-4 с добавлением 2,4-Д и

Таблица 2

Цитология жизнедеятельности культуры клеток

Название	Общая концентрация клеток	Концентрация жизнеспособных клеток	Жизнеспособность	Средний размер жизнеспособных клеток	Макс размер клетки
МС 1	$1,2 \times 10^5$ /мл	$8,6 \times 10^4$ /мл	74 %	34,8 мкм	60 мкм
МС 2	$2,3 \times 10^5$ /мл	$1,2 \times 10^5$ /мл	63 %	31,0 мкм	60 мкм
МС 3	$8,6 \times 10^5$ /мл	$4,5 \times 10^4$ /мл	63 %	27,0 мкм	60 мкм
МС 4	$6,4 \times 10^5$ /мл	$5,9 \times 10^5$ /мл	92 %	15,9 мкм	60 мкм



Рис. 6. Морфология клеток каллусных культур *Dracoccephalum palmatum* Steph. под микроскопом

кинетина начинали развиваться через 5-6 суток после введения их в культуру *in vitro*, а в средах МС-1, МС-3 с добавлением 2,4-Д и БАП каллус начал развиваться через 13-14 суток.

Самую высокую индукцию каллуса наблюдали в средах МС-2, МС-4 с 2,4-Д и кинетином в качестве регуляторов роста. Внешне полученные культуры в средах МС-2 и МС-4 были рыхлыми, мягкими, светлого оттенка. Культуры в средах МС-1 и МС-3 с содержанием 2,4-Д и БАП отличались более твердой зернистой структурой и частота каллусообразования была заметно ниже.

Результаты анализатора клеток показывают, что средний размер клеток варьирует от 15,9 мкм до 34,8 мкм. Показатели жизнеспособности клеток в средах МС-2 и МС-3 равны 63 %. Высокие показатели жизнеспособности выявлены в средах МС-1 (74 %), МС-4 (92 %) (табл. 2).

Формы клеток полученных каллусов рассматривали под микроскопом Primo Star Zeiss со встроенной камерой Axio Cam 5s (рис. 6). На фотографии четко видны клетки разной формы, начиная с меристемоподобной формы до паренхимоподобной.

Заключение

Таким образом, при культивировании *in vitro* листовых эксплантов нами впервые были получены каллусные культуры клеток *Dracoccephalum palmatum* Steph. В связи с тем, что

опубликованных литературных сведений о культивировании *Dracocephalum palmatum* Steph. не имеется, настоящую работу можно рассматривать как первую публикацию, посвященную этому вопросу. Первичный каллус получен на всех четырех испытанных питательных средах. Наиболее быстрая индукция каллуса отмечена в средах МС-2, МС-4 с содержанием 2,4-Д и кинетина. Наиболее жизнеспособные каллусы получены в средах МС-1 и МС-4. В целом исследование показало, что успех культивирования листовых эксплантов *Dracocephalum palmatum* Steph. определяется, прежде всего, составом питательных сред, при этом наиболее эффективным является использование кинетина в качестве цитокинина.

Изучение анатомической структуры каллуса, проведенное на анализаторе клеток Countess (Invitrogen), показало, что в каллусе преобладают группы клеток диаметром 5-60 мкм. Форма их может быть различной – от меристеподобной до паренхимоподобной форм. Среди них располагаются группы мелких клеток, заполненные более густой цитоплазмой.

По полученным результатам будет проведена работа по исследованию ростовых характеристик каллуса *Dracocephalum palmatum* Steph., а также исследован качественный состав вторичных метаболитов полученных культур клеток и их сопоставление с результатами химических исследований дикорастущих растений из оймьконской популяции. Проведенные работы раскрывают возможности дальнейшего получения культур клеток дикорастущих растений не только данного вида, но и других растений, произрастающих на территории Якутии.

Л и т е р а т у р а

1. Володин В. В., Безматерных К. В., Смирнова Г. В., Октябрьский О. Н., Алексеева Л. И., Канаев В. А. Антиоксидантные свойства экстрактов растений семейства Lamiales, произрастающих в республике Коми // Известия Коми научного центра УрО РАН. Вып. 1(17). – Сыктывкар, 2014. – С. 27-31.
2. Данилова Н. С., Павлова П. А. Интродукционные возможности видов рода *Dracocephalum* L. в Центральной Якутии // Вестник КрасГАУ. – 2012. – № 9. – С. 70-72.
3. Кузовкина И. Н., Прокофьева М. Ю., Урмалина А. Р., Чернышева Т. П. Морфологические и биохимические особенности генетически трансформированных корней шлемника андрахновидного // Физиология растений. – 2014. – Т. 61, № 5. – С. 739-749.
4. Pouraboli I., Nazari S., Sabet N. et al. Antidiabetic, antioxidant, and antilipid peroxidative activities of *Dracocephalum polychaetum* shoot extract in streptozotocin-induced diabetic rats: In vivo and in vitro Editor-in-Chief: John M. Pezzuto // Pharm Biol. – 2016. – 54 (2). – P. 272-278.
5. Najafi M., Ghasemian E., Fathiazad F., Garjani A. Effects of Total Extract of *Dracocephalum moldavica* on Ischemia/Reperfusion Induced Arrhythmias and Infarct Size in the Isolated Rat Heart Iranian // Journal of Basic Medical Sciences. – 2009. – No. 4, V. 11. – P. 229-235.
6. Jahaniani F., Ebrahimi S., Rahbar-Roshandel N., Mahmoudian M. Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschyii* and a potential anti-cancer agent // Phytochemistry, Vol. 66, Issue 13, July 2005, P. 1581-1592.
7. Sobhani A.M., Ebrahimi S.A., Mahmoudian M. An in vitro evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by *Peganum harmala* L. seeds extract and its beta-carboline alkaloids // J Pharm Pharm Sci, 5. – 2002. – P. 19-23.
8. Asgarpanah J., Ramezanloo F. Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. // African Journal of Pharmacy and Pharmacology, Vol. 6(22). – P. 1573-1580.
9. Ahmadzadeh Sani T., Mohammadpour E., Mohammadi A., Memariani T., et. al. Original article cytotoxic and apoptogenic properties of *Dracocephalum kotschui* aerial part different fractions on calu -6 and mehr -80 lung cancer cell lines // Journal of Farmacia. – 2017. – Vol. 65, 2. – P. 189-193.
10. Gopi C., Nataraja Sekhar Y. and Ponmurugan P. In vitro multiplication of *Ocimum gratissimum* L. through direct regeneration // African Journal of Biotechnology. – 2006. – Vol. 5 (9). – P. 723-726.
11. Fenglan Li, Lijuan Shi, Xianfeng Jiang, Yao Fu!, Hui Zhao, Bingxiu Zhang, Yanzhong Feng, Feifei Qin, Yunfei Gao, Hui-lian Xu, Baozhong Hu. Somatic embryogenesis and histological observations of *Dracocephalum argunense* Fisch. ex Link. // Journal of Food, Agriculture & Environment, Vol. 11 (3&4), – 2013. – P.738-744.

12. Otroshy M. and Moradi K. Micropropagation of medicinal plant *Dracocephalum kotschyi* Boiss. via nodal cutting technique // *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 5(25). – 2011. – P. 5967-5972.
13. Sharafi A., Hashemi H., Azadi P. Hairy root induction and plant regeneration of medicinal plant *Dracocephalum kotschyi* Physiol // *Mol. Biol. Plants*, 20(2). – 2014. – P. 257-262.
14. Otroshy M., Moradi K. Rapid Regeneration of *Dracocephalum Kotschyi* Boiss. from Nodal Explants // *Journal of Life Science and Medical Research Feb*, Vol. 3 Iss. 1. – 2013. – P. 11-14.
15. Weremczuk-Jezyna Iz., Grzegorzcykkarolak I., Frydrych B., Hnatuszko-Konka K. Rosmarinic Acid Accumulation and Antioxidant Potential of *Dracocephalum moldavica* L. Cell Suspension Culture // *Not Bot Horti Agrobi*, 45(1). – 2017. – P. 215-219.
16. Olennikov, D.N., Chirikova N.K., Oklopkova Z.M., Zulfugarov I.S. Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Tánara Ótó* (*Dracocephalum palmatum* Stephan), a Medicinal Plant Used by the Nort-Yakutian Nomads // *Molecules*, 18. – 2013. – P. 14105-14121.
17. Данилова Н. С., Борисова С. З., Иванова Н. С. Декоративные растения Якутии: Атлас-определитель. М.: ЗАО «Фитон+», 2012, 248 с.: ил.
18. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. Учеб. пособие. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
19. Орлова Е. В. Оптимизация условий культивирования *in vitro* люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) // Ученые записки Орловского государственного университета. Серия естественные, технические и медицинские науки. Орловский государственный университет им. И. С. Тургенева. – № 3. – 2012. – С. 128-131.

References

1. Volodin V. V., Bezmaternykh K. V., Smirnova G. V., Oktiabr'skii O. N., Alekseeva L. I., Kanaev V. A. Antioksidantnye svoystva ekstraktov rastenii semeystva Lamiaceae, proizrastaiushchikh v respublike Komi // *Izvestiia Komi nauchnogo tsentra UrO RAN. Vyp. 1(17)*. – Syktyvkar, 2014. – S. 27-31.
2. Danilova N. S., Pavlova P. A. Introduktsionnye vozmozhnosti vidov roda *Dracocephalum* L. v Tsentral'noi Iakutii // *Vestnik KrasGAU*. – 2012. – № 9. – S. 70-72.
3. Kuzovkina I. N., Prokof'eva M. Iu., Urmalina A. R., Chernysheva T. P. Morfologicheskie i biokhimicheskie osobennosti geneticheski transformirovannykh kornei shlemnika andrakhnovidnogo // *Fiziologiya rastenii*. – 2014. – T. 61, № 5. – S. 739-749.
4. Pouraboli I., Nazari S., Sabet N. et al. Antidiabetic, antioxidant, and antilipid peroxidative activities of *Dracocephalum polychaetum* shoot extract in streptozotocin-induced diabetic rats: In vivo and in vitro Editor-in-Chief: John M. Pezzuto // *Pharm Biol.* – 2016. – 54 (2). – R. 272-278.
5. Najafi M., Ghasemian E., Fathiazad F., Garjani A. Effects of Total Extract of *Dracocephalum moldavica* on Ischemia/Reperfusion Induced Arrhythmias and Infarct Size in the Isolated Rat Heart Iranian // *Journal of Basic Medical Sciences*. – 2009. – No. 4, V. 11. – R. 229-235.
6. Jahaniani F., Ebrahimi S., Rahbar-Roshandel N., Mahmoudian M. Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschyii* and a potential anti-cancer agent // *Phytochemistry*, Vol. 66, Issue 13, July 2005, P. 1581-1592.
7. Sobhani A.M., Ebrahimi S.A., Mahmoudian M. An in vitro evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by *Peganum harmala* L. seeds extract and its beta-carboline alkaloids // *J Pharm Pharm Sci*, 5. – 2002. – R. 19-23.
8. Asgarpanah J., Ramezanloo F. Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. // *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 6(22). – R. 1573-1580.
9. Ahmadzadeh Sani T., Mohammadpour E., Mohammadi A., Memariani T., et al. Original article cytotoxic and apoptogenic properties of *Dracocephalum kotschui* aerial part different fractions on calu -6 and mehr -80 lung cancer cell lines // *Journal of Farmacia*. – 2017. – Vol. 65, 2. – R. 189-193.
10. Gopi C., Nataraja Sekhar Y. and Ponmurugan P. In vitro multiplication of *Ocimum gratissimum* L. through direct regeneration // *African Journal of Biotechnology*. – 2006. – Vol. 5 (9). – R. 723-726.
11. Fenglan Li, Lijuan Shi, Xianfeng Jiang, Yao Fu!, Hui Zhao, Bingxiu Zhang, Yanzhong Feng, Feifei Qin, Yunfei Gao, Hui-lian Xu, Baozhong Hu. Somatic embryogenesis and histological observations of

Dracocephalum argunense Fisch. ex Link. // *Journal of Food, Agriculture & Environment*, Vol. 11 (3&4), – 2013. – P.738-744.

12. Otroshy M. and Moradi K. Micropropagation of medicinal plant *Dracocephalum kotschy* Boiss. via nodal cutting technique // *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 5(25). – 2011, – R. 5967-5972.

13. Sharafi A., Hashemi H., Azadi P. Hairy root induction and plant regeneration of medicinal plant *Dracocephalum kotschy* Physiol // *Mol. Biol. Plants*, 20(2). – 2014. – R. 257-262.

14. Otroshy M., Moradi K, Rapid Regeneration of *Dracocephalum Kotschy* Boiss. from Nodal Explants // *Journal of Life Science and Medical Research Feb*, Vol. 3 Iss. 1. – 2013. – P. 11-14.

15. Weremczuk-Jezyna Iz., Grzegorzyczkrolak I., Frydrych B., Hnatuszko-Konka K. Rosmarinic Acid Accumulation and Antioxidant Potential of *Dracocephalum moldavica* L. Cell Suspension Culture // *Not Bot Horti Agrobo*, 45(1). – 2017, – R. 215-219.

16. Olennikov, D.N., Chirikova N.K., Oklopkova Z.M., Zulfugarov I.S. Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Tánara Ótó* (*Dracocephalum palmatum* Stephan), a Medicinal Plant Used by the Nort-Yakutian Nomads // *Molecules*, 18. – 2013. – R. 14105-14121.

17. Danilova N. S., Borisova S. Z., Ivanova N. S. *Dekorativnye rasteniia Iakutii: Atlas–opredelitel'*. M.: ZAO «Fiton+», 2012, 248 s.: il.

18. Butenko R. G. *Biologiya kletok vysshikh rastenii in vitro i biotekhnologii na ikh osnove. Ucheb. posobie.* – M.: FBK-PRESS, 1999. – 160 s.

19. Orlova E. V. Optimizatsiia uslovii kul'tivirovaniia in vitro liutserny posevnoi (*Medicago sativa* L.) // *Uchenye zapiski Orlovskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya estestvennye, tekhnicheskie i meditsinskie nauki. Orlovskii gosudarstvennyi universitet im. I. S. Turgeneva.* – № 3. – 2012. – S. 128-131.

