

УДК 582.61:57.082.261

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПОСОБОВ АСЕПТИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ
В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* РАСТЕНИЙ *MELITTIS SARMATICA* КЛОК.****Е.В. САХВОН¹, О.А. КУДРЯШОВА², И.Ф. ВАЙНОВСКАЯ³, А.А. ВОЛОТОВИЧ¹**¹Полесский государственный университет,

г. Пинск, Республика Беларусь

²Республиканский лесной селекционно-семеноводческий центр,

Минский район, Республика Беларусь

³ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»,

г. Минск, Республика Беларусь

Введение. В настоящее время одна из наиболее острых экологических проблем в мире – стремительное сокращение ареалов распространения и полное исчезновение видов растений. Усиливается сокращение биологического разнообразия, а также возможность устойчивого использования природных биологических ресурсов [1, с. 53; 2, с.2]. Исключительно актуальной становится проблема сохранения видового разнообразия растительного мира. На сегодняшний день 70% дикорастущих растений нашей страны находятся под угрозой исчезновения. За последние 150 лет под влиянием комплекса антропогенных факторов из состава флоры Республики Беларусь выпало 46 видов аборигенных сосудистых растений [3, с.173].

Культивирование растений в условиях *in vitro* представляет собой альтернативный, перспективный способ сохранения генофонда высших растений. Биотехнологические методы, основанные на клональном микроразмножении растений, играют важную роль в сохранении видового разнообразия. Такие методы позволяют быстро размножать и сохранять редкие и исчезающие виды, возвращать их в естественные условия обитания, в короткие сроки получать биомассу растений для нужд промышленности [4, с.68; 5, с.184]. В качестве исходного материала для асептического введения и стабилизации *in vitro* используют различные части растений: стеблевые сегменты, эпидермис и гипокотили, ткани зародыша и семена. При работе с редкими и исчезающими видами предпочтительно использовать семенной материал, поскольку это позволяет на максимальном уровне сохранить естественную популяцию. Однако у многих редких видов растений возникает проблема глубокого покоя семян, преодолеть которую возможно в условиях *in vitro*, и значительно сократить срок вывода семян из состояния покоя [6, с.3].

Кадило сарматское – многолетнее самоопыляемое травянистое растение семейства *Lamiaceae* L [7, с. 221]. В диком виде распространено в Средней и Атлантической Европе, на западе европейской части России [8, с.87]. Это ценное лекарственное, пряное, декоративное и медоносное растение [9, 3152; 10, с.154; 11, с.56]. Широкий спектр хозяйственно полезных свойств определяется его богатым химическим составом [12, с.114]. Во многом это служит предпосылкой тому, что уже не один десяток лет кадило сарматское находится в статусе редкого растения для территории нашей страны [7, с.221; 13, с.79]. На данный момент оно входит в Список редких и находящихся под угрозой исчезновения на территории Республики Беларусь видов диких животных и дикорастущих растений, включенных в Красную книгу Республики Беларусь 2014 года: 3 категория природоохранной значимости [14, с.189].

Кадило сарматское обладает аутохорией. Семена сразу же после созревания выпадают из чашечек, они имеют недоразвитый зародыш и при хранении быстро теряют всхожесть. Это затрудняет выращивание растения, однако наиболее эффективным способом репродукции кадила в культуре на сегодняшний момент остается генеративный [11, с.56; 15, с.66].

В настоящее время имеются данные о микрклональном размножении *Melittis sarmatica* в условиях *in vitro*. Авторы исследуют как эффективность размножения кадила микрочеренками, так и культивирование каллусной ткани этого растения [16, с.264; 17, с.420; 18, с. 770; 19, с.18]. Учитывая ограниченные природные запасы кадила и сложность его размножения семенами, а также скудные данные по асептическому введению и размножению кадила *in vitro*, целью наших исследований явилось изучение и сравнение разных способов асептического введения *in vitro* растений кадила сарматского (*Melittis sarmatica* Klok.), с использованием семян и черенков с пазушными почками.

Методика и объекты исследования. Объектом исследования стали растения кадила сарматского (*Melittis sarmatica* Klok.), интродуцированные в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси в условиях открытого грунта.

Для асептического введения в культуру *in vitro* использовали свежесобранные семена и черенки с пазушными почками растений.

Семена стерилизовали 0,1% раствором нитрата серебра при продолжительности экспозиции 5 и 10 минут. После стерилизации семена трехкратно промывали в стерильной бидистиллированной воде в течение 30 минут. Затем выкладывали в стерильные стеклянные емкости объемом 250 мл на стерильные бумажные фильтры, смоченные стерильной бидистиллированной водой с добавлением гормонов по схеме:

1. 0 мг/л 6-БАП и 0 мг/л ЭБ (контроль)
2. 0,1 мг/л 6-БАП
3. 0,5 мг/л 6-БАП
4. 1,0 мг/л 6-БАП
5. 0,1 мг/л ЭБ
6. 0,5 мг/л ЭБ
7. 1,0 мг/л ЭБ
8. 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л ЭБ

Емкости с семенами помещали на стеллажи световой установки культурального помещения биотехнологической лаборатории НИЛ клеточных технологий в растениеводстве ПолесГУ при температуре +25°C, фотопериоде день/ночь – 16/8ч, освещенности 6000 лк, относительной влажности воздуха 70%. Учет общего количества стерильных всходов проводили дважды: через четыре и через восемь недель культивирования. Количество семян в каждом из восьми вариантов опыта, в среднем, составило 30 штук. Повторность трехкратная.

Стерильные взошедшие семена, полученные после стерилизации 0,1% раствором AgNO₃ были высажены на агаризованную питательную среду на микро-, макро- солевой основе среды МС [20, с.23], содержащую тиамин (0,2 мг/л), пиридоксин (0,8 мг/л), мезоинозит (100 мг/л) и сахарозу (1%), 9 г/л агар-агара, при pH 5,7. Перед посадкой на агаризованную, питательную среду у проростка отсекали гипокотиль практически полностью, оставляя только несколько миллиметров. Учет общего количества стерильных регенерантов проводили через четыре недели культивирования на стеллажах световой установки культурального помещения биотехнологической лаборатории НИЛ клеточных технологий в растениеводстве ПолесГУ при температуре +25°C, фотопериоде день/ночь – 16/8ч, освещенности 6000 лк, относительной влажности воздуха 70%.

При использовании черенков для получения асептической культуры срезы были запарафинированы, что исключило проникновение стерилизующего агента внутрь сосудистого цилиндра и предотвратило значительную интоксикацию ткани. Перед стерилизацией растительный материал был тщательно отмыт хозяйственным мылом, а затем промыт дистиллированной водой. Далее черенки подвергались предварительной обработке 0,01% раствором перманганата калия (время экспозиции 3 минуты) и 70% этиловым спиртом (время экспозиции 20 секунд). В качестве основного стерилизующего агента был использован 0,1% раствор диацета. Изучали эффективность действия этого вещества при разном времени экспозиции (3, 5, 7 и 10 минут). После стерилизации черенки пятикратно промывали стерильной дистиллированной водой. Концы стебля, покрытые парафином, отрезали и черенки высаживали в пробирки с агаризованной питательной средой, содержащей половинный состав микро-, макро- солевой основы по Мурасиге и Скугу (МС) [20, с.23], тиамин (0,2 мг/л), пиридоксин (0,8 мг/л), мезоинозит (100 мг/л) и сахарозу (1%), 9 г/л агар-агара, при pH 5,7. Пробирки с черенками помещали на стеллажи световой установки культурального помещения при температуре +25°C, фотопериоде день/ночь – 16/8ч, освещенности 6000 лк, относительной влажности воздуха 70%.

Результаты и их обсуждение. При получении асептической культуры *in vitro* немаловажная роль в процессе стерилизации принадлежит подбору стерилизующих соединений, эффективности их концентраций и продолжительности времени обработки с целью освобождения от инфекции и получения высокого выхода жизнеспособных, регенерирующих эксплантов. Для стерилизации материала используют различные стерилизующие соединения с различной концентрацией и временем экспозиции [21, с.19].

Стерилизующие соединения по степени их дезинфицирующего действия условно можно разделить на несколько групп: соединения, обладающие сильным дезинфицирующим действием – соединения, содержащие ртуть (сулема, диацетид, азотнокислая ртуть); соединения, обладающие

средним дезинфицирующим действием – содержащие в своем составе активный хлор (гипохлориты натрия, калия, кальция, хлорамин); соединения, обладающие слабым дезинфицирующим действием – перекись водорода и перманганат калия с присущими им окислительными свойствами [22, с.47].

В результате пятиминутной экспозиции в 0,1% растворе AgNO₃ стерильными оказались 92,2% семян (таблица 1).

Таблица 1 – Процент всхожести и стерильности семян кадила сарматского после обработки 0,1% раствором AgNO₃

Время обработки AgNO ₃	Всхожесть, %	Стерильность, %
5 минут	1,0	92,2
10 минут	2,0	98,0

При увеличении времени экспозиции до 10 минут, процент стерильных семян увеличился до 98,0%. Процент взошедших семян при пятиминутной обработке 0,1% раствором AgNO₃ составил 1%, а при 10-минутной обработке – 2%, от общего количества семян в восьми вариантах опыта. Увеличение времени экспозиции семян в 0,1% растворе AgNO₃ до 10 минут привело к двукратному увеличению количества взошедших, стерильных семян (таблица 1).

Наиболее высокие показатели по стерилизации и всходам семян кадила сарматского наблюдались в вариантах опыта с 0,5–1,0 мг/л 6-БАП (2,1–6,0%), а также при сочетании 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л ЭБ (3,1–4,8%), в зависимости от концентрации фитогормонов и времени экспозиции в 0,1% растворе AgNO₃ (таблица 2). В присутствии 0,1–1,0 мг/л ЭБ количество взошедших, стерильных семян составило 1%.

Экспланты, полученные из стерильных проростков высаживали на агаризованную питательную среду без фитогормонов и осуществляли учет количества стерильных регенерантов через четыре недели культивирования на стеллажах световой установки. Все регенеранты, полученные из семян, проходивших стерилизацию в 0,1% растворе AgNO₃ на протяжении 5 минут, оказались инфицированы. Количество стерильных, жизнеспособных растений, полученных из семян, проходивших стерилизацию в 0,1% растворе AgNO₃ на протяжении 10 минут, составило 93%.

Таблица 2 – Влияние времени экспозиции семян в 0,1% растворе AgNO₃ и концентрации гормонов на всхожесть и контаминацию семян кадила сарматского

Концентрация гормонов, мг/л	Время экспозиции в 0,1% растворе AgNO ₃ , мин			
	5		10	
	Наличие контаминации, %	Количество взошедших, стерильных семян, %	Наличие контаминации, %	Количество взошедших, стерильных семян, %
-	7,3	0	7,2	0
6-БАП 0,1	9,4	0	-	0
6-БАП 0,5	7,3	2,1	-	3,6
6-БАП 1,0	7,3	2,1	-	6,0
ЭБ 0,1	10,4	0	-	1,2
ЭБ 0,5	5,2	0	9,4	0
ЭБ 1,0	5,2	1,0	-	0
6-БАП 0,5 +ЭБ 0,5	10,4	3,1	-	4,8

Примечание: 6-БАП – 6-бензиламинопурин; ЭБ – 24-эпибрассинолид.

При использовании черенков кадила сарматского в качестве исходного материала для асептического введения в культуру *in vitro* показано, что время стерилизации влияло не только на стерильность исходного материала, но и на его жизнеспособность (таблица 3). Так, при стерилизации черенков 0,1% раствором диацита в течение 3 минут не было получено стерильных растений. С

увеличением времени обработки 0,1% раствором диацида возрастало количество стерильных черенков и при 10 минутной экспозиции достигло 100%. Однако большинство черенков оказывались нежизнеспособны, а оставшиеся живыми черенки слабо регенерировали и не образовывали корней.

Таблица 3 – Влияние времени стерилизации черенков кадила сарматского 0,1% раствором диацида на их стерильность, жизнеспособность и укореняемость *in vitro*

Время стерилизации 0,1% диацидом, мин.	Стерильность материала, %	Частота некроза, %	Укоренившиеся черенки, %
3	0,0	100,0	0,0
5	10,4	82,7	8,5
7	72,6	37,3	28,7
10	100,0	92,1	0,0

Наилучшие результаты были получены при 7 минутной обработке 0,1% раствором диацида, но и в данном случае только 28,7% регенерантов после четырех недель культивирования образовывали корни.

Хотя процесс образования корней в условиях *in vitro* у растений семейства *Lamiaceae* (роды *Lavandula*, *Salvia*) напрямую зависит от присутствия в среде культивирования ауксинов [23, с. 599; 24, с. 80], растения *Melittis sarmatica* в условиях *in vitro* не нуждаются в добавлении гормонов, стимулирующих корнеобразование. При добавлении в среду культивирования индолилмасляной кислоты в концентрации 0,25-1,00 мг/л количество корней у регенерантов кадила сарматского уменьшается в 1,2-1,5 раз, по сравнению с безгормональным контролем [4, с.71]. Схожий эффект наблюдается и у *Salvia officinalis* L. [25, с. 31], также представителя семейства *Lamiaceae*.

Заключение. При асептическом введении в культуру *in vitro* семян кадила сарматского, с использованием 0,1% раствора $AgNO_3$ в качестве стерилизующего агента на протяжении 5 или 10 минут, стерильность семян составила 92,2% и 98,0%, соответственно, а всхожесть – 1% и 2%, соответственно.

Наиболее высокие показатели по стерильности и всхожести семян наблюдались при сочетании 6-БАП и ЭБ в концентрациях по 0,5 мг/л (всхожесть составила 3–5%), а также при добавлении в среду только 0,5–1,0 мг/л 6-БАП (всхожесть составила 2–6%), или только 0,1–1,0 мг/л ЭБ (всхожесть составила 1–2%).

Экспланты из визуально стерильных проростков семян, полученных при стерилизации 0,1%-ным раствором $AgNO_3$ на протяжении 5 минут, оказались инфицированы через четыре недели культивирования после пересадки в агаризованную питательную среду. Количество стерильных, жизнеспособных растений, полученных из семян, проходивших стерилизацию в 0,1% растворе $AgNO_3$ на протяжении 10 минут, составило 93%.

При стерилизации черенков кадила сарматского в 0,1% растворе диацида в течение 3–10 минут количество стерильных черенков увеличивалось прямо пропорционально от 0 до 100%. С увеличением времени экспозиции материала в 0,1% растворе диацида большинство черенков оказались нежизнеспособными, а оставшиеся живыми черенки слабо регенерировали и не образовывали корней.

Наиболее высокие результаты по регенерации (62,7%) и укореняемости (28,7%) стерильных черенков были получены при семиминутной обработке 0,1% раствором диацида.

Авторы выражают искреннюю благодарность академику НАН Беларуси, доктору химических наук, профессору Владимиру Александровичу Хрипачу за любезно предоставленный для исследований 24-эпибрассинолид, произведенный на базе лаборатории химии стероидов ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси».

ЛИТЕРАТУРА

1. Edison, S. Biodiversity of Tropical Tuber Crops in India / S. Edison [et al.] // National Biodiversity Authority Chennai, TamilNadu, India, 2006. – 60 p.
2. Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow / A. Gurib-Fakim // Molecular Aspects of Medicine. – 2006. – vol. 27. – P. 1–93.

3. Об установлении списков редких и находящихся под угрозой исчезновения на территории Республики Беларусь видов диких животных и дикорастущих растений, включаемых в Красную книгу Республики Беларусь – Постановление Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь, 9 июня 2014 г., № 26 // Нац. реестр правовых актов Респ. Беларусь. – 2014. – № 28. – С. 173-189.
4. Wączek, K. In vitro propagation of bastard balm (*Melittis melissophyllum* L.) / K. Wączek [et al.] // *Herba Pol.* – 2015. – Vol. 61(3). – P. 67–76.
5. Сахвон, Е.В. Оздоровление растений *Melittis sarmatica* в культуре *in vitro* / Е.В. Сахвон, Т.И. Фоменко // Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов: материалы III Междунар. Конф., посвяще. 110-летию со дня рожд. акад. Н.В. Смольского, Минск, 7–9 октября 2015 г.: в 2 ч. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]; редкол.: В.В. Титок [и др.]. – Минск : Конфидо, 2015. – С. 184–186.
6. Ветчинкина, Е.М. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.02.01 / Е.М. Ветчинкина; ГБС им. Н.В. Цицина РАН. – М., 2010. – 170 с.
7. Гречаный, И.А. Большой иллюстрированный справочник лекарственных трав и растений / И.А. Гречаный. – Харьков : Книжный клуб «Клуб семейного досуга», 2015. – 544 с.
8. Природа Беларуси: энциклопедия. В 3 т. Т.3. Растения, грибы, животные / редкол.: В.Ю. Александров [и др.]. – Минск: Беларус. Энцыкл. Імя П.Броўкі, 2014. – 464 с.
9. Kaurinovic, V. Antioxidant activities of *Melittis melissophyllum* L. (*Lamiaceae*) / V. Kaurinovic [et al.] // *Molecules.* – 2011. – Vol. – 16, P. 3152–3167.
10. Skrzypczak-Pietraszek, E. Chemical profile and seasonal variation of phenolic acid content in bastard balm (*Melittis melissophyllum* L., *Lamiaceae*) / E. Skrzypczak-Pietraszek, J. Pietraszek // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* – July 2012. – vol. 66. – P. 154–161.
11. Центральный ботанический сад НАН Беларуси: сохранение, изучение и использование биоразнообразия мировой флоры / В. В. Титок [и др.] ; под ред. В. В. Титка, В. Н. Решетникова. – Минск : Беларус. навука, 2012. – 345 с.
12. Корзун О.С. Лекарственные растения: пособие для студ. высш. учеб. завед. / О.С. Корзун, Н.А. Дуктова; под. ред. Н. Н. Пьянусова. – Горки БГСХ, 2013. – 262 с.
13. Лознухо, И.В. Особенности кадила сарматского (*Melittis sarmatica* Klok.) в условиях культуры / И.В. Лознухо, Т.К. Гавриленко, В.С. Линник // Пряно-ароматические и лекарственные растения: перспективы интродукции и использования: материалы Междунар. конф., Минск, 31 мая–2 июня 1999 г. / НАН Беларуси, ЦБС НАН Беларуси, Минсельхозпрод РБ, Концерн «Белбиофарм»; ред. В.Н. Решетников. – Минск, 1999. – С. 79-80.
14. Красная книга Республики Беларусь: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / Мин-во природн. ресурсов и охраны окруж. среды РБ; редкол.: Л.И. Хоружик [и др.]. – Минск: Белорусская энциклопедия им. Петруся Бровки, 2005. – 456 с.
15. Кухарева, Л.В. Особенности размножения кадила сарматского (*Melittis Sarmatica* Klock.) при интродукции / Л.В. Кухарева, Т.М. Новичкова, А.В. Эльяшевич // Пряно-ароматические и лекарственные растения: перспективы интродукции и использования: материалы Междунар. Конф., Минск, 31 мая–2 июня 1999 г. / НАН Беларуси, ЦБС НАН Беларуси, Минсельхозпрод РБ, Концерн «Белбиофарм»; ред. В.Н. Решетников. – Минск, 1999. – С. 66-67.
16. Skrzypczak, E. The tissue culture and chemical analysis of *Melittis melissophyllum* L. / E. Skrzypczak, L. Skrzypczak // *Acta Hort.* – 1993, P. 263–267.
17. Мазур, Т.В. Регуляция ростовых процессов каллусной культуры представителей семейства *Lamiaceae* / Т.В. Мазур [и др.] // Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры: материалы Междунар. конф., посвящ. 80-летию ЦБС НАН Беларуси, Минск, 19–22 июня 2012 г.: в 2 ч. / НАН Беларуси, ЦБС НАН Беларуси; редкол.: В.В. Титок [и др.]. – Минск, 2012. – Ч.2. – С. 419-423.
18. Skrzypczak-Pietraszek, E. Polysaccharides from *Melittis melissophyllum* L. herb and callus / E. Skrzypczak-Pietraszek, A. Hensel // *Pharmazie.* – 2000. – Vol. 55. – P. 768–771.
19. Бердичевец, Л.Г. Микрклональное размножение кадила сарматского / Л.Г. Бердичевец [и др.] // Ботанические сады: состояние и перспективы сохранения, изучения, использования биологического разнообразия растительного мира: тез. докл. Междунар. науч. конф. г. Минск, 30–31 мая 2002 г. / Центральный Ботанический сад НАН Беларуси. – Минск : БГПУ, 2002. – С. 18.
20. Trigiano, R.N. Plant Development and Biotechnology / R.N. Trigiano, D.J. Gray. – CRC Press LLC, 2005. – 358 p.

21. Цыренов, В.Ж. Основы биотехнологии: культивирование изолированных клеток и тканей растений Часть 2 / В.Ж. Цыренов // Восточно-сибирский ГТУ. Улан-Удэ. – 2003 – 276 с.
22. Калинин, Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений / Ф.Л. Калинин, Г.П. Кушнир, В.В. Сарнацкая // К.: Наук. Думка. – 1992. – 228с.
23. Skala, E. In vitro regeneration of *Salvia nemorosa* L. From shoot tips and leaf explants / E. Skala, H. Wysokinska // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2004. – Vol. 6. – P. 596–602.
24. Andrade, L.B. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC) / L.B. Andrade [et al.] // *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* – 1999. – 56, Vol. 2. – P. 79–83.
25. Avato, A. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. / P. Avato [et al.] // *Plant Science.* – 2005. – 169. – P. 29-36.

COMPARATIVE ANALYSIS OF ADMINISTRATION ASEPTIC IN CULTURE *IN VITRO* PLANTS *MELITTIS SARMATICA* KLOK

E.V. SAKHVON, O.A. KUDRYASHOVA, I.F. VAYNOVSKAYA, A.A. VOLOTOVICH

Summary

There were developed the methods of sterilization and introduction *in vitro* of a rare aromatic plants of the Belarusian flora of *Melittis sarmatica* Klok. The seeds and cuttings with axillary buds were used as a material for introduction *in vitro* culture. As the main sterilizing agents there were used the 0.1% solution of silver nitrate and the 0.1% solution of the diacid. Influence of a 6-benzilaminopurin (6-BAP), 24-epibrassinolid (EB), their combinations and concentration on *in vitro* viability and germination of plant seeds *Melittis sarmatica in vitro* is studied. The highest rates on sterility and viability of seeds were observed at a combination 6-BAP and EB in concentration on 0.5 mg/l (viability of 3-5%), at addition on medium only of 0.5-1.0 mg/l 6-BAP (viability of 2–6%), or only of 0.1–1.0 mg/l of EB (viability of 1–2%). The most high influence on sterilization (72.6%), regeneration (62.7%) and rooting (28.7%) of sterile cuttings have been received at seven-minute processing of 0.1% solution of the diacid.

Key words: *Melittis sarmatica*, *in vitro*, sterilization, explant, silver nitrate, the diacid, benzylaminopurine, epibrassinolide.

Статья поступила 18 марта 2016г.