

УДК 604.7:582.929.4

ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСОГЕНЕЗА И СОМАТИЧЕСКОГО ОРГАНОГЕНЕЗА У РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ЭКСПЛАНТОВ МЯТЫ БОЛОТНОЙ (*MENTHA PULEGIUM L.*)

М.М. МУБАРАК¹, Р.О. НОВАКОВСКИЙ¹, Е.Н. БАРАНОВА², М.Ю. ЧЕРЕДНИЧЕНКО¹

¹ РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева;
² ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАН)

В настоящее время активно развивается направление получения фармацевтически ценных веществ из растительного сырья. Mentha pulegium L. (мята болотная) является продуцентом эфирного масла, основным компонентом которого является пулегон, используемый в фармацевтической промышленности, а также при химическом синтезе ментола. Метод культуры клеток и тканей способен обеспечить необходимым количеством растительного материала для наработки и последующего выделения ценных соединений в большом количестве. Создание подобной технологии подразумевает наличие эффективной системы регенерации растений из explantов.

В работе определен режим стерилизации семян (обработка в течение 10 мин. 5%-ным раствором гипохлорита натрия, входящего в состав коммерческого препарата Белизна) для получения максимального выхода асептических донорных проростков. Изучена способность различных типов explantов Mentha pulegium L. (сегменты стебля, листьев, черешки) к индукции каллусогенеза и соматического органогенеза побегов in vitro в зависимости от минерального состава питательной среды на основе Мурасиге и Скуга, а также добавления регуляторов роста в различном соотношении и сочетании. Подобраны варианты питательных сред, позволяющие индуцировать образование каллуса из различных explantов с частотой более 90%. Проведено гистологическое изучение каллусной ткани, образованной из сегментов стебля и фрагментов листа. Несмотря на высокую способность к каллусообразованию, соматический органогенез побегов был отмечен только у единичных explantов. Изучен морфогенетический потенциал сегментов узлов стебля в качестве альтернативного explанта для культивирования.

Ключевые слова: мята болотная (Mentha pulegium L.), культура in vitro, каллусогенез, соматический органогенез побегов.

Лекарственные растения являются важным источником природных антиоксидантов, которые способны уменьшать частоту мутаций, повреждений ДНК и образования опухолей в результате действия ультрафиолетового излучения и окислительного стресса у млекопитающих [6]. Семейство Яснотковые (Lamiaceae), или Губоцветные (Labiatae), включает в себя такие роды лекарственных растений, как *Agastache*,

Mentha, *Thymus*, *Hyssopus*, *Ocimum*, и является одним из важнейших семейств растений, содержащих антиоксиданты [8]. Виды рода *Mentha* изучаются относительно давно [10]. Показана противораковая и противолучевая активность вторичных метаболитов мяты [17]. Род *Mentha* включает в себя множество видов травянистых, многолетних ароматических растений, таксономическая классификация которых затруднена из-за их высокой фенотипической пластичности и способности к образованию спонтанных гибридов [6].

Мята болотная (*Mentha pulegium* L.) — экономически важный источник эфирного масла и природных антиоксидантов. Основным компонентом эфирного масла данного вида является пулегон, который может использоваться в качестве предшественника при химическом синтезе таких соединений, как ментол и ментофуран [11]. Его содержание варьирует от 41,8% у мяты из Туниса до 96% в растениях из Марокко. Эфирное масло *M. pulegium* L. используется в фармацевтической, косметологической промышленности и в качестве инсектицида [9].

Культура клеток и тканей предлагает широкие возможности для индукции генетической изменчивости генотипов мяты за счет соматической варибельности, получения соматических гибридов. При этом необходимым условием является разработка удобной и воспроизводимой технологии получения растений-регенерантов из соматических клеток. Ряд видов рода *Mentha*, включая *M. arvensis* L., *M. × piperita* L., *M. suaveolens* Ehrh., *M. × spicata* L. и *M. viridis* L., был успешно введен в культуру *in vitro*, получены регенеранты из различных эксплантов путем прямого органогенеза или через стадию каллуса [13, 14, 16, 18, 20]. Так, Rech и Pires изучили морфогенетическую способность пазушных почек шести видов *Mentha* [14]. Sato с соавт. получили полноценные растения-регенеранты из протопластов, выделенных из листовых эксплантов мяты перечной (*Mentha × piperita* L.), при культивировании на питательной среде Гамборга (B5) с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП) и α -нафтилуксусной кислоты (НУК) [19]. Caissard с соавт. осуществили введение чужеродной ДНК в клетки *M. × piperita* L. методами агробактериальной и биобаллистической трансформации [7]. Reed проводила исследования по изучению длительного культивирования тканей трех видов мяты (*M. arvensis* L., *M. × spicata* L., *M. suaveolens* Ehrh.) в различных световых и температурных режимах на фоне варьирующего количественного содержания азота в питательной среде с целью сохранения генетического материала [15]. Xu с соавт. исследовали каллусогенез из листовых эксплантов *Mentha haplocalyx* Briq. и рекомендовали использовать питательную среду 1/2 МС с добавлением 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л НУК [20]. Samantaray с соавт. для индукции каллусогенеза у *M. × spicata* L. добавляли в питательную среду МС 2,4-Д в концентрации 2,5 мг/л, что приводило к образованию каллуса с частотой 92% [16].

Отечественные ученые также проявляли интерес к изучению видов рода *Mentha* в культуре *in vitro*. Так, Бугаенко проводил эксперименты по биотрансформации монотерпеноидов в культуре клеток *Mentha canadensis* L., в результате которых было показано, что у данного вида существует два пути биосинтеза ментола: пиперитонный и пулегонный [1]. Бугара и Мальцева исследовали особенности каллусообразования у листовых и стеблевых эксплантов *Mentha piperita* L. при культивировании на питательной среде МС, содержащей 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л БАП, 0,5 мг/л [3]. Авторами было установлено, что привнесение в питательную среду селена в концентрациях 5 мг/л и 10 мг/л оказывало стимулирующее действие на индукцию каллусообразования в культуре листовых эксплантов.

Таким образом, целью данного исследования являлось изучение процессов морфогенеза *in vitro* у растений мяты болотной (*Mentha pulegium* L.) при культивировании различных экплантов на питательных средах с различным составом регуляторов роста.

Материалы и методы

Объектом исследования служили семена двух сортов *Mentha pulegium* L. — Соня и Пеннироял. Для введения в культуру *in vitro* семена дезинфицировали 0,1%-ным раствором хлорида ртути (II) и 5%-ным раствором гипохлорита натрия, входящего в состав коммерческого препарата Белизна. Экспозиция составляла 5 и 10 мин. или 10 и 15 мин., соответственно.

Для индукции морфогенеза использовали питательные среды с полным (МС) и 50%-ным содержанием минеральных солей и витаминов по Мурасиге и Скугу (½ МС) [12] с добавлением 3% сахарозы, 0,8% агара и регуляторов роста в различных соотношениях и концентрациях: α -нафтилуксусной кислоты (НУК), 6-бензиламинопурина (БАП), 6-фурфурилметиламинопурина (кинетин) (табл. 1). Опыты проводили в 3-кратной повторности по 10 экплантов различных типов (сегменты листьев и стеблей, черешки) в каждой. Донорные асептические растения и полученные от них экпланты культивировали в условиях световой комнаты при температуре 18–20°C и 16-часовом световом дне. Результаты экспериментов фиксировали спустя 6 недель культивирования.

Т а б л и ц а 1

Вид и концентрация регуляторов роста, входящих в состав питательных сред на основе МС, для индукции процессов морфогенеза *Mentha pulegium* L.

Обозначение среды	Концентрация регуляторов роста, мг/л			Обозначение среды	Концентрация регуляторов роста, мг/л		
	БАП	кинетин	НУК		БАП	кинетин	НУК
МС1	0,5	–	–	МС9	1,0	–	0,5
МС2	1,0	–	–	МС10	1,0	–	1,0
МС3	1,5	–	–	МС11	0,5	–	0,5
МС4	2,0	–	–	МС12	0,5	–	1,0
МС5	–	0,5	–	МС13	–	1,0	0,5
МС6	–	1,0	–	МС14	–	1,0	1,0
МС7	–	1,5	–	МС15	–	0,5	0,5
МС8	–	2,0	–	МС16	–	0,5	1,0

Для гистологического исследования использовали каллусную ткань, образованную из сегментов листьев и стеблей *Mentha pulegium* L. сорта Соня. Фрагменты каллусной ткани фиксировали в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере Серенсена (рН 7,2) с добавлением 1,5% сахарозы. После отмывки

от фиксирующей смеси растительный материал дофиксируют 1% раствором четырехоксида осмия (OsO_4), обезживают в этаноле повышающейся концентрации (30, 50, 70, 96 и 100%), затем в окиси пропилена и заключают в смесь эпоксидных смол Эпона-812 и Аралдита по стандартной методике [5]. Полутонкие срезы толщиной 1–2 мкм изготавливают с помощью ультрамикротомы LKB-V (LKB, Швеция), после чего их монтируют на предметные стекла и заключают в смесь эпоксидных смол. Препараты анализируют и фотографируют в микроскопе Olympus BX51 (Olympus, Япония), оборудованном камерой Color View II (Soft Imaging System, Германия).

Статистическую обработку результатов эксперимента проводят с использованием параметрических критериев Стьюдента, Фишера и Дункана с помощью программы AGROS (версия 2.11), а также стандартных пакетов программы Windows Excel 2010.

Результаты и обсуждение

Донорами для получения эксплантов могут служить как взрослые растения, выращенные в условиях *in vivo*, так и молодые проростки, введенные в культуру *in vitro*. В публикациях, посвященных морфогенезу различных видов рода *Mentha in vitro*, донорами для получения эксплантов выступают преимущественно взрослые растения, выращенные в нестерильных условиях [15, 16]. В связи с этим нами было запланировано введение в культуру *in vitro* семян исследуемого нами вида *Mentha pulegium* L.

Установлено, что выход асептических проростков при обработке 0,1%-ным раствором хлорида ртути (II) семян сорта Пеннироял был существенно ниже, чем при использовании 5%-ного раствора гипохлорита натрия (табл. 2). Аналогичная ситуация отмечена и для сорта Соня при максимальных экспозициях обоих стерилизующих агентов. Таким образом, для введения в культуру *in vitro* семян *Mentha pulegium* L. сортов Пеннироял и Соня можно рекомендовать использование 5%-ного раствора гипохлорита натрия при обработке в течение 15 мин. Данный режим стерилизации обеспечивает наибольший выход асептических проростков.

Т а б л и ц а 2

Влияние вида стерилизующего агента и экспозиции на выход асептических проростков *Mentha pulegium* L.

Сорт	Выход асептических проростков, %			
	5%-ный раствор гипохлорита натрия		0,1%-ный раствор хлорида ртути (II)	
	10 мин.	15 мин.	5 мин.	10 мин.
Соня	62,0 ± 8,0	78,0 ± 4,9	66,0 ± 6,8	50,0 ± 5,6
Пеннироял	90,0 ± 0,0	96,0 ± 2,4	66,0 ± 6,8	78,0 ± 3,7

По результатам, представленным в таблице 3, каллусогенез на питательной среде, содержащей полную концентрацию основных компонентов МС, происходил в случае обоих сортов только на средах МС9–12, т.е. при наличии БАП и НУК. Ча-

стота каллусогенеза была высокой (83,6–100,0%). На основе ½ МС образование каллуса также было наиболее эффективным на средах, содержащих 0,5–1,0 мг/л БАП в сочетании с 0,5–1,0 мг/л НУК, хотя отмечался и на некоторых других вариантах питательных сред (МС3, МС4, МС13–16). При этом нужно отметить отсутствие существенных различий между типами эксплантов по способности к каллусогенезу (рис. 1).

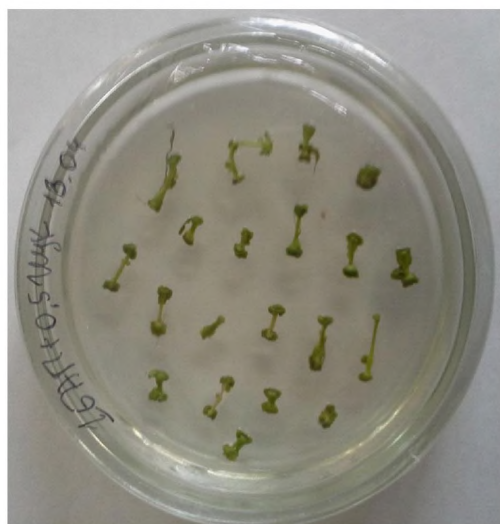
Т а б л и ц а 3

Частота каллусогенеза в зависимости от минерального состава питательной среды, регуляторов роста и типа экспланта, %

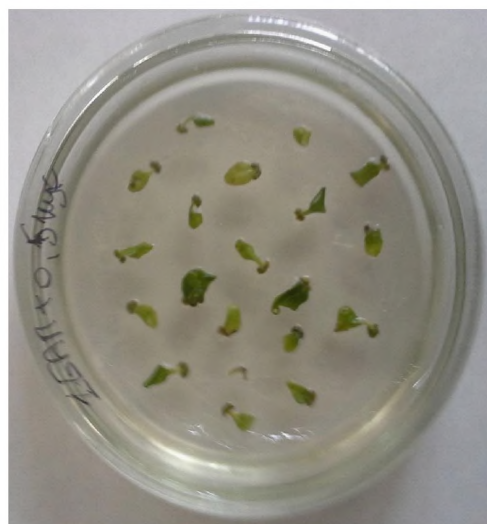
Обозначение гормонального состава среды	Содержание основных компонентов МС, %	Эффективность каллусогенеза в зависимости от сорта и типа экспланта, %					
		Пеннироял			Соня		
		лист	черешок	стебель	лист	черешок	стебель
МС3	50	39,4b-f	0,0a	53,3d-g	39,8c-e	0,0a	98,9q
МС4	50	0,0a	0,0a	54,0e-g	50,5d-i	0,0a	100,0q
МС9	100	97,6rs	91,3j-s	97,6rs	94,9k-q	83,6h-q	98,9q
	50	97,6rs	97,6rs	91,3j-s	97,6n-q	83,3f-q	91,3j-q
МС10	100	94,9l-s	98,9s	97,6rs	97,6n-q	98,9q	97,6n-q
	50	94,9m-s	97,6rs	97,6rs	97,6n-q	83,6i-q	98,9q
МС11	100	98,9s	97,6rs	98,9s	98,9q	97,6pq	98,9q
	50	97,6rs	97,6rs	98,9s	98,9q	98,9q	98,9q
МС12	100	98,9s	97,6rs	100,0s	100,0q	98,9q	98,9q
	50	97,6rs	91,3i-s	100,0s	98,9q	98,9q	98,9q
МС13	50	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	72,0e-o	0,0a
МС14	50	0,0a	0,0a	46,6c-g	0,0a	83,6g-q	0,0a
МС15	50	80,7g-s	68,9f-r	97,6rs	39,4b-e	0,0a	100,0q
МС16	50	0,0a	0,0a	93,3k-s	0,0a	0,0a	100,0q

Примечание. 1. Частота каллусогенеза в вариантах гормонального состава и минеральной основы питательной среды, отсутствующих в таблице, равна 0,0а. 2. Варианты, отмеченные одинаковыми буквами, статистически незначимо отличаются по критерию Дункана ($\alpha = 0,05$).

Результаты гистологического анализа свидетельствуют о том, что каллусная ткань, сформированная из сегментов стебля и листа *M. pulegium* L. сорта Соня, характеризовалась значительной вариабельностью клеток по размеру и форме (рис. 2). Клетки каллусной ткани можно отнести к двум морфологическим типам: мери-

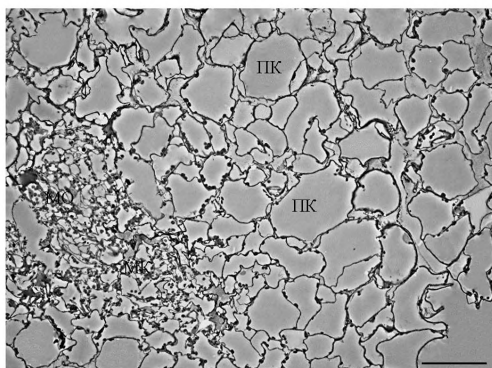


A)

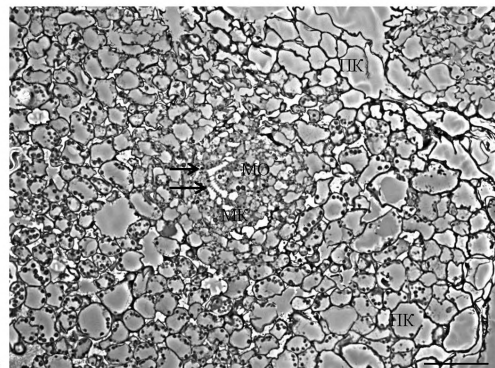


Б)

Рис. 1. Образование каллусной ткани на стеблевых (А) и листовых (Б) эксплантах *Mentha pulegium* L. после 15 сут. культивирования на питательных средах MS, содержащих 1 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л НУК



A)



Б)

Рис. 2. Гистологическое изучение каллусной ткани, сформированной из эксплантов стебля (А) и листа (Б) *Mentha pulegium* L. сорта Соня: ПК — паренхимные клетки; МК — меристематические клетки; МО — меристематический очаг; стрелками обозначены трахеидоподобные элементы. Масштабная линейка — 100 мкм

стематическому и паренхимному. Клетки меристематического типа располагаются в каллусной ткани крупными скоплениями, формируя меристематические очаги. Они характеризуются относительно небольшим размером, содержат плотную цитоплазму, небольшую вакуоль и крупные ядра, расположенные преимущественно в цен-

тральной части клетки. В отличие от меристематических клеток клетки паренхимного типа характеризуются большим размером, небольшим количеством цитоплазмы и хорошо развитой системой вакуолей, в которых, как известно, происходит накопление вторичных метаболитов [2, 4]. Паренхимные клетки каллусной ткани, сформированной из тканей листа, имеют округлую, овальную или удлинённую форму. В отличие от паренхимных клеток каллусной ткани, сформированной из тканей листа, паренхимные клетки каллуса, образованного из сегментов стебля, характеризуются неправильной формой и большим размером. В меристематических очагах каллусной ткани можно наблюдать расположение клеток рядами. В ней присутствуют элементы проводящей системы — трахеидоподобные элементы. Анализ иллюстративного материала позволяет отчетливо видеть большое количество включений, по-видимому, соединений вторичного метаболизма, в меристематических и паренхимных клетках каллусной ткани, сформированной из обоих типов эксплантов.

При изучении стеблевого органогенеза не было получено существенных различий по вариантам опыта как между сортами и типами эксплантов, так и по составу среды. Стеблевой органогенез проходил на всех вариантах питательных сред ½ МС, однако частота органогенеза побегов была очень низкой и варьировала от 1,2 до 10,8%.

В таблице 4 представлена эффективность корневого органогенеза у изучаемых сортов. Наибольшие значения отмечались на средах ½ МС13–16 (0,5–1 мг/л кинетин в сочетании с 0,5–1 мг/л НУК). Частота корневого органогенеза в этих вариантах колебалась от 65,3 до 100%. На остальных вариантах сред эффективность морфогенеза была низкой и составила от 1,2 до 19,3%.

Таблица 4

Влияние состава питательной среды на эффективность корневого органогенеза

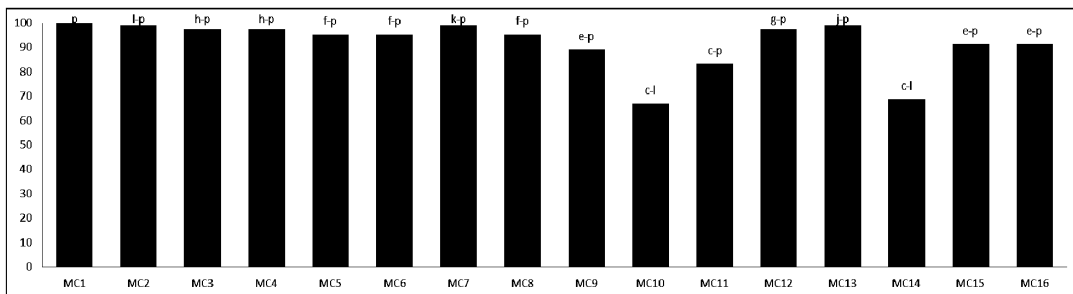
Обозначение гормонального состава среды	Содержание основных компонентов МС, %	Эффективность корневого органогенеза, %					
		Пеннироял			Соня		
		лист	черешок	стебель	лист	черешок	стебель
МС1	100	0,0а	0,0а	0,0а	0,0а	1,2а-г	0,0а
	50	1,2а-с	0,0а	0,0а	0,0а	0,0а	0,0а
МС2	50	13,0а-н	1,2а-с	1,2а-с	0,0а	0,0а	0,0а
МС3	100	1,2а-с	0,0а	0,0а	4,6а-и	1,2а-г	0,0а
МС5	100	0,0а	0,0а	1,2а-с	2,4а-г	0,0а	1,2а-г
	50	0,0а	0,0а	0,0а	18,4ф-н	1,2а-г	0,0а
МС6	100	0,0а	0,0а	0,0а	16,4д-н	0,0а	13,0а-л
	50	1,2а-с	1,2а-с	13,0а-н	16,4д-н	1,2а-г	1,2а-г
МС7	100	0,0а	0,0а	10,8а-г	0,0а	0,0а	0,0а
	50	0,0а	1,2а-с	25,4е-н	2,4а-н	1,2а-г	2,4а-н

Обозначение гормонального состава среды	Содержание основных компонентов МС, %	Эффективность корневого органогенеза, %					
		Пеннироял			Сося		
		лист	черешок	стебель	лист	черешок	стебель
МС8	100	1,2а-с	0,0а	0,0а	0,0а	1,2а-г	0,0а
	50	1,2а-с	1,2а-с	19,3с-н	19,3г-п	1,2а-г	0,0а
МС9	100	0,0а	0,0а	0,0а	0,0а	0,0а	1,2а-г
МС10	100	0,0а	0,0а	0,0а	0,0а	0,0а	1,2а-г
МС11	100	13,0а-н	0,0а	0,0а	0,0а	0,0а	0,0а
МС13	100	22,5d-н	32,9g-и	91,6w-з	2,4а-н	0,0а	15,8с-п
	50	95,5yz	94,9x-з	72,1о-у	81,1s-з	75,0r-з	68,9p-з
МС14	100	72,2l-у	75,0p-з	43,2h-п	15,8с-п	25,4h-о	47,9п-г
	50	65,3i-в	68,5j-у	87,0s-з	91,3x-з	93,3yz	83,3u-з
МС15	100	72,0m-у	68,9k-у	89,2u-з	2,2а-г	26,2i-о	43,2l-г
	50	89,2t-з	91,3v-з	97,6z	46,7m-г	69,0q-з	38,5j-к
МС16	100	15,8b-н	25,4f-н	72,0n-у	39,7k-к	83,3v-з	94,9z
	50	87,0s-з	83,6q-з	100,0z	83,3t-з	83,6w-з	56,6o-в

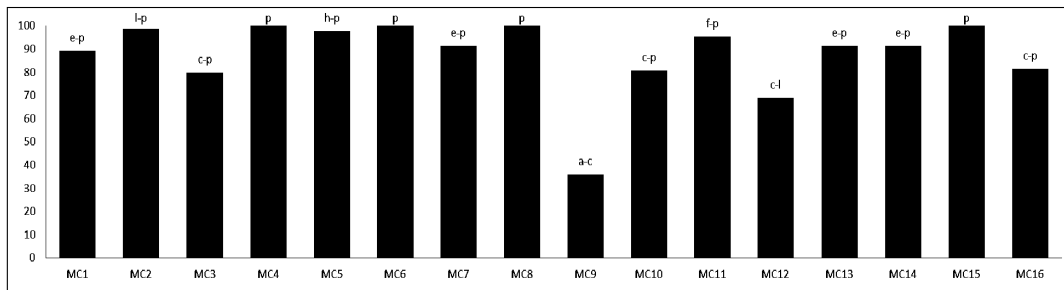
Примечание. 1. Частота каллусогенеза в вариантах гормонального состава и минеральной основы питательной среды, отсутствующих в таблице, равна 0,0а. 2. Варианты, отмеченные одинаковыми буквами, статистически незначимо отличаются по критерию Дункана ($\alpha = 0.05$).

Таким образом, процессы морфогенеза происходили преимущественно на средах $\frac{1}{2}$ МС.

В связи с тем, что частота стеблевого органогенеза у обоих сортов на всех типах эксплантов была довольно низкой, методику индукции соматического органогенеза у данных сортов нельзя считать достаточно эффективной. Поэтому был проведен эксперимент по индукции стеблевого органогенеза на питательной среде $\frac{1}{2}$ МС с добавлением регуляторов роста из сегментов узлов, которые по своей природе содержат меристематические ткани. Наибольшие показатели эффективности регенерации были получены на питательных средах, содержащих либо только БАП (МС1–4), либо только кинетин (МС5–8), а также сочетание кинетина и НУК (МС13–16) (рис. 3). Наименьшая частота органогенеза побегов была отмечена на средах МС9–12, содержащих в среде БАП в качестве цитокининового компонента и НУК в концентрациях 0,5–1,0 мг/л.



а



б

Рис. 3. Частота стеблевого органогенеза из узлов *Mentha pulegium* L. в зависимости от содержания регуляторов роста в составе питательной среды $\frac{1}{2}$ МС и генотипа: а — сорт Пеннироял; б — сорт Соня. Варианты, отмеченные одинаковыми буквами, статистически незначимо отличаются по критерию Дункана ($\alpha = 0,05$)

Выводы

1. Для стерилизации семян *Mentha pulegium* L. можно рекомендовать обработку 5%-ным раствором гипохлорита натрия в течение 15 мин.
2. Наибольшая частота каллусогенеза отмечена на средах, содержащих 0,5–1,0 мг/л БАП в сочетании с 0,5–1,0 мг/л НУК при $\frac{1}{2}$ МС.
3. Несмотря на достаточно высокую эффективность каллусогенеза, стеблевого органогенез на всех типах эксплантов идет с очень низкой частотой (от 1,2 до 10,8%), при этом в качестве минеральной основы лучше использовать $\frac{1}{2}$ МС. Для индукции корневого органогенеза можно использовать добавление в питательную среду 0,5–1 мг/л кинетина и 0,5–1 мг/л НУК.
4. В качестве альтернативного типа экспланта в экспериментах по клональному микроразмножению можно использовать сегменты узлов благодаря содержащимся в них меристематическим тканям. Эффективность стеблевого органогенеза в этом случае составляет от 61,8 до 100%.

Библиографический список

1. Бугаенко Л.А. Генетические и биотехнологические аспекты уточнения путей биосинтеза монотерпеноидов у мяты // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». Т. 23 (62). 2010. № 4. С. 66–71.

2. Бугара И.А., Бугара А.М. Морфологические и цитохимические исследования каллусных культур мяты // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». 2008. Т. 21 (60). № 1. С. 44–52.
3. Бугара И.А., Мальцева О.А. Получение каллусных культур *Mentha piperita* L. и их цитологическая характеристика при выращивании на питательных средах с различной концентрацией селена // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». Т. 24 (63). 2011. № 4. С. 17–23.
4. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Морфогенез в андроклинных каллусах злаков: цито-гистологические особенности // Успехи соврем. биологии. 2010. Т. 130. № 3. С. 247–257.
5. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир, 1975. 324 с.
6. Aftab K., Sial A.A. Phytomedicine New and old approach // Hamdard Medicus, 1999. P. 22–28.
7. Caissard J.C., Faure O., Jullien F., Colson M., Perrin A. A direct regeneration in vitro and transient GUS expression in *Mentha piperita* // Plant Cell Rep., 1996. Vol. 16. P. 67–70.
8. Halvorsen B.L., Carlsen M.H., Phillips K.M. et al. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in United States // Am J Clin Nutr, 2006. Vol. 84. P. 95–135.
9. Hori M. Antifeeding, settling inhibitory and toxic activities of labiate essential oils against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) // Appl. Entomol. Zoo., 1999. Vol. 34. P. 113–118.
10. Ka M.-H., Choi E.H., Chun H.-S., Lee K.-G. Antioxidative Activity of Volatile Extracts Isolated from *Angelica tenuissima* roots, Peppermint Leaves, Pine Needles, and Sweet Flag Leaves // J. Agric. Food Chem., 2005. Vol. 53. P. 4124–4129.
11. McConkey M.E., Gershenson J., Croteau R. Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint // Plant Physiol., 2000. Vol. 122. P. 215–223.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant, 1962. Vol. 15. P. 473–497.
13. Pooviaiah C.R., Stephen R.W.C., Matthew J. A In vitro adventitious shoot regeneration of native spearmint using internodal explants // Hort. Sci., 2006. Vol. 41. P. 414–417.
14. Rech E.L., Pires M.J.P. Tissue culture propagation of *Mentha* sp. by the use of axillary buds // Plant Cell Rep., 1986. Vol. 5. P. 17–18.
15. Reed B.M. In vitro storage conditions for mint germplasm // Hort. Sci., 1999. Vol. 34. P. 350–352.
16. Samantaray A., Sial P., Kar M. Micro-propagation and biochemical analysis of Spear Mint (*Mentha spicata*). Indian J Innov Dev, 2012. Vol. 1. P. 489–493.
17. Samarth R.M., Panwar M., Kumar M., Kumar A. Protective Effects of *Mentha piperita* Linnon Benzo[a]-pyrene-induced Lung Carcinogenicity and Mutagenicity in Swiss Albino Mice Protection of Swiss Albino Mice Against Whole-Body Gamma Irradiation by *Mentha piperita* (Linn) // Mutagenesis, 2006. Vol. 21(1). P. 61–66.
18. Sarwar S., Zia M. Riaz-ur-Rehman, Fatima Z., Sial R.A., Chaudhary M.F. In vitro direct regeneration in mint from different explants on half strength MS medium // African Journal of Biotechnology, 2009. Vol. 8(18). P. 4667–4671.
19. Sato H., Enomoto S., Oka S., Hosomi K., Ito Y. Plant regeneration from protoplasts of peppermint (*Mentha piperita* L.) // Plant Cell Rep., 1993. Vol. 12. P. 546–550.
20. Xu Y., Wei Lin L., Cheng Yuan L., Yan L. Induction and multiplication of leaf callus from two cultivars of *Mentha haplocalyx*. J Plant Resour Environ, 2009, Vol. 18. P. 84–88.

INTRODUCTION OF SOMATIC ORGANOGENESIS FROM DIFFERENT EXPLANT KINDS OF PENNYROYAL (*MENTHA PULEGIUM* L.)

M.M. MOUBARAK¹, R.O. NOVAKOVSKIY¹, E.N. BARANOVA², M.YU. CHEREDNICHENKO¹

¹ Russian Timiryazev State Agrarian University,

² All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology of RAS)

European pennyroyal (Mentha pulegium L.) is the source of essential oils and natural antioxidants. The main component of the essential oil is pulegone. In the last years plant tissue culture techniques have appeared as a strong tool for the micropropagation and plant breeding of many species.

The aim of this research was to develop technology cultivation in vitro of two varieties of European pennyroyal (Pennyroyal and Sonia) and the possibility of callus induction and somatic shoot organogenesis from different explants. The results showed that the best response for seeds sterilization was to treatment with 5% sodium hypochlorite for 15 minutes. Murashige and Skoog (MS) basal medium was used for morphogenesis induction. The highest frequency of callus formation was revealed on ½ MS media containing 0.5–1.0 mg/l of BAP with 0.5–1.0 mg/l NAA. The callus tissue from stem and leaf segments were histologically studied. Shoot organogenesis has very low frequency from all explants (1.2 to 10.8%), moreover, it is better to use ½ MS medium. Furthermore, nodes showed very high shoot organogenesis efficiency (61.8–100%). Also, for the induction of root organogenesis the ½ MS nutrient medium supplemented with 1–0.5 mg/l kinetin and 1–0.5 mg/l NAA was used.

Key words: European pennyroyal (Mentha pulegium L.), in vitro, antioxidants, essential oils, morphogenesis, callusogenesis, somatic shoot organogenesis.

Мубарак Манна Мабрук — асп. кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Россия, Москва, Тимирязевская ул., 49; e-mail: drmaneea1981@hotmail.com).

Новаковский Роман Олегович — студ. кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Россия, Москва, Тимирязевская ул., 49; e-mail: Olegovich47@mail.ru).

Баранова Екатерина Николаевна — к. б. н., вед. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (127550, Россия, Москва, Тимирязевская ул., 42; e-mail: greenpro2007@rambler.ru).

Чередниченко Михаил Юрьевич — к. б. н., доц. кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Россия, Москва, Тимирязевская ул., 49; e-mail: michael.tsch@gmail.com).

Moubarak Maneea Mabrouk — PhD-student of the Department of Genetics, Biotechnology, Breeding and Seed Production, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49; e-mail: drmaneea1981@hotmail.com).

Novakovsky Roman Olegovich — student of the Department of Genetics, Biotechnology, Breeding and Seed Production, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49; e-mail: Olegovich47@mail.ru).

Baranova Ekaterina Nikolaevna — senior scientific worker, Laboratory of Cell Biology, PhD in Biology, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 42; e-mail: greenpro2007@rambler.ru).

Cherednichenko Mikhail Yuryevich — PhD in Biology, Associate Professor of the Department of Genetics, Biotechnology, Breeding and Seed Production, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49; e-mail: michael.tsch@gmail.com).