

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРЯМОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ МИКРОПОБЕГОВ
КОТОВНИКА И ИССОПА *IN VITRO* С ЦЕЛЬЮ ПОПОЛНЕНИЯ ГЕНОФОНДА**

И.В. МИТРОФАНОВА, кандидат биологических наук;

В.Д. РАБОТЯГОВ, доктор биологических наук;

Н.Н. ИВАНОВА

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Различные виды родов *Nepeta* L. и *Hyssopus* L., относящиеся к семейству губоцветных (*Lamiaceae*), являются перспективными лекарственными, пряно-ароматическими и эфирномасличными растениями [1, 2]. Котовник кошачий (*Nepeta cataria* L.), или котовник лимонный (*N. cataria* var. *citriodora* Beck.), является многолетним растением. Эфирное масло котовника лимонного отличается высокой антимикробной активностью и фунгицидным действием по отношению к плесневым грибам, рекомендуется для использования в новых композициях парфюмерных изделий [3]. Иссоп (*Hyssopus officinalis* L.) также является многолетним растением, достигая до 80 см в высоту. Цветки мелкие, розовые, темно синие и белые. Эта культура уже давно и широко используется в народной и традиционной медицине различных стран (Индия, Болгария, Германия, Австрия, Франция и т.д.), при производстве рыбных продуктов, как пряно-вкусовое сырье. Эфирное масло иссопа широко применяется в косметической промышленности [1, 2]. Недавно это растение стало популярным и в озеленении.

Культурой ткани иссопа начинали заниматься в 1987 г. во Франции, но это исследование было связано только с изучением способности зародышей к регенерации *in vitro*. Был исследован морфогенетический потенциал пыльников, зародышей и отдельных семядолей иссопа [9, 16]. Для разработки методов мутагенеза *in vitro* нам был необходим эффективный метод регенерации из вегетативных органов и тканей, исключаяющий этап каллусогенеза. В отделе биотехнологии и биохимии растений был разработан способ прямой регенерации растений иссопа обыкновенного в условиях *in vitro* и получен патент [4, 11].

Целью настоящего исследования была разработка способа прямой регенерации котовника и сравнительное изучение особенностей адвентивного побегообразования иссопа и котовника в условиях *in vitro*.

Материалы и методы исследований

Для прямой регенерации были использованы листовые диски размером 1-2 мм котовника и иссопа, культивируемых в условиях *in vitro* и взятых из коллекционных насаждений отдела новых ароматических и лекарственных культур Никитского ботанического сада.

В качестве базовой культуральной среды была использована питательная среда Мурасиге и Скуга (МС) [12] с половинным набором макро- и микросолей, полным составом витаминов, 30 г/л сахарозы, 6 г/л агара Difco («Sigma», США). рН среды доводили до 5,7 с помощью 0,1 Н КОН или HCL. К среде перед автоклавированием были добавлены 6-бензиламинопурин (БАП), тидиазурон (ТДЗ) и β-индолилуксусная кислота (ИУК). Среду разливали в чашки Петри и в конические колбы по 20-50 мл. Время автоклавирования среды составило 10-15 минут при 115°C.

Эффективность влияния БАП и ИУК в концентрациях 4, 6, 9, 10 мкМ и ТДЗ в концентрациях 0,5, 1, 3, 6, 9 мкМ на индукцию регенерации микропобегов была проверена при помещении культуральных сосудов с эксплантами в комнату с температурой 24±1°C, 16 часовым фотопериодом и интенсивностью освещения от 1-3 клк. Контролем служила среда без фитогормонов и культивирование эксплантов в темноте.

Микропобеги укореняли на среде без ауксина или при низкой концентрации ИМК.

Обработку полученных данных проводили с помощью программы STATISTICA for Windows, версия 5.1. Каждый опыт проводился трижды с десятикратной повторностью.

Среднее количество регенерирующих микропобегов фиксировали на 4 и 8 неделю культивирования.

Результаты и обсуждение

Результаты предыдущих лет показали, что различные комбинации концентраций БАП и ИУК в питательной среде МС неэффективны в индукции прямой регенерации микропобегов котовника и иссопа.

Известно, что одним из перспективных цитокининов в настоящее время является ТДЗ [8]. Разработка способа прямой регенерации адвентивных микропобегов из листовых эксплантов древесных и кустарниковых растений с применением ТДЗ позволила не только размножать растения, но и создавать реципиентные системы для генетической трансформации. Концентрация ТДЗ, варьирующая в пределах от 0,1 до 20 мкМ, стимулировала прямой органогенез микропобегов яблони [7], груши [6], рододендрона [13], представителей рода *Rubus* [15], гипсофиллы [5], розы [14], винограда [10] и других растений.

Разработанный способ прямой регенерации растений иссопа с использованием ТДЗ [11] позволил нам провести подобные эксперименты на котовнике. Как и в случае с иссопом максимальное количество листовых эксплантов, способных к регенерации адвентивных почек и микропобегов, отмечали на 8 неделю культивирования (табл. 1). Однако у котовника удалось добиться высокой регенерации микропобегов при повышении концентрации до 9 мкМ, в то время как для иссопа оптимальная концентрация составила 6 мкМ.

Таблица 1

Влияние концентраций ТДЗ на частоту регенерации микропобегов котовника и иссопа из листовых эксплантов в условиях *in vitro*

Концентрация ТДЗ, мкМ	Количество листовых эксплантов с микропобегами, %			
	Котовник		Иссоп (форма 38285)	
	4 недели	8 недель	4 недели	8 недель
0,5	0	0	1,5 ± 0,1	9,0 ± 1,2
1,0	0	0	2,0 ± 0,2	10,0 ± 3,5
3,0	5,0 ± 0,5	10,0 ± 2,0	20,0 ± 3,0	40,0 ± 7,9
6,0	15,0 ± 1,5	45,0 ± 5,0	45,0 ± 5,0	90,0 ± 4,0
9,0	33,5 ± 2,5	75,0 ± 3,0	10,0 ± 2,0	20,0 ± 2,5

Отмечено, что через 8 недель среднее количество адвентивных почек на эксплант у котовника достигало 12 штук (рис. 1). Этот показатель оказался значительно ниже, чем при культивировании эксплантов иссопа (рис. 2). При низких концентрациях ТДЗ чаще всего не происходило никаких морфогенетических процессов. Незначительное образование каллуса получено на среде, дополненной 6 мкМ ТДЗ.



Рис. 1. Регенерация микропобегов из листовых эксплантов котовника на питательной среде с 9 мкМ ТДЗ.

Влияние количества пассажей на регенерационную способность листовых дисков котовника оказалось таким же, как и в случае с листовыми дисками иссопа. Однако из данных таблицы 2 видно, что листовые экспланты, взятые с микропобегов котовника после 3 субкультивирований в условиях *in vitro*, не способны как к образованию каллуса, так и к адвентивному побегообразованию. Количество пассажей 4-5 оказалось оптимальным для последующей прямой регенерации микропобегов. Увеличение количества пассажей снижало коэффициент размножения и увеличивало процент образования оводненных микропобегов.

Таблица 2

Регенерационная способность листовых эксплантов котовника и иссопа на 8 неделю культивирования в зависимости от количества субкультивирований микропобегов в условиях *in vitro*

№ пассажа	Морфогенетические процессы	Коэффициент размножения	
		Котовник	Иссоп (форма 38285)
1 – 3	Формирование каллуса	0	0
4 – 5	Адвентивное побегообразование	1:10 – 1:12	1:16 – 1:20
6 – 8	Образование оводненных микропобегов	1:15	1:10



Рис. 2. Адвентивное побегообразование в культуре листовых эксплантов иссопа на питательной среде с 6 мкМ ТДЗ

При культивировании листовых эксплантов котовника в условиях *in vitro* установлена зависимость частоты регенерации микропобегов от интенсивности освещения. Как видно из результатов, представленных в таблице 3, в темноте не происходит каких-либо изменений с листовыми дисками. По сравнению с листовыми эксплантами иссопа максимальное количество эксплантов котовника было способно к регенерации микропобегов при интенсивности освещения 2 клк. Увеличение интенсивности освещения индуцировало каллусообразование на поверхности листовых дисков.

Наряду с этим отмечено, что адаксиальное расположение листовых дисков как иссопа, так и котовника на питательной среде увеличивало частоту регенерации до 90% и 70% соответственно. На протяжении года от одного листового экспланта котовника и иссопа можно получить около 10000 микропобегов, которые отделяют и укореняют на $\frac{1}{2}$ нормы среды МС, дополненной 8-11 мкМ ИМК. Корни длиной 5-6 см формируются в течение 2-2,5 недель. Число укорененных микропобегов котовника и иссопа достигало 72% и 80% соответственно.

Таким образом, разработанная нами методика получения растений иссопа из листовых эксплантов, перенесенная практически полностью на экспланты котовника, позволила с высокой степенью эффективности получить регенеранты обеих культур. Оба способа регенерации могут быть использованы в размножении, селекции и сохранении ценных эфирномасличных, пряно-ароматических и лекарственных растений.

Таблица 3

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

Интенсивность освещения, клк	Количество листовых эксплантов с микропобегами, %	
	Котовник	Иссоп (форма 38285)
0	0,0	0,0
1	0,0	35,0 ± 11,0
1,5	25,0 ± 4,0	50,0 ± 4,3
2	70,0 ± 5,0	40,0 ± 7,9
2,5	45,0 ± 3,5	27,0 ± 3,0
3	15,0 ± 2,0	16,0 ± 6,1

Список литературы

1. 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.
2. Машанов В.И., Покровский А.А. Пряно-ароматические растения. – Москва: Агропромиздат, 1991. – 287 с.
3. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства *Hippuridaceae-Lobeliaceae*. - СПб: Наука, 1991. – 200 с.
4. Спосіб регенерації рослин *Hyssopus officinalis* L. в умовах *in vitro*: 68595 А Україна, МПК 7 А01Н4/00 / Митрофанова І.В., Іванова Н.М., Митрофанова О.В. (Україна). - № 2003087613; Заявлено 12.08.2003 р.; Надрук. 16.08.2004 р., Бюл. 8.
5. Ahroni A., Zuker A., Rozen Y., Shejtman H., Vainstein A. An efficient method for adventitious shoot regeneration from stem-segment explants of gypsophila // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* – 1997. – V. 49, N 2. – P. 101-106.
6. Chevreau E., Skirvin R.M., Abu-Qaoud H.A., Korban S.S., Sullivan J.G. Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (*Pyrus* sp.) cultivars *in vitro* // *Plant Cell Rep.* – 1989. – N 7. – P. 688-691.
7. Fasolo F., Zimmerman R.H., Fordham I. Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars // *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* - 1989. – V. 16. – P. 75-87.
8. Huettelman C.A., Preece J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 1993. – V. 33. – P. 105-119.
9. Le C.L. Multiplication *in vitro* de l'Hysope (*Hyssopus officinalis* L.) // *Revue suisse de Vitic. Arboric. Hortic.* – 1987. – V. 19, N 6. – P. 363-367.
10. Matsuta N., Hirabayashi T. Embryogenic cell lines from somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* L.) // *Plant Cell Rep.* – 1989. – N 7. – P. 684-687.
11. Mitrofanova I., Ivanova N. Using of leaf discs for direct regeneration of issope plants // *Horticulture and Vegetable Growing / Scientific works.* – 2000. – V. 19, N 3, Part 1. – P. 427-433.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15, N 3. – P. 473-497.
13. Preece J.E., Imel M.R. Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* 'P.J.M. Hybrids' // *Scientia Hort.* – 1991. – 48. – P. 159-170.
14. Uzunova K. Direct organogenesis of some ornamental rose genotypes // *Propagation of ornamental plants / Eds. I. Iliev, P. Zhelev, I. Tzvetkov, V. Gjuleva, G. Schmidt.*- Sofia: SEEK&SHARE: Balkanpress, 2000. – P. 142-145.
15. Yatsyna A.A., Kontsevaya I.I. Tissue culture of three species of the genus *Rubus* // *The Biology of Plant Cells In Vitro and Biotechnology: VIII Intl. Conf., Saratov, 9-13 Sep. 2003: Abstracts.* – Saratov, 2003. – P. 366.
16. Zilbervarg I.R., Mitrofanova I.V. Features of morphogenesis in organ and tissue culture of nep and issope // *Materials of 7 Intl. Conf. of Young Scientists in Horticulture, Lednice, Czech Republic, 14-16 Sept. 1999.* – Lednice, 1999. – P. 263-267.

COMPARATIVE STUDY OF DIRECT MICROSHOTS REGENERATION OF NEP AND HYSSOP *IN VITRO* FOR RECRUITMENT OF GENE POOL COLLECTION

Mitrofanova I.V., Rabotyagov V.D., Ivanova N.N.

The results of comparative study of features of direct plant regeneration of nep and hyssop from leaf explants in conditions *in vitro* are submitted. It was shown, that index of regeneration of investigated plants depends on TDZ concentration in culture medium, number of subculture and intensity of illumination.