

УДК 582.675.1.086

**ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР *MENTHA PIPERITA* L.
И ИХ ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ НА
ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ С РАЗЛИЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ СЕЛЕНА**

Бугара И.А., Мальцева О.А.

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: igorbugara@gmail.com*

Исследованы особенности каллусообразования в культуре вегетативных органов мяты перечной (*Mentha piperita* L.) *in vitro* на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга, содержащей 2,4-Д 2,0 мг/л, БАП 0,5 мг/л, кинетин 0,5 мг/л и селен в различных концентрациях. Установлено, что содержание селена в питательной среде в концентрациях 5 мг/л и 10 мг/л оказывало стимулирующее действие на индукцию каллусообразования в культуре листовых эксплантов мяты перечной.

Ключевые слова: *Mentha piperita* L., каллусная культура, селен.

ВВЕДЕНИЕ

Растения способны синтезировать и накапливать разнообразные вещества вторичного метаболизма, проявляющие биологическую активность и имеющие фармакологическое значение. Идентификация этих веществ, установление структуры и специфики биологического действия привели к тому, что в последнее десятилетие для лечения и профилактики различных заболеваний все шире начинают использоваться лекарственные средства на основе растительного сырья. Например, сегодня при лечении сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний препараты, получаемые из растений, составляют около 50%. При этом в медицине используют около 3000 видов растений, из них более 100 специально выращивают, остальные произрастают в дикой природе [1]. Поэтому природные запасы растительных лекарственных ресурсов быстро истощаются, под угрозой исчезновения находятся ценные в фармакологическом отношении виды. В этой связи становится актуальным поиск альтернативных источников сырья для фармакологии. В последние годы в качестве такого альтернативного источника рассматривают растительную биомассу (каллусную или суспензионную культуру), выращиваемую в условиях контролируемого эксперимента *in vitro*. Замена природного лекарственного сырья на гарантированно получаемую биомассу видится сегодня как один из радикальных способов, позволяющих сохранить ресурсы исчезающих видов лекарственных растений.

Мята перечная (*Mentha piperita* L.) – лекарственное и эфиромасличное растение с широким спектром практического использования, в диком виде не произрастает. Промышленные посадки мяты сосредоточены в Крыму [2]. Основное практическое

значение, обусловлено эфирным маслом, основным компонентом которого является ментол. Кроме того, в растении содержатся дубильные и смолистые вещества, каротин, геспередин, аскорбиновая, хлорогеновая, кофейная, урсоловая и олеоновая кислоты, тритерпеновые соединения, флавоноиды, рутин и бетаин [3].

Немаловажное значение имеют, накапливающиеся в растениях макро- и микроэлементы, способные оказывать существенное влияние на организм человека. Вместе с тем, далеко не все из них растения мяты способны аккумулировать из природной среды. Одним из примеров может служить селен, использование которого активно внедряется при разработке медицинских препаратов на основе растительного сырья. Установлено, что селен оказывает положительное влияние на состояние сердечно-сосудистой системы и иммунной систем организма человека [4, 5].

В этой связи, актуальным является разработка приемов получения каллусных культур мяты перечной *in vitro* с использованием модифицированных селенсодержащих питательных сред.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили растения мяты перечной (*Mentha piperita* L), выращенные в условиях закрытого грунта. В случае проявления первых визуальных признаков заболеваний или поражения вредителями, растения удаляли и в работе не использовали. В качестве эксплантов для введения в культуру *in vitro* были взяты молодые листья и стеблевые сегменты длиной 0,7-1,0 см. При выполнении экспериментальной работы использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре изолированных тканей растений [6]. Растительный материал поверхностно стерилизовали препаратом «Белизна» в течение 6 минут, а затем промывали в трех сменах автоклавированной дистиллированной воды. Экспланты помещали на поверхность модифицированных агаризованных питательных сред Мурасиге и Скуга [7], дополненных 2,4-Д (дихлорфеноксисукусная кислота) 2,0 мг/л, 6-БАП (6-бензиламинопурин) 0,5 мг/л, кинетином 0,5 мг/л и селеном в различных концентрациях. В качестве культуральных сосудов использовали химические пробирки 16 x 150мм, содержащие 10-15 мл питательной среды. В каждый культуральный сосуд помещали по одному экспланту. Экспланты культивировали в условиях термостатированного помещения (25–27 °С) при относительной влажности воздуха 60-70%, освещенности 2-3 тыс. люкс и 16-часовом фотопериоде. В процессе культивирования проводили визуальный анализ первичного каллуса, измерение ростовых характеристик и морфометрических параметров. Частоту каллусообразования определяли по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантированных.

Для цитологического анализа каллусных культур их фиксировали по Карнуа, окрашивали ацетокармином и готовили временные препараты [8]. Цитологические исследования проводили на световом микроскопе МР1-5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование молодых листьев и стеблевых сегментов в условиях *in vitro* на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга позволило выявить их различную способность к каллусообразованию (табл.1, табл.2).

Таблица 1

Частота каллусообразования и интенсивность роста каллусных культур, индуцированных из молодых листьев, на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (0-пассаж)

Типы и концентрации фитогормонов, мг/л			Частота каллусообразования, $\bar{X} \pm S_x$	Интенсивность роста каллуса*
Кинетин	БАП	2,4-Д		
-	-	-	0,0	-
-	0,1	1,0	98,8 ± 1,1	++
-	0,5	2,0	97,7 ± 2,3	+++
0,1	-	1,0	94,4 ± 2,9	++
0,5	-	2,0	93,3 ± 1,9	++
0,5	0,5	2,0	100,0 ± 0,0	+++

Примечание: * + - низкая интенсивность роста, ++ - средняя интенсивность роста, +++ - высокая интенсивность роста.

Из результатов, представленных в таблицах, следует, что на безгормональной питательной среде индукция каллусообразования в культуре вегетативных органов не наблюдалась. Вместе с тем, при использовании питательных сред, содержащих экзогенные фитогормоны в различных концентрациях частота каллусообразования наблюдалась в пределах 94,4% – 100,0%. Отличия сводились, главным образом, к интенсивности роста каллусных культур.

Таблица 2

Частота каллусообразования и интенсивность роста каллусных культур, индуцированных из стеблевых эксплантов, на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (0-пассаж)

Типы и концентрации фитогормонов, мг/л			Частота каллусообразования, $\bar{X} \pm S_x$	Интенсивность роста каллуса*
Кинетин	БАП	2,4-Д		
-	-	-	0,0	-
-	0,1	1,0	92,2 ± 2,9	++
-	0,5	2,0	90,0 ± 5,1	+
0,1	-	1,0	84,4 ± 4,8	+
0,5	-	2,0	90,0 ± 2,7	++
0,5	0,5	2,0	100,0 ± 0,0	+++

Первые признаки индукции каллусообразования в культуре вегетативных органов *M. piperita* визуально обнаруживались на 10–14 сутки культивирования в зависимости от типа экспланта и состава питательной среды. На эксплантах молодых листьев образование каллуса наблюдалось в базальной части в местах

рассечения ткани. Образование каллуса в культуре стеблевых сегментов было приурочено к поверхности среза. Формирующийся каллус имел светло-зеленую окраску и рыхлую консистенцию (рис. 1).

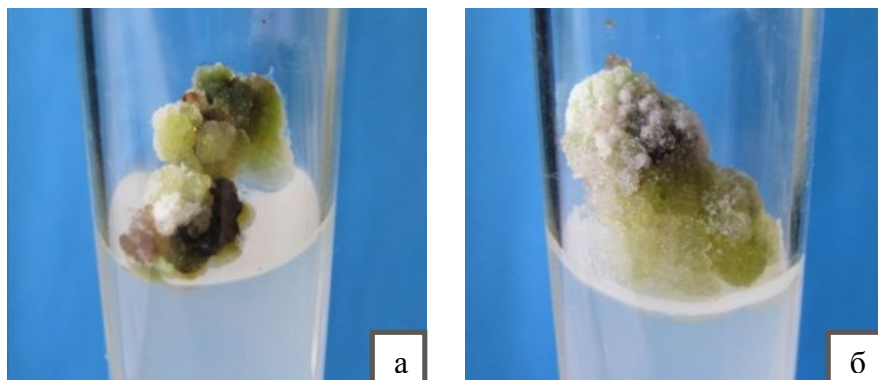


Рис.1. Каллусная культура *Mentha piperita* L., индуцированная в культуре листовых (а) и стеблевых эксплантов (б).

Проведенные исследования показали преимущество использования для индукции каллусогенеза в культуре листовых и стеблевых эксплантов *M. piperita* модифицированных питательных сред, дополненных 2,4-Д, БАП и кинетином. Использование различных концентраций 2,4-Д для индукции каллусообразования является хорошо известным и наиболее распространенным методическим подходом. Аналогичный подход, основанный на использовании отличных от установленных нами концентраций фитогормонов, был использован ранее и другими авторами для получения каллусных культур различных видов мяты. При этом не была обнаружена зависимость индукции каллусогенеза от типа экспланта. В наших исследованиях образование каллуса наблюдалось при использовании в качестве экспланта как молодых листьев, так и стеблевых сегментов.

Для изучения влияния селена на частоту каллусообразования и цитологические особенности каллусных культур *M. piperita* нами было проведено культивирование стеблевых эксплантов на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга, содержащей 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП, 0,5 мг/л кинетина (контроль без селена) и селен в различных концентрациях (рис. 2).

Полученные результаты показали зависимость частоты каллусообразования от концентрации селена в питательной среде. Содержание селена в концентрациях 0,1 мг/л, 0,2 мг/л, 0,5 мг/л и 1 мг/л снижало частоту каллусообразования на 15% - 30% относительно контроля. Вместе с тем, добавление селена в состав питательной среды в более высоких концентрациях (5 мг/л и 10 мг/л) повышало частоту каллусообразования до 96% - 100%, что соответствовало контрольному варианту опыта.

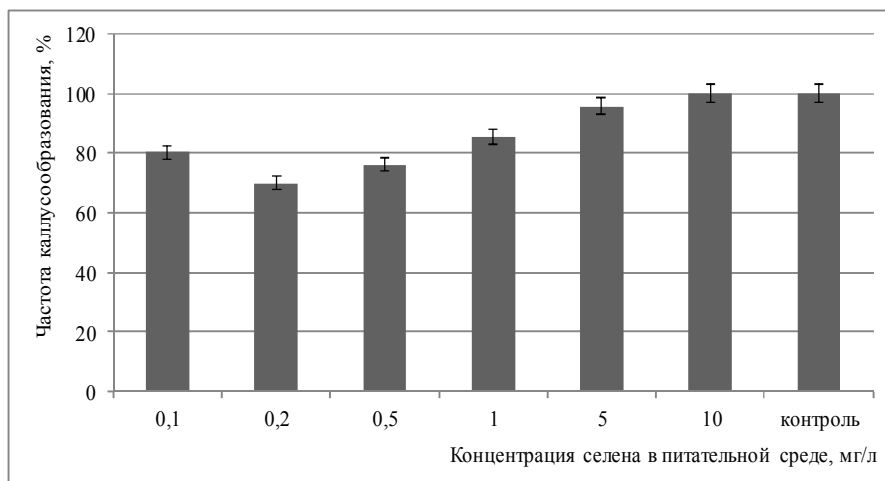


Рис.2. Влияние различных концентраций селена на частоту каллусообразования в культуре стеблевых эксплантов *Mentha piperita* L. *in vitro*.

Присутствие селена в питательной среде оказывало влияние и на морфологические особенности каллусных культур мяты (рис. 3). В зависимости от повышения концентрации селена окраска каллуса изменялась от светло-зеленой до бордово-коричневой.



Рис.3. Морфологические особенности каллусных культур *Mentha piperita* L. в зависимости от содержания селена в питательной среде: а - 0,1 мг/л, б - 5,0 мг/л, в - 10,0 мг/л.

Цитологические исследования позволили установить, что каллусные культуры *M. piperita*, индуцированные на селенсодержащих питательных средах, состояли преимущественно из клеток паренхимного типа, характеризующихся крупными размерами, небольшим количеством цитоплазмы и сильной вакуолизацией. Такие клетки имели округлую, овальную и удлинённую форму (рис. 4). Однако, при низких концентрациях селена в питательной среде, паренхимные клетки отличались большими размерами, и среди каллусных клеток встречались трахеидоподобные

элементы. С увеличением концентрации селена наблюдалась тенденция к уменьшению размеров паренхимных клеток, на фоне которых встречались одиночные гигантские клетки изометрической формы.

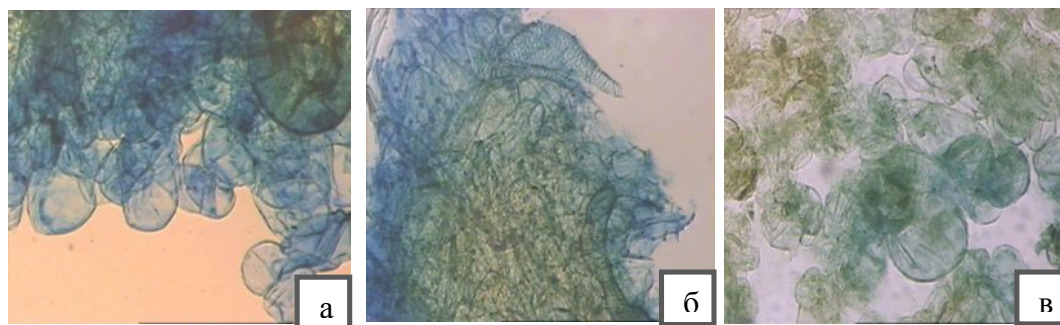


Рис. 4. Морфология клеток каллусных культур *Mentha piperita* L индуцированных на питательных средах, содержащих селен в различных концентрациях: а, б – 1 мг/л, в – 10 мг/л (увеличение 15x10, окраска - метиленовый синий).

Таким образом, проведенные нами исследования показали возможность получения каллусных культур *M. piperita* на питательной среде, дополненной 2,4-Д, БАП и кинетином. При этом не обнаруживалась зависимость индукции каллусообразования от типа исходного экспланта. В наших исследованиях образование каллуса наблюдалось как в культуре молодых листьев, так и в культуре стеблевых сегментов. Полученные результаты согласуются с данными ранее выполненных исследований по культивированию *in vitro* вегетативных органов промышленных сортов мяты [9, 10].

Результаты культивирования стеблевых сегментов *M. piperita* на селенсодержащих питательных средах показали стимулирующее влияние высоких концентраций селена на частоту каллусообразования. Вероятно, проявление данной зависимости связано с цитологическими характеристиками каллусных культур, проявляющимися в уменьшении размеров и меристематизацией клеток паренхимного типа при более высоких концентрациях селена в питательной среде.

ВЫВОДЫ

1. Подобран состав питательной среды для индукции каллусообразования в культуре вегетативных органов *M. piperita*.
2. Установлено, что концентрации селена в питательной среде 5 мг/л и 10 мг/л оказывают стимулирующее действие на индукцию каллусообразования в культуре стеблевых сегментов *M. piperita*.

Список литературы

1. Кунах В.А. Биотехнология лекарственных растений. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / Кунах В.А. – К.: Логос. – 2005. – 724 с.
2. Мустаце Г.И. Культура мяты перечной / Мустаце Г.И. – Кишинев: Штиинца. – 1985. – 165 с.
3. Бойченко Э.С. О ментольности эфирного масла мяты сорта 541 / Э.С. Бойченко / Медицинская промышленность СССР. – 1960. – № 10. – С. 18–21.
4. Запрометов М.Н. Вторичный метаболизм и его регуляция в культурах клеток и тканей растений / М.Н. Запрометов // Культура клеток растений: [сб. статей под. ред. Р. Г. Бутенко]. – М.: Наука, 1981. – С 37–50.
5. Селен в депонирующих средах Нечерноземной зоны Европейской части России и агрохимический метод коррекции дефицита селена / С.П. Торшин, Т.М. Удельнова, Н.И. Конова [и др.] // Экология. – 1996. – № 4. – С. 253–258.
6. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
7. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol.15, № 13. – P. 473–497.
8. Паушева Л.А. Практикум по цитологии растений / Паушева Л.А. – М.: Колос, 1980. – 304 с.
9. Бугара И.А. Клональное микроразмножение мяты в культуре стеблевых сегментов *in vitro* / И.А. Бугара // Тематический сборник научных трудов «Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана». – 2004. – С. 97–103.
10. Бугара И.А. Морфологическое и цитохимическое исследование каллусных культур мяты / И.А. Бугара // Ученые записки ТНУ им. Вернадского. Серия «Биология, химия». Т.21. – 2008. – №1. – С. 44–52.

Бугара І.О. Одержання калусних культур *Mentha piperita* L. та їх цитологічна характеристика при вирощуванні на живильних середовищах з різною концентрацією селену / І.О. Бугара, О.А. Мальцева // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2011. – Т. 24 (63), № 4. – С. 17-23.

Досліджено особливості калусоутворення в культурі вегетативних органів м'яты перцевої (*Mentha piperita* L.) *in vitro* на модифікованому живильному середовищі Мурасиге та Скуга, що містить 2, 4-Д 2,0 мг/л, БАП 0,5 мг/л, кінетин 0,5 мг/л і селенів у різних концентраціях. Установлено, що зміст селену у живильному середовищі у концентраціях 5 мг/л та 10 мг/л виявляє стимулюючу дію на індукцію калусоутворення в культурі листових есплантів м'яты перцевої.

Ключові слова: *Mentha piperita* L., калусная культура, селен.

Bugara I.A. Receive of *Mentha piperita* L. callus culture and their cytological characteristics when grown in nutrient medium with different concentrations of selenium / I.A. Bugara, O.A. Malceva // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2011. – Vol. 24 (63), No 4. – P. 17-23.

The features of callus cultures in vegetative organs of peppermint (*Mentha piperita* L.) *in vitro* on a modified medium Murashige and Skoog containing 2,4-D 2,0 mg /l, BAP 0,5 mg/l kinetin 0,5 mg/l and various concentrations of selenium was investigation. It was established that the selenium in the medium in concentrations of 5 mg/l and 10 mg/l has a stimulating effect on the induction of callusogenesis of leaf explants of mint.

Keywords: *Mentha piperita* L., callus culture, selenium.

Поступила в редакцию 20.11.2011 г.