

The periwinkle *Vinca minor* L. has been entered into culture *in vitro*. A callus and suspension cultures of this plants has been obtained and characterized for its growth and some cytomorphological parameters. Ability of a plant to synthesize alkaloid vincamin has been shown by TLC.

МИТРОФАНОВА И.В., МИТРОФАНОВА О.В., РАБОТЯГОВ В.Д.

*Никитский ботанический сад – Национальный научный центр,
Украина, 98648, АР Крым, Ялта, e-mail: in_vitro@ukr.net*

РОЛЬ АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В СИСТЕМЕ ПРЯМОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ ИССОПА (*HYSSOPUS OFFICINALIS* L.) И КОТОВНИКА (*NEPETA CATARIA* VAR. *CITRIODORA* BECK.) *IN VITRO*

Различные виды родов *Nepeta* L. и *Hyssopus* L., относящиеся к семейству губоцветных (*Lamiaceae*), являются перспективными эфирномасличными, пряно-ароматическими и лекарственными растениями [3, 4]. Котовник кошачий (*Nepeta cataria* L.), или котовник лимонный (*N. cataria* var. *citriodora* Beck.) – многолетнее растение. Эфирное масло котовника лимонного отличается высокой антимикробной активностью и фунгицидным действием по отношению к плесневым грибам, рекомендуется для использования в новых композициях парфюмерных изделий. Иссоп обыкновенный (*Hyssopus officinalis* L.) с мелкими розовыми, темно-синими и белыми цветами также является многолетним растением, достигая высоты 80 см. Эта культура уже давно и широко используется в народной и традиционной медицине различных стран (Индия, Болгария, Германия, Австрия, Франция и т.д.), и как пряно-вкусовое сырье в пищевой промышленности при производстве рыбных продуктов. Эфирное масло иссопа широко применяется в косметической промышленности [3]. Совсем недавно это растение стало популярным в озеленении.

Первое сообщение по культуре тканей иссопа появилась в 1987 году во Франции. Учеными был исследован морфогенетический потенциал пыльников, зародышей и отдельных семядолей иссопа в условиях *in vitro* [8]. Более глубокое изучение морфогенетических способностей вегетативных органов и тканей котовника и иссопа было начато в 90-х годах в отделе биотехнологии Никитского ботанического сада [6, 9, 10]. Учеными НБС-ННЦ совместно со специалистами из Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины был разработан способ полиплоидизации котовника с помощью антимикротрубочковых соединений и получены новые формы [11, 12]. Однако для размножения генетически однородного посадочного материала, эффективного применения мутагенов и генетической трансформации котовника и иссопа необходимо разработать прямую регенерацию этих культур в условиях *in vitro*.

Целью настоящего исследования было выявление основных факторов влияющих на систему прямой регенерации растений иссопа и котовника *in vitro*.

Материалы и методы

Исследования по культуре органов и тканей котовника *N. cataria* и иссопа *H. officinalis* выполняли на базе отдела биотехнологии и биохимии растений НБС-ННЦ. Для прямой регенерации были использованы листовые диски котовника и иссопа размером 1-2 мм, с культивируемых в условиях *in vitro* растений. Исходный растительный материал котовника и иссопа был отобран в коллекционных посадках отдела новых ароматических и лекарственных культур НБС. В исследования были включены две формы иссопа: с синей (80882) и белой (38285) окраской венчика цветка. В качестве базовой культуральной среды использовали питательную среду МС с половинным набором макро- и микросолей, полным составом витаминов, 30 г/л сахарозы, 6 г/л агара Difco («Sigma», США). Эффективность влияния тидиазурона (ТДЗ) в концентрациях 0,5, 1,0, 3,0, 6,0, 9,0

мкМ на индукцию регенерации микропобегов была изучена при размещении сосудов с эксплантами в культуральной комнате с температурой $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 16 часовым фотопериодом и интенсивностью освещения $0-62,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Контролем служила среда без регуляторов роста при культивировании эксплантов в темноте. Каждый эксперимент был поставлен трижды в 10-кратной повторности.

Результаты и обсуждение

Тидиазурон как индуктор процессов соматического эмбриогенеза и органогенеза в настоящее время является одним из перспективных веществ цитокинового типа действия. Разработка способа прямой регенерации адвентивных микропобегов из листьев и сегментов побегов древесных и кустарниковых растений с применением ТДЗ позволила не только размножать растения, создавать реципиентные системы для генетической трансформации, но и изучать процессы морфогенеза, которые индуцируются непосредственно в клетках самого экспланта [7].

Использование в опытах по регенерации микропобегов иссопа различных концентраций ТДЗ позволило нам выделить среди них оптимальную. Так, у 45% листовых дисков иссопа при добавлении в питательную среду $6,0 \text{ мкМ}$ ТДЗ уже через 4 недели культивирования по периферии экспланта происходила активная индукция образования адвентивных почек и регенерация микропобегов ($15,6 \pm 2,4$ микропобега на листовой эксплант). При низких концентрациях ТДЗ ($0,5$ и $1,0 \text{ мкМ}$) образовывались лишь единичные микропобеги. Повышение концентрации ТДЗ до $9,0 \text{ мкМ}$ стимулировало формирование каллуса и значительно уменьшало побегообразование иссопа. Наряду с этим, было установлено, что увеличение продолжительности культивирования листовых дисков иссопа до 8 недель повышало частоту регенерации, и количество эксплантов, способных регенерировать микропобеги достигало 96%. Кроме того, было показано, что листовые диски иссопа с синей окраской венчика цветка обладали более высокой регенерационной способностью, чем с белой.

В процессе исследования было также изучено влияние количества субкультивирований на способность листовых эксплантов иссопа к адвентивному побегообразованию. Так, листовые диски, взятые с микропобегов, прошедших 3 субкультивирования в условиях *in vitro*, образовывали каллус и не формировали адвентивных почек. Показано, что максимальное количество адвентивных почек и микропобегов регенерировало из листовых эксплантов, отобранных с микропобегов иссопа после 4-5 пассажа. После 6-8 субкультивирования на эксплантах отмечали появление массы оводненных, а в дальнейшем нежизнеспособных микропобегов.

Известно, что ориентация листовых эксплантов к поверхности питательной среды и возраст донорного растения оказывают влияние на частоту регенерации микропобегов [1, 2, 5]. Листовые диски иссопа, помещенные нами на питательную среду, начинали сразу же увеличиваться в размерах, изменяя свою форму и приподнимаясь над средой. Было отмечено, что расположение листовых эксплантов адаксиальной стороной к питательной среде активизировало регенерационные процессы (табл. 1). Такая ориентация эксплантов позволила нам через 8 недель культивирования получить стабильную регенерацию микропобегов у 90% и 45% листовых дисков иссопа с синей и белой окраской венчика цветка соответственно.

Таблица 1

Регенерационный потенциал листовых эксплантов двух форм иссопа при их различной ориентации к питательной среде (через 8 недель культивирования)

Расположение эксплантов к питательной среде	К-во листовых эксплантов формирующих микропобеги, %		К-во микропобегов / листовой диск, шт.	
	форма 80882	форма 38285	форма 80882	форма 38285

Абаксиальное	47 ± 6,0	10 ± 5,0	8,2 ± 1,4	1,5 ± 0,3
Адаксиальное	90 ± 4,0	45 ± 2,0	15,2 ± 1,9	4,7 ± 1,2

Наряду с влиянием ТДЗ, количества пассажиров и ориентации листовых эксплантов по отношению к питательной среде была изучена индуцирующая роль интенсивности освещения на процессы прямой регенерации микропобегов иссопа обыкновенного. Полученные результаты показали, что в отсутствии освещения не происходило образования адвентивных почек на исследуемых эксплантах. Был определен оптимальный показатель интенсивности освещения ($25 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$), при котором 90% и 50% листовых дисков иссопа с синей и белой окраской венчика цветка, соответственно, регенерировали адвентивные почки и микропобеги. Частота регенерации и количество микропобегов на эксплант значительно уменьшались при интенсивности освещения $37,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Увеличение же интенсивности освещения до $62,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ индуцировало быстрое увеличение размера культивируемого экспланта, однако в этих условиях только низкий процент листовых дисков иссопа был способен к регенерации микропобегов. Чаще всего при такой интенсивности освещения экспланты погибали.

Как и в случае с иссопом максимальное количество листовых эксплантов котовника, способных к регенерации адвентивных почек и микропобегов, отмечали на 8 неделю культивирования. Однако у котовника удалось добиться высокой регенерации микропобегов при повышении концентрации ТДЗ до 9,0 мкМ, в то время как для иссопа оптимальная концентрация составила 6,0 мкМ. Кроме того, отмечено, что через 8 недель среднее количество адвентивных почек на эксплант достигало 12 штук. Этот показатель оказался значительно ниже, чем при культивировании эксплантов иссопа. При низких концентрациях ТДЗ чаще всего отмечали только увеличение размера листовой пластинки котовника. Незначительное образование каллуса по краю высечки листа наблюдали на среде, дополненной 6,0 мкМ ТДЗ.

Кроме того, отмечено, что листовые экспланты, взятые с микропобегов котовника после 3 субкультивирований в условиях *in vitro*, не были способны как к образованию каллуса, так и к адвентивному побегообразованию. 4-5-тые пассажи оказались оптимальными для последующей прямой регенерации микропобегов. Увеличение количества субкультивирований снижало коэффициент размножения и увеличивало процент образования оводненных микропобегов, которые быстро погибали.

При культивировании в условиях *in vitro* листовых эксплантов котовника установлена зависимость частоты регенерации микропобегов от интенсивности освещения. Как видно из результатов, представленных в таблице 2, в темноте не происходило каких-либо изменений с листовыми дисками. По сравнению с листовыми эксплантами иссопа максимальное количество эксплантов котовника было способно к регенерации микропобегов при интенсивности освещения $37,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Увеличение интенсивности освещения индуцировало каллусообразование на поверхности листовых дисков. Кроме того, отмечено, что адаксиальное расположение листовых дисков как иссопа, так и котовника на питательной среде увеличивало частоту регенерации до 90% и 70% соответственно.

Таблица 2

Частота регенерации микропобегов из листовых эксплантов котовника и иссопа *in vitro* в зависимости от интенсивности освещения

Интенсивность освещения, $\text{мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$	К-во листовых эксплантов с микропобегами, %	
	Котовник	Иссоп (форма 38285)
0	0,0	0,0
12,5	0,0	35,0 ± 11,0
25	25,0 ± 4,0	50,0 ± 4,3
37,5	70,0 ± 5,0	40,0 ± 7,9
50	45,0 ± 3,5	27,0 ± 3,0

62,5	15,0 ± 2,0	16,0 ± 6,1
------	------------	------------

На протяжении года от одного листового экспланта котовника и иссопа в результате разработанной системы прямой регенерации растений было получено 10000 микропобегов, которые отделяли и укореняли на ½ нормы среды МС, дополненной 2,46 мкМ и 9,80 мкМ ИМК соответственно. Корни длиной 5-6 см формировались в течение 2-2,5 недель. Число укорененных микропобегов котовника и иссопа достигало 72% и 80% соответственно. Однако количество адаптированных растений не превышало 40-50% у обоих исследуемых видов.

Таким образом, установлена зависимость регенерационного процесса у иссопа и котовника от генотипа, концентрации ТДЗ, количества субкультивирований, расположения листовых дисков на питательной среде и интенсивности освещения. Определены оптимальные концентрации ТДЗ для иссоп – 6,0 мкМ, для котовника – 9,0 мкМ, применение которых индуцировали образование микропобегов у 70-90% листовых дисков при адаксиальном расположении на среде. Максимальное количество адвентивных микропобегов регенерировало из листовых дисков исследуемых культур, отобранных с микропобегов после 4-5 пассажей в условиях *in vitro* при интенсивности освещения 25 мкМ м⁻² с⁻¹ (иссоп) и 37,5 мкМ м⁻² с⁻¹ (котловник).

Литература

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учебное пособие. – М.: ФГК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
3. Либусь О.К., Работягов В.Д., Кутько С.П., Хлыпенко Л.А. Эфирномасличные и пряно-ароматические растения: Научно-популярное издание. – Херсон: Айлант, 2004. – 272 с.
4. Машанов В.И., Покровский А.А. Пряно-ароматические растения. – Москва: Агропромиздат, 1991. – 287 с.
5. Митрофанова И.В. Микрклональное размножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) // Труды Никит. ботан. сада. – 1997. – Т. 119. – С. 63-95
6. Митрофанова И.В., Работягов В.Д., Аксенов Ю.В. Морфогенез и регенерация растений котовника *in vitro* // Переработка лекарственного сырья и производство фитопрепаратов для медицины и сельского хозяйства: Тез. докл. междунар. науч.-практ. конф. (5-6 сентября 1996 г., Алматы, Казахстан). – Алматы, 1996. – С. 75.
7. Huetteman C.A., Preece J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1993. – Vol. 33, N 2. – P. 105-119.
8. Le C.L. Multiplication *in vitro* de l'Hysope (*Hyssopus officinalis* L.) // Revue suisse de Vitic. Arboric. Hortic. – 1987. – Vol. 19, N 6. – P. 363-367.
9. Mitrofanova I., Ivanova N. Using of leaf discs for direct regeneration of issope plants // Horticulture and Vegetable Growing: Scientific works Lithuanian Inst. Hort. and Lithuanian Univ. Agr. – 2000. – Vol. 19, N 3, Part 1. – P. 427-433.
10. Mitrofanova I.V., Ivanova N.N., Rabotyagov V.D., Zilbervarg I.R., Shenfish N.R. Special features of the genus *Nepeta*'s plants morphogenesis and regeneration *in vitro* // Problems and perspectives of biotechnology development in ornamental gardening and horticulture: Abstracts Intl. Conf. (25-26 September 1997, Yalta, Ukraine). – Yalta, 1997. – P. 67.
11. Mitrofanova I.V., Zilbervarg I.R., Yemets A.I., Mitrofanova O.V., Blume Ya.B. The effect of dinitroaniline and phosphorothiamidate herbicides on polyploidisation *in vitro* of *Nepeta* plants // Cell Biology International. – 2003. – Vol. 27. – P. 229-231.
12. Zilbervarg I.R., Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Rabotyagov V.D., Blume Ya.B. Using oryzalin and amiprofos-methyl for obtaining issope and nep polyploid forms *in vitro* // Cell Biology International. – 1998. – Vol. 21, N 12. – P. 914-915.

Резюме

Установлены основные абиотические и биотические факторы, влияющие на процесс прямой регенерации *in vitro* эфиромасличных и лекарственных растений. Показана роль генотипа, концентрации ТДЗ, количества субкультивирований, расположения листовых дисков на питательной среде и интенсивности освещения в системе прямой регенерации растений иссопа и котовника.

Встановлено основні абіотичні та біотичні фактори, які впливають на процес прямої регенерації *in vitro* ефіроолійних і лікарських рослин. Показано роль генотипу, концентрації ТДЗ, кількості субкультивувань, розташовування листових дисків на поживному середовищі та інтенсивності освітлення у системі прямої регенерації гісопу та м'яти котячої.

The main abiotic and biotic factors influencing on process of direct regeneration *in vitro* essential oil and medical plants were established. The role of genotype, TDZ concentration, number of subcultivation, placing of leaves disks on culture medium and intensity of illumination in the system of direct regeneration in hyssop and nep plants was demonstrated.

**МИХАЛЬСКАЯ С.И., КОМИСАРЕНКО А.Г., МАЛИНА А.Э.,
БРОННИКОВА Л.И., ТИЩЕНКО Е.Н.**

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
Украина, 0302, Киев, ул. Васильковская 31/17, e.mail:oltyko@gmail.com*

ВЛИЯНИЕ ТИОСУЛЬФАТА НАТРИЯ НА ИНДУКЦИЮ РЕГЕНЕРАЦИИ *IN VITRO* ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Для генетического улучшения подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) биотехнологическими методами за последние десятилетия предложено ряд перспективных систем регенерации *in vitro* [1-3]. Вместе с тем реализации морфогенетического потенциала многих сельскохозяйственно-ценных линий и гибридов *H. annuus* свойственна низкая эффективность и вариабельность.

Регенерация *in vitro* подсолнечника может осуществляться путём прямого/непрямого как органогенеза, так и соматического эмбриогенеза [1-5]. При этом отмечается зависимость от типа эксплантата, а также генотипа, условий культивирования и их взаимодействия. Имеются сведения и о генотипическом контроле показателей - количество побегов на общее количество эксплантатов и на регенерирующий эксплантат [6,7]. На индукцию регенерации оказывают влияние регуляторы роста, углеводы, в ряде случаев повышению побегообразования способствуют органические и неорганические компоненты, в частности аминокислоты, гидролизат казеина, KNO₃ [4, 5, 8].

Цель данного исследования – оценка эффективности применения тиосульфата натрия для повышения частоты регенерации *in vitro* из сегмента проростка инбредных линий и гибридов подсолнечника.

Материалы и методы

Объектом исследования служили инбредные линии подсолнечника 96А/3, 16А/3, 70А/3 (селекции Одесского селекционно-генетического Института, УААН).

Зрелые ядра семян стерилизовали последовательно 96% этанолом (2 мин) и 15% раствором хлорамина (30-40 мин), затем трехкратно промывали автоклавированной дистиллированной водой и высаживали на агаризованную питательную среду Мурасиге-Скуга (МС). Культивировали 3-4 дня при температуре 25–26 °С, 16-часовом фотопериоде и освещённости 3-4 клк.

3-4-дневные проростки делили пополам вдоль зародышевой оси, удаляли корешок и апикальную меристему с примордиями листьев. В качестве первичного