

УДК 633.822:581.143.6

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР МЯТЫ И ИХ ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Бугара И. А.

Введение. Каллусная культура растений достаточно широко используется для решения различных теоретических вопросов и прикладных задач. Она является удачной модельной системой для исследования закономерностей дедифференциации и морфогенеза, установления роли в этих процессах отдельных групп фитогормонов и физических факторов [2,3]. Вместе с тем каллусная культура находит все большее применение как источник соматональной изменчивости для получения растений - регенерантов, имеющих селекционную ценность. Работы, касающиеся получения каллусных культур и растений регенерантов мяты, проводились преимущественно на дикорастущих видах [5]. Сортовой материал и, прежде всего, новые сорта, созданные в последние годы, пока не привлекались для подобных исследований.

Основная цель наших исследований заключалась в оптимизации условий получения и пассирования каллусных культур некоторых сортов мяты.

Материал и методы. Материалом для проведения исследований служили сорта мяты Заграва, Симферопольская 200, Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6. Растения выращивали в вегстационарных сосудах объемом 10 л. В качестве экплантов использовали сегменты молодых листьев и стеблей. Культивирование проводили в химических пробирках на модифицированной агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга [4], дополненной бензимламинопурином (БАП), кинетином и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д). Условия культивирования: температура 23 – 25°C, освещенность 2 – 3 тыс. люкс при 16-часовом фотопериоде, относительная влажность воздуха составляла 60%.

Для цитологических исследований каллусные ткани фиксировали по Карнуа. Фрагменты каллуса раздавливали на предметном стекле и окрашивали метиленовым синим. Временные препараты исследовали под микроскопом ЛЮМАМ И-2.

Результаты и обсуждение. Для оптимизации условий получения каллусных культур листовые и стеблевые сегменты различных сортов мяты культивировали на модифицированных питательных средах Мурасиге-Скуга, различающихся по типу и концентрации экзогенных фитогормонов (таблица 1). Исследования показали, что по частоте каллусообразования используемые сорта можно условно разделить на три группы. Первую группу составили сорта Заграва и Симферопольская 200. Средняя

Таблица 1
Частота каллусообразования у сортов мяты при культивировании стеблевых и листовых сегментов на различных модификациях питательной среды Мурашиге-Скуга.

Сорт	Гормональный состав, мг/л			Тип экспланта	Частота каллусообразования, %	Тип экспланта	Частота каллусообразования, %
	БАП	кине-тин	2,4-Д				
Заграва	0,1	-	1,0	Листовые сегменты	100,0 ± 0,00	Стеблевые сегменты	100,0 ± 0,00
	0,5	-	2,0		100,0 ± 0,00		100,0 ± 0,00
	-	0,1	1,0		100,0 ± 0,00		84,7 ± 0,88
	-	0,5	2,0		92,3 ± 0,66		92,3 ± 1,20
	0,5	0,5	2,0		100,0 ± 0,00		100,0 ± 0,00
Симферопольская 200	0,1	-	1,0	Листовые сегменты	100,0 ± 0,00	Стеблевые сегменты	80,3 ± 0,33
	0,5	-	2,0		100,0 ± 0,00		100,0 ± 0,00
	-	0,1	1,0		92,3 ± 0,66		86,7 ± 0,66
	-	0,5	2,0		100,0 ± 0,00		86,7 ± 0,33
	0,5	0,5	2,0		100,0 ± 0,00		92,0 ± 0,57
Украинская перечная	0,1	-	1,0	Листовые сегменты	84,6 ± 0,88	Стеблевые сегменты	85,0 ± 0,33
	0,5	-	2,0		79,6 ± 0,88		87,0 ± 0,58
	-	0,1	1,0		93,3 ± 0,33		80,0 ± 0,57
	-	0,5	2,0		92,6 ± 0,33		66,3 ± 0,88
	0,5	0,5	2,0		100,0 ± 0,00		92,3 ± 0,66
Прилуцкая 6	0,1	-	1,0	Листовые сегменты	78,7 ± 1,20	Стеблевые сегменты	79,3 ± 1,20
	0,5	-	2,0		80,7 ± 0,88		81,0 ± 0,57
	-	0,1	1,0		77,0 ± 0,57		78,0 ± 0,58
	-	0,5	2,0		78,3 ± 0,88		79,0 ± 0,58
	0,5	0,5	2,0		79,7 ± 0,88		80,7 ± 0,33
Двухукосная	0,1	-	1,0	Листовые сегменты	78,3 ± 1,43	Стеблевые сегменты	78,7 ± 1,20
	0,5	-	2,0		80,0 ± 1,52		80,7 ± 0,88
	-	0,1	1,0		76,7 ± 0,88		77,0 ± 0,57
	-	0,5	2,0		77,7 ± 1,44		78,3 ± 0,88
	0,5	0,5	2,0		79,0 ± 1,52		79,7 ± 0,88

частота каллусообразования у этих сортов составляла 96,6% и 93,8%. Во вторую группу можно отнести сорт Украинская перечная. У данного сорта средняя частота каллусообразования составила 86,1%. В третью группу вошли сорта Двухукосная и Прилукская 6, у которых средняя частота каллусообразования была соответственно 71,7% и 79,2%.

Исследования показали, что при использовании в качестве эксплантов листовых и стеблевых сегментов у всех сортов наблюдалась довольно высокая частота каллусоогенеза. Однако в целом в культуре листовых сегментов изучаемых сортов мяты обнаруживалась более высокая частота каллусообразования чем в культуре стеблевых сегментов. Эта закономерность особенно характерна для сортов Заграва, Симферопольская 200 и Украинская перечная.

Частота каллусообразования в культуре листовых сегментов изучаемых сортов мяты в значительной степени зависела от местоположения листа на побеге растения-донора. У всех сортов максимальная частота каллусоогенеза наблюдалась при

Таблица 2

Частота каллусообразования в культуре листовых сегментов мяты в зависимости от положения листа на побеге растения - донора (модифицированная питательная среда Мурациге-Скуга, БАП-0,5 мг/л, кинетин – 0,5 мг/л, 2,4-Д – 2,0 мг/л)

Сорт	Пары листьев на основном побеге		
	1 – 4	5 – 8	9 – 12
Симферопольская 200	100%	93,3%	76,6%
Заграва	100%	96,6%	83,3%
Украинская перечная	100%	96,6%	80,0%
Двухукосная	96,6%	83,3%	70,0%
Прилукская 6	96,6%	80,0%	66,6%

введении в изолированную культуру листовых сегментов, взятых с 1-4 пары листьев. Листовые сегменты, отобранные со средних и нижних ярусов (5-8 и 9-12 пары) обладали пониженной способностью образовывать каллус (таблица 2).

Исследования по изучению особенностей индукции каллусообразования у мяты проводились нами в течение 4 лет. Это позволило установить сезонную закономерность в индукции каллуса у изучаемых сортов. Наиболее интенсивно процесс образования каллуса наблюдался в весенний и осенний периоды. Так, средняя частота каллусообразования являлась наиболее высокой в апреле – мае и немного ниже, но все же достаточно высокой в октябре – ноябре. В среднем для исследуемых сортов она составила 80 – 100%. В летний и зимний периоды наблюдался спад в интенсивности каллусообразования. Наиболее низкая частота каллусообразования была отмечена в летний и зимний периоды. Средняя частота каллусоогенеза летом составляла от 70 до 94% в зависимости от сорта. В зимние месяцы этот показатель был несколько ниже – 69 – 93%. Установленная зависимость позволяет сделать заключение, что процесс

образования и роста каллусных культур *in vitro* находится в зависимости от особенностей физиологических процессов, протекающих в растении-доноре *in vivo* в различное время года.

Цитологические исследования показали, что каллусные культуры изучаемых сортов мяты характеризовались высоким уровнем морфологической и генетической гетерогенности. В каллусных культурах мяты сортов Симферопольская 200, Заграва, Украинская перечная, Двухукосная, Прилукская 6 обнаруживались паренхимные клетки различных размеров и формы, меристематические клетки, элементы проводящей системы, эмбриоидоподобные структуры и запасающие клетки. Вместе с тем каллусные культуры изучаемых сортов не проявляли особой морфологической специфики и при цитологическом анализе выглядели достаточно однотипно, независимо от генотипа. В этой связи целесообразно рассмотрение цитологических особенностей популяций каллусных культур мяты (I–V пассажа) на примере сорта Симферопольская 200.

Каллусные ткани, индуцированные из листовых эксплантов мяты сорта Симферопольская 200, в стационарной фазе роста характеризовались высоким уровнем цитологической гетерогенности. Основную массу каллуса составляли клетки паренхимного типа различного размера и формы. Среди них было наибольшее количество клеток сильно удлинённой спиралевидной формы. Наряду с таким типом паренхимных клеток были выявлены клетки овальной и округлой формы, которые иногда имели гигантские размеры и выделялись из клеток основной массы каллуса. Паренхимные клетки имели, как правило, одно крупное ядро, относительно мелкое ядрышко и небольшое количество постенно-расположенной цитоплазмы.

Клетки меристематического типа располагались среди паренхимных клеток каллуса крупными локальными скоплениями. Они имели небольшие размеры, плотную, слабовакуолизированную цитоплазму и крупное ядро.

Особенно следует отметить присутствие в каллусных культурах изучаемых сортов мяты эмбриоидоподобных структур. Эти структуры состояли обычно из нескольких десятков клеток, имели глобулярную форму или проявляли тенденцию к полярности. Таким образом, вероятно, каллусные культуры мяты потенциально способны к реализации морфогенного потенциала за счет развития эмбриоидоподобных структур при пересадке каллуса на питательные среды определённого состава.

Проведённые исследования позволили оптимизировать условия получения каллусных культур мяты при эксплантации на питательные среды листовых и стеблевых сегментов. В отличие от ранее проведённых работ другими авторами [3, 5], мы впервые использовали для этих целей перспективный сортовой материал. Выполненные нами цитологические исследования в основном подтвердили факты, полученные для других видов растений, свидетельствующие о высокой морфологической гетерогенности каллусных культур [1]. Вместе с тем цитологические исследования однозначно показали, что полученные каллусные культуры потенциально

способны к морфогенезу с образованием растений. Доказательством этого процесса можно считать обнаружение эмбриоидоподобных структур, находящихся на различных стадиях развития.

Список литературы

1. Бугара А. М. Клеточная дифференциация и экспериментальный морфогенез у эфиромасличных растений: Автореф. Дис... докт. биол. наук. 03.00.05. – Кишинев, 1992. – 44 с.
2. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
3. Родов В. С., Резникова С. А. Получение и характеристика суспензионной культуры клеток мяты перечной (*Mentha piperita* L.) в связи с биосинтезом терпеноидов // Физиология раст. – 1982. – Т.29. – № 4. – С. 644 – 648.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – 15. – № 13. – P. 473 – 497.
5. Spenser A., Hamill J. D., Rhodes M. L. In vitro biosynthesis of monoterpenes by *Agrobacterium* transformed shoot cultures of two *Mentha* species // *Phytochemistry.* – 1993. – 32. – P. 191 – 193.

Поступила в редакцию 18.03.2003 г.