

С. О. Ясеновська,
старший науковий співробітник

А. О. Глибовець,
науковий співробітник
Український інститут експертизи
сортів рослин

УДК 631.527:633.822:57.085.2

Отримання посухостійких ліній м'яту перцевої (*Mentha piperita*. L.) в умовах *in vitro*

У статті наведені результати дослідження сортів м'яту перцевої на посухостійкість із застосуванням біотехнологічних методів селекції, оснований на використанні хімічного мутагену ПЕГ-6000 та клонального розмноження в культурі тканин і органів *in vitro*.

Ключові слова:

м'ята перцева, сорт, рослина-регенерант, посухостійкість, живильне середовище, калюс

У лісостепових районах України м'яту перцеву (*Mentha piperita* L.) вирощують для потреб фармацевтичної промисловості як ефіроолійну рослину. Свіжу або сушену траву використовують для добування ефірної олії і натурального ментолу [1, 2].

Традиційним методом розмноження м'яту є розсадний спосіб. Проте для прискореного впровадження нових сортів у виробництво, а також розмноження унікальних селекційних генотипів використання лише цього методу недостатньо. Необхідно розробити ефективні технології розмноження і виробництва високоякісного посадкового матеріалу на принципово новій методичній основі. Перспектива створення таких технологій пов'язана з розробкою заходів клонального мікророзмноження на основі комплексу клітинних технологій з використанням ізольованих тканин і органів *in vitro*.

Нині накопичено великий фактичний матеріал щодо впливу різних хімічних та фізичних мутагенів на ізольовані тканини й органи в ряді видів

рослин [3,4]. Мутагенну обробку використовують для розширення генетичної мінливості за отримання соматоклонів, а також як попередній етап у клітинній селекції на стійкість до біотичних та абіотичних факторів [5,6].

Метою даної роботи було вивчення сортів м'яту перцевої з метою виділення генетичних джерел високої стрес-стійкості до посухи із застосуванням хімічного мутагену поліетиленгліколю-6000 (ПЕГ-6000).

Порівняння частот якісних ознак у популяціях проводили за допомогою методу хі-квадрат (χ^2) [7].

Об'єкти та методика досліджень. Об'єктом досліджень слугували сорти м'яту перцевої Прилуцька 6 та Сімферопольська 200.

Дослідження проводились у лабораторії біотехнології та

біорізноманіття Національного університету біоресурсів та природокористування України.

Для отримання посухостійких ліній м'яту перцевої використовували живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС). Приготування поживних середовищ проводилось з використанням традиційних методик, прийнятих у роботах по культурі тканин [7]. Як мутаген застосовували ПЕГ-6000, який є непроникною осмотично активною речовиною.

Вміст ефірної олії визначали методом прискореного екстрагування розчинниками згідно з ДСТУ 7096:2009.

Результати досліджень та їх обговорення. Дослідження стійкості рослин м'яту до посухи проводилося на основі визначення фізіологічного параметра-стрес-депресія проростання насіння в розчині сахарози, імітуючого недоста-

Таблиця 1

Схожість насіння м'яту перцевої

Сорт	Загальна кількість насіння, шт.	Схожість насіння		Х ² ₀₅	
		штук	%	факт.	теорет.
Прилуцька 6	100	21	21	1,00	3,84
Сімферопольська 200	100	15	15		

Таблиця 2

Одержання асептичних проростків сортів м'яти перцевої в 4% розчині хлораміну

Сорт	Тривалість стерилізації, (хв.)	Загальна кількість проростків, шт.	Кількість інфікованих проростків через 5 дб		Ефективність стерилі-зації, (%)	χ^2_{05}	
			штук	%		факт.	теорет.
Прилуцька 6	15	21	3	14	86	0,008	3,840
Сімферопольська 200	15	15	2	13			

чу вологи. Насіння пророщували в термостаті без доступу світла при постійній температурі 21-22 °С протягом 16 дб у чашках Петрі (табл. 1).

Оскільки χ^2_{05} факт. < χ^2_{05} теорет., то різниця між кількістю пророслих насінин обох сортів м'яти перцевої неістотна.

Було встановлено, що чим вищий відсоток проростання насіння в умовах посухи, тим посухостійкіший зразок.

Оцінка реакцій сортів м'яти на стресову дію була різною у фізіологічних змінах показників. Залежно від генотипу сорти розрізнялися амплітудою такого фізіологічного параметра, як проростання, що дало змогу розподілити їх на стійкі та середньостійкі. Сорт м'яти Прилуцька 6 є посухостійкішим, ніж Сімферопольська 200, що підтверджується дослідженнями, проведеними в

Таблиця 3

Склад середовищ для культивування калюсної тканини м'яти перцевої

Компоненти середовища, мг	Перший варіант	Другий варіант
МС-макро,	100	50
МС-мікро	1	1
Fe-хелат	5	5
Мезоінозит	100	100
Сахароза, г	20	20
B ₁	0,1	0,5
B ₆	0,5	–
PP	0,5	–
Гліцин	2	–
Гідролізат казеїну	–	0,5
БАП	0,5	1
НОК	–	0,5
ІОК	–	0,1
Агар	0,7%	0,7%
Дріжджовий екстракт	–	10



Рис 1. Рослини – регенеранти сорту Прилуцька 6.

розсаднику конкурсного сортовипробування.

Отримані проростки стерилізували розчином хлораміну (4%) протягом 15 хв та висаджували на агаризоване безгормональне живильне середовище МС. Результати стерилізації представлені в табл. 2.

χ^2_{05} факт. < χ^2_{05} теорет., тому немає істотної різниці між ефективністю простерилізованих проростків досліджуваних сортів м'яти.

Хлорамін, як стерилізатор, виявився ефективним засобом для отримання стерильних проростків обох сортів м'яти перцевої (рис. 1).

Стерилізовані експлантати м'яти перцевої на модифікованому середовищі МС (варіант перший з додаванням 0,5 мг/л БАП, варіант другий з додаванням 1 мг/л БАП + 0,5 мг/л НОК та 0,1 мг/л ІОК) через декілька тижнів проліферували калюсну тканину (табл. 3).

Культивували калюсні тканини в темній культуральній кімнаті за t 25±1°C, відносної вологості – 60-65%. У подальшому одержану калюсну тканину використовували для одержання посухостійких клітинних ліній.



Рис. 2. Рихлий калюс м'яти перцевої

Найбільш інтенсивно рихлий, здатний до регенерації калюс, утворювався за субкультивування експлантатів або цілих пагонів на середовищі другого варіанта (рис.2).

У дослідженнях по добору посухостійких клітинних ліній м'яти перцевої використовувалося модифіковане живильне середовище МС доповнене регуляторами росту (1 мг/л БАП + 0,5 мг/л НОК). Як селективний агент використовували мутаген ПЕГ-6000 [8]. Мікрокалюси висаджували на середовище із сублетальною концентрацією ПЕГ-6000. Для встановлення сублетальної концентрації ПЕГ-6000 калюсну культуру висаджували на живильні середовища з різною концентрацією ПЕГ (10%; 20%; 30%; 40%) і виявляли концентрацію, при якій також спостерігалось значне зменшення приросту калюсної тканини. Далі проводилася жорстка селекція з використанням сублетальної концентрації за схемою: – 1, 2, 3 пасажі – на середовищі із селективним фактором; 4, 5 – контроль без селективного агента; 6, 7 – на селективному середовищі.

Було встановлено, що концентрація сублетальної дози



Рис. 3. Морфогенний посухостійкий калюс м'яти перцевої

ПЕГ-6000 для сортів Прилуцька 6 становить 30%, а Сімферопольська 200 – 20%.

У результаті послідовних доборів виділяли резистентні клони, що стабільно зберігали ознаку стійкості до селективного агента (рис.3).

Для успішного морфогенезу відібрані калюси висаджували на живильне середовище МС, доповнене 6-бензиламінопурином у концентрації 0,5 мг/л.

Пробірки переносили у світлу культуральну кімнату з умовами: температура 25°C, 16-годинний фотоперіод, освітлення 3000 – 4000 лк (рис.4) [9].

Для вкорінення відбирали пагони одного розміру з добре розвиненими листками й висаджували в живильне середовище. Досліджували середовище МС з половинною концентрацією макросолей, мікроелементів, вітамінів та регуляторів росту. Найкращим для ризогенезу пагонів виявилось середовище з половинною концентрацією макросолей, мікроелементів та вітамінів. Відсоток ризогенезу обох сортів м'яти на даному середовищі становив 99%.

За кілька днів до висаджування у ґрунтовий субстрат пробірки з рослинами відкривали і залишали відкритими, починаючи адаптацію до умов меншої вологості. Потім обережно виймали рослини, ретельно відмивали кореневу систему від залишків



Рис. 4. Непрямий морфогенез м'яти перцевої в культурі *in vitro*

живильного середовища, обробляли 5% розчином перекису водню і висаджували в горщики зі спеціально підготовленим субстратом. Як субстрат використовували суміш ґрунту, торфу, піску (2:1:1). Після висадження рослини накривали скляними ковпаками для підвищення вологості та кращого приживання [10]. Частка приживання рослин – регенерантів сорту Прилуцька 6 на субстраті становила 97%, Сімферопольська 200 – 95%. Укорінені та адаптовані до зовнішніх умов рослини – регенеранти висаджували в умови відкритого ґрунту.

Перевірка рослин – регенерантів м'яти перцевої на посухостійкість проводилась в умовах дефіциту води в ґрунті і за відносно високих температур повітря. Як контроль використовували рослини сортів м'яти перцевої Прилуцька 6 та Сімферопольська 200, створені традиційними методами селекції. Результати перевірки рослин на посухостійкість представлені в таблиці 4.

Наступним етапом досліджень було висадження рослин – регенерантів в умови відкритого ґрунту і проведення спостережень щодо інтенсивності росту та адаптації рослин у період вегетації (табл. 5). З наведеної таблиці видно, що рослини – регенеранти сортів м'яти перцевої Прилуцька 6 та Сімферопольська 200 мають значно



Рис. 5. Рослини – регенеранти



Рис. 6. Рослини – регенеранти сорту Прилуцька 6 і Сімферопольська 200

вищу стійкість до несприятливих абіотичних факторів (посухи), ніж звичайні рослини цих же сортів.

Отже, рослини – регенеранти сорту Прилуцька 6 (рис. 5) адаптувались до умов відкритого ґрунту дещо гірше сорту Сімферопольська 200 (на 2% рівень адаптації нижчий) (рис. 6), але ріст рослин в обох варіантах є досить інтенсивний і стабільний.

Таблиця 4

Посухостійкість рослин-регенерантів за t +30-32 °C та критичної вологості ґрунту (50-55%)

Сорт	Кількість днів, протягом яких не проявлялись ознаки в'янення
Прилуцька 6 (контроль)	12
Прилуцька 6 (рослини-регенеранти)	23
Сімферопольська 200 (контроль)	9
Сімферопольська 200 (рослини-регенеранти)	16

Результати оцінки вмісту ефірної олії рослин м'яти перцевої представлені в табл. 6.

За результатами досліджень, у листках рослин – регенерантів обох сортів спостерігалось значне зниження вмісту ефірної олії порівняно з контрольними рослинами цих же сортів. Тому можна зробити припущення, що між підвищенням посухостійкості у рослин м'яти перцевої та вмістом в них ефірної олії спостерігається негативна кореляція.

Висновки. Таким чином, при вивченні сортів м'яти перцевої Прилуцька 6 та Сімферопольська 200 було встановлено, що обидва сорти мають високий генетичний потенціал, особливо сорт Прилуцька 6, який володіє підвищеною стійкістю до екстремальних умов середо-

Таблиця 5
Результати досліджень рослин – регенерантів в умовах відкритого ґрунту

Сорти	Дата	Висота рослин, см	Результати адаптації рослин до умов відкритого ґрунту	
			штук	%
Прилуцька 6	Висадки: 30.06.09	10-13	26	–
	1-ше спостереження: 12.07.09	16-19	24	94
	2-ге - - 27.07.09	25-29	24	94
	3-тє - - 10.08.09	35-40	24	94
Сімферопольська 200	Висадки: 30.06.09	9-12	18	–
	1-ше спостереження: 12.07.09	15-17	17	96
	2-ге - - 27.07.09	23-27	17	96
	3-тє - - 10.08.09	33-37	17	96

Таблиця 6
Вміст ефірної олії в листках рослин м'яти перцевої

Сорт	Прилуцька 6 (рослини-регенеранти)	Прилуцька 6 (контроль)	Сімферопольська 200 (рослини-регенеранти)	Сімферопольська 200 (контроль)
Вміст ефірної олії, %	2,5 – 2,7	2,7 – 2,8	3,0 – 3,1	3,1 – 3,3

вища. Отримані дані в процесі досліджень, в подальшому можуть бути використані в практичній селекції для виділення посухостійких генотипів.

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Ковальов, В. М. Фармакогнозія з основами біохімії рослин: підручник для студентів вищих фармацевтичних установ освіти. / В. М. Ковальов, О. І. Павлій, Т. І. Ісакова. – Харків: Прапор, вид-во НФАУ, 2000. – 705 с.
2. Лебеда А. П. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник. / А. П. Лебеда, Н. І. Джуренко, О. П. Ісайкіна [та ін.]. – К.: Вид-во Українська енциклопедія ім. М. П. Бажана, 1992. – 544 с.
3. Гирко, В. С. Нетрадиционные методы создания селекционного материала пшеницы. / В. С. Гирко. // Дис. докт. с.-х. наук: 06.01.05. – Киев, 1999. – 42 с.
4. Мельничук, М. Д. Біотехнологія рослин: підручник. / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах. – К.: Поліграф-Консалтинг, 2003. – 520 с.
5. Сидоров, В. А. Биология растений. Клеточная селекция. / В. А. Сидоров. – К.: Наукова думка, 1990. – 280 с.
6. Шамина, З. Б. Генетическая изменчивость в популяциях соматических клеток растений в культуре. / З. Б. Шамина. // Автореф. дис. докт. биол. наук. / 03.00.15 – генетика – Ленинград, 1988. – 35 с.
7. Калинин, Ф. Л. Методы культуры тканей физиологии и биохимии растений. / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
8. Калинин, Ф. Л. Технология микрклонального размножения растений. / Ф. Л. Калинин, Г. П. Кушнир, В. В. Сарнацкая. – К.: Наукова думка, 1992. – 228 с.
9. Кучук, Н. В. Генетическая инженерия высших растений. / Н. В. Кучук – К.: Наук. думка, 1997. – 157 с.
10. Крыськов, Е. И. О реакции мяты *Mentha piperita* L. на гиббереллин. / Е. И. Крыськов, Д. Ф. Шкурят. // Ботанич. журнал, 1961. – Т. 46, 15.– С. 707–710.