

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

**ՄՈՐԱԴՆԻԱՆԻ ՀՈԶԱԹ ԱԼԻԱԿԲԱՐՈՎԻ**

***Melissa officinalis* L. ԿԱԼՈՒՍԱՅԻՆ ԵՎ ԲԶԶԱ-ԿԱԽՈՒԹԱՅԻՆ  
ԿՈՒՆՏՈՒՐԱՅԻ ՄԼՆԴԱՄԻՋԱՎԱՅՐԻ ՕՊՏԻՄԱԼԱՑՈՒՄԸ**

Գ.00.14 – «Կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

**Մ Ե Ղ Մ Ա Գ Ի Ր**

Երևան – 2014

---

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

**МОРАДХАНИ ХОДЖАТ АЛИАКБАРОВИЧ**

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ КАЛУСНОЙ  
И КЛЕТОЧНО-СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ  
*Melissa officinalis* L.**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук  
по специальности **03.00.14** – «Биотехнология»

Ереван – 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Գ.Ս. Դավթյանի անվան հիդրոպոնիկայի պրոբլեմների ինստիտուտում:

Գիտական ղեկավար՝

կ.գ.դ. Է.Դ. Սարգսյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կ.գ.դ. Հ.Ռ. Վարդապետյան  
կ.գ.թ. Մ. Թ. Պետրոսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

ՀՀ ԳՆ Բանջարաբոստանային և տեխնիկական մշակաբույսերի գիտական կենտրոն

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2014 թ. հունիսի 11-ին ժամը 14<sup>00</sup> ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ք. Երևան, Գյուրջյան փող. 14, հեռ./ֆաքս՝ (37410) 65 41 80:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2014 թ. հունիսի 11-ին:

Մասնագիտական խորհրդի

գիտական քարտուղար, կ.գ.թ.՝

Գ. Ե. Ավետիսովա

---

Тема диссертации утверждена в Институте проблем гидропоники им. Г.С. Давтяна НАН РА.

Научный руководитель:

д.б.н. Э.Д. Саркисян

Официальные оппоненты:

д.б.н. Г.Р. Вардапетян

к.б.н. М.Т. Петросян

Ведущая организация:

Научный центр овощебахчевых и технических культур МСХ РА

Защита диссертации состоится 11 июля 2014г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА, действующего при НПП «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел./факс (37410) 65 41 80:

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПП «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 11 июня 2014 г.

Ученый секретарь

специализированного совета, к.б.н.

Г.Е. Аветисова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Метод культуры тканей растений *in vitro* является приоритетным в прикладных и фундаментальных исследованиях биологии развития растений. Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию новых методов для получения полезных вторичных метаболитов, используемых в фармацевтической, пищевой парфюмерной и др. промышленности. *M. (Melissa) officinalis* L. многолетнее травянистое растение из семейства губоцветных (*Lamiaceae*). Используются листья 1/3 части верхушек побегов, собираемые в начале цветения. Содержание эфирного масла (ведущая группа биологически активных соединений) в надземных органах растения колеблется в пределах 0.02-0.2 %, в зависимости от места произрастания. Эфирное масло определяет лечебное свойство растений и обладает седативным, антидепрессивным, спазмолитическим, иммуномодулирующим, противовирусным, антиаллергическим, антимикробным свойствами. В медицине наиболее известны настои и препараты из травы *M. officinalis* (Ново-пассит, Персен, Нервофлюкс). Широкий спектр терапевтического действия препаратов *M. officinalis* обусловлен содержанием биологически активными веществами: монотерпены (цитронеллал, мерцен, гераниол), фенилпропаноиды, розмариновая кислота, флавоноиды, витамины В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, С, β-каротин, микро и макроэлементы и другие (Blumental et al 2000; Marangui et al 2004; Stella and Braga 2002; Wawrosch 2005).

В основном потребность лекарственного сырья *M. officinalis* обеспечивается за счет дикорастущей флоры, что приводит к сокращению естественных природных запасов, поэтому целесообразнее вводить его в культуру с целью разработки методов получения лекарственного сырья в управляемых условиях. Особое значение в условиях *in vitro* приобретает возможность контролировать и направленно регулировать проявления клеточных потенций с помощью физических и химических факторов (элементы питания, гормональные факторы). Этот метод имеет ряд преимуществ: независимость от влияния почвенно климатических условий и сезонности, в достаточно короткие сроки и на небольшой лабораторной площади можно получить высокий выход экологически чистой и стандартизированной продукции; возможность синтеза ценных вторичных метаболитов растений, что и является одним из нетрадиционных способов охраны растений позволяющий создавать банк тканей *in vitro* и является актуальной проблемой.

Учитывая вышензложенное, разработка и совершенствование биотехнологии культивирования *M. officinalis*, оптимизация питательной среды для каллусной и суспензионной культуры в условиях *in vitro* предоставит возможность повысить продуктивность и получить качественное растительное сырье с высоким содержанием БАВ, что весьма актуально и имеет большое значение для фармацевтической промышленности и охраны природных ресурсов этого вида.

**Цель и задачи исследования.** Основная цель работы получение изолированных культур *M. officinalis*, разработка оптимальных УСЛОВИЙ культивирования для роста и биосинтеза некоторых продуктов вторичного метаболизма. Для достижения поставленной цели были разработаны и разрешены следующие задачи:

- исследовать четыре популяции *M. officinalis* произрастающие в разных климатических поясах Ирана (Амадан, Газвин, Урмия, Рашт), определить наиболее подходящая популяция для использования в клеточной культуре;
- выбрать экспланты и подобрать оптимальные условия культуры *in vitro* для каллусогенеза;
- изучать скорость регенерации, процент корнеобразования, индукцию побегообразования, интенсивность пролиферации;

- выбрать наиболее благоприятную основную среду;
- изучить зависимость роста полученных каллусных и суспензионных культур от степени обеспеченности питательной среды азотом, регуляторами роста растений (PPP) (ИУК, НУК, ТДЗ), углеводов (глюкоза, фруктоза, сахароза);
- определить выход продукции эфирного масла с идентификацией компонентов: в интактных растениях, в растениях выращенных в теплице и в клеточно-суспензионной культуре;
- проводить сравнительный анализ антиоксидантной активности эфирных масел *M. officinalis* с синтетическим антиоксидантом бутилгидроксианизолом (БАГ);
- изучить влияние эфирного масла на продление срока хранения подсолнечного масла и широко-распространенной в Иране сладости.

#### **Научная новизна. Впервые:**

- проведено сравнительное изучение популяций *M. officinalis* четырех различных климатических поясов Ирана (Амадан, Газвин, Рашт, Урмия). Выявлены общие закономерности и специфические особенности культивирования эксплантов *M. officinalis in vitro*. Установлена возможность получения оптимальной вариации каллуса из популяции Амадан. Разработаны питательные среды для роста и клонального микроразмножения растений;
- получена хорошо растущая каллусная и клеточно-суспензионная культура путем оптимизации питательной среды; показана возможность направленной регуляции биосинтеза эфирного масла в культуре;
- определена взаимосвязь между применением регуляторов роста растений (PPP), каллусной индукцией и каллусной биомассой в целях получения наиболее благоприятных условий для клеточного роста;
- произведен анализ свежей массы клеток, сухой массы клеток, объема клеточных конгломератов, жизнеспособности клеток в суспензионной культуре для выбора наиболее приемлемого углеводного компонента;
- проведен сравнительный анализ влияния синтетического антиоксидантного аналога БАГ и эфирного масла *M. officinalis*;
- произведена экстракция вторичных метаболитов трех вариантов *M. officinalis* из различных культуральных условий (дикорастущие (интактные) и тепличные растения, и клеточно-суспензионная культура);
- оценена роль эфирного масла *M. officinalis* в замедлении процесса разложения пищевых продуктов.

#### **Основные положения выносимые на защиту.**

- Определение относительной взаимосвязи между применением PPP и каллусной индукцией, каллусной биомассой с целью изыскания наиболее благоприятных для роста клеток условий.
- Результаты анализов свежей и сухой массы клеток, объема конгломерата клеток (ОКК) и их жизнеспособности в суспензионной культуре для выбора наиболее приемлемой углеводной обработки.
- Сравнительный анализ эфирных масел из сырого материала различных культур (интактного, тепличного растения и клеточно-суспензионной культуры).
- Сравнительный анализ антиоксидантной активности эфирного масла на основе определения пероксидного числа (ПЧ) и йодного числа (ЙЧ) и во всех исследуемых образцах эфирного масла *M. officinalis* и синтетического антиоксиданта (БАГ).

**Апробация диссертации.** Материалы диссертации были представлены и обсуждены: на конгрессе по развитию производства лекарственных растений (Тегеран,

Иран, 28.02- 1.03, 2010); на международном симпозиуме по лекарственным растениям (Шираз, Иран, 21-23.06, 2010); на заседаниях научного совета Института проблем гидропоники им. Г.С. Давтяна НАН РА (Ереван, 2008-2012).

**Публикации.** Основные положения диссертации опубликованы в 5 научных работах.

**Место выполнения работы.** Эксперименты проводились на базе Института проблем гидропоники им. Г.С. Давтяна НАН РА, а фитохимические анализы - в Институте АСЕСР, Илам, Иран.

**Структура и объем диссертации.** Основные положения диссертации изложены на 101 страницах компьютерного текста, состоящего из введения, обзора литературы, экспериментальной части с материалами и методами исследования, включая 26 таблиц, 31 рисунков, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 73 источника.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Приготовление образцов растений.** Сбор семян *M. officinalis* проводился с 4-х популяций ботанических садов Ирана: г. Урмия, Амедан, Газвин и Рашт. В процессе данного исследования суспензионной культуры *M. officinalis* поэтапно проводилась две отдельные процедуры: прямая и непрямая регенерация.

**Прямая регенерация.** Приследовалась цель выборов эксплантов для непрямой регенерации. Исследовались влияние различных концентраций (1.5; 2.0; 2.5 и 3.0 мг/л) двух видов цитокининов (включая ТДЗ и КИН) на различные виды эксплантов (кончики побегов, листовые сегменты). Экспланты отделялись и помещались на среде MS (Murashige, Skoog, 1962).

**Непрямая регенерация.** Применялись различные виды PPP. ТДЗ комбинировался с двумя ауксинами ИУК и НУК в различных концентрациях. Концентрации НУК и ИУК составляли 0.1 мг/л и 0, 1, 1.5 и 2 мг/л соответственно, тогда как концентрация ТДЗ во всех вариантах составляла 0.5 мг/л. В процессе данного эксперимента определялись объем каллуса, процент каллусной индукции и количество дней, необходимых для каллусной индукции. Процесс прорастания начинался с момента помещения семян на разбавленную ½ среду МС, с добавлением 3% сахарозы и 0.7% агара. Культуры инкубировались при температуре 25±2 °С и 16-часовом дневном освещении в различные периоды времени (10, 15, 20 и 25 дней).

Для каллусной индукции (кончиков побегов) испытано и определено комбинирование PPP. В качестве лучшей базальной среды для продолжения культивирования были выбраны две питательные среды - МС и В5. Полученные каллусы с регенерированными побегами переводились на питательные среды МС и В5 без регуляторов роста для продолжения роста. Через 25 дней побеги отделялись от каллуса и отдельно помещались в стеклянные пробирки, содержащие 35 мл среды до момента дождения приблизительно 2 см длины. Для каллусной инициации эксплантами служили: кончики побегов, полученные из 25-дневной рассады; стебли, которые поверхностно простерилизовывались в течение 7 мин в растворе гипохлорида натрия (0.5%), содержащего также несколько капель Tween 20 и 5-кратно промывались дистиллированной водой. Раневые части обрабатывались стерилизующим агентом, а здоровые кончики побегов использовались в эксперименте в качестве экспланта. Эксперимент проводился по Полному рандомизированному дизайну (ПРД), согласно которому выбирались 20 эксплантов растений для обработки и мониторинга. Каждая обработка повторялась 5 раз. Из питательных сред выбрана МС и обогащена PPP различными концентрациями: (0-2 мг/л) ИУК, (0-2 мг/л) НУК, (0.5 мг/л) ТДЗ в отдельности или в комбинации с отмеченными ауксинами. рН всех сред был

отрегулирован до 5.8. Целью этих экспериментов определение эффективности РРР на развитие каллуса, где оценивались следующие параметры: влияние РРР на процент каллусной индукции, объема каллуса, а также количество дней, необходимых для индукции.

**Корнеобразование.** Удлиненные побеги-регенеранты пересаживались на питательную среду обогащенную различными концентрациями (0-1мг/л) ауксинов ИМК, ИУК, НУК и выдерживались в течение 1 месяца, при этом в каждом варианте использовалось 20 побегов.

**Оценивание клеточно-сuspензионной культуры.** Для получения стабильной клеточной линии из 1г рыхлого каллуса, полученного после 6-ой субкультуры через 20 дней, проводилось клеточно-сuspензионное субкультивирование, с применением 1г клеток (с оптимальным прививочным размером), распределенных в 6 конических колбах с 35 мл среды в каждой (в общем 210мл). Среда содержали различные концентрации ИУК 0-2 мг/л, НУК 1-2 мг/л и ТДЗ 0.5мг/л. Эксперименты устанавливались по ПРД: 3 варианта и 3 повтора в течение 16 дней. Клеточно-сuspензионные культуры иницировались путем встряхивания 35г рыхлого каллуса при 110 об/м в темноте при t=27°C. В результате свободные и маленькие клетки собирались каждый последующий день эксперимента.

**Статистический анализ.** Каждая обработка включала в себя 20 эксплантов в трех повторах. Процент каллус-продуцирующих эксплантов регистрировался через две недели культивирования. Частота индукции побегообразования и среднее количество побегов на культуру определялись и регистрировались через 5 недель культивирования. Для статистического анализа использовались средние значения и стандартные ошибки. Все данные полученных результатов подвергались статистической обработке согласно технике анализа вариаций (ANOVA), а значения сравнивались при помощи DUNKAN теста (p=0.01) и SAS9 для ПРД.

**Определение компонентов эфирного масла в листьях интактных и культивированных в тепличных условиях растений.** Для этого использовали 100г высушенных листьев и проводили гидродистилляцию в течение 4-х часов согласно методу, описанному в Европейской Фармакопее. Полученные эфирные масла высушивались ангидрическим сульфатом натрия и выдерживались при температуре t=5°C до момента тестирования и анализа. Далее полученные эфирные масла подвергались анализу для идентификации компонентов. Анализ эфирных масел проводился при помощи газового хроматографа (ГХ) Hewlett-Packard 5896 Series II, оснащенного FID-детектором и DB5 колонкой (5% фенил, 95% диметил полилизил оксан), 30м x 0,25мм id, с толщиной пленки в 0,25мкм.

**Определение компонентов эфирного масла клеточно-сuspензионной культуры.** Эфирное масло выделялось из клеточно-сuspензионной культуры после 4-х дней субкультивирования. До процесса выделения эфирного масла клеточная сuspензия в каждом эксперименте продерживалась, по крайней мере, в течение 4-х периодов субкультивирования. 100г свежих клеток *M. officinalis* высушивались в печи при t=60°C. Высушенные клетки перетирались в порошок с последующим экстрагированием в присутствии гексана. Фильтрат экстракта ротационным устройством выпаривался при t=60 °C и окончательно продерживался при t=6 °C до его дальнейшего использования в газовой-хроматографическом анализе. Вес неочищенного экстракта из клеток составил 40мг.

**Исследование антиоксидантного эффекта *M. officinalis* на подсолнечное масло и сравнение его антиоксидантной активности с БГА.** Образцы очищенных, обесцвеченных и дезодорированных (РОД) стандартов подсолнечного масла при-

менялись для исследования антиоксидантной активности эфирных масел *M. officinalis*. Подсолнечное масло легко приобретает прогорклость из-за высокого содержания в нем ненасыщенных жирных кислот. Проведен сравнительный анализ антиоксидантной активности эфирного масла *M. officinalis* с синтетическим антиоксидантом БГА.

**Анализ параметров прогорклости подсолнечного масла.** Определялись значения свободных жирных кислот (СЖК), пероксидное число (ПЧ) и йодное число (ЙЧ) (АОС, 1989). Определение конъюгированных диенов проводилось по рекомендованным методам IUPAC (IUPAC, 1987). Все эксперименты устанавливались по ПРД. Полученные данные выражались средними значениями повторов (среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка, (n=3)). Для точности и правильности тесты повторялись 3 раза.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние базальной среды на процесс регенерации побегов.** Результаты, представленные в табл.1. показывают, что наиболее благоприятной питательной средой для регенерации побегов, полученных из каллуса является среда MS (72.1%). При сравнении питательных сред - MS, B5 и WPM, оказалось, что по содержанию фосфора и кальция они не отличались, тогда как по содержанию азота отличались. Общее содержание азота в WPM среде (14.7мкмоль/л) было намного ниже, чем в средах MS (60.03мкмоль/л) и B5 (27.03мкмоль/л). Поэтому общее содержание азота может оказаться важным фактором, влияющим на процесс регенерации побегов.

Таблица 1

Влияние базальной среды на регенерацию побегов *M. officinalis*

Эксплант	Базальная среда	Каллус-продуцирующие экспланты, %	Побегообразующие каллусы, %	Количество побегов на эксплант
Кончики побегов	MS	100	72.1 $\pm$ 1.73	11.7 $\pm$ 0.87
	B5	100	67.9 $\pm$ 1.45	9.1 $\pm$ 0.73
	WPM	100	36.3 $\pm$ 0.97	3.3 $\pm$ 0.35

Количество побегов на каллус регистрировалось через 5 недель культивации

**Прямая регенерация.** Полученные результаты показали, что в течение 30 дней на всех испытанных средах побеги развивались непосредственно из меристемных клеток (кончики побегов) или же через редифференциацию каллуса, в основном начинающегося с кончика побега. Оценивались ответы двух видов эксплантов: кончики побегов и листовых сегментов. Для этой цели были приготовлены разные концентрации двух различных видов цитокининов. Результаты показали, что в тех же самых концентрациях (1.5, 2.0, 2.5, 3.0мг/л), выбранных для ТДЗ и КИН, концентрация ТДЗ имела сравнительно лучший ответ и для кончиков побегов, и для листовых сегментов (табл. 2).

Для обоих эксплантов увеличение концентрации ТДЗ до 3мг/л постепенно повышало значения всех исследуемых характеристик, а концентрация 3мг/л оказалась наиболее эффективной для побегообразования эксплантов (85 и 71%), при среднем количестве эксплантов (3.44, 1.66) и высоте побегов (1.73, 0.89см). ТДЗ во всех своих концентрациях превосходил КИН. В сравнительном анализе вариантов, выяснилось что наличие ТДЗ, в концентрации от 1 - 3мг/л является наилучшим для процесса побегообразования.

Влияние ТДЗ и КИН на исследуемые показатели

Эксплант	ТДЗ, мг/л	КИН, мг/л	Побегообразующие экспланты, %	Количество побегов на эксплант	Высота побегов, см	Побегообразующая способность, %
Кончики побегов	контроль*	-	45	0.478 <sup>f**</sup>	0.21 <sup>e</sup>	0.2
	1.5	-	68	1.15 <sup>d</sup>	0.57 <sup>d</sup>	0.6
	2.0	-	73	1.59 <sup>c</sup>	0.72 <sup>c</sup>	1.2
	2.5	-	80	3.43 <sup>a</sup>	0.72 <sup>a</sup>	2.4
	3.0	-	85	3.44 <sup>a</sup>	1.73 <sup>a</sup>	3.1
	-	1.5	55	0.75 <sup>c</sup>	0.25 <sup>e</sup>	0.4
	-	2.0	63	1.49 <sup>c</sup>	0.63 <sup>cd</sup>	0.7
	-	2.5	66	1.49 <sup>c</sup>	0.66 <sup>cd</sup>	1.1
	-	3.0	73	2.45 <sup>b</sup>	1.29 <sup>b</sup>	1.8
Листовые сегменты	контроль*	-	38	0.478 <sup>f**</sup>	0.21 <sup>e</sup>	0.10
	1.5	-	58	1.00 <sup>d</sup>	0.35 <sup>d</sup>	0.43
	2.0	-	63	1.15 <sup>c</sup>	0.44 <sup>c</sup>	1.00
	2.5	-	69	1.55 <sup>a</sup>	0.78 <sup>a</sup>	1.50
	3.0	-	71	1.66 <sup>a</sup>	0.89 <sup>a</sup>	2.60
	-	1.5	43	0.45	0.22 <sup>e</sup>	0.20
	-	2.0	52	0.98 <sup>c</sup>	0.37 <sup>cd</sup>	0.60
	-	2.5	57	1.22 <sup>c</sup>	0.43 <sup>cd</sup>	0.70
	-	3.0	64	1.46 <sup>b</sup>	0.74 <sup>b</sup>	1.10

**Непрямая регенерация.** Морфогенетический ответ зависит от вида эксплантов и регуляторов роста, использованных в культуральной среде (Вајај, 1986; Kool et al., 1999). Применялись различные концентрации и комбинации ауксинов (ИУК, НУК) и цитокинина (ТДЗ), определялись объем каллуса, процент каллусной индукции и количество дней, требующиеся для каллусной индукции по двум видам эксплантов - кончики побегов и гипокотили. Согласно полученным результатам, кончики побегов, выделенные из 25-дневной рассады проявляли наибольший эффект по каллусной индукции; в связи с чем объем каллуса, процент каллусной индукции и количество дней, требующиеся для каллусной индукции достигали своих максимальных значений при комбинации ИУК (1мг/л), НУК (1.5мг/л) и ТДЗ(0.5мг/л). Это заключение коррелирует с данными, полученными Gori и Vatsala (2006), указывающими на то, что комбинация ауксинов и цитокининов не только индуцирует больше рыхлого каллуса, но и увеличивает частоту каллусной индукции по сравнению с другими вариантами. Виды каллусов, наблюдаемые в (1.5мг/л) НУК, (1мг/л) ИУК и (0.5мг/л) ТДЗ были зеленовато-желтыми и рыхлыми и потому могли быть использованы либо для непрямой регенерации, либо же для суспензионной клеточной культуры (рис.1 и рис.2).



Рис.1 Каллусная индукция эксплантов на питательной среде, через 2 недели культивирования

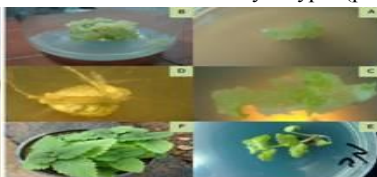


Рис. 2 Непрямая регенерация кончиков побегов, полученные из 25-дневных проростков

Результаты указывают на больший эффект комбинации двух видов ауксинов с ТДЗ, по сравнению с комбинацией лишь одного ауксина с ТДЗ. Например, под влиянием



НУК, ИУК и ТДЗ индуцировались неподходящие для клеточной суспензии мягкие и белые каллусы, приводящие к появлению симптомов ветрификации (табл. 3).

Таблица 3

Влияние ТДЗ и различных ауксинов на регенерационную способность экспланта

Эксплант	Варианты	Регуляторы роста, мг/л			Объем каллуса, мм	Индукция каллуса, %	Дни каллусной индукции
		ИУК	НУК	ТДЗ			
Кончики побегов					0 <sup>f</sup>	0	0
	1	1.0	1.5	0.5	17.80 <sup>a</sup>	80	3.9 <sup>a</sup>
	2	1.5	1.5	0.5	11.50 <sup>dbc</sup>	70	12.7 <sup>cde</sup>
	3	2.0	1.5	0.5	9.20 <sup>dec</sup>	64	10.6 <sup>b</sup>
	4	1.0	1.0	0.5	13.20 <sup>b</sup>	68	13.6 <sup>ef</sup>
	5	1.5	1.0	0.5	11.70 <sup>bc</sup>	58	11.7 <sup>bcd</sup>
	6	2.0	1.0	0.5	11.00 <sup>dbc</sup>	55	12.6 <sup>cde</sup>
	7	1.0	0	0.5	8.60 <sup>de</sup>	45	11.5 <sup>bcd</sup>
	8	1.5	0	0.5	10.00 <sup>dc</sup>	50	13.2 <sup>def</sup>
	9	2.0	0	0.5	9.40 <sup>dec</sup>	62	11.1 <sup>bc</sup>
	10	0	1.0	0.5	6.80 <sup>e</sup>	50	13.1 <sup>def</sup>
	11	0	1.5	0.5	10.10 <sup>dc</sup>	35	16.9 <sup>f</sup>
12	0	2.0	0.5	8.90 <sup>dec</sup>	28	16.9 <sup>f</sup>	

Средние значения с обозначенными теми же буквами не особо разнятся в случае применения множественной линии тестов Dunkan ( $p \leq 0,05$ )

**Определение наилучшей популяции.** Исследовались 4 популяции ботанических садов в различных климатических поясах Ирана (г. Амедан, Газвин, Рашт и Урмия). Индивидуумы отобранные из популяция Амедан показали более высокое значение среднего количества побегов (СКП), тогда как Газвин проявила минимальное СКП. Растения из популяции Амедан имели незначительную разницу по сравнению с популяцией Урмия - лишь на 1%.

Таблица 4

Сравнительная характеристика побегообразования и корнеобразования различных популяций

Эксплант	Популяция	ТДЗ, 3 мг/л, НУК, 1 мг/л		НУК, 1 мг/л
		СКП/эксплант	СР, %	ПК, %
Кончики побегов	Амедан	3.20 <sup>b</sup>	85	83
	Газвин	1.80 <sup>c</sup>	78	74
	Рашт	2.00 <sup>c</sup>	68	73
	Урмия	2.50 <sup>b</sup>	86	76

Данные получены на основе 4-х отдельных экспериментов. Средние значения с обозначенными теми же буквами не особо разнятся в случае применения множественной линии тестов Dunkan ( $p \leq 0,05$ )

Растения из популяции Амедана по проценту корнеобразования (ПК) превышали все остальные со значительной разницей, а популяция Урмия занимала последующее положение с 7%-ой разницей. Обобщая результаты по всем параметрам можно заключить, что популяция Амедан являлась наиболее потенциальной среди всех остальных. Поэтому и все эксперименты проводились на базе популяции Амедан (табл.4).

**Определение клеточной биомассы.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки *M. officinalis* хорошо растут на жидкой среде, содержащей 1мг/л НУК и 0.5мг/л ТДЗ (5.48г/эксплант). В то же время 1г прививочного материала в 35мл культуральной среде проявлял максимальную кинетику роста. Максимальная клеточная биомасса, которая в начальном прививочном материале составляла 0.75г, через 26 дней культивирования составила около 5.48г (табл. 5).

Таблица 5

Рост клеточной биомассы на жидкой питательной среде МС с добавлением различных концентраций регуляторов роста

Эксплант	НУК, мг/л	ИУК, мг/л	ТДЗ, мг/л	Свежая масса, г/эксплант	Сухая масса, г/эксплант
Каллус	0	0	0	0 <sup>f</sup>	0 <sup>e</sup>
	1.0	0	0.5	5.48 <sup>a</sup>	0.41 <sup>a</sup>
	1.5	0	0.5	5.17 <sup>b</sup>	0.35 <sup>b</sup>
	2.0	0	0.5	4.15 <sup>d</sup>	0.27 <sup>c</sup>
	0	1.0	0.5	3.74 <sup>e</sup>	0.22 <sup>d</sup>
	0	1.5	0.5	4.76 <sup>c</sup>	0.35 <sup>b</sup>
	0	2.0	0.5	4.33 <sup>d</sup>	0.28 <sup>c</sup>

Средние значения с обозначенными теми же буквами не особо разнятся в случае применения множественной линии тестов Dunkan ( $p < 0,05$ )

**Влияние углеводов на регенерацию побегов.** Для исследования влияния карбогидратных источников на регенерацию побегов, различные концентрации сахарозы, глюкозы и фруктозы добавлялись в среду МС, содержащую 3мг/л ТДЗ и 1мг/л НУК. Полученные результаты показали, что наличие в питательной среде углеводов является необходимым условием для регенерации побегов. Среда с фруктозой 10г/л и с сахарозой 30г/л проявляли большее воздействие на интенсивность регенерации побегов. Среди всех видов сахаров наилучшие результаты для регенерации побегов обеспечивались 20г/л глюкозо-содержащей средой (табл.6).

Таблица 6

Влияние углеводов на регенерацию побегов из стеблевых эксплантов (кончики побегов)

Углеводы, г/л	Каллус-продуцирующие экспланты, %	Побегообразующие каллусы, %	Количество побегов на эксплант
0	0	0	0
Глюкоза (10)	100	34.1±1.92	3.5±0.98
Глюкоза (20)	100	73.9±2.75	11.5±0.43
Глюкоза (30)	100	65.2±2.64	9.1±0.27
Глюкоза (40)	100	57.3±3.22	8.8±1.07
Сахароза (10)	100	23.1±1.67	3.2±0.76
Сахароза (20)	100	70.4±2.73	8.7±0.54
Сахароза (30)	100	75.4±2.81	8.3±0.89
Сахароза (40)	100	63.1±1.65	7.2±0.77
Фруктоза (10)	100	77.5±2.56	4.2±0.74
Фруктоза (20)	100	66.0±2.39	4.9±0.32
Фруктоза (30)	100	36.0±2.42	3.5±0.45
Фруктоза (40)	100	33.0±1.77	2.7±0.61

Количество побегов на каллус регистрировалось через 5 недель культивации на среде, индуцирующей побегообразование. Средние ± CO, n=90

Превосходство глюкозы в способствовании регенерации побегов возможно было из-за ее наиболее эффективного усвоения тканями, а следовательно и непосредственного использования ее для обеспечения энергией органогенеза побегов. Меньшая приемлемость сахарозы для образования придаточных побегов может быть связана с ее частичным расщеплением до глюкозы и фруктозы. По мере повышения концентрации глюкозы (>20г/л) экспланты продуцировали более рыхлый каллус, однако интенсивность регенерации и количество побегов на эксплант понижались.

### Оптимизация концентрации сахарозы в клеточно-суспензионной культуре.

Результаты табл.7 показывают, что свежая масса клеток неуклонно увеличивалась и достигала своего максимального значения (73.30г/л) на 10-ый день в контроле и впоследствии уменьшалась на 12-ый день (71.30г/л). Среди всех сахарозных обработок наибольшее влияние было отмечено при 60г/л и 80г/л концентрациях, при которых максимальные значения свежей массы зарегистрированы на 10-ый (80.60г/л) и 8-ой (82.60г/л) дни, соответственно.

Таблица 7

Сравнительный анализ свежей массы клеток под влиянием различных концентраций сахарозы, г/л

День	2	4	6	8	10	12
Контроль	40.6±3.0	47.0±4.0	50.0±2.0	66.0±2.4	73.3±4.0	71.3±3.4
Сахароза :40	43.0±2.0	47.0±3.0	50.0±4.3	66.0±5.0	73.3±2.1	71.3±2.3
Сахароза :60	44.6±3.4	51.0±4.2	57.0±2.3	72.0±4.0	80.6±3.4	74.0±1.3
Сахароза :80	44.6±2.3	54.3±4.3	65.3±2.3	82.6±4.3	75.3±3.4	64.0±5.2

Полученные результаты сухой массы клеток приведены в табл.8, согласно которым намечалась такая же тенденция, что и для свежей массы клеток.

Таблица 8

Сравнительный анализ сухой массы клеток под влиянием различных концентраций сахарозы, г/л

День	2	4	6	8	10	12
Контроль	0.14±0.01	0.15±0.03	0.15±0.02	0.16±0.04	0.18±0.03	0.17±0.02
Сахароза:40	0.14±0.03	0.16±0.05	0.17±0.04	0.18±0.03	0.19±0.05	0.18±0.03
Сахароза:60	0.14±0.02	0.16±0.03	0.18±0.05	0.19±0.05	0.21±0.05	0.18±0.04
Сахароза:80	0.14±0.03	0.19±0.04	0.20±0.05	0.23±0.03	0.21±0.06	0.19±0.03

Уровень сахарозы также имел значительное влияние и в этом случае, как и в случае свежей массы клеток с максимальным значением сухой массы при сахарозной обработке в концентрации 80г/л на 8-ой день (0.23г/л). Не отмечалось особой разницы между концентрациями 60г/л и 80г/л сахарозы на 10-ый день. Результаты сравнительного анализа объема конгломерата клеток (ОКК) представлены в таблице 9. Согласно полученным результатам ОКК достигал своих максимальных значений (48%) на 8-ой день эксперимента с последующим снижением в его остальные дни. Максимальное значение ОКК регистрировалось при концентрациях сахарозы 60 и 80г/л (без особой разницы между ними); по всей вероятности сахароза способна увеличивать время достижения пика при своей концентрации в 80г/л.

Таблица 9

Сравнительный анализ объема конгломерата клеток под влиянием различных концентраций сахарозы, г/л

День	2	4	6	8	10	12
Контроль	15.0±0.8	19.0±0.6	23.0±1.2	34.0±0.8	44.3±1.6	40.0±0.8
Сахароза:40	15.0±0.5	19.6±0.1	25.0±0.5	36.0±1.0	46.3±1.5	41.6±1.2
Сахароза:60	15.0±1.0	20.3±0.7	25.6±0.8	37.3±1.2	48.0±0.8	42.6±1.7
Сахароза:80	15.0±0.1	21.0±1.2	35.0±1.0	48.0±1.5	43.3±1.4	37.0±1.5

В отношении жизнеспособности клеток, согласно приведенным в табл.10 данным отмечается положительная корреляция между уровнем жизнеспособности клеток и продукцией биомассы. Максимальный уровень жизнеспособных клеток отмечался на 6-ой и 8-ой дни эксперимента (92.00%), когда и регистрировалась максимальная продукция биомассы.

Сравнительный анализ жизнеспособности клеток под влиянием различных концентраций сахарозы, %

День	2	4	6	8	10	12
Контроль	76.0±2.0	84.6±1.5	92.0±2.4	92.0±1.8	87.0±2.4	80.0±2.3
Сахароза 40	77.0±1.2	87.0±2.2	92.0±2.5	92.0±2.2	90.0±2.4	85.0±3.2
Сахароза 60	78.0±1.8	87.0±3.2	94.0±1.7	92.0±3.1	90.0±2.5	82.0±2.3
Сахароза 80	78.0±2.0	87.0±1.7	92.0±2.4	92.0±2.5	90.0±3.2	82.0±4.2

Минимальные же значения жизнеспособности клеток отмечались на 2-ой день эксперимента при всех концентрациях сахарозы: минимальный уровень жизнеспособности клеток в контроле составлял 76.0%. Таким образом, чем выше была концентрация сахарозы, тем выше отмечался и уровень жизнеспособности клеток.

### Влияние различных ауксинов на процесс корнеобразования эксплантов.

Процесс корнеобразования требует наличия ауксинов в питательной среде (Tavares et al., 1996). Через 25 дней 96%-ное корнеобразование наблюдалось на питательной среде с 1мг/л НУК, тогда как ИУК и ИМК в той же самой концентрации и в то же время обеспечивали соответственно 73% и 64%-ное корнеобразование. Остальные характеристики достигали своих максимальных величин при 1мг/л НУК, при этом длина корней и побегов составляла 4 и 3.3 см соответственно, а количество корней на эксплант -3.2 (табл.11).

Таблица 11

Влияние ауксинов на количество и длину корней, удлинение побегов, полученных из 4-х недельной культуры на питательной среде МС

НУК, мг/л	ИМК, мг/л	ИУК, мг/л	Кол-во корней на эксплант	Длина корней, см	Длина побегов, см	Корнеобразование, %
0	0	0	0.50 <sup>g</sup>	0.75 <sup>g</sup>	0.75 <sup>g</sup>	43
0.5	0	0	1.20 <sup>e</sup>	2.10 <sup>d</sup>	1.50 <sup>e</sup>	68
0.75	0	0	3.00 <sup>b</sup>	3.20 <sup>b</sup>	2.13 <sup>c</sup>	94
1.0	0	0	3.20 <sup>a</sup>	4.00 <sup>a</sup>	3.30 <sup>a</sup>	96
0	0.5	0	1.00 <sup>f</sup>	0.75 <sup>g</sup>	1.04 <sup>fg</sup>	53
0	0.75	0	1.25 <sup>e</sup>	1.25 <sup>f</sup>	1.06 <sup>fg</sup>	58
0	1.0	0	1.50 <sup>d</sup>	2.20 <sup>d</sup>	1.84 <sup>d</sup>	64
0	0	0.5	1.20 <sup>e</sup>	1.50 <sup>e</sup>	1.24 <sup>ef</sup>	64
0	0	0.75	1.50 <sup>d</sup>	2.40 <sup>c</sup>	2.23 <sup>bc</sup>	75
0	0	1.0	2.00 <sup>c</sup>	3.20 <sup>b</sup>	2.52 <sup>b</sup>	73

Средние значения с обозначенными теми же буквами не особо разнятся в случае применения множественной линии тестов Dunkan ( $p \leq 0.05$ )

### Идентификация компонентов эфирного масла в интактном растении *M. officinalis*.

В данном исследовании объемный процент эфирных масел в листьях интактного растения составил 0.20об.% (0.20мл/100г), а идентифицированных соединений оказалось 32, среди которых основными компонентами были: гераниал (22.48%), нерал (15.64%), цитронеллаль (13.22%), гераниол (6.83%),  $\beta$ -кариофиллен (4.22%) и  $\beta$ -кариофиллена оксид (3.94%) (рис.3 и рис. 4).

Рис. 3. Структура основных компонентов эфирного масла в интактном растении *M. officinalis*

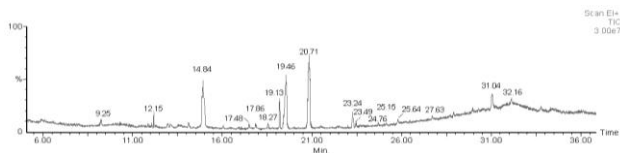


Рис.4. Хроматограмма эфирных масел интактного растения *M. officinalis*

В эфирном масле интактного растения *M. officinalis* содержание монотерпена составляло 80%, а сесквитерпена - 20%. Полученные результаты химического анализа эфирного масла *M. officinalis* показали, что терпены оказались основными компонентами их состава.

Таблица 12

Некоторые компоненты эфирных масел, полученных из листьев интактного растения

Компоненты	Время задержки, мин	Процент массы
6-метил-5-гептен-2-он	9.25	0.75
Линалоол	12.15	1.18
Цитронеллаль	14.84	13.22
Цитронеллол	17.48	0.34
Нерол	17.86	0.25
Метилцитронеллат	18.27	0.68
Гераниол	19.13	6.83
Нерал (цитрал в)	19.46	15.64
Гераниал(цитрал а)	20.71	22.48
β- кариофиллен	23.24	4.23
Геранилацетат	23.49	0.52
α-гумулен	24.76	0.17
γ -кадинен	25.15	0.15
Гермакран D	25.64	0.23
Кадина-3,9-диен	27.63	0.18
β- кариофиллен оксид	31.04	3.94
Гумулен оксид	32.16	0.81
Итого	-	71.6
Сумма монотерпеновых альдегидов	-	53.29
Сумма монотерпеновых спиртов	-	8.60
Сумма сесквитерпенов и сесквитерпеновых оксидов	-	9.71

Эти монотерпены найдены почти во всех эфирных маслах и имеют в структуре 10 атомов углерода и, по крайней мере, одну двойную связь. 10 атомов углерода происходят из двух изопреновых единиц. Они с легкостью реагируют с воздухом в теплых условиях. Эти монотерпеновые альдегиды обладают противогрибковым, противовоспалительным, дезинфицирующим, седативным и поднимающим настроение терапевтическими качествами и являются компонентами, придающими лимонный аромат *M. officinalis*, лимонграсу и цитронелле. Полезные свойства эфирных масел широко используются в ароматерапии (табл. 12). Отмечается различие в плане антиоксидантной активности у различных разновидностей и культиваров одного и того же растения. Фенольные антиоксиданты, являющиеся специфической группой вторичных метаболитов, играют важную роль в процессах защиты организма от вредного влияния радикалов кислорода и других его высокоактивных соединений (Allahverdiev *et al.*, 2004).

**Идентификация компонентов эфирных масел в растении *M. officinalis*, выращенном в тепличных условиях.** В данном исследовании объемный процент эфирных масел в листьях тепличных растений *M. officinalis* составил 0.14об.% (0.14мл/100г), а идентифицированных соединений оказалось 27, среди которых основными компонентами были:  $\beta$ -кариофиллена оксид (12.94%), гераниал (12.12%), нерал (9.45%),  $\beta$ -кариофиллен (8.15%), цитронеллал (8.10%) и гераниол (3.15%), (рис.5).

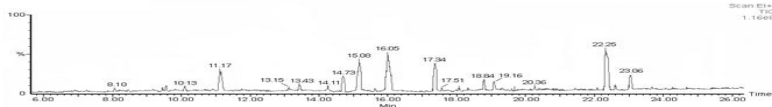


Рис. 5. Хроматограмма компонентов эфирных масел тепличных растений

Таблица 13

Некоторые компоненты эфирного масла растений *M. officinalis* выращенных в теплице

Компоненты	Время задержки, мин	Процент массы
6-метил-5-гептен-2-он	8.10	0.42
Линалоол	10.13	0.82
Цитронеллаль	11.17	8.10
Цитронеллол	13.15	0.27
Нерол	13.43	1.01
Метилцитронеллат	14.11	0.85
Гераниол	14.73	3.15
Нерал (цитрал в)	15.08	9.45
Гераниал(цитрал а)	16.05	12.12
$\beta$ - кариофиллен	17.34	8.15
Геранилацетат	17.51	0.43
$\alpha$ -гумулен	18.27	0.78
$\gamma$ - кадинен	18.84	1.35
Гермакран D	19.16	1.15
Кадина-3,9-диен	20.36	0.48
$\beta$ - кариофиллен оксид	22.25	12.94
Гумулен оксид	23.06	2.21
<b>Итого</b>	-	63.68
Сумма монотерпеновых альдегидов	-	30.83
Сумма монотерпеновых спиртов	-	5.25
Сумма сесквитерпенов и сесквитерпеновых оксидов	-	27.60

Результаты химического анализа эфирного масла *M. officinalis*, выращенного в условиях теплицы показали, что сесквитерпены и монотерпеновые алдегиды являются основными компонентами их состава (табл.13).

**Выход эфирного масла в клеточно-суспензионной культуре *M. officinalis*.**

Выход эфирного масла, полученных из клеточно-суспензионной культуры на 8-10 дни культивирования (конец экспоненциальной фазы) составил 0.10об.% (мл/100г). В эфирном масле суспензионной культуры идентифицировали 25 соединений, среди которых основными компонентами оказались:  $\beta$ -кариофиллена оксид (20.48%),  $\beta$  кариофиллен (13.15%), гераниал (6.12%), нерал (3.24%), цитронеллаль (3.17%) и гумулена оксид (3.15%) (рис. 6).

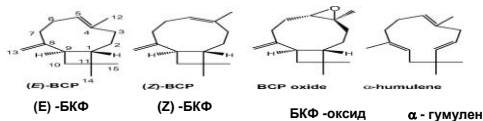


Рис.6. Структура основных компонентов эфирного масла клеточно-сuspensionной культуры β-кариофиллен и β-кариофиллена оксид были преимущественными составляющими сесквитерпеновой фракции исследуемого эфирного масла клеток suspensionной культуры *M. officinalis*. Эти сесквитерпены состоят из 15 атомов углерода и обладают сложным фармакологическим эффектом (противовоспалительным и противоаллергическим и другими свойствами) (рис. 7).

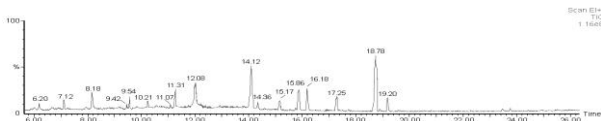


Рис. 7. Хроматограмма компонентов эфирного масла клеточно-сuspensionной культуры

При сравнении компонентом эфирного масла клеточно-сuspensionной культуры идентифицированные газовой хроматографией методом, выяснилось, что содержание монотерпена значительно уменьшилось, а содержание сесквитерпена увеличилось. Фракция монотерпенов гидрокарбонатов достигла лишь 15% в целом, что было значительно меньше по сравнению с таковыми, найденными в эфирных маслах цветков и листьев интактного растения, а сесквитерпеновые гидрокарбонаты и другие компоненты основных фракций эфирных масел, полученных из клеток достигали до 40 и 45% в целом (табл. 14).

Таблица 14

Некоторые компоненты эфирного масла, полученного из suspensionной культуры клеток

Компоненты	Время задержки, мин	Процент массы
6-метил-5-гептен-2-он	6.2	0.14
Линалоол	7.12	0.95
Цитронеллаль	8.18	3.17
Цитронеллол	9.42	0.15
Нерол	9.54	0.75
Метилцитронеллат	10.21	0.27
Гераниол	11.07	0.18
Нерал (цитрал в)	11.31	3.24
Гераниал (цитрал а)	12.08	6.12
β- кариофиллен	14.12	13.15
Геранилацетат	14.36	0.44
α-гумулен	15.17	1.24
γ-кадинен	15.86	2.65
Гермакран D	16.18	2.73
Кадиная-3,9-диен	17.25	1.84
β- кариофиллен оксид	18.78	20.48
Гумулен оксид	19.20	3.16
<b>Итого</b>	-	<b>60.63</b>
Сумма монотерпеновых альдегидов	-	13.38
Сумма монотерпеновых спиртов	-	2.03
Сумма сесквитерпенов и сесквитерпеновых оксидов	-	45.22

Фактически, выход продукции эфирного масла суспензионных культуры составил 0.1%, тогда как у таковых, полученных из растений - 0.2%. Уровень эфирного масла *M. officinalis* варьируется в пределах от 0.05 до 0.3%, что довольно таки мало по сравнению с другими представителями семейства Labiatae, а стоимость и цена эфирного масла *M. officinalis* на рынке достаточно велика.

**Определение антиоксидантной активности эфирного масла *M. officinalis* при воздействии на подсолнечное масло и сравнение ее с БГА.** Образцы очищенных, обесцвеченных и дезодорированных (РОД) стандартов подсолнечного масла применялись для исследования антиоксидантной активности эфирного масла *M. officinalis*. Подсолнечное масло является удобным объектом для эксперимента, так как имеет большой спрос в пищевой промышленности и является богатым источником линоленовой кислоты. Подсолнечное масло легко приобретает прогорклость из-за высокого содержания в нем ненасыщенных жирных кислот. Проведен сравнительный анализ антиоксидантной активности эфирного масла *M. officinalis* с синтетическим антиоксидантом БГА.

**Исследование параметров прогорклости подсолнечного масла.** Липиды, содержащая полиненасыщенные жирные кислоты, с легкостью окисляются под воздействием молекулярного кислорода путем свободно-радикального цепного механизма.

Результаты исследования, представленные в таблице 15 показывают изменения в значениях свободных жирных кислот и указывают на значительное повышение их уровня в контрольных образцах (необработанных БГА и эфирным маслом) в течение 8-недельного периода, что в образцах с БГА и эфирным маслом отмечалось намного ниже по сравнению с контролем (рис.8). Антиоксидантные свойства эфирного масла *M. officinalis* проявлялись постепенно, так как уровень жирных кислот в результате гидролиза триглицеридов повышается по мере реагирования масла с влажностью.

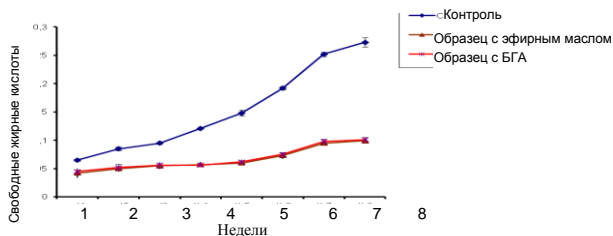


Рис. 8. Значения уровней свободных жирных кислот (%) в различных образцах рафинированных, обесцвеченных и дезодорированных (РОД) подсолнечных масел за 8-недельный период.

Таблица 15

Значения уровней свободных жирных кислот (%) в различных образцах рафинированного, обесцвеченного и дезодорированного (РОД) подсолнечного масла за 8-недельный период

Недели	Контроль	Образец с эфирным маслом <i>M. officinalis</i>	Образец с БГА
1-ая	0.07±0.002	0.04±0.008	0.05±0.002
2-ая	0.09±0.003	0.05±0.005	0.05±0.006
3-ая	0.10±0.002	0.06±0.006	0.06±0.001
4-ая	0.12±0.001	0.06±0.004	0.06±0.002
5-ая	0.15±0.005	0.06±0.001	0.06±0.002
6-ая	0.19±0.003	0.07±0.006	0.08±0.004
7-ая	0.25±0.004	0.10±0.002	0.10±0.004
8-ая	0.27±0.008	0.10±0.002	0.10±0.004



Значения пероксидных чисел (ПЧ) выражались в мэкв кислорода/кг жиров и определялись методом йодной титрации. Уровень окисления йодида калия в уксусной среде активным кислородом жиров определялся титрацией свободного йода с тиосульфатом натрия с использованием крахмала в качестве индикатора. Изменения пероксидного числа приведены в табл.16. Известно, что определение пероксидного числа является одним из наиболее распространенных тестов окислительной прогорклости в маслах и жирах. На основе этого степень окисления в образцах подсолнечного масла определялась при помощи этого параметра (ПЧ) в отсутствии и наличии антиоксидантов за 8-недельный период времени. По полученным результатам ПЧ увеличивалось линейно по мере удлинения срока хранения (рис.9).

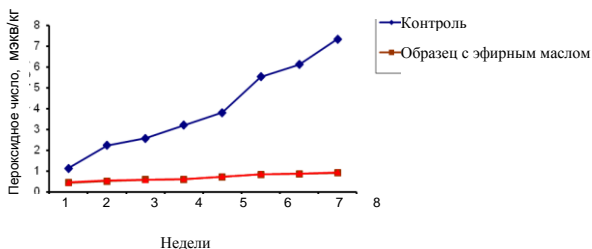


Рис. 9. Пероксидные числа в различных образцах РОД подсолнечного масла, мэкв/кг

Процесс окисления липидов постепенно ускорялся, однако в образцах с БГА и эфирными маслом был очень низким по сравнению с контролем, предопределяя в них рост ПЧ до значений 0.95 и 0.92, соответственно.

Таблица 16

Значения пероксидных чисел в различных образцах РОД подсолнечного масла, мэкв/кг

Недели	Контроль	Образцы с эфирным маслом	Образцы с БГА
1-ая	1.15±0.02	0.45±0.02	0.47±0.04
2-ая	2.25±0.03	0.53±0.01	0.55±0.01
3-я	2.58±0.04	0.60±0.01	0.58±0.05
4-ая	3.21±0.03	0.62±0.04	0.63±0.04
5-ая	3.82±0.05	0.73±0.04	0.75±0.04
6-ая	5.54±0.04	0.85±0.05	0.86±0.05
7-ая	6.12±0.05	0.88±0.07	0.89±0.01
8-ая	7.35±0.03	0.92±0.04	0.95±0.01

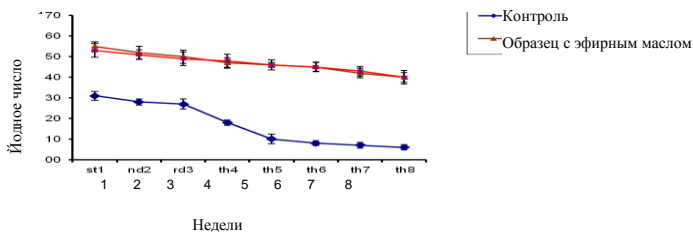


Рис. 10. Йодные числа (Ед) в различных образцах РОД подсолнечного масла

Йодное число (ЙЧ) определяет количество реактивных двойных связей, имеющихся в структуре масел. Чем больше значение ЙЧ, тем больше двойных связей содержится в образце, и потому требуется больше усилий для снижения интенсивности окисления.

Результаты, представленные в табл.17. показывают вариации ЙЧ в РОД образцах подсолнечного масла. В контроле значения ЙЧ за 8-недельный период изменились от 131 до 106 Ед (рис.10). За тот же самый период времени в образцах, содержащих БГА и эфирное масло ЙЧ достигло значений 140 Ед, тогда как в начале эксперимента они составляли 153 и 155 Ед, соответственно.

Таблица 17

Значения йодного числа (Ед) в различных образцах РОД подсолнечного масла

Недели	Контроль	Образцы с эфирным маслом <i>M.officinalis</i>	Образцы с БГА
1-ая	131.0±2.21	155.0±2.25	153.0±3.24
2-ая	128.0±1.52	152.0±3.15	151.0±2.35
3-я	127.0±2.51	150.0±3.24	149.0±3.36
4-ая	118.0±1.24	147.0±2.50	148.0±3.24
5-ая	110.0±2.36	146.0±1.25	146.0±2.35
6-ая	108.0±1.21	145.0±2.13	145.0±2.35
7-ая	107.0±1.45	142.0±2.34	143.0±2.35
8-ая	106.0±1.27	140.0±2.36	140.0±3.24

При сопоставлении этих результатов с контролем очевидно, что значения в контроле значительно ниже таковых в образцах с БГА и с эфирным маслом, хотя и без значимой разницы между последними. Это означает, что изменения ЙЧ в образцах с БГА и с эфирным маслом происходят почти с одинаковой интенсивностью (табл.17). Процесс изменений во всех образцах начинался с незначительного повышения в величинах, однако динамика повышения значений в данном эксперименте была интенсивнее, чем в остальных исследованиях: после 8-недельного периода и в конце эксперимента сопоставление данных выявило значительную разницу между контрольными и другими образцами, где значения в контроле, образцах с эфирным маслом и с БГА составляли 0.87; 0.58 и 0.59, соответственно.

Исследования параметров долговечности широко распространенной в Иране сладости при обработке эфирным маслом *M. officinalis*, непосредственно указывают на антиоксидантные свойства эфирного масла. Результаты качественного анализа, зарегистрированные через 8 недель приводятся в табл.18.

Таблица 18

Влияние эфирного масла *M. officinalis* на срок хранения сладости при комнатной температуре

время (недели)	Контроль		Образцы содержащие эфирное масло	
	pH	изменение вкуса	pH	изменение вкуса
1	6.1	-	6.1	-
2	6.0	-	6.1	-
3	5.9	незначительное	6.1	-
4	5.7	достаточно горькое	6.0	-
5	5.5	горькое	6.0	-
6	5.2	горькое и кислое	5.9	слегка горькое
7	3.9	горькое и кислое	6.0	слегка горькое
8	3.9	горькое и кислое	6.0	слегка горькое
9	3.8	горькое и кислое	5.5	слегка горькое

В течение первых двух недель эксперимента исследуемые образцы не проявляли каких-либо изменений в плане внешнего вида, цвета, запаха и вкуса и сохранились до пятой недели, однако качественные изменения в контроле проявлялись уже с 3-ей недели. pH в контроле также неуклонно понижался, достигнув значения 3.8 в конце эксперимента. В этом плане в группе обработанных эфирным маслом образцов pH слегка понижался, достигая значения 5.5 до конца эксперимента.

Таким образом оптимизация питательной среды для каллусной и суспензионной культур является эффективной для ускоренного размножения посадочного материала *M. officinalis* для тепличной, суспензионной культуры с целью получения высокого выхода лекарственного сырья и эфирного масла.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из необходимости более глубокого познания биологии роста и развития *M. officinalis*, с целью получения качественного лекарственного сырья, нами проведены исследования по установлению оптимальных условий на основе внедрения технологии изолированных культур.

Произведен подбор наиболее подходящей популяции. Выяснилось, что побеги развивались непосредственно из меристематических эксплантов (кончики побегов) или через редифференциацию каллуса, что часто индуцировалось на основе кончиков побегов на всех испытанных средах в течение 30 дней. Из применяемых двух видов цитокининов (ТДЗ и Кинетин) ТДЗ проявлял лучшую респонсивность в плане пролиферации растений у всех используемых эксплантов. Результаты показали, что среди всех комбинаций цитокининов (ТДЗ) и ауксинов ( $\alpha$ -НУК, ИМК, ИУК) в различных концентрациях, комбинация 1мг/л НУК и 3мг/л ТДЗ оказалась наиболее приемлемой для более выраженной пролиферации эксплантов, а 25-дневный рассадный период был выбран как наиболее благоприятный для получения эксплантов. Соответственно, кончики побегов явились наилучшим эксплантом из 25-дневной рассады для размножения по сравнению с листовыми сегментами и гипокотилем: в наших исследованиях кончики побегов, выделенные из 25-дневной рассады проявляли должную респонсивность для каллусной индукции. В целях оптимизации наилучшей обработки для каллусной индукции *M. officinalis* было установлено, что экспланты, полученные из кончиков побегов продуцировали каллус намного больше, чем полученные с гипокотыля. Очевидная каллусная индукция получалась на питательной среде МС, содержащей 1.5 мг/л НУК, 1мг/л ИУК и 0.5мг/л ТДЗ.

С целью оптимизации наилучшего варианта корнеобразования, регенерированные побеги пересаживались на среду МС, содержащую ИМК,  $\alpha$ -НУК и ИУК, где через 25 дней наблюдалась индукция корней. На питательной среде с 1мг/л  $\alpha$ -НУК регистрировался 96%-ый ризогенез. В то же самое время в испытанных вариантах развивались в среднем 3.32см корни.

Испытание углеводов в различных концентрациях выявило, что наиболее благоприятным для суспензионной культуры оказался сахароза, при котором максимальная свежая масса клеток регистрировалась на 10-ый и 8-ой дни соответственно при 60г/л и 80г/л сахарозы. Результаты касательно сухой массы клеток указывали на ее максимально регистрируемое значение при 80г/л сахарозной обработке на 8-ой день. Максимальное значение объема конгломерата клеток регистрировалось на фоне 60г/л и 80г/л сахарозной обработок. Фитохимическим анализом эфирного масла выявлено, что его содержание в листьях интактного растертия составил 0.20мл/100г, а основными компонентами оказались монотерпены: гераниал (22.48%) и нерал (15.64%);

в листьях тепличных растений - 0.14мл/100г, а основные компоненты масла β-кариофиллена оксид (12.94%), гераниал (12.12%) и нерал (9.45%). Итак, сесквитерпен и монотерпен являются главными компонентами эфирного масла тепличных растений. Выход эфирного масла из суспензионной культуры составил 0.1мл/100г, где проидентифицировано 25 соединений, основными из которых явились β-кариофиллена оксид (20.48%) и β-кариофиллен (13.15%). Сравнительное газово-хроматографическое определение компонентов эфирного масла клеточно-суспензионной культуры показал, что содержание в ней монотерпена значительно уменьшилось, а содержание сесквитерпена увеличилось.

Исследованиями выявлена высокая антиоксидантная активность эфирного масла *M. officinalis* и синтетического антиоксиданта БГА. В качестве индикаторов антиоксидантной активности определялись пероксидные и йодные числа. На основе этого, степень окисления в образцах РОД подсолнечных масел определялась при помощи ПЧ в отсутствии и наличии антиоксидантов в 8-недельный период времени. Эфирное масло *M. officinalis* также проявил высокую антиоксидантную активность в плане продления срока хранения широко-распространенной в Иране сладости. Результаты качественного анализа этого продукта, зарегистрированные через 8 недель свидетельствуют о незначительных изменениях его внешнего вида, запаха и вкуса.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Различные популяции *M. officinalis* являются подходящими объектами для продуцирования эфирного масла в связи с чем возникает необходимость их применение с использованием данной технологии. Применение метаболитов культуры клеток растения *M. officinalis* в медицине и в пищевой промышленности весьма актуально и перспективно, что дает основы для широкомасштабной его культивации в коммерческих целях продуцирования этих ценных вторичных метаболитов на базе проецирования и создания биореактора. Предлагается также применение эфирного масла *M. officinalis* в пищевой промышленности для продления срока годности качества продуктов. Полученные данные о закономерностях побегообразования и каллусогенеза *M. officinalis* расширяют информацию о роли фитогормонов в регуляции процессов онтогенеза растительного организма. Разработана наиболее подходящая питательная среда для роста клеток изолированной культуры. Благодаря разработанной биотехнологии, из полученного *in vitro* растительного материала можно создать изолированную и тепличную культуру и получить качественное экологически чистое лекарственное сырье. Основные результаты работы могут послужить руководством для внедрения метода культуры *in vitro* в производство для получения лекарственного сырья и биологически активных соединений, которые заменяют соединения получаемые из дикорастущих растений. В качестве хорошего источника природных антиоксидантов эфирное масло полученное из клеточной культуры *M. officinalis* может использоваться в производстве жиросодержащих пищевых продуктов. Доказана способность *M. officinalis*, как эффективной натуральной биодобавки для замедления процессов разложения в производстве кондитерских изделий. Внедрение данной технологии позволит удовлетворить спрос на лекарственные препараты и сохранить природные ресурсы.

## ВЫВОДЫ

1. Выращивание посадочного материала, каллуса и клеточно-суспензионной культуры в *in vitro* условиях целесообразно и перспективно. Среди всего материала для эксплантов (кончики побегов, листовые сегменты и гипокотили) наилучшим оказались кончики побегов. Кончики побегов, выделенные из 25-дневных проростков проявляли наиболее приемлемые эффекты по всем исследуемым характеристикам по сравнению с другими возрастными группами.

2. ТДЗ (3мг/л) проявил наилучшую респонсивность для пролиферативных процессов эксплантов по сравнению с Кинетином. Комбинация ТДЗ и ауксина оказалась жизненно необходимым условием для процессов регенерации растений, где концентрации 1мг/л НУК и 3мг/л ТДЗ явились наиболее эффективными для регенерирования побегов.

3. Питательная среда МС являлась наиболее эффективной для процента регенерации (72.1%) и количества побегов (11.7%) полученных с каллуса. Процесс корнеобразования в эксплантах оказался наиболее интенсивным в среде с ауксином ( $\alpha$ -НУК). Углеводный состав явился необходимым фактором для регенерации побегов, т. к. экспланты, растущие на безуглеводной среде не формировали никакого каллуса и побегов. В плане биомассы клеток, учитывая свежую и сухую массы клеток, наиболее благоприятной оказалась жидкая среда, содержащая 1мг  $\alpha$ -НУК и 0.5мг/л ТДЗ (обеспечив 5.48г/эксплант свежей и 0.4г/эксплант сухой массы, соответственно).

4. Выяснилось, что процент эфирного масла, содержащегося в листьях интактного растерния составил 0.2 мл/100г, а его основными компонентами оказались гераниал (22.48%) и нерал (15.64%). Таким образом, монотерпены явились главными компонентами эфирного масла *M. officinalis*. Содержание эфирного масла в листьях тепличных растений составило 0.14 мл/100г. Идентифицировано 27 соединений, среди которых основными компонентами оказались  $\beta$ -кариофиллена оксид (12.9%), гераниал (12.12%), нерал (9.45%) и  $\beta$ -кариофиллен (8.15%). В клеточно-суспензионной культуре содержание эфирного масла составило 0.1мл/100г, однако выход с единицы площади оказался намного больше, в сравнении с другими вариантами. В эфирном масле идентифицировано 25 соединений, где основными компонентами явились кариофиллена оксид (20.48%) и  $\beta$ -кариофиллен (13.5%). Газово-хроматографическое определение компонентов эфирного масла клеточно-суспензионной культуры *M. officinalis* показало, что содержание в ней монотерпенов значительно уменьшилось, а содержание сесквитерпенов увеличилось.

5. Эфирное масло *M. officinalis* проявило сильную антиоксидантную активность, как и синтетический антиоксидант БГА. Эфирное масло *M. officinalis* оказалось весьма полезным для повышения устойчивости подсолнечного масла к окислению, а также продлению срока годности иранской сладости, где рН образцов, обработанных эфирным маслом оставался на уровне 5.5, а вкусовые качества были приемлемы до 6-ой недели начала эксперимента.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Hojat Moradkhani. Investigation of adventitious shoot regeneration from *in vitro* stem explants of *Melissa officinalis* L. Journal of Medicinal Plants Research, Vol. 6 (16), P. 3217-3221, 30 April, 2012.
2. Moradkhani H., Sargsyan E., Acquisition of cell suspension culture of *Melissa officinalis* L., Bulletin of state agrarian university of Armenia, N1 (33), P 60-64, 2011.
3. Moradkhani H., Sargsyan E., Bibak H., Naseri B., Sadat-Hosseini M., Fayazi-Barjin A. and Meftahizade H. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(25), P. 2753-2759, 29 December Special Review, 2010.
4. Heidar Meftahizade, Elmira Sargsyan and Hojat Moradkhani. Investigation of antioxidant capacity of *Melissa officinalis* L. essential oils. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(14), P. 1391–1395, 18 July, 2010.
5. H. Meftahizade, H. Moradkhani, B. Naseri, M. Lofti and A. Naseri, Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4 (3), P. 240-246, 4 February, 2010.

### Մորադխանի Հոջաթ Ալիակբարի

*Melissa officinalis* L. ԿԱԼՈՒՍԱՅԻՆ ԵՎ ԲԶԶԱ-ԿԱՆՈՒԹԱՅԻՆ ԿՈՒՆՏՆՈՒՐԱՅԻ ՄԱՆԴԱՄԻՋԱՎԱՅՐԻ ՕՊՏԻՄԱԼԱՑՈՒՄԸ

### Ամփոփագիր

**Բանալի բառեր`** *Melissa (M) officinalis* L., կալուս, բջջա-կախութային կուլտուրա, եթերայուղ, ֆիտոհորմոններ, հակաօքսիդանտային ակտիվություն, աուքսին:

Աշխատանքի հիմնական նպատակը արժեքավոր դեղաբույսի` *M. officinalis* ներմուծումն է *in vitro* մշակույթ, մեկուսացված կուլտուրայի ստացումը, օպտիմալ պայմանների մշակումը, եթերայուղի պարունակության, դրա հակաօքսիդանտային ակտիվության որոշումը և կիրառումը սննդային արժեք ներկայացնող արևածաղկի ձեթի և Իրանում շատ գործածական քաղցրավենիքի սննդային արժեքի որակի պահպանման համար:

Սերմերը հավաքվել են Իրանի տարբեր բնակլիմայական պայմաններում աճող 4 բուսաբանական այգիների (ք. Համեդան, Ռաշտ, Գազվին, Ուրմիա) բույսերից: Ըստ ծրունակության, ռեգեներացիայի, ընձյուղների արմատակալման արդյունքների որպես լավագույն` հետագա փորձարկման համար, ընտրվել են Համեդանի սերմերը: Սննդամիջավայրերի (ՄՄ, B5, WPM) համեմատական հետազոտման արդյունքում, որպես հիմնական սննդամիջավայր ընտրվել է ՄՄ: *In vitro* պայմաններում սերմերից ստացվել են էքսպլանտներ (ընձյուղի վերնամաս, հիպոկոտիլ, տերևային հատված), դրանցից կալուսային հյուսվածքներ և բջջա-կախութային կուլտուրա:

Ընտրվել են հյուսվածքների պրոլիֆերացիայի և ռեգեներացիայի անհրաժեշտ լավագույն պայմանները: Ռեգեներացիայի լավագույն արագություն` տերևամասի և հիպոկոտիլի համեմատ ցուցաբերել են ընձյուղի ծայրամասից անջատված

մերիստեմատիկ բջիջներով էքսպլանտները: Ընձյուղների զարգացման համար (ուղղակի՝ մերիսթեմային էքսպլանտից և անուղղակի՝ կալուսից) ՏԴՋ պարունակող սննդամիջավայրը կինետիկն համեմատությամբ առավել նպաստավոր է: ՏԴՋ (3մգ/լ) և ՆՔԹ (1.5մգ/լ) պարունակությամբ սննդամիջավայրը ընձյուղառաջացման համար ապահովել է բարձր արդյունավետություն: Արմատակալման համար ստացված ընձյուղներն անջատվել և տնկարկվել են ՆՔԹ (1մգ/լ) հավելմամբ ՄՍ սննդամիջավայրի վրա, որն ապահովել է 96% արդյունք:

Բացահայտվել է 25 օրեկան բուսակներից վերցված էքսպլանտների առավելությունը կալուսի խթանման, կալուսի ծավալի աճի և կալուսառաջացման օրերի կրճատման նպատակով, որի համար նպաստավոր սննդամիջավայր է հանդիսացել ՄՍ + ԻՔԹ (1մգ/լ), ՆՔԹ (1.5մգ/լ) և ՏԴՋ (0.5մգ/լ) համակցությամբ:

Կալուսային հյուսվածքի մաքսիմում աճ դիտվել է 18-րդ օրը և դրանց թարմ և չոր քաշերի լավագույն արդյունք ապահովել է ԻՔԹ (1մգ/լ) և ՏԴՋ (0.5մգ/լ) պարունակող հեղուկ սննդամիջավայրը: 35 մլ սննդամիջավայրում բջիջների լավագույն աճ է նկատվել 1գ բջիջների տնկարկման դեպքում: Մսնդամիջավայրում ածխաջրատների (սախարոզ, ֆրուկտոզ, գլյուկոզ) հավելմամբ լավագույն արդյունք ստացվել է սախարոզի դեպքում: Կալուսային և բջջա-կախության կուլտուրայի համար բացահայտվել են բջիջների աճն ապահովող լավագույն պայմանները:

Բջջա-կախության կուլտուրայում բջիջների թարմ և չոր քաշի առումով ավելի նշանակալի ազդեցություն դիտվել է 60 և 80 գ/լ սախարոզով մշակման դեպքում՝ 8-րդ օրը: Իսկ չոր քաշի վերաբերյալ ստացված տվյալների առավելագույն արդյունք արձանագրվել է 80 գ/լ սախարոզի առկայության դեպքում:

Որոշվել է ինտակտ, ջերմոցային բույսերի և բջջա-կախության կուլտուրայի էթերայուղերի պարունակությունը (համապատասխանաբար՝ 0.20, 0.14, 0.10%) և դրանց բաղադրամասերը: **Ինտակտ բույսի** տերևներում էթերայուղի պարունակությունը 0.2 մլ/100գ է, որի հիմնական բաղադրամասերն են՝ գերանիոլ (22.48%), ներալ (15.64%): Սյսպիսով էթերայուղի հիմնական բաղադրամասը մոնոտերպեններն են: **Ջերմատնային բույսերից** ստացված էթերայուղի պարունակությունը 0.14 մլ/100գ է: Հայտնաբերվել է 27 միացություն որոնց թվում հիմնական բաղադրամասերն են՝ β-կարիոֆիլեն օքսիդ (12.9%), ներալ (9.45%), գերանիալ (12.12%), β-կարիոֆիլեն (8.15%): **Բջջա-կախության** կուլտուրայում էթերայուղի պարունակությունը 0.1մլ/100գ է, սակայն միավոր մակերեսից էլը գերազանցում է մյուս տարբերակներին: Հայտնաբերված 25 բաղադրամասերից հիմնականներն են՝ կարիոֆիլեն օքսիդ (20.48%) և β-կարիոֆիլեն (13.5%): Բջջա-կախության կուլտուրայի էթերայուղի պարունակությունում մոնոտերպենների քանակը ավելի ցածր է, իսկ սեսկվիտերպեններինը՝ ավելի բարձր:

*M. officinalis* էթերայուղը ցուցաբերում է բարձր հակաօքսիդանտային ակտիվություն: Պերօքսիդային և յոդային թվերի արժեքները՝ որպես *M. officinalis* էթերայուղի հակաօքսիդանտային ակտիվությունը որոշող ցուցանիշ փորձարկվել են արևածաղկի ձեթի սննդարժեքի կենսաստեղծության վրա: Ըստ ստացված տվյալների, պերօքսիդային և յոդային թվերի արժեքներն աճել են ուղիղ համեմատությամբ՝ ձեթի պահպանման ժամկետին զուգընթաց: Առաջին շաբաթվա վերջում պերօքսիդային թվի արժեքը կազմել է 1.15, իսկ ութերորդ շաբաթվա

վերջում ստուգիչ խմբում զգալիորեն աճել է մինչև 7.35, մինչդեռ փորձի ավարտին եթերայուղ պարունակող նմուշներում այդ արժեքը կազմել է 0.95 և 0.92, համապատասխանաբար: Փորձի 8-րդ շաբաթվա վերջում յոդային թվի արժեքը եթերայուղ պարունակող նմուշներում հասել է 140 ինչը նշանակալիորեն բարձր է եղել ստուգիչ խմբի տվյալներից (106): 9-րդ շաբաթվա ավարտին նկատվել է համի չնչին փոփոխություն, մինչդեռ ստուգիչ խմբում զգալի փոփոխություններ ի հայտ են եկել սկսած 3-րդ շաբաթից: Նույնպիսի դրական արդյունք է արձանագրվել նաև սինթետիկ նյութով՝ բութիլիիդրօքսիանիզոլով (ԲՀՄ) մշակված արևածաղկի ձեթի նմուշներում: Պարզվել է, որ ինչպես եթերայուղով, այնպես էլ ԲՀՄ մշակման դեպքում մինչև 6-րդ շաբաթը համի փոփոխություն չի արձանագրվում, ինչը վկայում է *M. officinalis* եթերայուղի բարձր հակաօքսիդանտային ակտիվության մասին:

Բացահայտվել է նաև եթերայուղի դրական ազդեցությունը Իրանում շատ գործածական քաղցրավենիքի սննդային արժեքների որակի պահպանման համար:

Հաստատվել է տարբեր նյութերով (հորմոնալ, հանքային և ածխաջրածնային հավելումներ) ՄՄ սննդամիջավայրի օպտիմալացման արդյունավետությունը *M. officinalis* աճեցման, ընձյուղառաջացման, կալուսային, բջջա-կախութային կուլտուրայի աճեցման, եթերայուղի ստացման նպատակով:

**Moradkhani Hojat Aliakbar**  
**OPTIMIZATION OF NUTRIENT MEDIUM OF CALLUS AND CELL-SUSPENSION CULTURE OF *MELISSA OFFICINALIS* L.**

**Summary**

**Key words:** *Melissa (M) officinalis* L., callus, cell-suspension culture, essential oil, phytohormones, antioxidant activity, auxin.

The main aim of the current research is introduction of medicinal plant *M. officinalis* to *in vitro* culture, receipt of isolated culture, elaboration of optimal conditions, determination of essential oil content as well as the antioxidant activity and its application with the aim of promoting the durability and taste quality of useful Iranian candy and sunflower oil having nutritional value.

The seeds of *M. officinalis* were collected from plants grown in four different climatic regions of botanical gardens (Hamedan, Rasht, Ghazvin, Urmia) of Iran. For further investigation as the best variant according to the results of shoot germination, regeneration and root formation were selected seeds collected from Hamedan population. In the result of comparative analysis of basal media (MS, B5, WPM) was selected MS. Explants (shoot tip, hypocotyl, leaf segment) were obtained from the plantlets cultivated in *in vitro* conditions from which callus tissue and cell suspension culture were introduced.

For tissue proliferation and regeneration were chosen appropriate conditions. The best regeneration rate demonstrated shoot tips excised from meristem explants compared with leaf segment and hypocotyl. For shoot induction (direct regeneration from meristem explants and indirect from callus) more suitable medium was MS supplemented with TDZ compared with Kinetin. Medium supplemented with TDZ (3mg/l) and NAA (1.5mg/l) provided high productivity for shoot induction. For root formation the obtained shoots were excised and



transplanted on MS medium supplemented with NAA (1mg/l) which provided 96% risogenesis.

It was revealed that for callus induction, callus volume and days required for callus induction the best explants were 25 day seedlings for which the suitable medium was MS with IAA (1mg/l), NAA (1.5mg/l) and TDZ (0.5mg/l) content.

Maximum growth of callus induction was reported on the 18<sup>th</sup> day and the highest result of callus fresh and dry weight provided the liquid medium supplemented with IAA (1mg/l) and TDZ (0.5 mg/l). The best cell growth was observed in case of culturing 1g cells on 35 ml medium. Among carbohydrates (sucrose, glucose, fructose) used on the medium the highest result demonstrated the medium with sucrose content. For callus and cell-suspension culture were determined suitable conditions.

In suspension culture the result of cell fresh and dry weight was observed significant increase in case of 60 and 80 g/l of sucrose on the 8<sup>th</sup> day of cultivation. But in case of dry weight maximum result was recorded at 80 g/l of sucrose content.

In intact, greenhouse plants and cell-suspension culture was determined the content of essential oils (0.2, 0.14, 0.1% respectively) and their components. The content essential oil was 0.2 ml/100gr in the leaves from **intact plant**. The major components were geranial (22.48%), neral (15.64%). The obtained results showed that monoterpenes were the main components in chemical analysis of essential oil of *M. officinalis*. The percentage of essential oil was 0.14 ml/100gr in the leaves from **greenhouse**. In chemical analysis were identified 27 components. The major components were  $\beta$ -caryophyllene oxide (12.9%), neral (9.45%), geranial (12.12%),  $\beta$ -caryophyllene (8.15%). In **cell-suspension** culture the content of essential oil was 0.1ml/100gr, but in case of the yield per unit of area was much more, in comparison with other variants. In essential oil were identified 25 compounds:  $\beta$ -caryophyllene oxide (20.48%),  $\beta$ -caryophyllene (13.15%). The content of monoterpenes significantly decreased, but the content of sesquiterpenes increased.

Essential oil of *M.officinalis* has high antioxidant activity. Peroxide and iodine value define the antioxidant activity of essential oil of *M. officinalis* which was determined in sunflower oil. The results of analyses showed that peroxide and iodine value were increased linearly with the storage time of sunflower oil. At the end of the 1<sup>st</sup> week peroxide value was 1.15. Iodine value during 8 weeks it increased and reached to 7.35, but at the end of the experiment the essential oil samples it reached to 0.95 and 0.92 respectively. At the end 8<sup>th</sup> week of the experiment in essential oil samples iodine value reached to 140 which was significantly higher compared with control sample (106). At the end of the 9<sup>th</sup> week were observed insignificant changes of taste in sunflower oil, meantime in control samples the same process was observed since the 3<sup>rd</sup> week. Similar positive results also were reported in sunflower oil samples treated with synthetic BHA (Butylated hydroxy-anisole). It was found out that sunflower oil treated with essential oil and BHA till the 6<sup>th</sup> day any changes in taste were not recorded. This fact confirms high antioxidant activity of *M. officinalis* essential oil.

It was also revealed the positive influence of *M. officinalis* essential oil on durability and taste quality of Iranian candy.

The productivity of optimization of MS medium with different concentrations of hormones and carbohydrates was confirmed for shoot induction, callus tissue and cell suspension culture, essential oil and cultivation of *M. officinalis*.