

УДК 633.822:581.143.6

## КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ И ОЗДОРОВЛЕНИЕ *MENTHA PIPERITA L. IN VITRO*

Бугара И.А.

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

Показана возможность клонального микроразмножения и оздоровления мяты перечной (*Mentha piperita L.*) на основе культуры изолированных меристем *in vitro*. Использование модифицированной питательной среды Мурасиге и Скуга, содержащей ИУК 0,5 мг/л, кинетин 0,1 мг/л, 6-БАП 1,0 мг/л и рибавирин 5 мг/л позволяет получать и массово размножать свободные от вирусной инфекции растения-регенеранты.

**Ключевые слова:** *Mentha piperita L.*, клональное микроразмножение, оздоровление.

### ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе развития биологической науки большое внимание уделяется поиску нетрадиционных подходов, позволяющих существенно обогатить отдельные её отрасли новыми методами, успешно зарекомендовавшими себя не только в области теоретических исследований, но и на практике. Одним из таких подходов является получение безвирусного посадочного материала методом культуры изолированных клеток, тканей и органов растений *in vitro*. В последние годы методы культуры тканей находят всё большее применение для получения и оздоровления перспективных видов и сортов, используемых в производстве [1, 2]. Вместе с тем, недостаточно внимания уделяется исследованиям по оздоровлению и размножению дикорастущей флоры, которая является исходным материалом для создания промышленных сортов. Несомненно, необходима разработка эффективных технологий размножения и производства высококачественного безвирусного посадочного материала на принципиально новой методической основе. Перспектива создания таких технологий связана с разработкой приёмов клонального микроразмножения на основе комплекса методов культуры изолированных тканей и органов *in vitro*. Техника *in vitro* позволяет наиболее полно реализовать потенциал растений к вегетативному размножению и является на сегодняшний день главной составляющей современных биотехнологий клонирования и производства посадочного материала в экономически развитых странах мира.

Исследования по получению посадочного материала мяты на основе биотехнологических подходов, выполненные в Украине в основном проводились на перспективных промышленных сортах [3]. Дикорастущие виды *Mentha piperita L.*, *Mentha spicata L.*, *Mentha arvensis L.*, *Mentha viridis L.* и некоторых другие, в подобных исследованиях использовались недостаточно.

Наряду с этим, возрастающий спрос на эфирное масло мяты диктует необходимость разработки эффективных биотехнологических способов оздоровления и клонального микроразмножения дикорастущих видов, для их последующего использования при создании промышленных сортов.

В связи с этим, целью настоящей работы являлась разработка приемов массового размножения и оздоровления *M. piperita* на основе использования комплекса методов культуры изолированных клеток, тканей и органов *in vitro*.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментальных исследований *in vitro* использовали растения *M. piperita* выращенные в условиях закрытого грунта. Апикальные, латеральные меристемы и вегетативные почки выделяли под бинокулярным микроскопом МБИ-10 при помощи скальпеля и специально изготовленной для этой цели препаровальной иглы ланцетовидной формы с острыми, режущими краями. При проведении экспериментальных работ использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре изолированных клеток, тканей и органов растений [4]. Экспланты помещали на поверхность модифицированной агаризованной питательной среды Мурасиге и Скуга [5], содержащей 0,5 мг/л ИУК (индолилуксусная кислота), 0,1 мг/л кинетин, 1,0 мг/л 6-БАП (6-бензиламинопурин). В качестве культуральных сосудов использовали химические пробирки 1,5 x 16 см с 10 мл питательной среды. Для гарантированного получения оздоровленных от вирусной инфекции растений *M. piperita* в состав питательной среды добавляли вицид рибавирин (1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид, «Sigma-Aldrich», США) в концентрации 5 мг/л [6].

Диагностику растений *M. piperita* и растений полученных в культуре изолированных меристем проводили на растениях-индикаторах. В качестве растений-индикаторов были использованы *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana rustica* L., *Nicotiana tabacum* L. var. Havana, *Nicotiana tabacum* L. var. Samsun, *Petunia hybrida* Hort. Заражение проводилось механически на стадии 4 – 8 листьев. С каждого образца отбирали 1 г растительного материала, измельчали в фарфоровой ступке с 2 мл экстрагирующего буфера. Листья травянистых растений-индикаторов натирали полученным гомогенатом с помощью белочной кисточки и оставляли на 10 – 15 минут, излишки гомогената смывали дистиллированной водой. Зараженные растения помещали в теплицу при положительной температуре 23 – 26 °С. Результаты диагностики отмечали через 7 – 12 суток после возможного инфицирования растений с учетом местной реакции [2].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Начальным этапом исследований по получению оздоровленного посадочного материала *M. piperita*, являлась первичная диагностика донорных растений на наличие вирусной инфекции. Для разработки методики получения оздоровленного посадочного материала мяты, нами были обследованы на наличие или отсутствие вирусов растения без внешних симптомов поражения. Исследования показали, что при использовании растений-индикаторов, проявление внешних симптомов значительно варьировало. Так,

местная реакция *Nicotiana glutinosa* L. в ответ на втирание гомогената, полученного из листьев *M. piperita* проявилась в появлении некротических пятен в местах поражения. При втирании гомогената в листья *Nicotiana tabacum* L. var. Havana, *Nicotiana tabacum* L. var. Samsun, *Petunia hybrida* Hort. было отмечено появление характерных хлорозных пятен. Вместе с тем, на растениях *Nicotiana rustica* L. визуальных симптомов вирусного поражения обнаружено не было. В дальнейшем растения, гомогенат, из листьев которых выявил положительную реакцию на вирусную инфекцию, не использовали. По результатам биотестирования количество безвирусных растений составило 40% от общего числа исследуемых.

При разработке методики клонального микроразмножения и оздоровления *M. piperita* существенное значение имеет размер исходного экспланта. Известно, что экспланты большего размера обладают лучшей способностью к приживаемости и дальнейшему развитию, по сравнению с эксплантами меньшего размера. Вместе с тем, при использовании минимального по размеру экспланта повышается вероятность получить оздоровленные от вирусной инфекции растения-регенеранты.

В ходе выполнения настоящего исследования была изучена зависимость между размерами эксплантов изолированных меристем *M. piperita* и их способностью к морфогенезу и регенерации *in vitro* (табл. 1).

**Таблица 1**  
**Количество эксплантов, способных к морфогенезу и регенерации растений, в зависимости от их размера, %**

| Конус нарастания<br>0,25-0,31мм | Меристемы с 1 парой примордиев<br>0,48-0,53 мм | Меристемы с 2 парами примордиев<br>1,22-1,31 мм | Меристемы с 3 парами примордиев<br>1,47-1,61 мм | Вегетативные почки<br>2,11-2,25 мм |
|---------------------------------|--|---|---|------------------------------------|
| 0,0                             | 57,7 ± 3,9                                     | 83,9 ± 1,3                                      | 96,6 ± 1,9                                      | 97,8 ± 1,1                         |

Способность эксплантов к морфогенезу в условиях *in vitro* оценивали визуально по появлению первой пары листьев и началу регенерации микропобегов. Исследования показали, что с увеличением размера экспланта способность к морфогенезу повышалась. Лучшей способностью к морфогенезу и регенерации обладали меристемы размером 1,22 – 1,61 мм, а также вегетативные почки. В обоих случаях количество эксплантов, способных регенерировать микропобеги, составляло 83,9 – 96,6 %.

Таким образом, для разработки приемов клонального микроразмножения и оздоровления *M. piperita* целесообразно использовать меристемы с 2 парами листовых примордиев, размером 1,22 – 1,31 мм, приживаемость которых в условиях *in vitro* достигает 83,9 %. При этом повышается вероятность получения микрорастений, свободных от вирусной инфекции.

Первые видимые признаки морфогенеза в культуре изолированных меристем *M. piperita* связанные с разворачиванием первой пары листьев обнаруживались на 18 – 20 сутки культивирования. Через 7 – 10 суток наблюдалось формирование основного микропобега и признаки развития дополнительных микропобегов. На 75-е сутки количество микропобегов достигало от 2 до 5 штук, при этом они имели нормальную морфологию, 4 – 7 пар листьев и хорошо развитую корневую систему (рис.1).

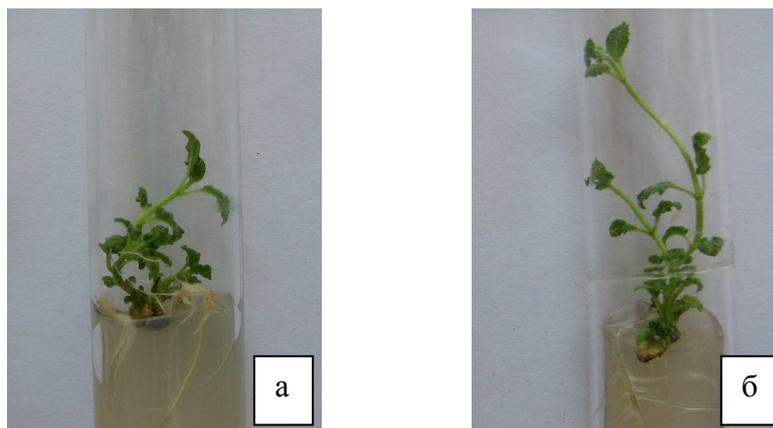


Рис. 1. Развитие растений-регенерантов в культуре изолированных меристем *Mentha piperita* L.: а) 40 сутки, б) 70 сутки культивирования.

Для повышения коэффициента размножения нами была изучена возможность сочетания культуры изолированных меристем с черенкованием микропобегов в условиях *in vitro* (рис. 2).

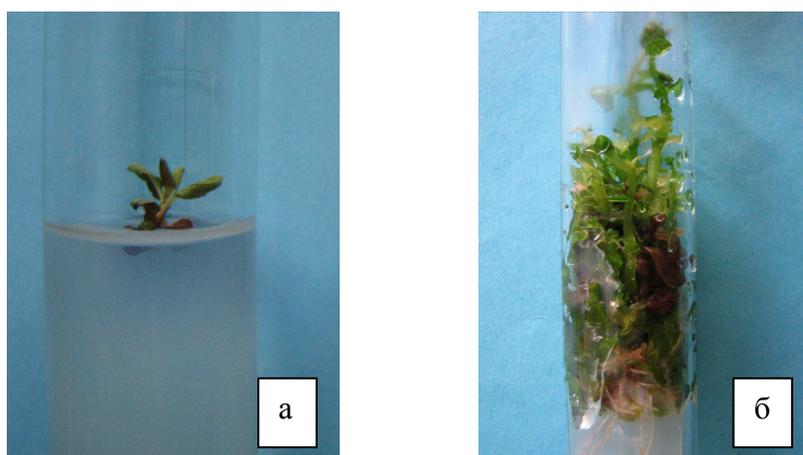


Рис.2. Черенкование растений-регенерантов *Mentha piperita* L. *in vitro*: а) 5 сутки, б) 70 сутки культивирования.

С этой целью изолированные меристемы выращивали на питательной среде до достижения максимального коэффициента размножения. Полученные микропобеги разделяли на 3 – 5 узлов (стеблевых сегментов с одной парой листьев) и каждый узел переносили на питательную среду того же состава. Полный цикл выращивания при использовании модифицированной питательной среды Мурасиге и Скуга составлял до 70 суток. Первым видимым проявлением морфогенеза являлась

быстрая регенерация микропобегов из пазушных меристем. Через 15 – 17 суток обнаруживалось множественное побегообразование и развитие корневой системы.

Через 70 суток культивирования количество микропобегов достигало 5 – 15 штук, при этом они имели нормальную морфологию, 4 – 7 пар листьев и хорошо развитую корневую систему.

Препарат рибавирин в концентрации 5 мг/л добавляли в состав питательной среды на этапе культивирования изолированных меристем. Повторное биотестирование растений-регенерантов проводили после 45 суток адаптации *in vivo*. Применение этапа повторного тестирования позволяет показать реальный эффект использования культуры *in vitro* и возможность дальнейшего внедрения разработанной нами серии приемов в производство для массового размножения и оздоровления *M. piperita*. Совместное использование препарата рибавирин с культурой изолированных меристем и вегетативных почек позволяет получить до 100% оздоровленных микрорастений мяты перечной.

В процессе адаптации растений-регенерантов к условиям *in vivo* определяли их приживаемость в различных субстратах (табл. 2). Лучшая приживаемость (97,5 %) наблюдалась при использовании в качестве субстрата смеси, состоящей из равных частей торфа и керамзита. Через 45 суток выращивания растений *in vivo* длина побегов увеличивалась в среднем в 3 раза, а количество листьев на побегах у всех изучаемых сортов в среднем 1,7 раза. Наряду с этим, в 1,7 раза увеличивалась длина и в 2,7 раза - количество корней.

Таблица 2

**Биометрические показатели растений *M. piperita* в процессе выращивания в условиях *in vivo* (субстрат торф-керамзит 1:1)**

| Длина основного побега, мм |            | Количество пар листьев на основном побеге, шт |            | Количество корней, шт |            | Длина корней, мм |            |
|----------------------------|------------|---|------------|-----------------------|------------|------------------|------------|
| 1-е сутки                  | 45-е сутки | 1-е сутки                                     | 45-е сутки | 1-е сутки             | 45-е сутки | 1-е сутки        | 45-е сутки |
| 50,5±1,3                   | 152,0±3,9  | 4,2±0,3                                       | 7,2±0,3    | 4,3 ± 0,1             | 7,2 ± 0,4  | 38,0 ± 0,3       | 106,0±2,5  |

После 45 суток адаптации растений-регенерантов в субстрате из смеси торфа и керамзита их пересаживали в пластиковые стаканы объемом 200 мл с почвой и доращивали в условиях закрытого грунта.

В дальнейшем растения, выращенные из меристемной культуры, высаживали в условия открытого грунта. Подготовку почвы и высадку растений проводили по традиционной схеме, как при посадке мяты рассадой [7]. Высаженные растения нормально проходили все фазы вегетационного развития.

## ВЫВОДЫ

1. Показана возможность клонального микроразмножения и оздоровления мяты перечной (*Mentha piperita* L.) на основе культуры изолированных меристем *in vitro*.
2. Использование модифицированной питательной среды Мурасиге и Скуга, содержащей ИУК 0,5 мг/л, кинетин 0,1 мг/л, 6-БАП 1,0 мг/л и рибавирин 5 мг/л позволяет получать и массово размножать свободные от вирусной инфекции растения-регенеранты.

## Список литературы

1. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приёмы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур / [Митрофанова О.В., Славгородская-Куприева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичева Л.А.] – Ялта: Издательство Крымпресс, 2000. – 45 с.
2. Сенчугова Н.А. Вірусні хвороби основних ефіроолійних культур Кримського регіону: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.06 / Н.А. Сенчугова – КНУ ім. Тараса Шевченка. – К., 2003. – 21 с.
3. Бугара И.А. Индуцированный морфогенез и клональное микроразмножение перспективных сортов мяты : автореф. дис. на соискание науч. степ. канд. биол. наук: 03.00.20 / И.А. Бугара – НБС-ННЦ. – Ялта, 2006. – 21 с.
4. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
5. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, No 13. – P. 473–497.
6. Латушкіна Т.М. Клональне мікророзмноження і оздоровлення лаванди *in vitro* : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с-х. наук: спец. 06.01.14 / Т.М. Латушкіна – ЮФ КАТУ НАУ. – Сімферополь 2006 – 16 с.
7. Мустьяце Г.И. Культура мяты перечной / Мустьяце Г.И. – Кишинев: Штиинца. – 1985. – 165 с.

**Бугара І.О. Клональне мікророзмноження та оздоровлення *Mentha piperita* L. *in vitro* / І.О. Бугара // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2013. – Т. 26 (65), № 1. – С. 10-15.**

Показана можливість клонального мікророзмноження та оздоровлення м'яти перцевої (*Mentha piperita* L.) на основі культури ізольованих меристем *in vitro*. Використання модифікованого живильного середовища Мурасиге і Скуга, що містить ІУК 0,5 мг/л, кинетин 0,1 мг/л, 6-БАП 1,0 мг/л і рибавірін 5 мг/л дозволяє отримувати та масово розмножувати вільні від вірусної інфекції рослини-регенеранти.

**Ключові слова:** *Mentha piperita* L., клональне мікророзмноження, оздоровлення.

**Bugara I.A. Clonal micropropagation and healthy *Mentha piperita* L. *in vitro* / I.A. Bugara // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2013. – Vol. 26 (65), No. 1. – P. 10-15.**

The possibility of clonal micropropagation and healthy of peppermint (*Mentha piperita* L.) based on the culture of isolated meristems *in vitro* was shown. Use of a modified medium Murashige and Skoog supplemented with IAA 0,5 mg/L, kinetin 0,1 mg/L, 6-BAP 1,0 mg/L and ribavirin 5 mg/L can receive the bulk copy free of virus infection regenerated plants.

**Keywords:** *Mentha piperita* L., clonal micropropagation, healthy.

Поступила в редакцію 21.02.2013 г.