

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ IN VITRO ШАЛФЕЯ КЛЕЙКОГО (SALVIA GLUTINOSA L.)

¹Карпеченко К.А., ¹Землянухина О.А., ¹Веprinцев В.Н., ¹Карпеченко Н.А.,
¹Карпеченко И.Ю., ¹Кондратьева А.М., ²Калаев В.Н.,
²Лепешкина Л.А., ²Серикова В.И.

¹ФГУП «Научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции»,
Воронеж, e-mail: leo-silva@rambler.ru;

²ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Ботанический сад
им. проф. Б.М. Козо-Полянского Воронежского государственного университета,
Воронеж, e-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Изучены особенности микроклонального размножения редкого вида региональной флоры шалфея клейкого (*Salvia glutinosa* L.). Подобраны условия для введения шалфея клейкого в стерильную пробирочную культуру in vitro. Определены тип первичного экспланта, способ стерилизации, солевой и гормональный состав сред. Отработана методика избавления вторичных эксплантов от остаточной эндогенной инфекции путем депонирования их в растворе антибиотика. Оптимизированы минеральный и гормональный состав сред для регенерации имеющихся меристем первичного экспланта, поддержания, мультипликации шалфея in vitro и индукции корнеобразования. Определены сроки, необходимые для прохождения всех этапов развития шалфея клейкого в культуре in vitro: от первичного экспланта до укорененного регенеранта в питательной среде. Полученные растения не витрифицированы, обладают хорошим ростом и развитием вегетативных органов, корней и пригодны для адаптации к почвенным условиям ботанического сада.

Ключевые слова: шалфей клейкий, введение in vitro, микроклональное размножение, культура тканей, корнеобразование

IN VITRO INTRODUCTION OF SALVIA GLUTINOSA L.

¹Karpechenko K.A., ¹Zemlianukhina O.A., ¹Veprintsev V.N., ¹Karpechenko N.A.,
¹Karpechenko I.Y., ¹Kondratieva A.M., ²Kalaev V.N., ²Lepeshkina L.A., ²Serikova V.I.

¹Research Institute of Forest Genetics and Breeding, Voronezh, e-mail: leo-silva@rambler.ru;

²Voronezh State University, Botanical garden of Voronezh state university by the name
of professor B.M. Kozo-Polyansky, Voronezh, e-mail: Dr_Huixs@mail.ru

The features of micropropagation of *Salvia glutinosa* L. *Salvia glutinosa* is a rare species of the regional flora. This species is listed in the regional lists of protected species of plants in central Russia. *Salvia glutinosa* cultivated in the botanical garden by the name professor B.M. Kozo-Polyansky of Voronezh State University in 2003. The study identified by the type of primary explant, the method of sterilization, and hormonal composition of saline environments. A technique for getting rid of secondary explants of endogenous infection. Optimized structure of the mineral and hormonal environment for the regeneration of the primary meristem explants, *Salvia glutinosa* in vitro multiplication and rooting. The terms of passing through all stages of development of *Salvia glutinosa* in culture in vitro: from the primary explant to regenerate rooted in the culture medium. The resulting plants are not vitrified, have good growth and development of vegetative organs and roots. They are suitable for adaptation to soil conditions botanical garden. As a result, you can get a clean source of virus free planting material of introduction for further work.

Keywords: *Salvia glutinosa*, in vitro introduction, microclonal multiplication, tissue culture, rooting

Шалфей клейкий (*Salvia glutinosa* L.) – лекарственное и декоративное растение семейства Губоцветные (*Lamiaceae*). Общий ареал вида охватывает Среднюю и Атлантическую Европу, Западное и Восточное Средиземноморье, Крым, Кавказ и Европейскую часть Средней полосы России [3]. В Центральном Черноземье указывается для Воронежской, Липецкой и Тамбовской областей. Это опушечно-лесной длиннокорневищный травянистый многолетник, 50–120 см высотой, мезофит, микотроф, эвтроф, светолюбивый, теневыносливый [2]. Цветет в августе-октябре. Размножается семенами. Шалфей клейкий содержит эфирное масло, имеющее зеленоватый цвет

и обладающее сильным, напоминающим мускат, не очень приятным запахом [3].

В ботаническом саду им. проф. Б.М. Козо-Полянского Воронежского госуниверситета культивируется с 2003 года. Выращен из семян репродукции ботанического сада им. акад. О.В. Фомина Киевского госуниверситета. Шалфей клейкий представлен в коллекции «Систематикум флоры Центрального Черноземья» и экспозиции «Дубравы Центрального Черноземья», где редко дает самосев.

В культуре in vitro растения шалфея клейкого образуют многочисленные стебли до 150 см высотой. Внутри куста стебли обычно прямые, по краю – слабоветвящи-

еся, имеют железистое опушение. Ширина листьев 7,5–12,0 см. Длина соцветий от 13 до 40 см. Цветки в мутовках по 2–6, венчики

длиной 3,0–3,5 см, желтые, с красноватым тонким узором на губах и точками с серповидно изогнутой верхней губой (рис. 1).



Рис. 1. Шалфей клейкий на экспозиции «Дубравы Центрального Черноземья» ботанического сада Воронежского госуниверситета

Шалфей клейкий является редким и охраняемым растением. Занесен в Красные книги Республики Башкортостан, Республики Татарстан, Калужской, Московской, Пензенской, Самарской, Саратовской, Тверской и Тульской областей [3]. Нарушение его местообитаний (вырубка лесов, рекреация, лесные пожары) ставит под угрозу существование устойчивых популяций этого вида в регионе. В ботаническом саду Воронежского госуниверситета разрабатываются методы его размножения, которые позволят получить посадочный материал для репатриации растений шалфея клейкого в природные фитоценозы.

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей введения в культуру *in vitro* шалфея клейкого. Согласно источникам литературы клональное размножение шалфея клейкого ранее не проводилось.

Материалы и методы исследования

Для введения в стерильную пробирочную культуру *in vitro* использовали осенние побеги растений, культивируемых в ботаническом саду Воронежского госуниверситета. В качестве первичного эксплантата был выбран стеблевой сегмент, содержащий пазушные почки, из которых после введения происходило развитие побегов (рис. 2). Стерилизацию проводили

по следующей схеме: побег вводимого растения аккуратно мыли под проточной водой мягкой губкой с ПАВ содержащим моющим средством. Затем обрезали листья на половину длины черешка и нарезали побег на сегменты, удобные для дальнейшей отмычки [1]. Полученные таким образом участки стебля с междоузлиями помещали в стеклянную емкость, заливали водопроводной водой, добавляли каплю ПАВ содержащего моющего средства, накрывали марлей и качали на качалке 10 минут. После этого материал ставили под проточную воду, не снимая марли, на 20 минут. По истечении этого времени в емкость с побегами заливали дистиллированную воду и снова качали 10 минут. Следующие этапы проводили в стерильных условиях: материал подвергали обеззараживанию в стерилизующих растворах, после чего троекратно по 5 минут отмывали в стерильной дистиллированной воде на качалке.

Для обеззараживания первичных эксплантов поверхностную стерилизацию проводили тремя способами. В первом случае материал помещали на 25 минут в раствор гипохлорита натрия (коммерческий отбеливатель «Белизна») и стерильной дистиллированной воды в соотношении 1:3 соответственно. Второй способ отличается тем, что в растворе гипохлорита натрия той же концентрации, что и в предыдущем варианте, экспланты находились 20 минут, после чего их погружали в 70%-й спирт на 10 секунд. В третьем случае использовали 4% раствор гипохлорита натрия, содержащий 0,04%-й мертиолята и стерилизовали 20 минут.



Рис. 2. Побегиообразование из пазушных почек на первичных эксплантах шалфея клейкого

После поверхностной стерилизации все экспланты помещали в пенициллиновые пузырьки на полную по макросолям среду Мурасиге и Скуга [5] с добавлением 1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП).

Для мультипликации образовавшиеся из пазушных почек регенеранты в ламинаре отделяли от первичного экспланта и помещали на половинную по макросолевному составу среду WPM с добавлением 0,2 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л гибберелловой кислоты (GA_3).

В некоторых случаях от эндогенной инфекции, проявившейся после отделения регенерантов от первичных эксплантов, удавалось избавиться обработкой их раствором бензилпенициллина натриевой соли (1000000 ед./500 мл воды: содержимое одного пузырька антибиотика в 500 мл стерильной дистиллированной воды) в течение 15 минут.

Результаты исследования и их обсуждение

В культуру *in vitro* шалфей клейкий вводили осенними побегами, срезанными с растений, культивируемых в условиях открытого грунта в ботаническом саду Воронежского государственного универ-

ситета. Исходный материал для введения в стерильную культуру *in vitro* отличался высоким уровнем внешней и внутренней естественной инфекции. Возможно это связано с тем, что растения были срезаны в осенний период. Поэтому были опробованы три способа стерилизации. Наблюдения показали, что стерилизующий раствор с 4%-м гипохлоритом натрия и мертиолятом малоэффективен, так как все вводимые побеги в довольно короткий срок (5–6 суток) пропали от развития внутренней бактериальной инфекции. Экспланты, введенные с использованием метода стерилизации гипохлоритом натрия со спиртом, выглядели лучше всего, но в базальной части также была инфекция. Метод стерилизации с использованием только гипохлорита натрия в большой концентрации дольше всего не давал проявляться колониям бактерий, что позволило получить регенеранты из пазух листьев и отделить их от первичных эксплантов (рис. 3).



Рис. 3. Регенеранты, отделенные от первичного экспланта шалфея клейкого

Таким образом, типом первичного экспланта был выбран стеблевой сегмент, содержащий почку и около сантиметра стебля вверх и вниз от почки. Вводимые экспланты помещали в вертикальном положении на полную по солевому составу среду WPM с добавлением 1 мг/л 6-БАП. На этой среде из пазушных почек быстро начинали развиваться побеги – регенеранты, поэтому она оптимальна для развития уже имеющихся меристем. Отметим, что долгое содержание на гормональной среде как первичных эксплантов, так и полученных из них регенерантов не целесообразно. При длительном культивировании растения становятся витрифицированными (обводненными) и могут потерять способность к размножению и корнеобразованию, а впоследствии погибнуть. В результате от пятнадцати первичных эксплантов было получено всего три регенеранта, вследствие чего оказалось актуально увеличение их количества с помощью микрочеренкования. Отделенные побеги поме-

щали в пенициллиновые пузырьки со средой WPM половинной по макросолевому составу (1/2 WPM) с добавлением 0,2 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л ГА₃, поскольку она подходит для мультипликации и вытягивания образующихся адвентивных побегов. Для избавления их от эндогенной инфекции, проявившейся после отделения регенерантов, качали на чашалке в растворе бензилпенициллина и пересаживали на свежую среду того же состава.

Депонирование *in vitro* проводили с периодическими пересадками на свежую среду, чтобы избежать высыхания и изменения состава среды вследствие жизнедеятельности растений [4].

Следующей после размножения стояла задача корнеобразования. При регулярной пересадке эксплантов на свежую среду корни образовывались в базальной части либо из небольшого каллуса, либо непосредственно на месте среза (рис. 4). Укоренение *in vitro* наблюдалось не ранее, чем через месяц поддержания стерильной культуры.

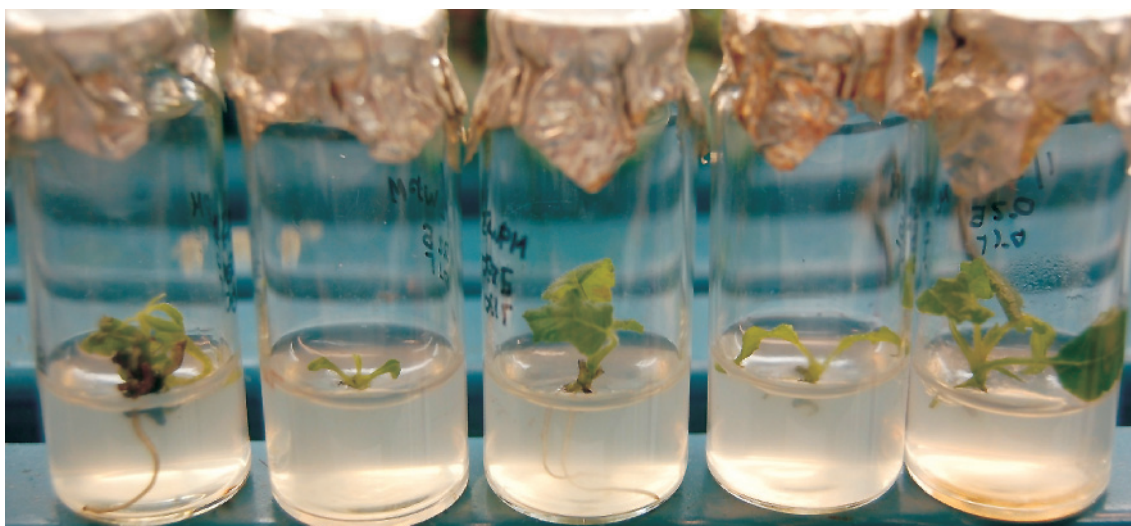


Рис. 4. Корнеобразование у шалфея клейкого в культуре *in vitro*

Полученные укорененные *in vitro* растения шалфея клейкого пригодны для перевода в условия *in vivo*. Сначала они должны пройти период адаптации к почвенным условиям в закрытом грунте, после чего смогут расти в открытом грунте. К преимуществам такого способа размножения можно отнести возможность размножения круглый год, поддержание и сохранение в виде растущей культуры в трудные периоды, простоту передачи и обмена растениями между лабораториями и конечными получателями продукции, возможность быстрого и масштабного тиражирования культур, получение чистого безвирусного исходного растительного

материала для дальнейших интродукционных работ.

Заключение

В результате проведенного нами исследования был разработан метод микрочлонального размножения редкого вида региональной флоры – шалфея клейкого. В процессе работы был подобран режим стерилизации, оптимизирован солевой и гормональный состав питательных сред для депонирования, мультипликации и корнеобразования эксплантов шалфея клейкого. Получены укоренившиеся в культуре *in vitro* растения, пригодные для адаптации к эдафическим условиям.

Работа выполнена в рамках и при поддержке государственного контракта на выполнение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» № 16.518.11.7099.

Список литературы

1. Бутова Г.П., Табацкая Т.М., Скробова Л.Л. Использование методов культуры ткани для размножения и генетического улучшения селекционного материала лесных древесных растений Центральный научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции // Генетика и селекция в лесоводстве. – М., 1991. – С. 41–49.
2. Маевский П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. – 10-е изд. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 600 с.
3. Флора СССР. Т. XXI. Губоцветные (вторая часть) [под ред. В.Л. Комарова]. – М.-Л.: Изд-во Ботанического института академии наук СССР, 1954. – 366 с.
4. Lloyd G., McCown B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture // Proc. Int. Plant Prop. Soc. – 1981. – Vol. 30. – P. 421–437.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.

References

1. Butova G.P., T.M. Tabackaja, L.L. *Skrobova Ispol'zovanie metodov kul'tury tkanej dlja razmnozhenija i geneticheskogo uluchshenija lesnyh drevesnyh rastenij* [Using tissue culture techniques for breeding and genetic improvement of breeding material of forest woody plants Central Research Institute of Forest Genetics and Plant Breeding], Genetics and breeding in forestry, 1991. pp. 41–49.
2. Maevskij P.F. *Flora srednej polosy evropejskoj chasti Rossii* [The flora of central European part of Russia]. Moscow, 2006. 600 p.
3. Flora of the USSR Lamiaceae (the second part). Vol. 21. [*Flora SSSR Gubocvetnye (vtoraja chast')*]. Moscow-Leningrad, BIN Publ., 1954. 366 p.
4. Lloyd G., McCown B., Proc. Int. Plant Prop. Soc. 1981. Vol. 30. pp. 421–437.
5. Murashige T., Skoog F., Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. pp. 473–497.

Рецензенты:

Свистова И.Д., д.б.н., профессор кафедры биологии растений и животных естественно-географического факультета ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный педагогический университет», г. Воронеж;

Мелькумова Е.А., д.б.н., профессор кафедры ботаники, защиты растений, биохимии, микробиологии ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», г. Воронеж.

Работа поступила в редакцию 06.04.2012.