

УДК 581.1:633.81

ДЛИТЕЛЬНОЕ ПАССИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК *Melissa officinalis* L.

© 2024 г. Н. А. Егорова^{а, *}, О. В. Якимова^а, И. В. Белова^а^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки “Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма”, Симферополь, Россия

*e-mail: yegorova.na@mail.ru

Поступила в редакцию 19.01.2024

После доработки 22.02.2024

Принята к публикации 29.02.2024

Изучены морфологические, цитофизиологические и биохимические (образование фенольных соединений) характеристики популяции каллусных культур клеток Melissa лекарственной (*Melissa officinalis* L.) – ценного лекарственного и эфиромасличного растения. Каллусные культуры получены из эксплантов гипокотилей и семядолей проростков *in vitro* и выращивались более полутора лет (19 пассажей культивирования). Установлено, что в течение первых семи пассажей прирост массы каллуса существенно не различался, однако при дальнейшем субкультивировании интенсивность роста культур (масса каллуса к концу цикла выращивания) повышалась. Максимальный прирост каллуса отмечен в 17–19 пассажах – ростовые индексы каллусов, иницированных из семядолей и гипокотилей, достигли 13.7 и 11.5 соответственно, что в 3.0–3.4 раза выше, чем в первых циклах выращивания культур. Полученные данные свидетельствуют о возможности длительного субкультивирования каллусных культур клеток Melissa, в процессе которого происходит автоселекция клеток по признаку интенсивности роста. Впервые для культур клеток *M. officinalis* определена динамика прироста каллуса, плотности и жизнеспособности клеточной популяции, а также соотношения различных типов клеток в цикле выращивания культуры. Установлена продолжительность основных фаз роста клеточной популяции: лаг-фаза – с 1 по 6 сут.; фаза ускорения роста – с 6 по 10 сут. Экспоненциальная фаза роста проходила с 10 по 14 сут. и характеризовалась высокой удельной скоростью роста $\mu = 0.21 \text{ сут.}^{-1}$ с 14 по 20 сут. зафиксирована фаза замедления роста культуры ($\mu = 0.05 \text{ сут.}^{-1}$), которая сменилась фазой линейного роста (20–30 сут., $\mu = 0.08 \text{ сут.}^{-1}$) и стационарной фазой (30–40 сут. ростового цикла). Таким образом, установлен “ступенчатый” характер роста культур, что может быть обусловлено наличием в культуре субпопуляций клеток с разной интенсивностью роста. При первичном скрининге в каллусах листового происхождения выявлены флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты в количествах, сопоставимых с листьями интактных растений, что свидетельствует о сохранении у клеток *in vitro* способности образования вторичных метаболитов и перспективности проведения дальнейших исследований в этом направлении.

Ключевые слова: *Melissa officinalis*, *in vitro*, каллусная культура, пассаж, фенольные соединения, цитофизиологические параметры, цикл роста

DOI: 10.31857/S0015330324040068, EDN: MNXDTW

ВВЕДЕНИЕ

Мелисса лекарственная (*Melissa officinalis* L.) – широко известное многолетнее эфиромасличное, лекарственное и пряно-ароматическое растение семейства *Lamiaceae*, которое произрастает в странах Средиземноморья, Центральной и Южной Европы, Северной Америки, Западной Азии, а также во многих регионах России [1, 2]. Из его сырья получают одно из самых дорогих эфирных масел (содержащих цитронеллаль, цитронеллол, нераль, гераниаль, линалоол и др.), а также CO₂-экстракт, в состав которого входят терпеноиды, жирные кисло-

ты, витамин Е, фитостерины и другие вещества [3, с. 69–70]. В надземных органах *M. officinalis* содержатся многие фенольные соединения, в том числе розмариновая кислота, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества и кумарины. Продукты переработки мелиссы обладают антиоксидантными, противовирусными, спазмолитическими, иммуномодулирующими и антимикробными свойствами и широко используются в медицине для лечения неврозов, ишемической болезни сердца, дерматитов, гастритов, атеросклероза, гипертонической и других болезней [4, 5].

Биотехнологические исследования этого ценного вида растения достаточно разнообразны и чаще всего направлены на разработку методик клонального микроразмножения *in vitro* [6–8]. Изучению процессов каллусогенеза посвящено очень мало работ, в основном они касаются оптимизации питательных сред и эксплантов для индукции каллуса или непрямого морфогенеза [9–11]. Значительное внимание исследователей привлекает анализ некоторых вторичных метаболитов, обычно извлекаемых из побегов, полученных при микроразмножении *in vitro*. В частности, имеются данные о накоплении в культивируемых микропобегах *M. officinalis* компонентов эфирного масла [12], флавоноидов и розмариновой кислоты [13, 14]. Есть сведения о синтезе некоторых фенольных соединений в зависимости от происхождения каллусов Melissa [15, 16].

Одним из основных этапов при разработке многих клеточных технологий растений (как получения исходного селекционного материала на основе соматоклональной изменчивости, так и биосинтеза вторичных метаболитов в каллусных или суспензионных культурах) является оптимизация условий для индукции и длительного пассирования каллусов с хорошей пролиферацией [17–19]. В ходе культивирования каллуса происходит адаптация клеток к условиям *in vitro*, формирование новых биологических систем и клеточных популяций, клетки которых начинают выполнять функции целых организмов, повышается генетическая гетерогенность каллусных клеток, а также ряд других процессов [20, 21]. Это обуславливает целесообразность изучения закономерностей роста и цитофизиологических изменений, происходящих в каллусных культурах за цикл выращивания. Подобные исследования позволяют не только расширить представления о закономерностях каллусогенеза, но и уточнить методические вопросы культивирования каллуса (например, определить оптимальную длительность цикла выращивания или сроки проведения обработок при клеточной селекции).

Цель работы – изучение ростовых и биосинтетических особенностей длительно пассируемых каллусных культур *M. officinalis* и определение некоторых цитофизиологических характеристик популяции каллусных клеток в цикле выращивания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали интактные растения Melissa лекарственной (*Melissa officinalis* L.) сорта Цитронелла, выращенные в условиях закрытого грунта, а также каллусы, индуцированные из листьев растений (выращенных

в условиях закрытого грунта) или органов стебильных проростков, полученных из семян в условиях *in vitro*.

Для введения в асептическую культуру в качестве эксплантов использовали высечки листовых пластинок (5 × 5 мм) донорных растений, а также сегменты гипокотилей и семядолей (4 × 5 мм) проростков *in vitro*. Исходный растительный материал (листья, семена) предварительно промывали в мыльном растворе 20 мин, ополаскивали в проточной воде 5–7 мин, а затем стерилизовали в течение 1 мин в 70% этаноле и 6 мин в 50% растворе препарата Бродофен 10Н (Florin, Венгрия) и трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Все работы по введению в культуру и пассированию каллусов выполняли в условиях ламинарного бокса БАВ-нп-01-“Ламинар-С”-1,2 (Lamsystems, Россия).

При введении в культуру *in vitro* и пассировании каллусов использовали ранее оптимизированную для Melissa [22] модификацию питательной МС-среды, содержащую 1.0 мг/л 2,4-Дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) (Sigma-Aldrich, США). Экспланты и каллусные ткани культивировали в закрытых ватно-марлевыми пробками пробирках (150 × 16 мм), содержащих 10 мл питательной среды. Культивирование осуществляли при температуре 26° ± 2°С, относительной влажности воздуха 70%, освещении 2–3 клк и продолжительности фотопериода 16 ч.

Пересадку каллусов на свежую питательную среду проводили в асептических условиях, при этом масса каллусного транспланта составляла 80–90 мг. Продолжительность цикла выращивания каллусных культур была 30–35 сут. В процессе культивирования проводили визуальный анализ развития каллусов. В конце цикла выращивания оценивали интенсивность роста каллуса весовым методом – определяли массу сырого каллуса путем его взвешивания. Индекс роста каллуса (I) определяли по формуле [23]:

$$I = (X_{\max} - X_0) / X_0,$$

где X_0 и X_{\max} – масса каллуса в начале цикла выращивания (масса транспланта) и максимальное ее значение в конце цикла (30–35 сут.) соответственно.

Для исследования цитофизиологических характеристик использовали каллусы девятого пассажа, полученные из эксплантов гипокотилей. Анализ цитофизиологических параметров популяции каллусных клеток в цикле выращивания проводили на 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45 сут. культивирования. Массу сырого каллуса оценивали на основании взвешивания не менее 20 индивидуальных каллусов. Удельную скорость роста (μ) определяли по формуле [23]:

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1),$$

где X_2 и X_1 — значение критерия роста (сырая масса клеток) в момент времени t_2 и t_1 соответственно.

Плотность каллуса (количество клеток на 1 мг сырой массы) определяли в 6-кратной повторности путем подсчета клеток в камере Фукса–Розенталя (Мини-Мед, Россия) после мацерации 100 мг каллуса в 20% хромовой кислоте при 60°C в термостате ТВЗ-25 (Медлабор-техника, Украина). Жизнеспособность клеток оценивали после окраски 0.5% метиленовым синим [23]. Цитологические препараты анализировали под микроскопом БИОЛАМ И (ЛОМО, Россия). В каждом варианте анализировали 500 клеток в 3-кратной повторности. При цитологическом анализе соотношения разных типов клеток на препаратах после окраски ацетокармином, приготовленном при использовании кармина (Merck, Германия), подсчитывали по 100 клеток в 10-кратной повторности. Выделяли несколько морфологических типов клеток: меристемо- и паренхимоподобные клетки, среди которых выделили три типа — округлые, гигантские и удлиненные.

Определение общих фенольных соединений, дубильных веществ и суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот проводили титриметрическим методом (модификация двух методов: метода Левенталя [24] и способа определения полифенолов по фракциям [25]). Для анализа использовали листья интактных растений и каллус листового происхождения первого пассажа, высушенные до 9–12% влажности. Навеску растительного материала (2 г) экстрагировали горячей дистиллированной водой на водяной бане 5drops-2S (Tianjin City Taisite Instrument CO. LTD, Китай) в течение 30 мин. Экстракт охлаждали, отфильтровывали и отбирали для анализа 10 мл (аликвота), добавляли 750 мл дистиллированной воды и 25 мл раствора индигокармина (РМ Инжиниринг, Россия). Полученную смесь титровали 0.1 N раствором перманганата калия до окрашивания в золотисто-желтый цвет. В контроле аликвотную часть раствора заменяли дистиллированной водой. Содержание полифенольных соединений определяли согласно рекомендациям [25].

Дубильные вещества дополнительно осаждали с помощью 5% раствора желатина, охлаждали 2 сут. при температуре 3–4°C в холодильнике ХЛ-340 (POZIS, Россия). Полученный раствор центрифугировали на центрифуге (TAGLER CM-12, Россия) при 3000 об./мин. в течение 5 мин. Затем отбирали фильтрат, в котором определяли суммарное содержание флавоноидов и фенолкарбоновых кислот титрованием перманганатом калия. Количество дубильных веществ рассчитывали по разнице между содер-

жанием полифенолов и суммарным содержанием флавоноидов и фенолкарбоновых кислот.

Статистическую обработку данных проводили согласно стандартным методам, с использованием пакета программ Microsoft Office (Excel 2010). На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке многих клеточных технологий одним из необходимых этапов является оптимизация условий для длительного пассирования каллусных культур и анализ морфо-физиологических параметров их роста. Ранее в наших исследованиях была подобрана питательная среда для индукции и пассирования каллусов из разных типов эксплантов мелиссы — сегментов органов интактных растений, а также асептических проростков, полученных из семян в условиях *in vitro* [22]. При культивировании на этой среде сегментов гипокотилей и семядольных листьев были получены каллусы, которые имели светло-бежевую окраску и плотную консистенцию с небольшими рыхлыми участками (рис. 1а, б), а из эксплантов листа растений — каллусы бежево-зеленой окраски и более плотной консистенции (рис. 1в).

Для каллусных культур мелиссы, полученных из гипокотилей и семядолей, проведен анализ пролиферации каллусов при длительном субкультивировании на протяжении 19 пассажей (рис. 2). В процессе выращивания культур отмечено, что каллусы из разных типов эксплантов в процессе длительного пассирования становились более рыхлыми. Установлено, что в течение первых семи пассажей прирост каллуса существенно не различался. Ростовой индекс при этом не превышал 4.3–4.6, а масса каллуса — 500–550 мг. Начиная с 9-го пассажа, выявлено достоверное увеличение массы каллуса из гипокотилей по сравнению с каллусом, полученным из семядолей. Следует отметить, что в каждом последующем пассаже масса каллусов (в конце цикла выращивания), полученных из разных типов эксплантов, повышалась, а максимальный прирост массы каллусной ткани отмечен в 17–19 пассажах. Ростовой индекс каллусных культур из семядолей и гипокотилей в этот период достигли 13.7 и 11.5 соответственно, что почти в 3.0–3.4 раза выше, чем в 1–7 пассажах. Такое повышение ростовой активности каллусных культур мелиссы, по-видимому, является следствием автоселекции хорошо растущих каллусных линий в пересадочной культуре и оптимальным сочетанием факторов культивирования, способствующим их успешной адаптации

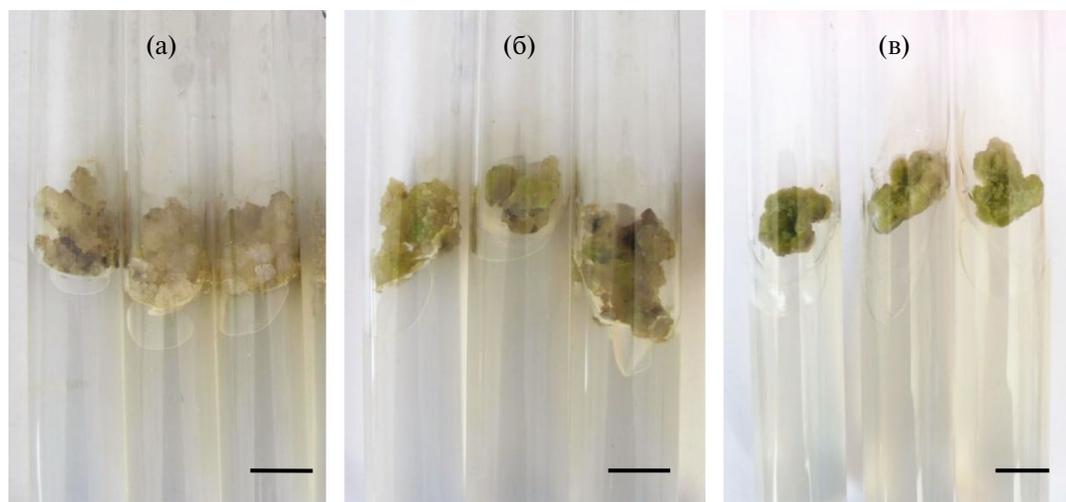


Рис. 1. Каллусные культуры *M. officinalis*, полученные из эксплантов: а – гипокотили (9 пассаж); б – семядоли (9 пассаж); в – листа (1 пассаж). Масштаб: 10 мм.

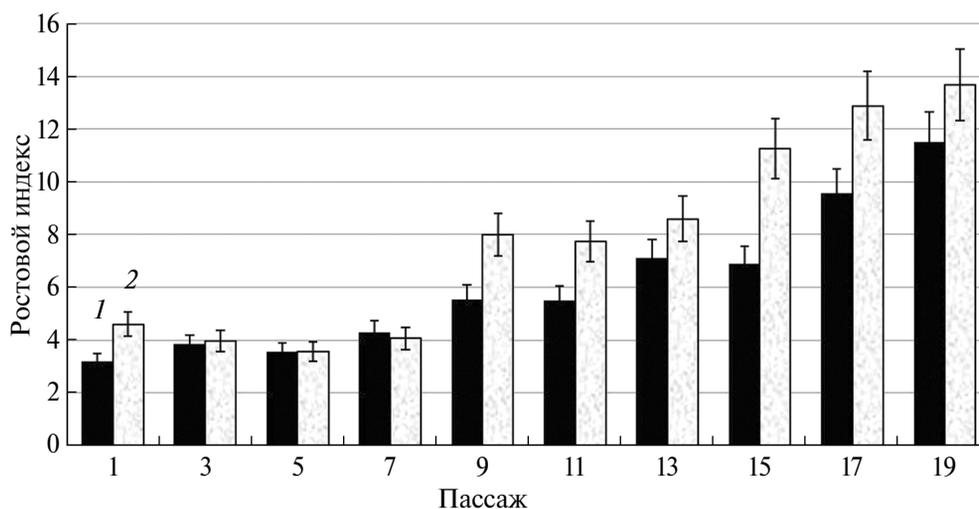


Рис. 2. Влияние пассажа и типа экспланта на прирост каллуса *M. officinalis* при его длительном культивировании. 1 – эксплант семядоли; 2 – эксплант гипокотили.

к используемым условиям выращивания *in vitro*. Это свидетельствует о возможности длительного (как минимум, в течение двух лет) пассирования каллусов мелиссы, а также отбора клеток по интенсивности роста, который происходит “скачкообразно” – после 7-го цикла выращивания. Из данных литературы для некоторых видов растений отмечалось, что основные изменения в пассируемых каллусных культурах происходят до 8–12 пассажей [20, с. 259–266]. В частности, улучшение роста каллусных культур при их длительном субкультивировании было выявлено у *Alhagi persarum* [26]. В.А. Кунах [20, с. 262–266] при анализе изменчивости прироста массы каллусов разных штаммов более десятка видов растений выделил пять основных типов роста.

При этом у штаммов 1 типа не наблюдалось существенных изменений роста в течение 24–40 пассажей, тогда как у 2–4 типов изменчивости прироста биомассы в процессе формирования клеточных штаммов происходило снижение биомассы после 1–2 пассажей, а затем повышение этого параметра с различной динамикой в ходе пассажей. Судя по полученным нами экспериментальным результатам, каллусные культуры мелиссы отличались от описанных типов, так как в течение 1–7 пассажей у каллусов из гипокотили изменений не наблюдали, а у каллусных культур, полученных из семядолей, происходило незначительное повышение ростового индекса. Дальнейшее существенное повышение прироста биомассы в течение изученных 19 пас-

сажей свидетельствует о продолжении процесса формирования штаммов с высокой пролиферативной активностью.

Для исследования динамики цитофизиологических параметров в цикле выращивания каллусной культуры мелиссы использовали каллус 9 пассажа, полученный из эксплантов гипокотилей, поскольку, начиная с этого пассажа, был отмечен более активный рост каллусных культур клеток мелиссы. Проведенный цитологический анализ каллусной культуры позволил выделить несколько морфологических типов клеток – меристемоподобные (мелкие, округлые, с крупным занимающим значительную часть клетки ядром, хорошо окрашиваемой цитоплазмой и соотношением “ширина : длина” менее 1 : 2) (рис. 3а) и паренхимоподобные, среди которых выделили три типа – округлые (небольшого размера и соотношением длины и ширины 1 : 1 или 1 : 2) (рис. 3б), гигантские (овальной или грушевидной формы, превышающие в 2–5 раз округлые) (рис. 3г) и удлинённые (у которых длина в несколько раз превышала ширину) (рис. 3в). Паренхимоподобные клетки отличались от меристемоподобных, прежде всего, более мелким ядром по сравнению с размером клетки, которое часто (особенно у гигантских и удлинённых клеток) располагалось у клеточной стенки. У клеток паренхимоподобного типа отмечали одну большую или несколько мелких вакуолей, что особенно характерно для гигантских клеток. Выделение таких типов клеток обусловлено разнообразием анализируемой популяции каллусных клеток мелиссы и возможностью более детального анализа происходящих в ходе культивирования процессов.

Данные об изменении массы и плотности каллуса, жизнеспособности клеточной популяции и соотношения разных типов клеток на протяжении 45 сут. культивирования представлены на рис. 4–7. Кривые роста массы каллуса представлены в обычной (рис. 4) и полулогарифмической системе координат (рис. 5), что позволяет более точно определить динамику изменения

ростовых характеристик и выделить фазы роста в цикле выращивания.

Установлено, что изменение массы каллуса в течение цикла выращивания в целом характеризовалось достаточно типичной S-образной кривой (рис. 4, 5). При этом отмечали более чем 8-кратное увеличение этого параметра за месяц культивирования. Такое накопление биомассы каллуса у мелиссы не очень значительно, хотя, как указывалось выше, при более длительном субкультивировании ростовой индекс каллуса повышался. Для некоторых эфиромасличных и лекарственных видов растений также сообщалось об относительно слабом приросте каллусных культур в течение пассажа, в частности, у каллусных культур *Foeniculum vulgare* ростовой индекс достигал всего 3.8 [27, с. 222–225], а у *Sutherlandia frutescens* – 5.9 [28]. Однако у некоторых видов выявлен более интенсивный рост каллуса – так, за цикл выращивания масса каллусной ткани у розы эфиромасличной увеличилась в 17 раз, у лаванды – в 18 раз, а у аниса – более чем в 40 раз [27, с. 71–243].

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что в исследуемом цикле выращивания в течение первых шести суток культивирования масса каллуса достоверно не увеличилась, отсутствовал видимый рост клеток, что соответствует лаг-фазе ростового цикла. В первые 2–3 сут. этого периода жизнеспособность клеточной популяции снизилась до 37.5% (рис. 4), что, вероятно, связано со стрессовым и/или травматическим действием пересадки и адаптацией популяции каллусных клеток. Следует отметить, что в течение первых шести суток плотность каллуса была минимальной – около 2000 клеток/мг, что почти в 2 раза меньше, чем при последующем культивировании (рис. 6), что обусловлено максимальным числом более крупных паренхимоподобных клеток и, следовательно, их меньшим числом на мг каллуса (рис. 7).

На 8 сут. культивирования отмечено достоверное увеличение массы каллуса – до 110 мг. Период с 8 по 10 сут., по-видимому, можно

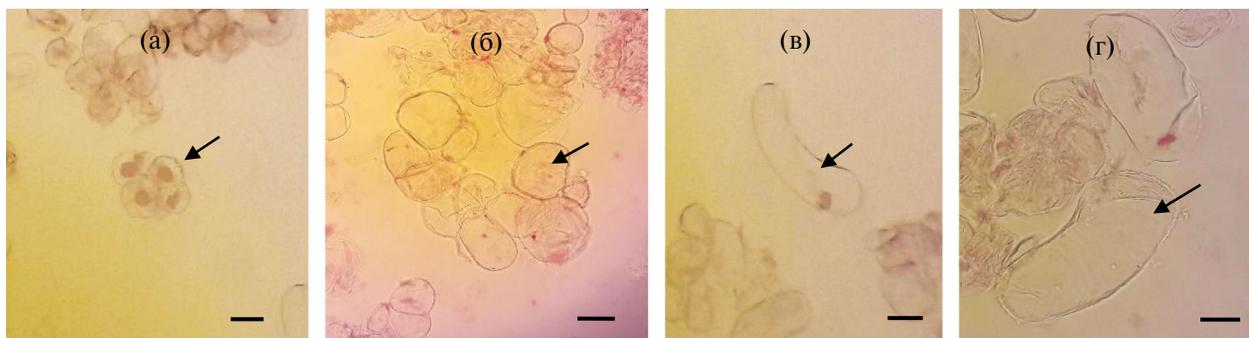


Рис. 3. Типы клеток в каллусной культуре *M. officinalis* – меристемоподобные (а) и паренхимоподобные клетки: округлые (б), удлинённые (в), гигантские (г). Масштаб: 50 мкм.

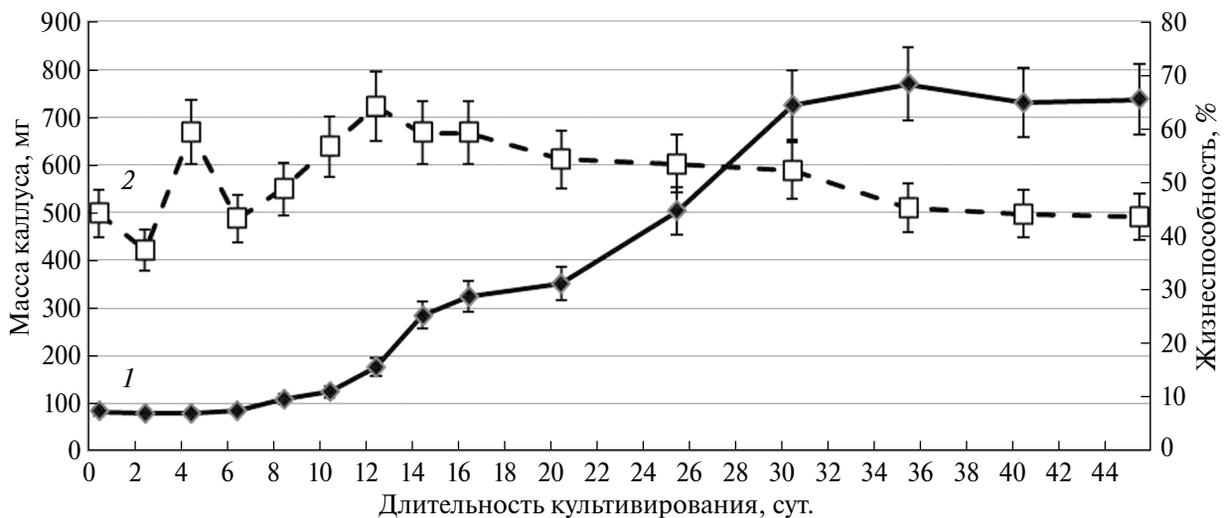


Рис. 4. Динамика изменения массы каллуса и жизнеспособности клеточной популяции в цикле выращивания каллусной культуры *M. officinalis*. 1 – масса каллуса; 2 – жизнеспособность.

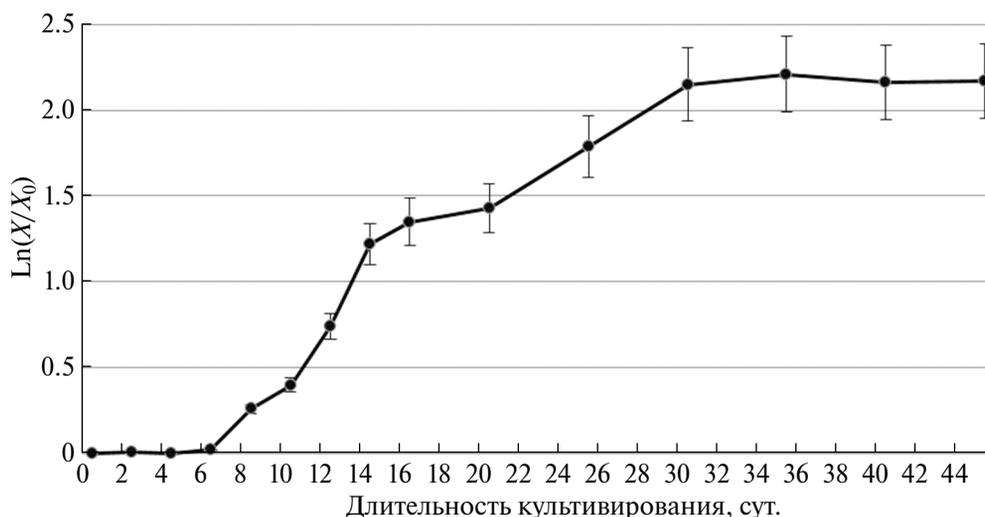


Рис. 5. Динамика изменения массы каллуса в цикле выращивания каллусной культуры *M. officinalis* в полулогарифмической системе координат.

выделить как фазу ускорения роста, когда наблюдался незначительный прирост каллуса (до 125 мг). Начиная с 10 сут., популяция каллусных клеток вступила в экспоненциальную (логарифмическую) фазу роста, которая продолжалась до 14 сут. В этот период жизнеспособность клеточной популяции возрастала, и к 12 сут. культивирования достигла максимального значения 64.2% (рис. 4). При этом происходило интенсивное деление клеток, о чем свидетельствует повышение количества меристемоподобных клеток и плотности каллуса за счет увеличения числа клеток на единицу массы. На 12–16 сут. культивирования выявлено максимальное содержание клеток меристематического типа (до 54.1%) в каллусной ткани (рис. 7). В экспоненциальной фазе также отмечена максимальная плотность

клеточной популяции, которая составила более 5000 клеток/мг (рис. 6).

Необходимо отметить “ступенчатый” характер роста каллусной культуры мелиссы – активный экспоненциальный рост с 10 по 14 сут. (линейный участок графика в полулогарифмической системе координат: удельная скорость роста $\mu = 0.21 \text{ сут.}^{-1}$), затем наблюдали замедление роста с 14 по 20 сут. ($\mu = 0.05 \text{ сут.}^{-1}$) и последующую активацию роста с 20 по 30 сут. ($\mu = 0.08 \text{ сут.}^{-1}$). Исходя из данных литературы, такой “ступенчатый” характер роста культуры может быть обусловлен наличием в них субпопуляций клеток с разной интенсивностью роста. Можно предположить наличие как минимум двух клеточных субпопуляций (линий) с разной скоростью пролиферации, что привело к фор-

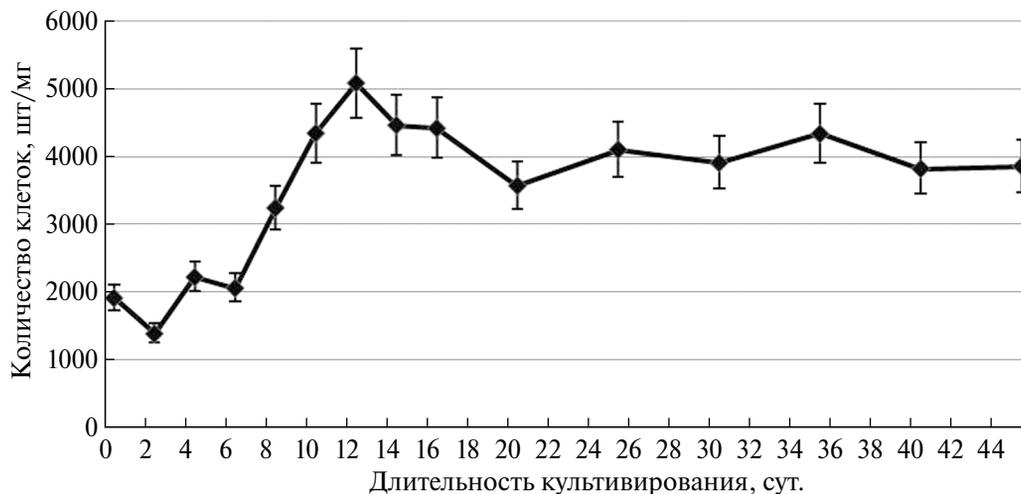


Рис. 6. Динамика изменения плотности каллуса в цикле выращивания каллусной культуры *M. officinalis*.

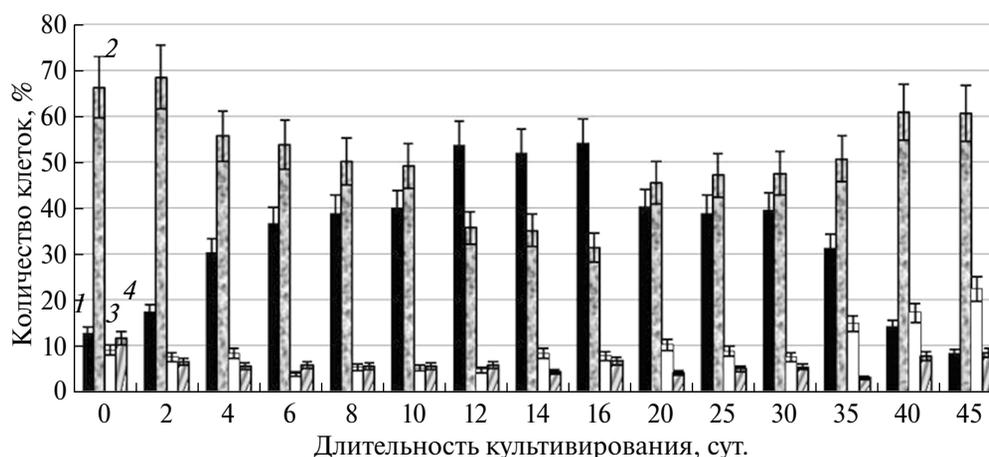


Рис. 7. Динамика изменения соотношения различных типов клеток в цикле выращивания каллусной культуры *M. officinalis*. 1 – меристемоподобные; 2 – округлые паренхимоподобные; 3 – гигантские паренхимоподобные; 4 – удлиненные паренхимоподобные.

мированию сложной кривой динамики роста, поскольку экспоненциальная фаза одной популяции может накладываться на линейную другой. Отбор в популяциях изолированных клеток в условиях *in vitro* основан на их высокой генетической вариабельности и различных темпах роста, приводящих по мере культивирования к разному соотношению вариантов с различной пролиферативной активностью [20, с. 231–338]. В качестве примера можно привести анализ прироста сухой биомассы в цикле выращивания миксоплоидного каллусного штамма АЕ-3 *Arnebia euchroma*, у которой также отмечали два выхода на плато на кривой роста (5–9 и 14–16 сут.) [20, с. 493–495].

Период с 20 по 30 сут. культивирования соответствовал линейной фазе роста клеточной популяции, когда скорость роста постоянна. В этот период масса каллуса увеличивалась более чем в 2 раза (с 350 до 720 мг). Прирост массы кал-

луса происходил, по-видимому, в основном за счет растяжения клеток, о чем свидетельствует снижение плотности клеточной популяции (до 3600–4100 кл./мг). К концу данной фазы количество меристемоподобных клеток уменьшилось в 1.4 раза (39.5%) и, соответственно, увеличилось до 47.6% число более крупных паренхимоподобных округлых клеток (рис. 7).

На 30–35 сут. культивирования происходил переход клеточной популяции в стационарную фазу роста. Судя по представленным данным, прекращался достоверный прирост массы каллуса, жизнеспособность клеточной популяции снизилась до 43.7% (рис. 4). К 45 сут. культивирования число клеток меристематического типа снизилось до 8.4% и возросло количество паренхимоподобных клеток (округлых – до 60.7%; гигантских – до 22.4%, удлиненных – до 8.5%). Аналогичные закономерности в конце цикла выращивания каллуса отмечали и у других видов

растений — *Lavandula angustifolia*, *Coriandrum sativum*, *Foeniculum vulgare*, *Anisum vulgare.*, *Rosa* spp. [27, с. 71–243], *Artemisia dracuncululus* [29].

Таким образом, на основе сопоставления изученных цитофизиологических параметров каллусной ткани Melissa определена продолжительность основных фаз развития клеточной популяции: лаг-фаза – с 1 по 6 сут.; 8–10 сут. – фаза ускорения роста; экспоненциальная фаза с 10 по 14 сут., замедление роста – “ступенька” (14–20 сут.), линейная – 20–30 сут. и стационарная фаза – 30–40 сут. ростового цикла.

Судя по имеющимся литературным данным, продолжительность фаз ростового цикла существенно варьирует у разных видов эфиромасличных и лекарственных растений. Так, у аниса обыкновенного и лаванды узколистной латентная фаза была в пределах 1–3 сут., тогда как у фенхеля обыкновенного она составила 12–14 сут. Стационарная фаза роста наступала у лаванды узколистной на 26–30 сут., у фенхеля обыкновенного – на 45–50 сут. культивирования [27, с. 71–243], у унгернии Виктора – на 50–60 сут., а у раувольфии змеиной только на 60–70 сут. [20, с. 412–606]. Отмечены отличия и в структуре клеточных популяций, в частности, минимальное количество гигантских клеток выявлено у розы эфиромасличной (до 10%), тогда как в каллусе герани эфиромасличной число таких клеток достигало 42% [27, с. 164–193]. У Melissa, как показали наши исследования, число гигантских паренхимоподобных клеток не превышало 18–22% в конце цикла выращивания.

Выявленные у Melissa лекарственной закономерности позволяют обосновать оптимальную длительность цикла выращивания, а также определить подходящую фазу роста для обработки каллусов различными соединениями или стрессорами при разработке методик мутагенеза *in vitro* или клеточной селекции на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам с целью получения резистентных соматклонов. Вместе с тем каллусные культуры могут использоваться не только в клеточных

технологиях, позволяющих индуцировать растения-регенеранты и на их основе создавать новые сорта, но и, возможно, в биотехнологии получения вторичных метаболитов *in vitro*. В доступных литературных источниках сведения о накоплении фенольных соединений в каллусных культурах Melissa очень немногочисленны, при этом авторы анализировали каллусы из сегментов стебля и не проводили сравнения с исходными растениями [15, 16]. Для определения целесообразности исследований такого рода мы провели первичный скрининг каллусных культур Melissa на наличие фенольных соединений (табл. 1). Для этого использовали каллусы, полученные из эксплантов листьев, поскольку известно, что синтез вторичных метаболитов *in vitro* обычно наблюдается в культурах, полученных из тех органов, в которых они накапливаются в интактных растениях [20, с. 410–616; 30]. В своих экспериментах мы отбирали культуры в стационарной фазе роста, которая у Melissa приходится на 30–40 сут. цикла выращивания. Выбор этого периода обусловлен имеющимися литературными данными о разобщенности во времени процессов роста в клеточной популяции и биосинтеза вторичных метаболитов, в связи с чем их максимальное содержание чаще обнаруживается в стационарной фазе [17, 20 с. 410–615; 31]. В результате проведенного анализа в каллусах Melissa были обнаружены фенольные соединения, причем их общее содержание (2.7%) было в 3.7 раза меньше, чем в листьях растений (9.8%). При этом дубильных веществ в культурах *in vitro* не выявлено, хотя в листьях показано их присутствие. Однако по сумме флавоноидов и фенолкарбоновых кислот образцы из листьев растений и каллусов достоверно не отличались (соответственно, 3.4 и 2.7%).

Полученные данные вполне согласуются с отмечаемыми многими исследователями фактами о том, что в клеточных культурах растений происходит синтез лишь некоторых, а иногда и не характерных для данного вида растения соединений, причем, как правило, в меньших ко-

Таблица 1. Содержание фенольных соединений в листьях и каллусных культурах *M. officinalis*

| Растительный материал | Общее содержание фенольных соединений, % | Сумма флавоноидов и фенолкарбоновых кислот, % | Содержание дубильных веществ, % |
|-----------------------------|--|---|---------------------------------|
| Листья исходных растений | 9.79 ± 0.31 | 3.43 ± 0.36 | 6.36 ± 0.06 |
| Каллусы из эксплантов листа | 2.67 ± 0.32 | 2.67 ± 0.32 | 0 |

личествах [17, 20, 30]. Единичные литературные сведения о накоплении фенольных соединений в каллусных или суспензионных культурах мелиссы лекарственной в основном посвящены анализу влияния состава питательной среды на их синтез. Так, Topdemir с соавт. [15] выявили в каллусе, индуцированном из узловых эксплантов *M. officinalis*, максимальное количество суммы фенольных соединений на питательной среде с 1.5 мг/л 2,4-Д и 0.5 мг/л БАП. В другом исследовании в каллусной культуре из сегментов стебля проростков (полученных из семян *in vitro*) мелиссы было показано наличие простых фенолов и флавоноидов, содержание которых повышалось при введении в питательную среду 300 мМ нитрата кадмия [16]. В нашей работе у *M. officinalis* впервые в каллусных культурах, полученных из листовых эксплантов, выявлены фенольные соединения в количествах, близких к их содержанию в интактных растениях. Это свидетельствует о перспективности проведения дальнейших более детальных исследований по изучению биосинтеза вторичных соединений у этого ценного лекарственного и эфиромасличного растения.

Таким образом, в результате проведенных экспериментальных работ изучены длительно выращиваемые каллусные культуры мелиссы лекарственной и показано увеличение интенсивности роста каллусной культуры клеток после 9-го пассажа, которая постоянно повышалась в течение последующих 10 пассажей. Ростовые индексы каллусных культур, полученных из эксплантов семядолей и гипокотилей, достигали в этих пассажах 13.7 и 11.5 соответственно, что почти в 3.0–3.4 раза выше, чем в начальных 1–7-м пассажах. Впервые установлены особенности и продолжительность основных фаз роста популяции каллусных клеток в цикле выращивания. Показано, что цикл выращивания каллусной культуры мелиссы составляет 30–40 сут. Полученные нами данные свидетельствуют о возможности длительного (не менее двух лет) субкультивирования каллусных культур мелиссы. При первичном скрининге в каллусах *M. officinalis* листового происхождения выявлено накопление флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в количествах, сопоставимых с листьями интактных растений.

Работа выполнена в рамках государственного задания № FNZW-2022-0008 (122101300035-2) при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prawal Pratap Singh Verma, Anand Singh, Laiq-ur-Rahaman, Bahl J.R. Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) an herbal medicinal plant with broad therapeutic uses and cultivation practices: a review // IJRAMR. 2015. V. 2. P. 0928.
2. Shakeri A., Sahebkar A., Javadi B. *Melissa officinalis* L. – A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology // J. Ethnopharmacol. 2016. V. 188. P. 204. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.010>
3. Пауштецкий В.С., Тимашева Л.А., Пехова О.А., Данилова И.Л., Серебрякова О.А. Эфирные масла и их качество. Симферополь: ИТ “АРИАЛ”, 2021. 212 с. <https://doi.org/10.33952/2542-0720-978-5-907506-16-9>
4. Virchea L.I., Gligor F.G., Frum A., Mironescu M., Myachikova N.I., Georgescu C. Phytochemical analysis and antioxidant assay of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) // *BIO Web of Conferences*. 2021. V. 40. Art. 02004. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20214002004>
5. Alizadeh Behbahani B., Shahidi F. *Melissa officinalis* Essential oil: chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity // *Nutr. Food Sci. Res.* 2019. V. 6. P. 17. <https://doi.org/10.29252/nfsr.6.1.17>
6. Radomir A.M., Stan R. *In vitro* morphogenetic reaction of *Melissa officinalis* L. // *Rom. J. Horticult.* 2020. V. 1. P. 15. <https://doi.org/10.51258/RJH.2020.02>
7. Petrova M., Nikolova M., Dimitrova M., Dimitrova L. Assessment of the effect of plant growth regulators on *in vitro* micropropagation and metabolic profiles of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) // *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.* 2021. V. 11. e4077. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.4077>
8. Егорова Н.А., Якимова О.В. Влияние длительного субкультивирования на клональное микроразмножение *Melissa officinalis* L. и *Origanum vulgare* L. // *Вестн. Том. гос. ун-та. Биология*. 2019. Т. 47. С. 22. <https://doi.org/10.17223/19988591/47/2>
9. Ghiorghita G.I., Maftei D.E.St., Nicuta D.N. Investigations on the *in vitro* morphogenetic reaction of *Melissa officinalis* L. species // *Anal. Stiintifice ale Universitatii “Alexandru Ioan Cuza”, Geneticasi Biologie Moleculara*. 2005. V. 5. P. 119.
10. Meftahizade H., Moradkhani H., Naseri B., Lofti M., Naseri A. Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes // *J. Med. Plant Res.* 2010. V. 4. P. 240.
11. Aasim M., Kahveci B., Korkmaz E., Doganay F., Bakirci S., Sevinc C., Akin F., Kirtis A. TDZ-IBA induced adventitious shoot regeneration of water balm (*Melissa officinalis* L.) // *J. Glob. Innov. Agric. Soc. Sci.* 2018. V. 6. P. 35.
12. Mokhtarzadeh S., Demirci B., Goger G., Khawar K.M., Kirimer N. Characterization of volatile components in

- Melissa officinalis* L. under *in vitro* conditions // J. Es-sent. Oil Res. 2017. V. 29. P. 299.
<https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1216900>
13. Mousavi S.-M., Shabani L. Rosmarinic acid accumulation in *Melissa officinalis* shoot cultures is mediated by ABA // Biol. Plantarum. 2019. V. 63. P. 418.
<https://doi.org/10.32615/bp.2019.057>
 14. Ebrahimi M., Kiarostami K., Nazem Bokae Z. Effect of salicylic acid on antioxidant properties of *in vitro* proliferated shoots of *Melissa officinalis* L. // Nova Biologica Reperta. 2019. V. 5. P. 420.
 15. Topdemir A., Gur N., Demir Z. Determination of total phenolic compounds and flavanoids in callus cultures of lemon grass (*Melissa officinalis* L.) stimulated with different plant growth regulators // Eur. J. Bio. Chem. Sci. 2018. V. 1. P. 7.
 16. Mousavi N., Razavizadeh R. Evaluation of changes in phenolic compounds and secondary metabolites of calluses and seedlings of *Melissa officinalis* L. under cadmium heavy metal stress // J. Plant Process Funct. 2021. V. 10. P. 17.
 17. Nosov A.M. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. V. 48. P. 609.
<https://doi.org/10.1134/S000368381107009X>
 18. Решетников В., Спиридович Е., Фоменко Т., Носов А. Растительная биотехнология – способ рационального использования биосинтетического потенциала // Наука и инновации. 2014. Т. 5. С. 21.
 19. Efferth T. Biotechnology applications of plant callus cultures // Engineering. 2019. V. 5. P. 50.
<https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
 20. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 724 с.
 21. Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A. Callusogenesis as an *in vitro* morphogenesis pathway in cereals // Russ. J. Dev. Biol. 2018. V. 49. P. 245.
<https://doi.org/10.1134/S106236041805003X>
 22. Якимова О.В., Егорова Н.А. Каллусогенез и морфогенез в культуре изолированных органов и тканей *Melissa officinalis* L. *in vitro* // Ученые записки Таврич. нац. ун-та им. В.И. Вернадского. Серия “Биология, химия”. 2014. Т. 27. С. 191.
 23. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. Москва: БИНОМ, 2011. 386 с.
 24. Запретов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Высшая школа, 1974. 214 с.
 25. Федосеева Г.М. Способ определения полифенольных соединений. Патент СССР, 1215708А. А 61 К 35/78. 1986.
 26. Титова М.В., Кочкин Д.В., Соболева Г.И., Фоменков А.А., Сидоров Р.А., Носов А.М. Получение и характеристика каллусных культур клеток *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse – продуцентов изофлавоноидов // Биотехнология. 2020. Т. 36. С. 35.
<https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-6-35-48>
 27. Егорова Н.А. Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение *in vitro*. Симферополь: ИД “Автограф”, 2021. 315 с.
<https://doi.org/10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4>
 28. Nosov A.V., Titova M.V., Fomenkov A.A., Kochkin D.V., Galishev B.A., Sidorov R.A., Medentsova A.A., Kotenkova E.A., Popova E.V., Nosov A.V. Callus and suspension cell cultures of *Sutherlandia frutescens* and preliminary screening of their phytochemical composition and antimicrobial activity // Acta Physioli Plant. 2023. V. 45. Art. 42.
<https://doi.org/10.1007/s11738-023-03526-7>
 29. Инюткина А.Г., Егорова Н.А. Цитофизиологические особенности каллусной ткани полыни эстрагон // Вісн. Харк. нац. аграр. ун-ту. Серія Біологія. 2011. Т. 3. С. 67.
 30. Claudia A. Espinosa-Leal, Cüsar A. Puente-Garza, Silverio Garcia-Lara *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds // Planta. 2018. V. 248. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
 31. Berezina E.V., Brilkina A.A., Schurova A.V., Veselov A.P. Accumulation of biomass and phenolic compounds by calluses *Oxycoccus palustris* PERS. and *O. macrocarpus* (AIT.) PERS in the presence of different cytokinins // Russ. J. Plant Physiol. 2019. V. 66. P. 67.
<https://doi.org/10.1134/S1021443718050035>