

УДК 633.81:57.085.2

КАЛЛУСОГЕНЕЗ И МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ *MELISSA OFFICINALIS* L. *IN VITRO*

Якимова О.В., Егорова Н.А.

Институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, Россия
E-mail: yegorova.na@mail.ru

Изучено влияние некоторых факторов (гормонального состава питательной среды, происхождения донорного растения, времени введения в культуру, типа экспланта) в процессе индукции каллусо- и морфогенеза у *Melissa officinalis* L. Подобраны режимы получения каллусной культуры из различных типов эксплантов (лист, стебель, черешок, гипокотиль и семядольные листья проростков). Максимальная частота и интенсивность каллусообразования были на среде МС с добавлением 1,0 мг/л НУК (или 2,4-Д) и 0,5 мг/л БАП. При культивировании органов проростков, полученных из семян *in vitro*, показано влияние на каллусо- и морфогенез возраста проростков и выявлена возможность индукции прямого морфогенеза из семядольных листьев. Для разработки метода клонального микроразмножения Melissa выявлены особенности морфогенеза при культивировании сегментов стебля с узлом в зависимости от состава питательной среды.

Ключевые слова: *Melissa officinalis* L., каллусогенез, морфогенез, микроразмножение, *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ

Мелисса лекарственная (*Melissa officinalis* L.) – это перспективное эфиромасличное, лекарственное и пряно-ароматическое растение, представитель семейства *Lamiaceae* LINDL., родиной которого являются страны Средиземноморья. Культивируется мелисса в Российской Федерации, на Украине, в Литве, Болгарии и многих других странах [1]. Мелисса имеет разнообразные области применения: в качестве медоноса, пряности, а также в медицине. Установлено, что препараты на основе мелиссы лекарственной обладают широким спектром фармакологической активности, включающим седативные, антидепрессантные, противовирусные, иммуномодулирующие, антигистаминные, антиоксидантные, противовоспалительные и антимикробные свойства [2, 3]. Эфирное масло входит в состав многих препаратов, обладающих успокаивающим действием. Мелисса чаще выращивается как лекарственное растение, так как содержание эфирного масла в сырье невелико и составляет от 0,02 до 0,30 % от сухой массы [3, 4]. В связи с этим в институте сельского хозяйства Крыма ведется селекционная работа с целью получения высокомасличных и высокопродуктивных сортов *M. officinalis* [5]. Для повышения эффективности селекции в настоящее время часто используются биотехнологические приемы, позволяющие получить новый исходный материал с повышенной урожайностью, качеством продукции и устойчивостью к стрессам, а также ускоренно его размножить. Наиболее распространенными клеточными технологиями получения новых генотипов для

селекции является использование соматоклональной изменчивости, клеточная селекция и мутагенез *in vitro* [6]. Разработка таких биотехнологий, прежде всего, базируется на получении каллусных культур. Одним из современных биотехнологических подходов является применение метода клонального микроразмножения, позволяющего быстро размножить ценные генотипы, в том числе и созданные в условиях *in vitro*, а также и новые сорта. Для этого используются разнообразные приемы, основанные на индукции морфогенеза из апикальных и пазушных почек или непосредственно из тканей разных органов растения, а также из каллусных культур [7].

В проанализированных литературных источниках содержится очень мало информации, касающейся культивирования изолированных тканей и органов *M. officinalis* [8-10]. Клеточные технологии создания исходного селекционного материала для этого вида практически не разработаны. В основном это исследования, касающиеся клонального микроразмножения мелиссы в культуре меристем или сегментов стебля с узлом [11-13], или использования культивируемых органов для получения компонентов эфирного масла [4]. В этих работах почти не затрагивались вопросы влияния экзогенных и эндогенных факторов на индукцию каллусных тканей или морфогенеза.

В связи с этим в задачи нашего исследования входило изучение влияния некоторых факторов (гормонального состава питательной среды, времени введения в культуру, происхождения донорного растения, типа экспланта, возраста исходного проростка) на процессы каллусо- и морфогенеза у мелиссы с целью разработки методов создания новых генотипов и микроразмножения *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили растения мелиссы лекарственной (*Melissa officinalis* L.) сорта Цитронелла. Экспланты вычленили из проростков, развившихся из семян *in vitro* (растения *in vitro*), и из растений закрытого грунта (растения *in situ*). При изучении влияния времени введения в культуру эксплантацию на питательные среды проводили с растений закрытого грунта в летний (июль-август) и зимний (январь-февраль) период. В качестве эксплантов использовали сегменты (размером 5-6 мм) листовой пластинки, стебля (междоузлия и участки с одним узлом), черешка листа, а также гипокотили и семядольные листья проростков, полученных из семян *in vitro*. Стерилизацию растительного материала проводили с применением 70 % этанола (1 мин) и 50 % раствора препарата «Брадофен» (4 мин). Работу в асептических условиях осуществляли согласно общепринятым методикам, принятым в исследованиях по культуре тканей и органов растений [14]. Экспланты культивировали на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением регуляторов роста растений различного типа действия – 2,4-Д, ИУК, НУК, БАП, кинетин, гибберелловая кислота (ГК). Культивирование осуществляли в культуральной комнате при температуре 26 °С, относительной влажности воздуха 70%, освещении 600 или 2000-3000 люкс с фотопериодом 16 часов. Частоту каллусогенеза (в %) и прирост каллуса (в баллах) определяли на 30–35 сутки культивирования. При этом 1

балл соответствовал массе каллуса 150–250 мг, 2 балла – 300–400 мг, 3 балла – более 450 мг. При анализе морфогенеза сегментов стебля с узлом оценивали число развившихся эксплантов, частоту множественного побегообразования, количество и длину побегов, а также наличие корней и каллуса. В каждом варианте опыта анализировали не менее 20-ти эксплантов, повторность опыта 2-3-х кратная. Статистическую обработку данных проводили согласно стандартным методам [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что при культивировании эксплантов листа, черешка и стебля (междоузлие) на большинстве анализируемых питательных сред уже на 10-14 сутки происходила индукция каллусогенеза. Каллус, полученный из разных типов эксплантов мяты, имел морфологические отличия (Рис.1). Из сегментов стебля обычно формировался плотный бежевый, иногда с белыми участками каллус. Каллусная ткань, полученная из эксплантов черешка и листа, также была плотной и имела зеленую, либо светло-зеленую с бежевыми вкраплениями окраску. Морфологическая характеристика каллуса не зависела от используемых нами модификаций питательной среды.

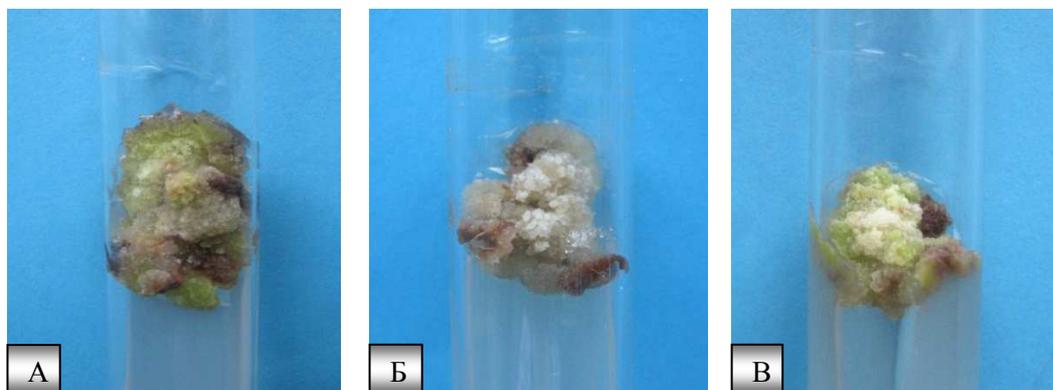


Рис. 1. Каллус, полученный из эксплантов листовой пластинки (А), стебля (Б) и черешка листа (В) мяты.

Изучено влияние гормонального состава питательной среды на процесс индукции каллусогенеза. При проведении этого эксперимента было испытано 16 модификаций среды МС, дополненной ауксинами (ИУК, НУК, 2,4-Д), цитокининами (БАП, кинетин) и ГК. Установлено, что на безгормональной питательной среде, а также при введении в состав среды только ауксинов или цитокининов, индукции каллусогенеза не было отмечено, или наблюдали начало образования каллуса с частотой 5,5-16,7%. Лучшие результаты были получены при использовании ауксинов в сочетании с цитокининами. При этом на отдельных вариантах сред (в частности, с 2,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л кинетина) отмечен процесс каллусогенеза, однако каллус был небольшой (не более 0,1–0,4 балла) и в

дальнейшем почти не развивался. Максимальная частота индукции каллуса (до 69,8–92,9%, в зависимости от типа экспланта) была на средах, дополненных НУК или 2,4-Д (1,0 мг/л) и кинетином или БАП (1,0 мг/л). При анализе прироста формирующегося на этих средах каллуса было показано, что лучшая его пролиферация (до 1,9 балла) отмечена на средах МС, содержащих 1,0 мг/л НУК или 2,4-Д и 0,5 мг/л БАП.

Полученные нами данные отличаются от результатов работы греческих исследователей, которые максимальную частоту образования каллуса (65%) у мелиссы отмечали на среде МС с 2 мг/л НУК [11]. Для лучшей индукции каллусогенеза Мефтахизейд и соавт. в составе среды использовали два ауксина и один цитокинин. В этих исследованиях максимальная частота каллусогенеза (до 80% из эксплантов гипокотилия) была получена на среде МС, дополненной 1 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л НУК и 0,5 мг/л кинетина [10]. В то же время Гогу и соавт. при получении каллуса из междоузлия и листа мелиссы указывали на эффективность использования в среде МС 0,5-2,0 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП [9].

В результате наших исследований было установлено, что индукция каллусогенеза у мелиссы зависела не только от состава питательной среды, но и от типа экспланта. Была проанализирована способность к индукции каллуса при культивировании на разных питательных средах сегментов листовой пластинки, стебля (междоузлие) и черешка листа. Лучшие показатели каллусообразования на большинстве испытанных питательных сред отмечены при использовании в качестве эксплантов листа или черешка, у которых частота образования каллуса и его прирост на оптимальных средах были до 1,5-2,9 раз выше, чем из стебля.

Исследовано влияние на формирование каллуса происхождения донорных растений, в качестве которых использовали растения, выращенные в условиях закрытого грунта, а также пробирочные растения (30-35 сут), полученные из семян *in vitro*. В качестве эксплантов в этом эксперименте использовали лист, стебель и черешок листа. Полученные данные показали, что для эксплантов растений *in vitro* на большинстве испытанных питательных сред показатели каллусообразования были в 2–2,5 раза выше, чем у эксплантов из растений *in situ*. Например, на среде с 1,0 мг/л 2,4-Д у всех типов эксплантов из растений закрытого грунта не отмечено образования каллуса, тогда как у эксплантов из растений *in vitro* наблюдалось начало каллусогенеза с частотой 20,6-50,0 %. На оптимальной среде МС6 (с 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП) из сегментов листа и стебля пробирочных растений частота индукции каллусогенеза составила соответственно 80,0 и 85,0%, тогда как для этих эксплантов, выделенных из растений *in situ*, этот показатель был соответственно 46,4 и 25,0%. Для ряда видов эфиромасличных растений, в том числе и мелиссы, в качестве эксплантов исследователи часто использовали различные органы проростков, развившихся из семян *in vitro* [9, 16]. Получение исходного растительного материала из пробирочных растений более удобно и доступно круглый год, а кроме того, иногда способствует лучшей индукции каллусогенеза и морфогенеза по сравнению с растениями, выращиваемыми в обычных условиях, что может быть обусловлено разным уровнем эндогенных фитогормонов.

Проведено изучение влияния времени введения в культуру *in vitro* на индукцию каллусогенеза из эксплантов листа, стебля и черешка, взятых из растений закрытого грунта. Как видно из данных, представленных в табл. 1, в зимний период (январь – февраль), частота формирования и прирост каллуса на большинстве питательных сред были 1,5-2 раза выше, чем летом (июль – август). На некоторых средах, например на среде МС с добавлением ИУК, БАП и ГК, индукцию каллуса из стебля и листа летом не наблюдали, а в зимний период частота каллусогенеза достигала 25 %. Вероятнее всего, влияние сезона на индукцию образования каллуса и его прирост связано с вегетативными фазами развития растения. В летний период у мелиссы наблюдалось цветение, а зимой у растений в условиях теплицы происходило активное отрастание зеленых побегов. Для лаванды [17] ранее было показано значительное повышение интенсивности каллусогенеза весной и осенью по сравнению с летом, что связано с отрастанием надземной массы и, по-видимому, изменением уровня и соотношения эндогенных фитогормонов, играющих важную роль в процессах дедифференциации *in vitro*.

Таблица 1.

Влияние типа и времени введения экспланта в культуру *in vitro*, состава питательной среды на индукцию каллусогенеза у *M. officinalis*

Гормональные добавки в среде МС, мг/л	Тип экспланта	Лето		Зима	
		частота образования каллуса, %	прирост каллуса, балл	частота образования каллуса, %	прирост каллуса, балл
ИУК – 0,5 БАП – 1,0 ГК – 0,5	лист	0	-	25,0±4,5	0,15±0,03
	стебель	0	-	21,0±4,7	0,86±0,07
	черешок	40,0±8,0	0,38±0,09	45,0±5,0	0,55±0,05
НУК – 1,0 БАП – 0,5	лист	0	-	46,4±3,5	1,35±0,04
	стебель	47,0±7,2	0,68±0,14	25,0 ±1,8	1,04±0,17
	черешок	36,0±8,3	0,42±0,07	71,5±10,0	1,05±0,03
2,4-Д – 1,0 БАП – 0,5	лист	41,0±3,5	0,47±0,06	69,8±8,4	1,47±0,06
	стебель	18,8±4,3	0,75±0,25	23,5±3,5	1,82±0,13
	черешок	11,8±1,7	0,38±0,13	52,8±5,5	1,86±0,05

Известно, что для индукции каллуса, наряду с органами зрелых растений, часто используются органы молодых проростков (гипокотиль, семядоля, корешок), которые у многих видов растений часто обладают лучшей способностью к дедифференциации и морфогенезу [6, 7, 16]. Одним из факторов, играющих важную роль в процессе каллусообразования, является физиологическое состояние донорного растения, которое обусловлено не только условиями его выращивания, но и возрастом. Поэтому мы провели исследование возможности использования для получения каллусной ткани мелиссы органов проростков разного возраста, полученных из семян *in vitro*. В качестве эксплантов были взяты семядольные листья и гипокотили из 4-х, 8-ми и 12-ти суточных проростков (табл. 2). В ходе этого эксперимента оценивали частоту

каллусогенеза и морфогенеза при культивировании эксплантов на четырех питательных средах. Что касается индукции каллуса, то наиболее интенсивно этот процесс наблюдался из сегментов гипокотилей, чем из семядольных листьев. Формирование каллуса происходило на тех же средах (МС6 и МС15), которые нами были ранее подобраны для культивирования других эксплантов Melissa. Исключение составила очень слабая пролиферация на среде МС3 у семядолей. Следует отметить, что для гипокотилей наибольшая частота индукции каллуса (95,0%) была на среде с НУК и БАП, тогда как для семядольных листьев максимальную частоту этого процесса (78,5%) обеспечивала среда с 2,4-Д и БАП.

Таблица 2.
Влияние возраста проростков, типа экспланта и состава питательной среды на индукцию каллусо- и морфогенеза у *M. officinalis*

Тип экспланта и возраст проростка		Основные показатели	Номер и гормональный состав питательной среды (мг/л)			
			МС3	МС4	МС6	МС15
			БАП – 1,0	кинетин – 1,0	НУК – 1,0 БАП – 0,5	2,4-Д – 1,0 БАП – 0,5
Гипокотиль	4 сут	частота каллусогенеза, %	0	0	95,0±7,3	54,1±5,4
		прирост каллуса, балл	-	-	0,5±0,1	0,9±0,4
	8 сут	частота каллусогенеза, %	0	0	40,0±2,5	75,0±9,2
		прирост каллуса, балл	-	-	0,5±0,1	1,1±0,1
	12 сут	частота каллусогенеза, %	0	0	0	0
	Семядольные листья	4 сут	частота каллусогенеза, %	0	0	0
прирост каллуса, балл			-	-	-	0,6±0,1
частота морфогенеза, %			6,6±0,3	23,1±1,3	0	0
8 сут		частота каллусогенеза, %	10,3±1,1	0	10,0±1,5	78,5±6,5
		прирост каллуса, балл	0,1±0,1	-	0,5±0,1	0,9±0,2
		частота морфогенеза, %	-	0	0	7,1±0,3
12 сут		частота каллусогенеза и морфогенеза, %	0	0	0	0

Наиболее интересным в этом эксперименте является выявленная зависимость морфогенетических процессов от возраста проростков (табл. 2). Установлено, что формирование каллуса происходило только у органов, выделенных из более молодых проростков (4 и 8 сут). При этом на среде МС15 у обоих эксплантов с увеличением возраста проростка с 4-х до 8-ми сут было отмечено повышение частоты каллусогенеза. При дальнейшем увеличении возраста проростков до 12-ти сут каллус из гипокотилей и семядольных листьев не формировался. Необходимо обратить внимание на то, что у семядольных листьев из 4-х суточных проростков происходила индукция прямого морфогенеза на средах с цитокининами. При культивировании гипокотилей морфогенеза ни на одной среде не было отмечено. Максимальная частота прямого морфогенеза наблюдалась при добавлении в состав среды 1,0 мг/л кинетина и составила 23,1%. С небольшой частотой этот процесс также был отмечен и из семядольных листьев 8-ми суточных проростков, но уже на среде с 2,4-Д и БАП. При индукции морфогенеза на поверхности эксплантов происходило формирование почек и развитие побегов. У эксплантов из проростков большего возраста прямого побегообразования не выявлено. Влияние возраста проростков на процессы дифференциации из изолированных эксплантов отмечали и у некоторых других видов. Так, для льна-долгунца было показано [18], что с увеличением возраста проростка с 5-ти до 14-ти сут частота регенерации из гипокотилия снижалась в 2-4 раза. Следовательно, у мелиссы молодые органы проростков можно культивировать для получения каллусной ткани, однако при этом формируется очень небольшой каллус с незначительным приростом (0,5-0,9 балла). Более эффективно, по-видимому, использование семядольных листьев для индукции прямого морфогенеза, который может применяться не только при получении нового селекционного материала, но и для микроразмножения *in vitro* (при отсутствии соматоклональной вариабельности).

Известно, что наиболее эффективным методом клонального микроразмножения является индукция уже существующих на растении меристем, при этом в качестве эксплантов часто используются почки или сегменты стебля с узлом [6, 7]. С целью разработки метода ускоренного размножения мелиссы *in vitro* было проведено исследование морфогенеза при культивировании сегментов стебля с одним узлом (размером 4-5 мм), выделенных из проростков, полученных из семян *in vitro* (Рис. 2). При этом было изучено влияние гормонального состава шести вариантов питательной среды МС, содержащей БАП, кинетин и ГК. На 7-10-е сутки культивирования начинался рост побегов из одной или двух пазушных почек. Показано, что почти на всех изученных вариантах сред происходило образование до 2-3-х дополнительных побегов. Наибольшая частота множественного побегообразования ($94,7 \pm 5,2$ %) была отмечена на среде с 1,0 мг/л БАП, однако при увеличении концентрации этого цитокинина она снижалась. При введении в состав среды 1-2 мг/л кинетина частота формирования дополнительных побегов была немного ниже (до $86,9 \pm 7,1$ %), однако развивающиеся побеги были в 2-8 раз длиннее (до $41,1 \pm 0,4$ мм). Это позволяет использовать для микроразмножения мелиссы два метода – индукцию множественного побегообразования и микрочеренкование развивающихся побегов.

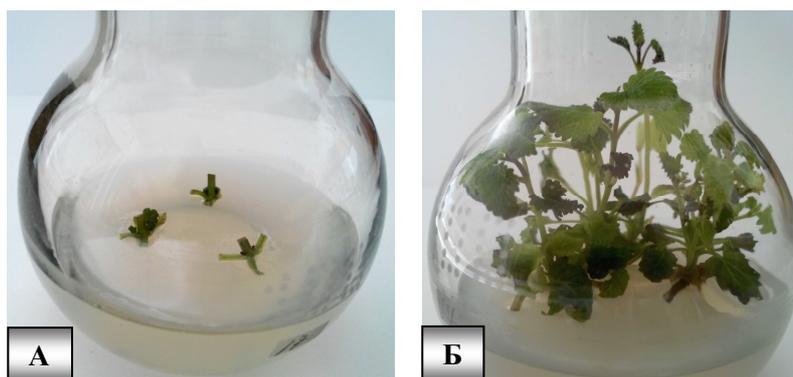


Рис. 2. Культивирование сегментов стебля с одним узлом у *M. officinalis in vitro*: развитие пазушных почек на 7-е сутки (А), индукция множественного побегообразования и формирование побегов на 30-е сутки (Б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано влияние происхождения донорного растения, времени введения в культуру, гормонального состава питательной среды, типа экспланта в процессе индукции каллусогенеза и морфогенеза у *Melissa officinalis* L. Подобраны режимы получения каллусной культуры из различных типов эксплантов (лист, стебель, черешок, а также гипокотиль и семядольные листья проростков). Максимальная частота (до 70–95%) и интенсивность каллусообразования были на среде МС с добавлением 1,0 мг/л НУК (или 2,4-Д) и 0,5 мг/л БАП. Лучшую способность к пролиферации на большинстве испытанных питательных сред проявили экспланты листа и черешка растения или гипокотили проростков. Для эксплантов растений *in vitro* во многих вариантах опыта показатели каллусообразования были в 2–2,5 раза выше, чем у эксплантов из растений *in situ*. В зимний период частота формирования и прирост каллуса в большинстве вариантов опыта были 1,5–2 раза выше, чем летом. Показано влияние на каллусо- и морфогенез возраста проростков, полученных из семян *in vitro*, и выявлена возможность индукции прямого морфогенеза из семядольных листьев с частотой до 23,1%. Установлены особенности морфогенеза при культивировании сегментов стебля с узлом, выделенных из пробирочных растений, и показано преимущество введения в состав среды кинетина, обеспечивающего высокую частоту множественного побегообразования (до 86,9%).

Список литературы

1. Назаренко Л.Г. Эфироны юга Украины / Л.Г. Назаренко, А.В. Афонин. – Симферополь: Таврия, 2008. – 144 с.
2. Дудченко Л.Г. Пряно-ароматические и пряно-вкусовые растения / Л.Г. Дудченко, А.С. Козьяков, В.В. Кривенко. — К.: Наук. Думка, 1989. — 304 с.
3. Moradkhani H. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review / H. Moradkhani, E. Sargsyan, H. Bibak [et al.] // J. of Medicinal Plants Research. – 2010. – Vol. 4, № 25. – P. 2753-2759.

4. Sato A. Essential Oil Composition of *Melissa officinalis* L. *in vitro* produced under the influence of growth regulators / A. Sato, S. Dasilva, L.S.L. Celso [et al.] // J. Braz. Chem. – 2005. – №16. – P. 1387–1390.
5. Невкрытая Н.В. Анализ эфирного масла из свежего и сухого сырья *Melissa officinalis* L. / Н.В. Невкрытая, Э.Д. Аметова // Перспективы интродукции декоративных растений в ботанических садах и дендропарках: Мат-лы Межд. науч. конф. – Симферополь, 2014. – С. 177–180.
6. Мельничук М.Д. Биотехнологія рослин: підручник / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. – К.: Поліграф Консалтинг, 2003. – 520 с.
7. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. – Київ: Наукова думка – 2005. – 272 с.
8. Лешина Г.Л. Оптимизация условий культивирования *in vitro* ряда лекарственных растений / Г.Л. Лешина, О.В. Булко, В.А. Дорошенко, А.П. Галкин // «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология»: тезисы докл. 9 Межд. конф. – Москва: ФБК-ПРЕСС, 2008. – С. 224–225.
9. Gogu I. Ghiorghita Investigations on the *in vitro* morphogenetic reaction of *Melissa officinalis* L. species / Gogu I. Ghiorghita, D.E.St Maftai, D.N. Nicuta // Anal. stiintifice ale Universitatii „Alexandru Ioan Cuza”, Genetica si Biologie Moleculara. – 2005. – Vol. 5. – P. 119–126.
10. Meftahizade H. Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. / H. Meftahizade, M. Lotfi, H. Moradkhani // African J. of Biotechnology. – 2010. – Vol. 9, № 28. – P. 4314–4321.
11. Galeş R. Aspects of floral structure and morphogenesis in *Melissa officinalis* / R. Galeş, Ana Preotu, C. Toma // Biology vegetable. – 2010. – № 2. – P.15–17.
12. Meftahizade H. Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes / H. Meftahizade, H. Moradkhani, B. Naseri [et al.] // J. of Medicinal Plants Research. – 2010. – Vol. 4, № 3. – P. 240–246.
13. Tavares A.C. Micropropagation of *Melissa officinalis* L. through proliferation of axillary shoots / A.C. Tavares, M.C. Pimenta, M.T. Gonsalves // Plant Cell Repts. – 1986. – Vol. 15, № 6. – P. 441–444.
14. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, Е.Е. Полищук. – К.: Наук. Думка, 1980. – 488 с.
15. Лакин Г.Ф. Биометрия: уч. пособие / Г.Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
16. Егорова Н.А. Некоторые аспекты биотехнологии эфиромасличных растений: индукция каллусо- и морфогенеза, использование соматклональной вариабельности / Н.А. Егорова // Физиология растений и генетика. – 2014. – Т. 46, №2. – С.108–120.
17. Егорова Н.А. Роль некоторых факторов в процессе индукции каллусогенеза *in vitro* у эфиромасличных растений / Н.А. Егорова, И.В. Ставцева, О.В. Якимова [и др.] // Фактори експериментальної еволюції рослин: Зб. наук. праць. – Київ: УТГіС, 2014. – Т. 15. – С. 63–67.
18. Шиша О.М. Отримання та характеристика ліній льону-довгунця, що експресують химерний ген тубуліну (*gfp-tub*) / О.М. Шиша // Автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.20 «Біотехнологія». – Київ, 2013. – 20 с.

CALLUSOGENESIS AND MORPHOGENESIS IN THE CULTURE OF ISOLATED ORGANS AND TISSUES OF *MELISSA OFFICINALIS* L. *IN VITRO*

Yakimova O.V., Yegorova N.A.

*Institute of Agriculture of the Crimea, Simferopol, Russia
E-mail: yegorova.na@mail.ru*

Melissa officinalis L. – is a perspective essential oil, medicinal and spice-taste plant, widespread in many countries of the world. To improve the efficiency of breeding it is appropriate to use biotechnological methods for obtaining a new initial material, as well as accelerate its propagation. Such cell technologies are based on obtaining of callus cultures

and induction of morphogenesis. In this work we investigated the influence of some factors (donor plant origin, the time of introduction to the culture, the hormonal composition of the nutrient medium, seedling age and type of explant) on the induction of callus formation and morphogenesis in melissa. The materials for the study were *M. officinalis* L. plants varieties 'Citronella'. Explants were isolated from seedlings, developing from the seeds *in vitro* ("plants *in vitro*"), and from plants of glass-covered ground ("plants *in situ*"). Sterilization of plant material was performed using 70% ethanol (1 min) and 50% antiseptic solution "Bradofen" (4 min). As a result of researches the regimes of obtaining callus culture from different types of explants (leaf, stem, petiole and hypocotyl and cotyledonary leaves of seedlings) were chosen. Callus obtained from the different types of explants of melissa had morphological differences. The maximum frequency (up to 70-95%, depending on the type of explant) and intensity of callus formation were on MS medium supplemented with 1.0 mg/l NAA (or 2,4-D) and 0.5 mg/l BAP. Better ability for proliferation in isolated culture on the majority of tested nutrient media showed explants of leaf and stem of the plants or seedling hypocotyl. The frequency of callus formation for explants of leaf and petiole was up to 1,5-2,9 times higher than that of the stem. The influence on the callusogenesis the origin of the donor plants, which were used as a plants, were grown in a glass-covered ground, and the test-tube plants (30-35 days old), obtained from the seeds *in vitro*, was investigated. For explants from "plants *in vitro*" in many variants of experiment the indicators of callus formation were 2-2.5 times higher than that of the explants from "plants *in situ*". On the optimal MS medium the frequency of callus formation from segments of leaves and stems of "plants *in vitro*" was respectively 80.0 and 85.0%, whereas for these explants, isolated from "plants *in situ*", this indicator was respectively 46.4 and 25.0%. It was found that in the winter (January - February) the frequency of callus formation on the majority of nutrient media from explants of leaf, stem and petiole were 1.5-2 times higher than in the summer (July - August). The possibility of using for the callus induction the explants of cotyledonary leaves and hypocotyls, isolated from seedlings, was investigated. In this experiment the seedlings of different ages (4-, 8- and 12-days-old), obtained from the seeds *in vitro*, were used. It has been found that the formation of callus occurred only from organs, excised from a young seedlings (4- and 8-days- old). Callusogenesis was observed with the highest frequency (up to 78.5 – 95.0%, depending on the explants) on the same modifications of MS medium (with BAP and NAA or 2,4-D), which we previously chosen for the cultivation of other explants of melissa. When cultured cotyledonary leaves of 4-day-old seedlings on the mediums with cytokinins the direct morphogenesis was induced. However when cultured hypocotyl the morphogenesis on any of medium was not observed. The maximum frequency of the direct morphogenesis (23,1%) was observed upon addition in the medium 1.0 mg/l kinetin. With small frequency this process was also marked from cotyledons of 8-day-old seedlings, but on a medium with 2,4-D and BAP. During the induction of morphogenesis at the surface of explants the buds and shoot development were found. For explants of more age seedlings the direct shoot formation was not revealed. With the aim of developing a method of clonal micropropagation for melissa the peculiarities of morphogenesis when cultured stem nodal segments (isolated from *in vitro* seedlings) on nutrient media of different composition were investigated. It

was shown the advantage of introduction in the nutrient medium kinetin, which provided a high frequency of multiple shoot formation (up to $86,9 \pm 7,1\%$) and development of shoots with a length up to $41,1 \pm 0,4$ mm. This allows to use for micropropagation of melissa two methods – induction of multiple shoot formation and micro cuttings of shoots.

Keywords: *Melissa officinalis* L., callusogenesis, morphogenesis, micropropagation, *in vitro*.

References

1. Nazarenko L.G., Afonin A.V. *Essential oil plants of southern Ukraine*, 144 p. (Simferopol: Tavriya, 2008).
2. Dudchenko L.G., Koziakov A.S., Kryvenko V.V. *Aromatic and spicy-taste plants*, 304 p. (K. : Nauk.dumka, 1989).
3. Moradkhani H., Sargsyan E., Bibak H., Naseri B., Sadat-Hosseini M., Fayazi-Barjin A., Meftahzade H. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review, *J. of Medicinal Plants Research*, **4**, № 25, p. 2753 (2010).
4. Sato A., Dasilva S., Celso L.S.L., Rosane A.S.S.G., Maria A.E. Essential Oil Composition of *Melissa officinalis* L. *in vitro*. Produced under the Influence of Growth Regulators, *J. Braz. Chem.*, №16, p. 1387 (2005).
5. Nevkrytaya N.V., Ametova E.D. Analysis of essential oil from fresh and dry raw *Melissa officinalis* L., *Proceedings of International Scientific Conference "Prospects of the introduction of ornamental plants in the botanical gardens and dendroparks"*, (Simferopol, 2014), p. 177.
6. Melnychuk M.D., Nowak T.V., Kunakh V.A. *Plant biotechnology: textbook*, 520 p. (Kyiv, Poligraf Consulting, 2003).
7. Kushnir G.P., Sarnatsky V.V. *Microclonal propagation of plants*, 272 p. (Kyiv, Naukova Dumka, 2005).
8. Leshina G.L., Bulko O.V., Doroshenko V.A., Galkin A.P. Optimization of culture conditions *in vitro* of several medicinal plants, *Abstracts 9 International Conference "Biology of plant cells in vitro and biotechnology"*, (Moscow: FBK-Press, 2008), p. 224.
9. Gogu I. Ghiorghita, Maftai D.E.St, Nicuta D.N. Investigations on the *in vitro* morphogenetic reaction of *Melissa officinalis* L. species, *Anal. stiintifice ale Universitatii „Alexandru Ioan Cuza”*, *Genetica si Biologie Moleculara*, **5**, p. 119 (2005).
10. Meftahzade H., M. Lotfi, Moradkhani H. Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L., *African J. of Biotechnology*, **9**, № 28, p. 4314 (2010).
11. Galeş R., Ana Preotu, Toma C. Aspects of floral structure and morphogenesis in *Melissa officinalis*, *Biology vegetable*, № 2, p.15 (2010).
12. Meftahzade H., Moradkhani H., Naseri B., Lotfi M., Naseri A. Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes, *J. of Medicinal Plants Research*, **4**, № 3, p. 240 (2010).
13. Tavares A.C., Pimenta M.C., Gonsalves M.T. Micropropagation of *Melissa officinalis* L. through proliferation of axillary shoots, *Plant Cell Repts.*, **15**, № 6, p. 441 (1986).
14. Kalinin F.L., Sarnatsky V.V., Polishchuk E.E., *Methods of tissue culture in the physiology and biochemistry of plants*, 488 p. (Kyiv, Naukova Dumka, 1980).
15. Lakin G.F., *Biometrics: a textbook for universities biological specialties*, 352 p. (M, Vysshaya shkola, 1990).
16. Yegorova N.A. Some aspects of essential oil plants biotechnology: callus and morphogenesis induction, use of somaclonal variability, *Plant Physiology and Genetics*, **46**, №2, p.108 (2014).
17. Yegorova N.A., Stavtzeva I.V., Yakimova O.V., Kamenyok L.I., Krivochatko A.G. Role of some factors in the process of callusogenesis induction *in vitro* in essential oil plants, *Factors of experimental evolution of organisms: Sci. papers*, **15**, p. 63 (Kyiv, 2014).
18. Shysha E.N. Obtaining and characteristics flax lines expressing chimeric tubulin gene (*gfp-tub6*), *The thesis for the degree of candidate of biological science: spec. 03.00.20 "biotechnology"*, 20 p. (Kyiv, 2013).

Поступила в редакцию 08.11.2014 г.