

УДК 633.81:57.085.2

ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ *ORIGANUM VULGARE L.*

О.В. Якимова,

аспирант

Н.А. Егорова,

доктор биологических наук

Институт сельского хозяйства Крыма
Россия, Республика Крым,
295453, г. Симферополь, ул. Киевская, 150
Тел: (0652) 560 007
E-mail: yegorova.na@mail.ru

Ключевые слова: *Origanum vulgare L.*,
каллусогенез, эксплант, *in vitro*.

Исследовано влияние гормонального состава питательной среды, времени введения эксплантов в культуру *in vitro* и типа экспланта (лист, стебель, черешок) на индукцию каллусогенеза в культуре изолированных органов у душицы обыкновенной (*Origanum vulgare L.*). Определен оптимальный режим получения асептических культур из семян, сегментов листа, стебля и черешка – последовательная обработка 70 %-ным этанолом (1 мин) и 50 %-ным «Брадофеном» (4 мин). Показано, что максимальная частота каллусогенеза (до 85 %) наблюдалась при использовании среды Мурасиге

и Скуга, дополненной 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л 6-БАП. На большинстве испытанных сред частота каллусогенеза выше при культивировании сегментов черешка листа по сравнению с эксплантами листа и стебля. Установлено, что при помещении на питательные среды эксплантов в весенний и зимний периоды частота каллусогенеза была в 2–4 раза больше по сравнению с летним.

Induction of callusogenesis in culture of isolated organs of *Origanum vulgare L.*

Yakimova O.V., postgraduate student

Egorova N.A., doctor of biology

Institute of Agriculture of Crimea
150, Kievskaya str., Simferopol, 295453, Crimea,
Russia
Tel: (0652) 560 007
yegorova.na@mail.ru

Key words: *Origanum vulgare L.*, callusogenesis, explant, *in vitro*

The influence of hormonal composition of the culture medium, the time of explants introduction in culture *in vitro* and the type of explants (leaf, stem, petiole) on the induction of callus formation in culture of isolated organs of oregano (*Origanum vulgare L.*) were investigated. The optimal regime of obtaining aseptic culture from seeds, segments of leaf, stem and petiole have been chosen – sequential processing of 70 % ethanol (1 min) and 50 % “Bradofen” (4 min.) It was shown that the maximum frequency of callus formation (up to 85 %) was observed when using Murashige and Skoog medium supplemented with 1,0 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l 6-BAP. On most tested media the frequency of callus formation was higher by culturing petiole segments compared to leaf and stem explants. It was established that when explants placed on the culture media in spring and winter the frequency of callus formation was 2–4 times larger compared to summer.

Введение. Душица обыкновенная (*Origanum vulgare L.*) – многолетнее травянистое растение, широко распространенное в странах Европы и Азии. Это растение нашло широкое применение в парфюмерной, косметической, пищевой, лакокрасочной промышленности, а также в медицине [1]. Особую ценность представляет эфирное масло душицы, содержащее тимол и карвакрол, которое по своим свойствам превосходит многие существующие антибиотики и антигистаминные препараты. Душица выращива-

ется чаще всего как пряно-ароматическое и лекарственное растение, т.к. содержание эфирного масла в сырье очень невелико (0,3–0,7 % на сухую массу) [2]. В связи с этим в Институте сельского хозяйства (ИСХ) Крыма были начаты исследования в области селекции с целью получения высокомасличных и высокопродуктивных генотипов. Для проведения селекционных работ на современном уровне весьма эффективно привлечение биотехнологических методов, которые позволяют создавать исходный селекционный материал, используемый для выведения новых сортов с повышенной урожайностью, качеством продукции и устойчивостью к стрессам. Наиболее распространенными клеточными технологиями, позволяющими расширить генетическое разнообразие, являются получение соматоклональных вариантов, клеточная селекция, мутагенез *in vitro* [3]. Однако для разработки таких биотехнологий, прежде всего необходимо оптимизировать условия для получения каллусных тканей.

Клеточные технологии создания исходного селекционного материала для душицы практически не разработаны. В литературе встречаются отдельные данные, касающиеся культивирования изолированных тканей и органов *Origanum vulgare* [4; 5; 6]. Основная часть анализируемых работ посвящена оптимизации условий клонального микроразмножения *in vitro* для некоторых видов *Origanum* [7; 8; 9; 10]. При этом в большинстве проведенных исследований почти не затрагивались вопросы индукции каллусных тканей или влияния различных факторов на их пролиферацию. В задачи нашего исследования входила отработка условий стерилизации эксплантов и изучение влияния состава питательной среды, типа экспланта и времени его введения в культуру *in vitro* на индукцию каллусогенеза у душицы.

Материалы и методы. Объектом исследований служили семена и фрагменты

органов растений душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.) перспективного селекционного образца № 10 из коллекции ИСХ Крыма. Исходные донорные растения выращивали в условиях закрытого грунта. В качестве эксплантов использовали семена, сегменты стебля, листа и черешка листа размером 5–6 мм. Стерилизацию растительного материала проводили с применением 70 %-ного этанола и 50 %-ного раствора препарата «Брадофен» при различных экспозициях. Работу в асептических условиях осуществляли согласно общепринятым методам [11]. Экспланты культивировали на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) разных модификаций, различающихся концентрацией и соотношением регуляторов роста растений различного типа действия – 2,4-Д, ИУК, НУК, 6-БАП, кинетин, гибберелловая кислота (ГК). Культивирование проводили в пробирках в культуральной комнате при температуре 26 °С, относительной влажности воздуха 70 % и освещенности 600 люкс с фотопериодом 16 часов. Через 30–40 суток определяли частоту каллусогенеза в процентах и прирост каллуса в баллах. При этом 1 балл соответствовал массе каллуса 150–250 мг, 2 балла – 300–400, 3 балла – более 450 мг. В каждом варианте опыта анализировали не менее 20 эксплантов, повторность опыта 2–3-кратная. Статистическую обработку данных проводили согласно общепринятым методам [12].

Результаты и обсуждение. Важным условием для успешного культивирования изолированных тканей и органов *in vitro* является получение асептической культуры из исходного растительного материала. Для стерилизации различных типов эксплантов (семян, листьев, стеблей, черешков листа) душицы было испытано шесть режимов (таблица). Установлено, что максимальная частота асептических эксплантов из сегментов листа (90 %) была достигнута при последовательном использовании 70 %-ного этанола (1 мин) и 50 %-ного «Брадофена» (4 мин). Такие же экспозиции стерилизующих веществ позволили получить 90–95 % стерильных эксплантов и для других вегетативных

органов – сегментов стебля и черешка листа. В качестве эксплантов у многих видов растений довольно часто используются ткани и органы проростков, полученных из семян *in vitro*, которые иногда обладают более высокой каллусообразующей или морфогенетической способностью по сравнению со зрелыми растениями [13], поэтому мы также подбирали условия и для получения стерильных проростков из семян душицы. При стерилизации семян максимальную частоту получения асептической культуры (100 %) обеспечивало применение более длительной экспозиции обработки «Брадофеном» (12 мин). Однако при использовании данного варианта стерилизации существенно снижался процент всхожести. Лучшее сочетание количества асептических и проросших семян было отмечено при их обработке 70 %-ным этанолом в течение 1 мин и 50 %-ным «Брадофеном» в течение 4 мин. При дальнейшем увеличении экспозиции возрастало число потемневших некротических эксплантов и значительно снижалось количество проросших семян, что, по-видимому, связано с негативным действием стерилизующих агентов.

Таблица

Влияние условий стерилизации и типа экспланта на получение асептической культуры душицы

Условия стерилизации	Количество семян, %			Количество листьев, %			некротических
	экспозиция, мин	асептических	инфицированных	проросших	асептических живых	инфицированных	
Этанол*	1	80,0 ±	20,0	92,5 ±	85,0	15,0	
«Брадофен»**	2	5,5	± 5,5	2,5	± 4,2	± 4,2	0
Этанол	1	90,0 ±	10,0	91,5 ±	90,0	10,0	
«Брадофен»	4	5,2	± 5,2	1,5	± 6,7	± 6,7	0
Этанол	1	80,0 ±	20,0	82,5 ±	80,0	15,0	5,0
«Брадофен»	6	5,7	± 5,7	2,5	± 6,3	± 3,8	± 1,2
Этанол	1	90,0 ±	10,0	77,0 ±	75,0	5,0	20,0
«Брадофен»	8	4,8	± 4,8	2,0	± 7,5	± 1,8	± 3,5
Этанол	1	95,0 ±	5,0	72,5 ±	45,0	0	55,0
Брадофен	10	3,7	± 3,7	3,5	± 5,4		± 5,4
Этанол	1	100	0	65,0 ±	40,0	0	60,0
«Брадофен»	12			4,0	± 5,7		± 5,7

Примечание: * – этанол 70 %; ** – «Брадофен» 50 %

При культивировании сегментов листа, черешка и стебля было установлено, что

через 10–15 суток на некоторых питательных средах начиналась индукция каллусной ткани. Каллус, полученный из разных типов эксплантов, почти не отличался по морфологическим характеристикам (рис. 1). На испытанных вариантах питательных сред обычно формировался рыхлый, оводненный каллус бежевого цвета, иногда с бурыми участками.



Рисунок 1 – Индукция каллусогенеза из сегментов черешка (а); первичный каллус из эксплантов листа (б) и стебля (в)

При анализе влияния гормонального состава питательной среды на процесс индукции каллусогенеза было испытано 16 вариантов среды МС (дополненной ауксинами, цитокининами и ГК), большая часть из которых представлена на рисунке 2. Установлено, что на безгормональной питательной среде, а также при введении в состав среды только цитокининов (6-БАП, кинетин) или ауксинов (ИУК, НУК) не наблюдалось индукции каллусогенеза. На среде МС10, содержащей 1,0 мг/л 2,4-Д, отмечали формирование каллуса малого объема с низкой частотой только из сегментов черешка листа. Как видно из полученных данных, лучшие результаты были при использовании одного из ауксинов (2,4-Д, НУК) в сочетании с цитокинином. Максимальная частота индукции каллусообразования (от 63,6 до 85,0 %, в зависимости от типа экспланта) была на среде МС15, которая содержала в качестве регуляторов роста 2,4-Д (1,0 мг/л) и 6-БАП (0,5 мг/л). При анализе прироста формирующегося первичного каллуса было отмечено, что лучшая его пролиферация (в среднем до 1,5 баллов) была также на этой среде. Следует обратить внимание, что на средах МС6, МС13, МС22, на которых также

происходила индукция каллусогенеза, образующийся каллус был очень небольшого размера (0,2–0,5 балла), и в дальнейшем его прироста почти не наблюдалось.

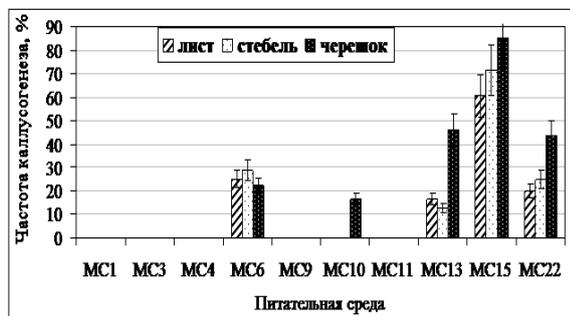


Рисунок 2 – Влияние гормонального состава питательной среды и типа экспланта на частоту индукции каллусогенеза у душицы. Концентрации гормонов в составе питательной среды МС (мг/л): МС1 – без гормонов; МС3 – 6-БАП (1,0); МС4 – кинетин (1,0); МС6 – НУК (1,0), 6-БАП (0,5); МС9 – НУК (1,0); МС10 – 2,4-Д (1,0); МС11 – ИУК (1,0); МС13 – НУК (1,0), кинетин (0,5); МС15 – 2,4-Д (1,0), 6-БАП (0,5); МС22 – 2,4-Д (1,0), кинетин (0,5)

Полученные нами данные по влиянию регуляторов роста на каллусообразование у душицы отличаются от результатов иорданских исследователей, согласно которым лучшая индукция каллуса у *O. vulgare* и *O. syriacum* была отмечена на среде МС с добавлением 0,1 или 0,5 мг/л 2,4-Д [5]. При дальнейшем пассировании максимальный прирост каллуса они отмечали при использовании тидиазурона (1,0 мг/л), а добавление 2,4-Д ингибировало его пролиферацию. Аналогичные данные, свидетельствующие о целесообразности использования 2,4-Д для каллусогенеза у душицы, были получены N. Kumari и P.P. Saradhi [6]. Введение в питательную среду 0,5 мг/л 2,4-Д, по данным иракских ученых, также способствовало интенсивному каллусообразованию, а максимального значения масса формирующегося каллуса (1014 мг) достигала на среде, содержащей 0,5 мг/л 2,4-Д и 3,0 мг/л 6-БАП [4]. S. El-Gengaihi с соавторами [9] установили, что у видов *Origanum* для индукции каллусогенеза наиболее эффективным является совме-

стное применение ауксина и цитокинина. Максимальная частота формирования каллуса, согласно их исследованиям, была отмечена на питательной среде с 0,5 мг/л НУК и 3,0 мг/л 6-БАП. В наших экспериментах было показано преимущество использования для индукции каллусогенеза у душицы 2,4-Д (1,0 мг/л) только при его совместном введении в питательную среду с цитокинином 6-БАП.

С целью определения подходящего типа экспланта для каллусообразования у душицы была проанализирована способность к индукции каллуса сегментами листа, стебля и черешка при их культивировании на разных питательных средах (рис. 2). Установлено, что лучшие показатели индукции каллуса на большинстве питательных сред были при использовании в качестве эксплантов сегментов черешка. Следует отметить, что на среде МС10 каллус с небольшой эффективностью формировался только из этого типа экспланта. При этом если на оптимальной питательной среде МС15 частота образования каллуса из черешка достоверно и не отличалась от таковой сегментов стебля, однако его прирост был в 1,5 раза выше. В зарубежных работах для получения каллусной ткани у разных видов душицы довольно часто используют экспланты листьев [4; 5].

В представленном эксперименте в качестве исходных донорных растений мы использовали растения, выращенные в условиях закрытого грунта, что позволило отбирать экспланты для введения в асептическую культуру почти в течение круглого года. Исследовано влияние времени введения эксплантов в культуру *in vitro* на образование каллуса из сегментов листа, стебля и черешка. Установлено, что при помещении на питательные среды эксплантов в весенний и зимний периоды частота каллусогенеза была гораздо выше по сравнению с летним. В частности, на оптимальной среде МС15 частота образования каллуса в мае и феврале варьировала от 45,5 до 85,0 % в зависимости от типа экспланта. В то же время при выделении сегментов листа и черешка из растений летом (август) час-

тога индукции каллуса составила всего 16,7 и 21,5 % соответственно, а из стебля – каллусогенеза не наблюдали. Выявленная изменчивость каллусообразования в течение года у душицы связана, по-видимому, с фазами вегетации растения. Снижение каллусообразующей способности летом, во время цветения растения, и повышение частоты индукции каллуса в конце зимы и весной, когда в теплице происходило активное отрастание побегов, может быть обусловлено физиологическим состоянием растения и различным уровнем эндогенных фитогормонов в эти периоды. Для ряда сортов лаванды также было показано снижение частоты каллусогенеза в 2,0–2,5 раза в летний период по сравнению с остальными сезонами [14]. Учитывая полученные нами данные, в дальнейшем введение в культуру *in vitro* эксплантов душицы проводили в основном в весенний период. В результате экспериментов были получены каллусные культуры из различных органов душицы, которые планируется использовать для исследования их способности к регенерации растений, что является дальнейшим этапом разработки клеточных технологий создания нового исходного селекционного материала.

Выводы. Определен оптимальный режим получения асептических культур из семян, сегментов листа, стебля и черешка душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.) – последовательная обработка 70 %-ным этанолом (1 мин) и 50 %-ным «Брадофеном» (4 мин). Установлено, что на индукцию каллусогенеза *in vitro* оказывали влияние сезон эксплантации, гормональный состав питательной среды и тип экспланта (лист, стебель, черешок). Максимальная частота образования каллуса (до 85,0 %) с хорошим приростом наблюдалась при использовании среды Мурасиге и Скуга, дополненной 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л 6-БАП. Показано, что на большинстве испытанных сред частота каллусогенеза выше при культивировании сегментов черешка листа по сравнению с эксплантами листа и стебля. Установлено, что при помещении на питательные сре-

ды эксплантов в весенний и зимний периоды частота каллусогенеза была в 2–4 раза больше по сравнению с летним.

Список литературы

1. Либусь О.К., Работягов В.Д., Кутько С.П., Хлыпенко Л.А. Эфиромасличные и пряно-ароматические растения. – Херсон: Айлант, 2004. – 270 с.
2. Бойко Е.Ф. *Origanum vulgare* L. и *Origanum tyttanthum* Gontsch. как лекарственные, эфиромасличные, пряно-ароматические и декоративные растения // Ученые записки Таврического национального университета. Серия «Биология, химия». – 2009. – Т. 22. – № 2. – С. 9–15.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
4. Abedaljasim M., Jasim Al-Jibouri, Ashwaq S. Abd, Duha M. Majeed, Eman N. Ismail. Influence of abiotic elicitors on accumulation of thymol in callus cultures of *Origanum vulgare* L. // Journal of Life Sciences. – 2012. – Vol. 6. – P. 1094–1099.
5. Rami M. Arafah, Rida A. Shibli, Mohsen Al-Mahmoud, Mohamad A. Shatnawi. Callusing, cell suspension culture and secondary metabolites production in persian oregano (*Origanum vulgare* L.) and arabian oregano (*O. syriacum* L.) // Jordan Journal of Agricultural Sciences. – 2006. – Vol. 2. – № 3. – P. 274–287.
6. Kumari N., Saradhi P.P. Regeneration of plants from callus culture of *Origanum vulgare* L. // Plant Cell Rep. – 1992. – Vol. 11. – P. 476–479.
7. Goleniowski M.E., Flamarique C., Bima P. Micropropagation of *Oregano* (*Origanum vulgare* x *appliedii*) from meristem tips // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2003. – Vol. 39. – P. 125–128.
8. Esin Akcam Oluk, Ali Cakir. Micropropagation of *Origanum sipyleum* L., an endemic medicinal herb of Turkey // African Journal of Biotechnology. – 2009. – Vol. 8. – № 21. – P. 5769–5772.
9. S. El-Gengaihi, Taha H.S., Kamel A.M. In vivo and in vitro comparative studies of *Origanum* species // J. of Food, Agriculture and Environment (JFAE). – 2006. – Vol. 4. – № 3, 4. – P. 127–134.
10. Crestea T.O., Falticeanu M., Prisecaru M. Considerations regarding the effects of growth regulators over the *in vitro* morphogenetic reaction at *Origanum vulgare* L. // J. Plant Develop. – 2008. – Vol. 15. – P. 133–138.
11. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук Е.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
12. Лакин Г.Ф. Биометрия: уч. пособие. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
13. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. – Київ: Наукова книга, 2005. – 260 с.
14. Єгорова Н.О. Біотехнологічні основи створення нових форм і розмноження ефіроолійних рослин: автореф. дис. ... д-ра біол. наук. – Ялта, 2012. – 48 с.

References

1. Libus' O.K., Rabotyagov V.D., Kut'ko S.P., Khlypenko L.A. Efiromaslichnye i pryano-aromaticheskie rasteniya. – Kherson: Aylant, 2004. – 270 s.
2. Boyko E.F. Origanum vulgare L. i Origanum tyttanthum Gontsch. kak lekarstvennye, efiromaslichnye, pryano-aromaticheskie i dekorativnye rasteniya // Uchenye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta. Seriya «Biologiya, himiya». – 2009. – T. 22. – № 2. – S. 9–15.
3. Butenko R.G. Biologiya kletok vysshih rasteniy in vitro i biotekhnologii na ih osnove. – M.: FBK-PRESS, 1999. – 160 s.
4. Abedaljasim M. Jasim Al-Jibouri, Ashwaq S. Abd, Duha M. Majeed, Eman N. Ismail. Influence of abiotic elicitors on accumulation of thymol in callus cultures of Origanum vulgare L. // Journal of Life Sciences. – 2012. – Vol. 6. – P. 1094–1099.
5. Rami M. Arafah, Rida A. Shibli, Mohsen Al-Mahmoud, Mohamad A. Shatnawi. Callusing, cell suspension culture and secondary metabolites production in persian oregano (Origanum vulgare L.) and arabian oregano (O. syriacum L.) // Jordan Journal of Agricultural Sciences. – 2006. – Vol. 2. – № 3. – P. 274–287.
6. Kumari N., Saradhi P.P. Regeneration of plants from callus culture of Origanum vulgare L. // Plant Cell Rep. – 1992. – Vol. 11. – P. 476–479.
7. Goleniowski M.E., Flamarique C., Bima P. Micropropagation of Oregano (Origanum vulgare x applii) from meristem tips // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2003. – Vol. 39. – P. 125–128.
8. Esin Akcam Oluk, Ali Cakir. Micropropagation of Origanum sipyleum L., an endemic medicinal herb of Turkey // African Journal of Biotechnology. – 2009. – Vol. 8. – № 21. – P. 5769–5772.
9. S. El-Gengaihi, Taha H.S., Kamel A.M. In vivo and in vitro comparative studies of Origanum species // J. of Food, Agriculture and Environment (JFAE). – 2006. – Vol. 4. – № 3, 4. – P. 127–134.
10. Crestea T.O., Falticeanu M., Prisecaru M. Considerations regarding the effects of growth regulators over the in vitro morphogenetic reaction at Origanum vulgare L. // J. Plant Develop. – 2008. – Vol. 15. – P. 133–138.
11. Kalinin F.L., Sarnatskaya V.V., Polishchuk E.E. Metody kul'tury tkaney v fiziologii i biohimii rasteniy. – K.: Naukova dumka, 1980. – 488 s.
12. Lakin G.F. Biometriya: uch. posobie. – M.: Vyssh. shk., 1990. – 352 s.
13. Kushnir G.P., Samats'ka V.V. Mikroklonal'ne rozmnozheniya roslin. – Kiiv: Naukova kniga, 2005. – 260 s.
14. Egorova N.O. Biotekhnologichni osnovi stvorenniya novih form i rozmnozheniya efirooliynih roslin: avtoref. dis. ... doktora biol. nauk. – Yalta, 2012. – 48 s.