

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ *MELISSA OFFICINALIS* L.

О. Л. КЛЯЧЕНКО, доктор сільськогосподарських наук, професор кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття

К. В. СОМ, магістр^{*}

О. О. ОЛІЙНИК, провідний фахівець

**Національний університет біоресурсів і природокористування
України**

E-mail: katya.som.95@ukr.net

Анотація. Меліса лікарська (*Melissa officinalis* L.) є перспективною ефіроолійною і лікарською рослиною. Проте вміст ефірної олії в рослинній сировині незначний. Тому нині головною метою селекціонерів є виведення високопродуктивних та високоолійних сортів *M. officinalis*. Визначено, що потреба в лікарській сировині меліси задовольняється дикоростучими рослинами. Це спричинює значне скорочення природних ресурсів. Тому доцільно вводити рослини меліси в культуру *in vitro*, ставлячи за мету розробку методів отримання лікарської сировини в керованих умовах. В багатьох наукових публікаціях, які стосуються біотехнології ефіроолійних культур, основна увага приділена розробці методів мікроклонального розмноження. В ході роботи встановлено особливості мікроклонального розмноження *Melissa officinalis* L. Досліджено способи отримання асептичної культури рослин меліси із зелених живців та насіння. Виявлено, що оптимальним для мікроклонального розмноження меліси є живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга, доповнене кінетином у концентрації 0,25 мг/л, за якого відбувається множинне пагоноутворення та ризогенез. В результаті удосконаленої методики мікроклонального розмноження, отримано генетично-стабільні, оздоровлені рослини-регенеранти меліси лікарської, придатні до адаптації *ex vitro*.

Ключові слова: меліса лікарська, *in vitro*, мікроклональне розмноження, *ex vitro*

Актуальність. Меліса лікарська (*Melissa officinalis* L.) – перспективна ефіроолійна і лікарська рослина, яка широко використовується в багатьох сферах промисловості [4]. Ефірна олія меліси входить до складу багатьох седативних препаратів, але вміст її в сировині дуже малий – приблизно 0,02 – 0,30% на суху масу. Тому в даний час головна мета селекціонерів – виведення високопродуктивних і високоолійних сортів *M. officinalis* [3, 4]. Збільшенню ефективності селекційних досліджень сприятиме використання біотехнологічних методів. На сьогодні потреба в лікарській сировині *M. officinalis* задовольняється більшою мірою дикоростучими рослинами, що призводить до значного скорочення природного фонду. Тому доцільно вводити рослини в культуру *in vitro*, ставлячи за мету розробку методів

^{*} Науковий керівник – О. Л. Кляченко

отримання лікарської сировини в контрольованих умовах [2, 4]. В більшості опублікованих наукових праць, які стосуються біотехнології ефіроолійних культур, основна увага приділена розробці методів мікроклонального розмноження [1, 2, 4, 5, 7, 8].

Мета роботи – вивчення особливостей мікроклонального розмноження рослин *M. officinalis* для одержання здорового посадкового матеріалу та подальшого їх пристосування до умов *ex vitro*.

Матеріали та методи досліджень. Матеріалом для досліджень слугували зелені живці з одним вузлом та насіння меліси лікарської (*M. officinalis* L.). Для оптимізації умов отримання асептичних рослин меліси використовували різні стерилізанти в певних концентраціях і тривалості експозиції [2]. Експлантати культивували на декількох модифікованих живильних середовищах Мурасіге і Скуга (МС) [6]: МС1 із додаванням індолілмасляної кислоти (ІМК) (0,1 мг/л), бензиламінопурина (БАП) (0,5 мг/л), гліцину (0,5 мг/л), аденіну (0,1 мг/л) та МС2 із додаванням кінетину (0,25 мг/л). Культивування здійснювали в культуральній кімнаті за температури 24-26°C і відносній вологості повітря 60-70%. Статистичну обробку даних проводили з використанням програми Excel.

Результати дослідження та їх обговорення. В залежності від виду експлантата підбирали відповідні умови стерилізації. На першому етапі роботи як експлантати використовували зелені живці (ділянки стебла з одним вузлом) меліси лікарської сорту Соборна, які виокремили від рослин *in situ*. Для отримання асептичних експлантатів меліси проводили стерилізацію за двома схемами з використанням комерційного препарату «Білизни» та 0,1 % розчину сулеми (HgCl₂). Серед них була обрана найкраща схема стерилізації експлантатів із використанням 70% етанолу (1хв), 0,1% сулеми (7хв) та 4-разового промивання у дистильованій воді по 10хв. За даною схемою рівень контамінації мікроорганізмами був найнижчим (5,5%).

Для введення в культуру *in vitro* насіння сорту Лимонний бальзам стерилізували протягом 1хв 70% етиловим спиртом, з подальшим перенесенням на 15хв у 0,1% розчин сулеми та тричі промивали дистильованою водою по 10хв. Дана схема забезпечувала ефективність стерилізації на рівні 100%, проте, кількість пророщеного насіння складала 70%. Це можна пояснити тим, що у разі збільшення тривалості стерилізації можна досягти абсолютної стерильності, але водночас кількість пророщених насінин може знизитись через некротизацію зародків [4]. Отримані нами асептичні живці та насіння переносили на безгормональне живильне середовище МС. Надалі в експлантатів, отриманих з рослин *in situ*, спостерігався сповільнений ріст. У разі перенесення частин стебел із однією сплячою брунькою на модифіковане живильне середовище МС1, доповнене ІМК (0,1 мг/л), БАП (0,5 мг/л), гліцином (0,5 мг/л) і аденіном (0,1 мг/л), відбувався запуск сплячих бруньок, але ріст пагонів при цьому сягав менше 1см.

Для удосконалення методики мікророзмноження рослин меліси лікарської, нами вивчено вплив середовища МС2, доповненого кінетином (0,25 мг/л) на розвиток експлантатів (рис.1). На 14 добу у рослин спостерігали

формування коренів на базальній частині пагона (2-3шт), висота пагона сягала не менше ніж 2см, додатково формувались 3-4 листки.

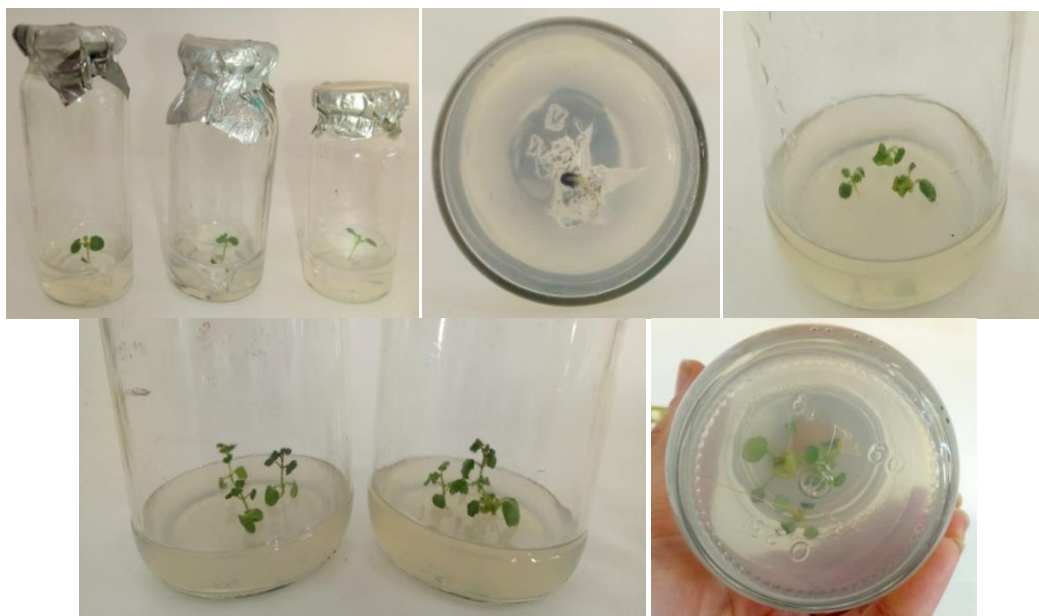


Рис. 1. Отримання стерильних проростків насіння меліси лікарської сорту Лимонний бальзам *in vitro*: 1 - проростки на безгормональному середовищі МС; 2 - перенесені проростки на середовище МС2, доповнене кінетином (0,25 мг/л); 3 - проростки на 14 добу субкультивування

В процесі розвитку рослини-регенеранти активно збільшували вегетативну масу, була добре розвинена коренева система, висота пагонів становила не менше 15см. Такі рослини є придатними для адаптації до умов *in vivo*.

Надалі для розмноження меліси отримували мікроживці з одним вузлом вже з добре сформованих рослин-регенерантів та переносили на свіже живильне середовище МС2 (рис.2). Нами було виявлено, що у всіх експлантатів через два тижні культивування починався ріст пагонів із пазушних бруньок та активно формувалися корені.



Рис. 2. Вплив живильного середовища МС2 з кінетином (0,25 мг/л) на розвиток мікроживців, виділених із насіння *in vitro*: 1 – мікроживці на середовищі МС2 (1-й день); 2 – мікроживці на 14-й день культивування; 3 – ризогенез у мікроживців (14-й день); 4 – рослини на 25-й день культивування; 5 – ризогенез у рослин (25-й день)

В результаті проведених досліджень встановлено, що середовище МС2, доповнене кінетином (0,25 мг/л), сприяло ефективному збільшенню вегетативної маси та формуванню кореневої системи, що дозволило в подальшому адаптувати отримані рослини-регенеранти до умов *in vivo*.

Висновки і перспективи. Показано, що найбільш оптимальним для мікроклонального розмноження меліси лікарської є живильне середовище МС2, доповнене кінетином у концентрації 0,25 мг/л, за якого відбувається множинне пагоноутворення та ризогенез.

В результаті удосконаленої методики мікроклонального розмноження меліси отримано генетично-стабільні, оздоровлені рослини-регенеранти, придатні до адаптації *in vivo*.

References

1. Bugara, I. A. (2013). Klonal'noe mikrorazmnozhenie i ozdorovlenie *Mentha piperita* L. in vitro [Clonal micropropagation and recovery of *Mentha piperita* L. in vitro]. Uchenye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta im. V.I. Vernadskogo. Seriya "Biologiya, khimiya". [Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. Series: Biology, chemistry], 26(1), 10–15.
2. Moradhani Hodzhat Aliakbarovich. Optimizatsiya pitatelnoy sredy kallusnoy i kletочно-suspenszionnoy kulturyi: melissa officinalis L.: avtoreferat dissertatsii na soiskanie uchenoy stepeni kandidata biologicheskikh nauk: spetsialnost 03.00.14 Biotehnologiya / Moradhani Hodzhat Aliakbarovich. – Erevan, 2014. – 25 s.
3. Nevkryitaya, N. V. (2008). Analiz vnutrividovogo raznoobraziya melissy lekarstvennoy s tselyu sozdaniya ishodnogo materiala dlya selektsii [Analysis of the instaspecific variety of lemon balm to create the source material for breeding]// Vinogradarstvo i vinodeli, 38, P. 65-68.
4. Yakimova, O. V., Egorova, N. A. (2014). Vvedenie v kulturu in vitro i mikrorazmnozhenie *Melissa officinalis* L. [Introduction to in vitro culture and micropropagation of *Melissa officinalis* L.]. Biotehnologicheskie priemy v sohranении bioraznoobraziya i selektsii rasteniy: sbornik statey Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii, Minsk, 18-20 avgusta 2014g. Natsionalnaya akademiya nauk Belarusi. Tsentralnyy botanicheskiy sad [Proceeding of the International Scientific Conference, Minsk, 18-20 August, 2014. Biotechnological methods in conservation of biodiversity and plant breeding. National Academy of Sciences of Belarus. The Central Botanical Gardens] (Minsk), 272-275.
5. Meftahizade, H., Moradkhani, H., Naseri, B. et al. (2010). Improved in vitro culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes. J. of Medicinal Plants Research. 4 (3), 240-246.
6. Murashige, T. A., Skoog, F. K. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol.Plant.* 15, 473-497.
7. Tavares, A.C., Pimenta, M.C., Gonsalves, M.T. (1996). Micropropagation of *Melissa officinalis* L. through proliferation of axillary shoots. *Plant Cell Repts.* 15 (6), 441–444.
8. Egorova, N. A. (2014). Nekotoryie aspekty biotehnologii efiromaslichnykh rasteniy: mikroklonalnoe razmnozhenie, sintez produktov vtorichnogo metabolizma in

vitro [Some aspects of essential oil plants biotechnology: microclonal propagation, synthesis of secondary metabolites in vitro]. Fiziologiya rasteniy i genetika. 46 (3), 187-201.

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ *MELISSA OFFICINALIS* L.

О. Л. Кляченко, К. В. Сом, О. О. Олейник

Аннотация. Мелисса лекарственная (*Melissa officinalis* L.) является перспективным эфиромасличным и лекарственным растением. Однако содержание эфирного масла в растительном сырье незначительное. Поэтому сегодня главной целью селекционеров является выведение высокопродуктивных и высокомасличных сортов *M. officinalis*. Определено, что потребность в лекарственном сырье мелиссы удовлетворяется дикорастущими растениями. Это вызывает значительное сокращение природных ресурсов. Поэтому целесообразно вводить растения мелиссы в культуру *in vitro*, ставя целью разработку методов получения лекарственного сырья в управляемых условиях. Во многих научных публикациях, касающихся биотехнологии эфиромасличных культур, основное внимание уделено разработке методов микроклонального размножения. В ходе работы установлены особенности микроклонального размножения *Melissa officinalis* L. Исследованы способы получения асептической культуры растений мелиссы из зеленых черенков и семян. Выявлено, что оптимальной для микроклонального размножения мелиссы есть питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга, дополненная кинетином в концентрации 0,25 мг/л, при которой происходит множественное побегообразование и ризогенез. В результате усовершенствованной методики микроклонального размножения, получены генетически стабильные, оздоровленные растения-регенеранты мелиссы лекарственной, пригодные к адаптации *ex vitro*.

Ключевые слова: мелисса лекарственная, *in vitro*, микроклональное размножение, *ex vitro*

MICROCLONAL PROPAGATION OF *MELISSA OFFICINALIS* L.

O. Klyachenko, K. Som, O. Oliinyk

Abstract. Depending on the type of explant, appropriate conditions for sterilization were selected. On the first stage of the work, as explants, green ticks (stems with a single node) of the medicinal varieties 'Soborna', which were isolated from plants *in situ*, were used as explants. To obtain aseptic melanoma explants, sterilization was performed in two regimens using the commercial preparation "Lysine" and 0.1% solution of $HgCl_2$. Among them, the best scheme of sterilization of explants using 70% ethanol (1min), 0.1% $HgCl_2$ (7min) and 4-time flushing in distilled water for 10min was chosen. Under this scheme, the level of contamination by microorganisms was the lowest (5.5%).

When introduced into an *in vitro* culture, seeds of the 'Lemon Balsam' strain were sterilized for 1min in 70% ethanol, followed by transferring to a 15min 0.1% HgCl₂ and washed 3 times with distilled water (10min). This scheme provided the effectiveness of sterilization at 100%, but the amount of germinated seeds was 70%. This can be explained by the fact that with increasing sterilization duration it is possible to achieve absolute sterility, but the amount of germinated seeds can decrease due to necrosis of the embryos. The obtained aseptic cuttings and seeds were transferred to the non-hormonal nutrient medium of MS. Subsequently, in the explants derived from plants *in situ*, slow growth was observed. When transferring parts of stems with one sleeping kidney to a modified nutrient medium MS1 supplemented with IMC (0.1 mg/l), BAP (0.5 mg/l), glycine (0.5 mg/l) and adenine (0.1 mg/l), there was the launch of sleeping kidneys, but the growth of shoots thus reached less than 1cm. To improve the method of micropropagation of melissa plants, we studied the influence of MS2 medium supplemented by KIN (0.25 mg/l) on the development of explants. At day 14, they observed the formation of roots on the basal part of the shoots (2-3pcs), the height of the shoots reached at least 2cm, further formed 3-4 leaves. During the development of the plant, regenerators actively recruited their vegetative mass, they had a well developed root system, the height of the shoots was not less than 15cm. Such plants are suitable for adaptation to *in vivo* conditions. Subsequently, for the propagation of mulch, micro-humans with one node were already obtained from well-formed regeneration plants and transferred to a fresh medium MS2. We have found that in all explants, after two weeks of cultivation, the growth of shoots from the axillary buds began and roots were actively formed.

As a result of the conducted research, it was found that the MS2 medium supplemented with KIN(0.25 mg/l) contributed to the effective collection of vegetative mass and the formation of the root system, which allowed further adaptation of the regenerated plants to *in vivo* conditions.

Key words: lemon balm, *in vitro*, microclonal propagation, *ex vitro*