

DOI 10.33952/2542-0720-2021-1-25-98-112

УДК 633.81:57.085.2

Егорова Н. А., Ставцева И. В.

**СОЗДАНИЕ СОРТА ШАЛФЕЯ МУСКАТНОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МЕТОДОВ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ.**

**1. ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ В КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ
IN VITRO**

ФГБУН «Научно исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»

Реферат. Для повышения эффективности селекции сельскохозяйственных растений, в том числе и одной из основных выращиваемых в России эфиромасличных культур – шалфея мускатного, необходимо привлечение биотехнологических методов. Один из таких приемов основан на индукции соматклональной вариабельности в культуре каллусных тканей. Для его разработки необходима оптимизация условий получения растений-регенерантов *in vitro* и их анализ. Цель работы – изучение особенностей морфогенеза и регенерации растений из каллусных культур для разработки клеточных технологий создания исходного селекционного материала на основе соматклональной изменчивости у *Salvia sclarea* L. Установлено, что у сортов шалфея оптимальными эксплантатами для получения морфогенного каллуса, из которого регенерировали побеги, являются сегменты почек и стебля с узлом (выделенные из проростков *in vitro*). При цитологическом анализе каллусных культур выявлено два типа морфогенеза – органогенез (геммогенез) и соматический эмбриогенез. Изучены особенности формирования морфогенного каллуса при длительном культивировании шести сортов и образцов шалфея. Максимальная частота морфогенеза отмечена во втором пассаже (от 32,4 до 85,2 % в зависимости от генотипа). Затем этот показатель снижался к 8–10-му пассажу до 0,0–3,9 %. У сортов С-785 и Тайган выявлена наибольшая частота морфогенеза (81,5–85,2 %) и длительность регенерационного потенциала каллуса (до 10-го пассажа). При анализе каллусных культур шести донорных растений сорта С-785 выявлена их гетерогенность по способности к индукции морфогенеза. Максимальная частота формирования морфогенного каллуса (во втором пассаже 76,3–91,5 %) и длительность сохранения морфогенного потенциала (до 12-го пассажа) отмечена у растений № 3 и 9, тогда как у № 2 регенерацию с частотой 3,6–9,7 % наблюдали только в течение трех пассажей. Анализ полученных из каллусов растений показал их изменчивость по морфологии – до 12,5 % образцов имели отклонения по сравнению с исходным сортом С-785 по форме листьев, структуре соцветий, окраске цветков и другим признакам. Выявленные у регенерантов соматклональные изменения по морфологическим и хозяйственно полезным признакам свидетельствуют о перспективности их использования в селекции шалфея.

Ключевые слова: *Salvia sclarea* L., каллус, эксплант, *in vitro*, морфогенез, пассаж, соматклональная изменчивость, растения-регенеранты.

Для цитирования: Егорова Н. А., Ставцева И. В. Создание сорта шалфея мускатного с использованием методов клеточной инженерии. 1. Получение растений-регенерантов в каллусной культуре *in vitro* // Таврический вестник аграрной науки. 2021. № 1(25). С. 98–112. DOI 10.33952/2542-0720-2021-1-25-98-112.

For citation: Yegorova N. A., Stavtzeva I. V. Creation of clary sage cultivar using cell engineering methods. 1. Obtaining of plant-regenerants in callus culture *in vitro* // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2021. No. 1(25). P. 98–112. DOI 10.33952/2542-0720-2021-1-25-98-112.

Введение

Род *Salvia*, включающий более 700 видов, является одним из наиболее распространенных в семействе Lamiaceae (Martinov). Почти все виды шалфея содержат эфирное масло, но в промышленной культуре в странах Средиземноморья и Центральной Европы, в США и Иране преимущественно возделывают шалфей мускатный (*Salvia sclarea* L.) [1]. В России, в том числе и в Крыму, он является одной из основных эфиромасличных культур [2]. Из соцветий этого растения получают эфирное и экстрактовое масла, склареол и некоторых другие продукты. В его семенах также имеется до 30–32 % жирного масла. Содержание эфирного масла в свежесобранном сырье составляет 0,20–0,32 %. Основными компонентами эфирного масла шалфея являются линалилацетат (35–75 %) и линалоол (10–21 %) [3]. Эфирное масло используют в парфюмерно-косметической промышленности, в ликероводочном, кондитерском и табачном производствах. Особенно широко эфирное масло шалфея применяют в медицине, благодаря его обезболивающим, противовоспалительным, противогрибковым, антибактериальным, антиоксидантным, тонизирующим и иммуномодулирующим свойствам [4, 5].

В разные годы в ФГБУН «НИИСХ Крыма» с использованием методов классической селекции были созданы несколько сортов шалфея мускатного, которые в основном и возделываются в производстве в нашей стране [2]. Однако использование таких традиционных методов не всегда позволяет получить генотипы с необходимыми параметрами продуктивности и устойчивости к абиотическим и биотическим стрессам. Для повышения эффективности селекционного процесса у шалфея, также как и у других сельскохозяйственных растений, необходимо дополнение традиционных приемов современными биотехнологическими подходами. Одним из методов, способствующих расширению генетического разнообразия, является индукция соматической изменчивости в культуре каллусных тканей *in vitro* [6]. Этот вид изменчивости обусловлен генетическими изменениями в клетках тканей и органов, культивируемых на питательных средах, чаще всего связанными с хромосомными изменениями (изменение количества и морфологии хромосом), небольшими перестройками хромосом, транспозицией подвижных генетических элементов, изменениями в метилировании последовательностей ДНК, соматическим кроссинговером и некоторыми другими причинами [7, 8]. Такая изменчивость, возникающая у культивируемых *in vitro* соматических клеток, может передаваться полученным из них растениям-регенерантам. Соматическая изменчивость достаточно широко используется для создания новых генотипов в селекции злаков, картофеля, овощных и цветочно-декоративных культур [6, 9, 10]. Разработка многих клеточных технологий растений, в частности, получения соматических клонов, основана на оптимизации режимов получения каллусных культур, индукции в них морфогенеза и подборе условий регенерации растений *in vitro* [11, 12].

Биотехнологические исследования, проведенные для различных видов рода *Salvia*, направлены, прежде всего, на разработку протоколов клонального микроразмножения [13–16]. Имеются сведения о способности изолированных культур отдельных видов шалфея продуцировать вторичные метаболиты [17–20]. Так, показана возможность синтеза у *S. multiorrhiza* розмариновой кислоты [19], у *S. sclarea* – склареола, а у *S. officinalis* – урсоловой кислоты и компонентов эфирного масла [18]. Разнообразные фенольные соединения выявлены в каллусных, суспензионных культурах или в культуре трансформированных корней у *S. viridis*, *S. officinalis*, *S. chamelaeagnea*, *S. fruticosa* [18, 20, 21]. Разработаны методики

получения отдаленных гибридов и отбора форм, устойчивых к осмотическому стрессу, с использованием культуры изолированных зародышей *S. sclarea* [22].

Исследованиям каллусных тканей различных видов шалфея (*S. officinalis*, *S. sclarea*, *S. hispanica*, *S. nemorosa*, *S. viridis*, *S. arinaceae*) и регенерации из них растений посвящено относительно небольшое число публикаций [23–29]. Для получения исходных эксплантов чаще всего в асептических условиях на питательных средах проращивают семена, а из развившихся проростков выделяют различные органы и ткани. Так, у *S. viridis* для индукции каллуса использовали экспланты стеблей или черешков листа, изолированные из пробирочных растений [29]. Судя по имеющимся литературным данным, у разных видов шалфея в качестве эксплантов для получения каллусных культур применяли верхушки побегов, почки [30, 31], листья [23, 26], или сегменты стебля [27, 29], выделенные из полученных в асептических условиях проростков.

Для индукции каллусогенеза у *S. officinalis* в питательную среду добавляли разные регуляторы роста – НУК и БАП [31], 2,4-Д и кинетин [26], 2,4-Д и БАП [17] или тиадазурон [30]. Процесс каллусогенеза у *S. chamelaeagnea* был эффективен при добавлении в питательную среду 2,4-Д [32], а у *S. fruticosa* – ТДЗ и ИУК [33]. Такая вариабельность состава сред для каллусообразования связана, прежде всего, с различными гормональными потребностями у используемых авторами эксплантов или видов и сортов шалфея.

Индукция процесса морфогенеза в каллусных культурах разных видов шалфея регулировалась применением разных типов и концентраций гормонов. Так, у *S. hispanica* выявлена эффективность введения в питательную среду МС 2,25 мкМ ауксина 2,4-Д для получения эмбрионного каллуса [27]. У *S. sclarea* максимальная частота инициирования органогенного каллуса из семядолей незрелых зиготических зародышей получена на среде с добавлением более высокой концентрации 2,4-Д (9,05 мкМ) [24]. Для *S. officinalis* формирование каллуса, индукция соматических зародышей и регенерация растений были достигнуты при последовательной смене питательных сред с добавлением кинетина и 2,4-Д, НУК и БАП или ТДЗ [26].

Во многих публикациях сообщается о питательных средах для индукции прямого морфогенеза из эксплантов почек или сегментов стебля с узлом, для чего чаще всего использовались среды МС с добавлением БАП или этого цитокинина в сочетании с 2,4-Д, ИУК, НУК, ИМК [13–15, 24, 25, 30]. Подавляющее большинство проанализированных работ посвящено оптимизации питательных сред для индукции каллусо- или морфогенеза у видов шалфея. Влияние различных экзогенных или эндогенных факторов на эти процессы обычно не рассматривалось. Вместе с тем хотелось бы отметить интересную работу О.М. Ioja-Boldura с соавторами, в которой показана важная роль возраста эксплантов и условий культивирования *in vitro* в индукции морфогенеза у *S. officinalis*. В частности, только использование молодых эксплантов (из проростков с шестью-семью листьями) и снижение интенсивности освещения способствовали формированию каллуса и индукции соматического эмбриогенеза [26].

Тем не менее, в литературе почти нет данных о регенерации из длительно пассируемого каллуса и разработках клеточных технологий создания генетически разнообразного материала у шалфея. Как правило, в доступных публикациях нет сведений об исследовании полученных *in vitro* растений-регенерантов шалфея. Для основных возделываемых в России сортов *S. sclarea* таких исследований ранее вообще не проводилось.

Цель исследований – изучение особенностей индукции морфогенеза и регенерации растений из каллусных культур для разработки клеточных технологий

создания исходного селекционного материала на основе соматональной изменчивости у шалфея мускатного.

Материалы и методы исследований

Материалом для исследований служили ткани и органы различных сортов и образцов шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.) – С-785, С-1122, Ай-Тодор, Тайган, R-1-6, R-2-9. В качестве эксплантов в экспериментах использовали почки и сегменты стебля с одним узлом, выделенные из полученных *in vitro* проростков. Для получения проростков семена предварительно стерилизовали в 0,1 % растворе диоксида, промывали автоклавированной дистиллированной водой и помещали на агаризованную безгормональную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) [34]. Через три-четыре недели из проростков вычленили апикальные почки (5–6 мм) или сегменты стебля с одним узлом и двумя пазушными почками (7–10 мм).

В работе использовали общепринятые в биотехнологии методы культуры органов и тканей растений [34], а также разработанные нами ранее для работы с культурой органов шалфея [22]. Асептические работы проводили в условиях ламинарного бокса БАВнп-01-«Ламинар-С»-1,2 (Россия). Культивирование осуществляли на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением α -нафтилуксусной кислоты (НУК), кинетина, 6-бензиламинопурина (БАП), гибберелловой кислоты (ГК₃), индолилмасляной кислоты (ИМК) (Sigma, США). Для получения и пассирования каллуса использовали питательную среду МС, дополненную 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП [35]. Культивирование каллусов и побегов проводили в пробирках с 10 мл агаризованной питательной среды. Пассирование каллуса осуществляли каждые 35–40 дней. Масса каллусного транспланта составляла 90–100 мг. Каллусные ткани и побеги культивировали при 26 ± 2 °С, относительной влажности воздуха 70 %, освещенности 600 (для каллуса) или 2000–3000 (для побегов и регенерантов) люкс с 16-часовым фотопериодом.

Цитологические исследования морфогенеза в каллусных культурах проводили на временных давленных препаратах, приготовленных по общепринятым методикам [36]. Материал фиксировали в смеси Карнуа и окрашивали ацетокармином по Р. Сноу (три часа при 56 °С) [36]. Предварительно проводили мацерацию каллусов в 0,1N HCl при 56 °С. Препараты исследовали с использованием микроскопа AxioScope A.1 (Zeiss) с фотокамерой AxioCam ERc5s (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

Полученные растения-регенеранты адаптировали *ex vitro* в смеси торфа и дерновой земли (1:1). Подросшие растения (R₀) с шестью-восемью листьями пересаживали в вазоны большего объема с этой смесью, а затем – в полевые условия, в питомник исходного материала, где выращивали в научном севообороте отдела эфиромасличных и лекарственных культур ФГБУН «НИИСХ Крыма» (Белогорский район, п. Крымская Роза) в течение двух лет до получения семян. На второй год вегетации проводили анализ морфологии регенерантов.

Статистическую обработку данных осуществляли согласно общепринятым методам математической статистики при помощи стандартного пакета документов Microsoft Office Excel (2010). Достоверность отличий оценивали по критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$. В таблицах представлены средние значения и их стандартные ошибки, а на графиках – средние значения и доверительные интервалы.

Результаты и их обсуждение

Необходимым и важнейшим этапом исследований при разработке многих клеточных технологий является оптимизация режимов индукции морфогенеза в каллусных культурах. Ранее в наших экспериментах было установлено, что у шалфея мускатного каллусные ткани можно получить из различных эксплантов, выделенных

из проростков, полученных из семян, – верхушки побега, сегментов листа, гипокотилия, семядоли, стебля с узлом, корня. У большинства этих эксплантов оптимальная среда для каллусогенеза содержала 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП [35]. При анализе морфогенетических потенций у каллусов, формирующихся из корня и гипокотилия, на испытанных средах морфогенных структур не выявлено, а у листового и семядольного каллусов происходило только образование корней. Лучшими эксплантами для получения морфогенного каллуса оказались сегменты почек и стебля с одним узлом. При культивировании этих эксплантов на среде для каллусогенеза у сорта С-785 формировалось 48,4–58,6 %, а на среде МС с добавлением кинетина (0,5 мг/л) и ГК₃ (0,1 мг/л) – 84,5–94,2 % морфогенных каллусов [35]. При индукции каллусогенеза из почек или микрочеренков развивался светло-бежевый, с зелеными зонами каллус (рисунок 1А), который активно пролиферировал при дальнейшем субкультивировании на среде МС с НУК и БАП (рисунок 1Б). В каллусных культурах, полученных из почек и микрочеренков, через две-три недели культивирования формировались почки, а затем из них развивались побеги без корней или с корнями, в зависимости от состава питательной среды (рисунок 1В). Из одного каллусного транспланта массой около 200 мг развивалось до 8–10 почек и микропобегов в течение одного субкультивирования.

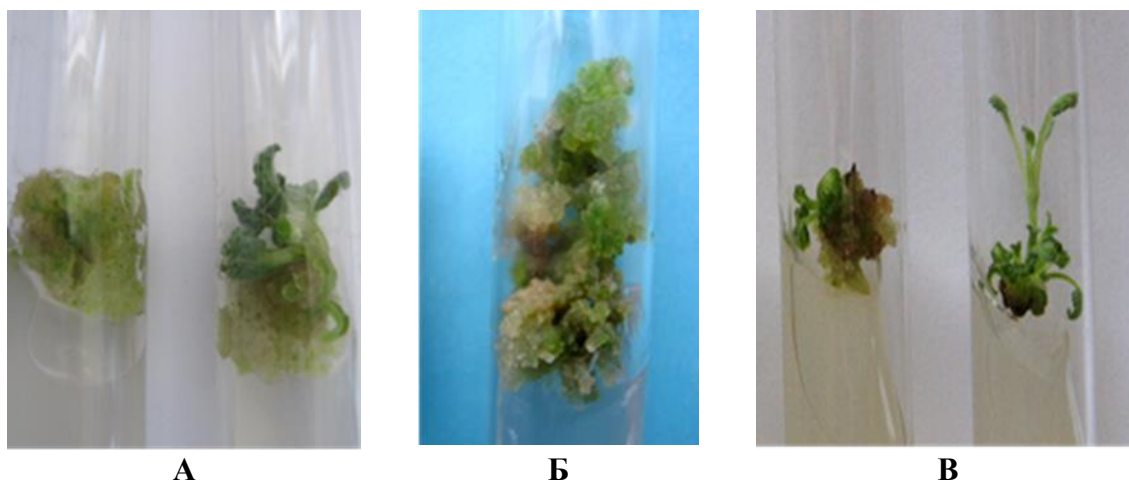


Рисунок 1 – Образование каллуса из почки побега (А); пассируемый каллус (Б); индукция морфогенеза и регенерация побегов в каллусе, полученном из почки (В) у *S. sclarea* сорта С-785

При цитологическом анализе в каллусных тканях, полученных из почек или сегментов стебля, были выявлены соматические зародыши, преимущественно на ранних стадиях развития, – 4-8-16-клеточные проэмбрио (рисунок 2 А). Наряду с этим, среди массы недифференцированных каллусных клеток наблюдали формирование апексов побегов (рисунок 2 Б). Данные факты свидетельствуют об одновременной индукции в каллусах шалфея мускатного двух типов морфогенеза – органогенеза (геммогенеза) и соматического эмбриогенеза. Такое наличие двух типов морфогенеза в каллусах впервые показано для *S. sclarea*. В работе W. Liu с соавторами сообщалось о регенерации растений у шалфея мускатного только путем органогенеза [24]. Однако для *S. hispanica* установлено, что при использовании в качестве регулятора роста 2,4-D, из эксплантов стебля, культивируемых в темноте, развивались в основном эмбриогенные каллусные ткани [27]. О. М. Ioja-Boldura с соавторами также выявили возможность индукции соматического эмбриогенеза в

кallусе, полученном из листовых эксплантов проростков *S. officinalis* [26]. Такие противоречивые данные могут быть обусловлены как использованием разных видов шалфея или эксплантов, так и различными составами питательных сред. У разных видов эфиромасличных растений были выявлены различные пути регенерации растений в каллусных культурах, в частности, у кориандра и фенхеля – только соматический эмбриогенез, у аниса – органогенез, а у лаванды в каллусах обнаруживали как соматические зародыши, так и зачатки почек [28].

Актуальной и порой наиболее сложной проблемой при разработке многих клеточных технологий является сохранение морфогенетических потенций каллуса при его длительном культивировании. Это связано с возрастающей генетической гетерогенностью культур по мере их пассирования и, следовательно, возможностью получения большего числа соматональных вариантов [7, 8]. В наших исследованиях индукцию морфогенеза в каллусах шалфея у сорта С-785 наблюдали на многих испытанных вариантах питательной среды МС: на среде с добавлением БАП и НУК вплоть до шестого пассажа, а на средах с введением кинетина и ГК₃ – до 10 пассажа. Тем не менее, максимальная частота морфогенеза и формирования проростков из каллусных клеток на всех средах отмечена в первом-третьем пассажах. Затем, по мере дальнейшего субкультивирования, происходило снижение интенсивности этого процесса. Наибольшая частота индукции побегообразования у сорта С-785 была характерна при длительном культивировании каллусов, полученных из почек и сегментов стебля с узлом, на модификации питательной среды МС, содержащей 0,5 мг/л кинетина и 0,1 мг/л ГК₃. Так, в каллусах из почек на этой питательной среде во втором пассаже частота индукции морфогенеза составила 84,5 %, а в восьмом пассаже – всего 12,5 %.

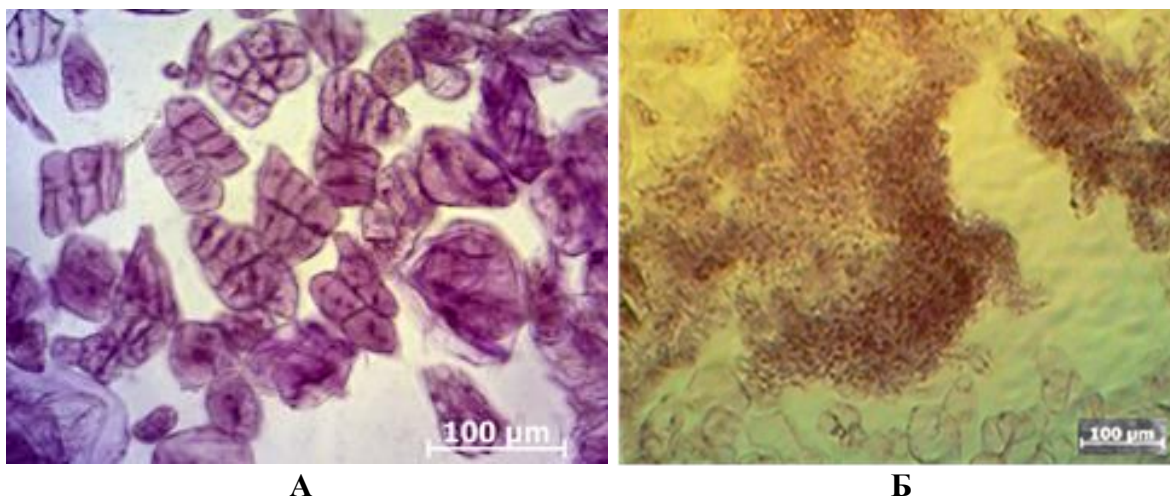


Рисунок 2 – Индукция развития соматических зародышей (А) и апекс побега (Б) в каллусной культуре, полученной из почки, у *S. sclarea* сорта С-785

Индукция каллуса, способного к длительной регенерации побегов из эксплантов почек, также выявлена и для других генотипов шалфея – сортов Ай-Тодор, С-1122, Тайган и регенерантов R-1-6 и R-2-9 (полученных из каллусов сорта С-785). Представленные в таблице данные свидетельствуют о существенном влиянии генотипических особенностей на морфогенетические потенции каллусных культур. Меньшей частотой морфогенеза отличались сорт С-1122 и регенерант R-2-9. При длительном субкультивировании установлено, что у сорта С-1122 индукция

морфогенеза происходила только до шестого пассажа, у Ай-Тодора и R-2-9 – до восьмого пассажа, а у С-785, Тайгана и R-1-6 морфогенетические способности сохранялись вплоть до 10-го пассажа. Однако с увеличением пассажа у всех генотипов отмечали существенное снижение частоты формирования каллусов с морфогенными структурами. Более того, в каллусах 8-10-го пассажей часто наблюдали развитие аномальных витрифицированных побегов.

Таблица – Влияние генотипа и пассажа на индукцию морфогенеза у *S. sclarea* в каллусных культурах, полученных из почек

Сорт, образец	Номер пассажа каллуса				
	2	4	6	8	10
С-785	81,5 ± 7,8	50,2 ± 5,9	18,5 ± 2,0	6,4 ± 0,7	2,6 ± 0,3
Ай-Тодор	78,5 ± 8,0	45,8 ± 5,0	22,4 ± 3,1	10,1 ± 1,4	0
Тайган	85,2 ± 7,1	56,6 ± 4,7	18,4 ± 1,8	8,1 ± 0,5	3,9 ± 0,5
С-1122	51,0 ± 4,2	22,2 ± 3,1	9,8 ± 1,5	0	0
R-1-6	69,2 ± 5,5	31,5 ± 3,0	21,8 ± 2,2	12,9 ± 1,1	2,2 ± 0,5
R-2-9	32,4 ± 4,2	17,8 ± 2,2	5,3 ± 0,9	0	0

Шалфей является перекрестноопыляющимся растением и поэтому его сорта представляют собой достаточно гетерогенную популяцию. В связи с этим целесообразно изучение влияния генотипа индивидуального донорного растения в пределах одного сорта на частоту и продолжительность индукции морфогенеза в каллусных культурах. Для этого использовали каллусы (полученные из почек) у шести исходных растений сорта С-785, которые культивировали в течение 12-ти пассажей (рисунок 3).

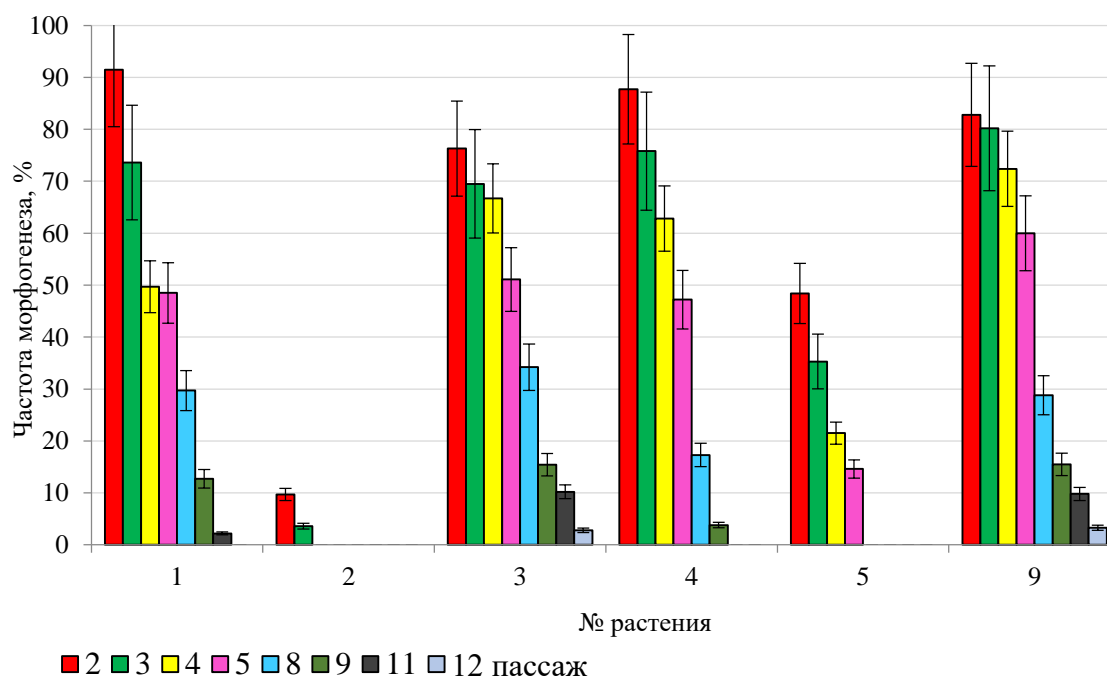


Рисунок 3 – Влияние генотипа индивидуального донорного растения *S. sclarea* сорта С-785 и пассажа на индукцию морфогенеза в каллусных культурах, полученных из почек

Представленные результаты демонстрируют существенную изменчивость индивидуальных растений шалфея по изученному признаку. Основная часть донорных растений обладала высоким морфогенным потенциалом в течение всех

изученных пассажей. Индукцию морфогенеза и формирование почек в каллусе у растений №№ 1, 3, 4, 9 наблюдали с достоверно не различавшейся частотой (во втором пассаже 76,3–91,5 %), которая постепенно снижалась по мере субкультивирования. При этом в каллусах растений № 3 и 9 образование почек и побегов происходило вплоть до 12-го пассажа, а у №№ 1, 4 – соответственно до 11 и 9-го пассажей. У растения № 2 образующиеся каллусы характеризовались минимальной морфогенетической способностью – у них регенерацию с небольшой частотой наблюдали только во втором и третьем пассажах (соответственно 9,7 и 3,6 %).

Аналогичные данные были получены и при изучении индивидуальных растений сорта Тайган, у которых частота морфогенеза в каллусах, полученных из разных донорных растений, варьировала от 0 до 78,8 %. Данные факты, обусловленные генетической гетерогенностью в пределах сорта шалфея, свидетельствуют о возможности проведения отбора отдельных форм с повышенной морфогенетической способностью. Такой прием целесообразно использовать при работе с сортами или образцами с низкой частотой регенерации растений.

У регенерировавших из каллусов побегов отмечали корнеобразование с частотой до 30–58 %. Для повышения эффективности ризогенеза формирующиеся побеги для укоренения переносили на питательную среду $\frac{1}{2}$ МС с 1 % сахарозы, содержащую 2,0 мг/л ИМК. На этой среде укоренялось от 52 до 82 % растений, в зависимости от генотипа и пассажа. Судя по литературным данным, укоренение побегов шалфея *in vitro* проходило на разных модификациях среды МС: у *S. santolinifolia* при добавлении в среду 2,5 мг/л ИМК [14], у *S. sclarea* – 5 мкМ ИУК и ИМК [16] или 0,5 мг/л ИУК [15], или 0,98 мкМ ИУК, ИМК [24], у *S. guaranitica* – 2,85 мкМ ИУК [13]. У *S. officinalis* на безгормональной среде МС частота ризогенеза достигала 97 %, тогда как при добавлении 4,92 мкМ ИМК – всего 48 % [26].

Установлено, что из каллусов 8-10-го пассажей часто развивались тератологические или мало жизнеспособные проростки, поэтому для анализа растений обычно использовали регенеранты из каллусных культур первого-третьего пассажей. Пробирочные растения шалфея с частотой от 75 до 92 % приживались при переносе в обычные условия выращивания с применением традиционных приемов адаптации *ex vitro* [22]. Необходимо отметить, что полученные из каллусных тканей растения-регенеранты шалфея можно еще до этапа адаптации к обычным условиям выращивания быстро размножить *in vitro*, используя разработанную для шалфея методику [35].

Следует обратить внимание, что подобранные в наших экспериментах условия культивирования способствовали регенерации побегов из каллусов в течение 6-10 пассажей. В имеющейся литературе мы не встретили упоминания о такой длительной регенерации в каллусных культурах не только у *S. sclarea*, но и у других видов шалфея. Только А. А. Tawfik и М. F. Mohamed сообщали о дифференциации побегов в каллусе *S. officinalis* в течение 3-х пассажей [30]. Ранее для ряда видов эфиромасличных растений (лаванды, кориандра, аниса, тысячелистника) нами была показана возможность индукции морфогенеза в каллусных культурах, как правило, в течение 3-5 пассажей [28]. Проведенная в нашем исследовании оптимизация питательных сред и эксплантов для длительной регенерации в каллусной культуре шалфея является хорошей основой для разработки многих клеточных технологий, в частности для получения соматических клонов, поскольку с увеличением длительности культивирования соматических клеток *in vitro* повышается их генетическая гетерогенность [6–8].

При изучении эффективности клеточной технологии индукции соматоклональных вариантов очень важен детальный анализ регенерировавших *in vitro* растений и их семенного потомства. Полученные из каллусов шалфея регенеранты R₀ после адаптации *ex vitro* переносили в полевые условия, где выращивали для получения семян при самоопылении (рисунок 4).



Рисунок 4 – Адаптация регенерантов шалфея *ex vitro* (А) и выращивание их в полевых условиях (Б)

При визуальном анализе у регенерантов, наряду с растениями с типичной для исходного сорта морфологией, было выявлено 12,5 % образцов с морфологическими отклонениями по сравнению с С-785. Это проявлялось в частности в изменении формы черешковых или сидячих листьев (например, №№ R-3-5; R-2-7 и др.), структуры соцветий (появилось ложно-мутовчатое ветвление у № R-21-2 и др.) (рисунок 5). Также у некоторых регенерантов выявлено изменение окраски цветков или прицветников, размера куста и некоторых других признаков. Был выделен раннеспелый образец № R-1-23, у которого цветение наблюдалось на 14 суток раньше исходного сорта С-785. Такое изменение морфологических признаков, которое сохранялось у растений в следующих поколениях (R₁-R₂), свидетельствует о наличии у регенерантов шалфея соматоклональных изменений.

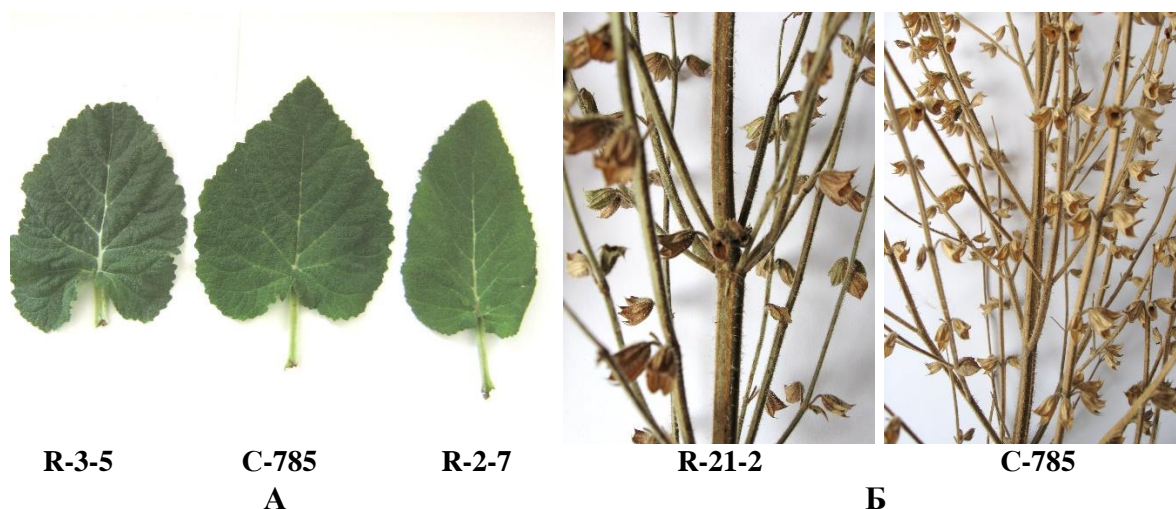


Рисунок 5 – Соматоклональная изменчивость у регенерантов шалфея, полученных из каллуса сорта С-785

Примечание. А – изменчивость морфологии листовой пластинки у черешковых листьев; Б – изменчивость ветвления соцветий.

Проведено сравнение распределения растений по некоторым количественным признакам в пределах исходного сорта и у регенерантов из каллусных культур [37]. Установлено, что по всем анализируемым признакам размах изменчивости у растений-регенерантов превосходил изменчивость внутри сорта С-785. Значительное варьирование признаков у регенерантов наблюдали по количеству боковых ответвлений второго порядка и цветonoсных побегов, массе соцветий, массовой доле эфирного масла и сбору эфирного масла с растения (коэффициенты вариации составили от 40,2 до 171,1 %). Большой размах изменчивости по этим признакам свидетельствует о высокой степени разнообразия полученных *in vitro* растений. Следует отметить, что для некоторых признаков (масса соцветий, высота растений) отмечен сдвиг популяции регенерантов в сторону нижней границы значений показателя, а для других (например, количество цветonoсных побегов), наоборот, – в сторону верхней границы [37]. Однако при смещении популяции к верхней или нижней границе по большинству признаков можно было выделить формы с более высокими показателями, выходящими за пределы изменчивости исходного сорта, которые и представляют интерес для селекции.

Значительную варибельность растений-регенерантов по многим количественным признакам, как в отрицательную, так и в положительную сторону, также отмечали у кукурузы, пшеницы, ячменя, картофеля и других видов растений [6–9].

При оценке индивидуальных растений в семенном потомстве регенерантов шалфея были выделены образцы, превосходящие исходный сорт С-785 по некоторым хозяйственным признакам. Наиболее перспективные семь образцов превышали показатели исходного сорта по основному признаку – сбору эфирного масла – на 46,0–141,7 %. Изучение этих растений на этапах селекционного процесса является предметом наших дальнейших исследований.

Выводы

Установлено, что оптимальными эксплантами для получения морфогенного каллуса, из которого можно регенерировать побеги, у сортов *S. sclarea* являются сегменты почек и стебля с узлом. Цитологический анализ выявил наличие в каллусных культурах из почек двух типов морфогенеза – органогенеза (геммогенеза) и соматического эмбриогенеза. В длительно культивируемом морфогенном каллусе четырех сортов и двух образцов шалфея максимальная частота морфогенеза отмечена во втором пассаже (32,4–85,2 % в зависимости от генотипа). К 8-10-му пассажам этот показатель снизился до 0,0–3,9 %. У сортов С-785 и Тайган выявлена наибольшая частота морфогенеза (81,5–85,2 %) и длительность регенерационного потенциала каллуса (до 10-го пассажа). При анализе каллусных культур шести индивидуальных донорных растений сорта С-785 установлена их гетерогенность по способности к индукции морфогенеза. Максимальная частота формирования морфогенного каллуса (во втором пассаже 76,3–91,5 %) и длительность сохранения морфогенного потенциала (до 12-го пассажа) отмечена у растений № 3 и 9, тогда как у растения № 2 регенерацию с частотой 3,6–9,7 % наблюдали только в течение второго-третьего пассажей. Анализ полученных из каллусов растений показал, что до 12,5 % образцов имели морфологические отклонения по сравнению с исходным сортом С-785. Выявленные у регенерантов соматональные изменения по морфологическим и хозяйственно полезным признакам свидетельствуют о перспективности их использования в селекции шалфея.

Литература

1. Бочкарёв Н. И., Зеленцов С. В., Шуваева Т. П., Бородкина А. П. Состояние таксономии, морфологии и селекции шалфея мускатного (обзор) // Масличные культуры. 2014. Вып. 1 (157-158). С. 165–177.
2. Паштецкий В. С., Невкрытая Н. В., Мишнев А. В., Назаренко Л. Г. Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра. Симферополь: ИТ «Ариал», 2018. 320 с.
3. Эфиромасличные культуры // Под ред. Тильбы В. А., Кочегуры А. В. Краснодар: Просвещение-Юг, 2017. 295 с.
4. Aćimović M., Kiproviski B., Rat M., Sikora V., Popović V., Koren A., Brdar-Jokanović M. *Salvia sclarea*: chemical composition and biological activity // Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management. 2018. Vol. 1(1). P. 18–28.
5. Poullos E., Giaginis C., Vasios G. K. Current state of the art on the antioxidant activity of sage (*Salvia spp.*) and its bioactive components // Planta Med. 2020. Vol. 86(4). P. 224–238. DOI: 10.1055/a-1087-8276.
6. Калашникова Е. А. Клеточная инженерия растений. М.: Юрайт, 2020. 333 с.
7. Remotti P. C. Somaclonal variation and *in vitro* selection for crop improvement // In book: Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement // Ed. by Mohan Jain S., Brar D. S., Ahloowalia B.S. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1998. P. 169–202.
8. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. К.: Логос, 2005. 730 с.
9. Игнатова С. А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса: Астропринт, 2011. 224 с.
10. Бишимбаева Н. К. Соматическая вариабельность как источник получения новых форм пшеницы с ценными признаками // Experimental Biology. 2015. Vol. 55. No. 3. P. 41–46.
11. Efferth T. Biotechnology applications of plant callus cultures // Engineering. 2019. Vol. 5. P. 50–59. DOI:10.1016/j.eng.2018.11.006.
12. Круглова Н. Н., Титова Г. Е., Сельдиминова О. А. Каллусогенез как путь морфогенеза *in vitro* у злаков // Онтогенез. 2018. Т. 49. № 5. С. 273–288. DOI: 10.1134/S0475145018050038.
13. Echeverrigaray S., Carrer R. P., Andrade L. B. Micropropagation of *Salvia guaranitica* Benth. through axillary shoot proliferation // Braz. arch. biol. technol. 2010. Vol. 53 (4). P. 883–888. DOI: 10.1590/S1516-89132010000400018.
14. Jan T., Khatoon K. *In vitro* regeneration of *Salvia santolinifolia* // Pak. J. Bot., 2014. Vol. 46(1). P. 325–328.
15. Ghanbar T., Hosseini B., Jabbarzadeh Z., Farokhzad A., Sharafi A. High-frequency *in vitro* direct shoots regeneration from axillary nodal and shoot tip explants of clary sage (*Salvia sclarea* L.). // Bulg. J. Agric. Sci. 2016. Vol. 22. No. 1. P. 73–78.
16. Grigoriadou K., Trikka F. A., Tsoktouridis G., Krigas N., Sarropoulou V., Papanastasi K., Maloupa E., Makris A. M. Micropropagation and cultivation of *Salvia sclarea* for essential oil and sclareol production in northern Greece // In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 2020. Vol. 56. P. 51–59. DOI: 10.1007/s11627-019-10040-4.
17. Santos-Gomes P. C., Seabra R. M., Andrade P. B., Fernandes-Ferreira M. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.) // J. Plant Physiol. 2003. Vol. 160. No. 9. P. 1025–1032. DOI: 10.1078/0176-1617-00831.
18. Егорова Н. А. Некоторые аспекты биотехнологии эфиромасличных растений: микрклональное размножение, синтез продуктов вторичного метаболизма *in vitro* // Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46. № 3. С. 187–201.
19. Wu C-F., Karioti A., Rohr D., Bilia A. R., Efferth T. Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of *Salvia miltiorrhiza* with cytotoxicity towards acute lymphoblastic leukemia cells // Food Chemistry. 2016. Vol. 201. No. 15. P. 292–297. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.01.054.
20. Grzegorzczuk-Karolak I., Kuźma Ł., Skała E., Kiss A. K. Hairy root cultures of *Salvia viridis* L. for production of polyphenolic compounds // Ind. Crops Prod. 2018. Vol. 117. P.235–244. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.03.014.
21. Grzegorzczuk-Karolak I. Optimization of culture conditions and cultivation phase for the growth of *Salvia viridis* transformed roots and polyphenolic compound production // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2020. Vol. 142. P. 571–581. DOI: 10.1007/s11240-020-01883-6.
22. Ставцева И. В., Егорова Н. А. Культура изолированных зародышей шалфея и ее использование в селекции. Методические рекомендации. Симферополь, ИЭЛР НААНУ, 2011. 20 с.
23. Kintzios S. E. *Salvia spp.*: tissue culture, somatic embryogenesis, micropropagation and biotransformation // In book: Sage: The Genus *Salvia* // Ed. by Kintzios S. E. CRC Press, 2000. P. 241–250.

[Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.routledge.com/Sage-The-Genus-Salvia/Kintzios/p/book/9789058230058> (дата обращения 05.03.2021).

24. Liu W., Chilcott C. E., Reich R. C., Hellmann G. M. Regeneration of *Salvia sclarea* via organogenesis // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2000. Vol. 36. No. 3. P. 201–206. DOI: 10.1007/s11627-000-0037-z.
25. Skala E., Wysokinska H. *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2004. Vol. 40. No. 6. P. 596–602. DOI: 10.1079/IVP2004580.
26. Iola-Boldura O. M., Radu F., Popescu S., Borozan A. Regeneration, micropropagation, callus cultures and somatic embryogenesis of common sage (*Salvia officinalis* L.) // *Bulletin UASVM Horticulture.* 2010. Vol. 67. No. 1. P. 308–313.
27. Marconi P. L., López M. C., De Meester J., Bovjin C., Alvarez M. A. *In vitro* establishment of *Salvia hispanica* L. plants and callus // *Biocnologia Vegetal.* 2013. Vol. 13. No. 4. P. 203–207.
28. Егорова Н.А. Некоторые аспекты биотехнологии эфиромасличных растений: индукция каллюсо- и морфогенеза, использование соматклональной вариабельности // *Физиология растений и генетика.* 2014. Т. 46. № 2. С. 108–120.
29. Зотова Е. П., Чердниченко М. Ю. Изучение морфогенного потенциала шалфея зеленого *Salvia viridis* L. *in vitro* // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2020. Т. 23. № 12. С. 52–55. DOI: 10.29296/25877313-2020-12-09.
30. Tawfik A. A., Mohamed M. F. Regeneration of salvia (*Salvia officinalis* L.) via induction of meristematic callus // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2007. Vol. 43. No. 1. P. 21–27. DOI: 10.1007/s11627-006-9002-9.
31. Bolta Z., Baricevic D., Bohanec B., Andresek S. A preliminary investigation of ursolic acid in cell suspension culture of *Salvia officinalis* // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2000. Vol. 62. No. 1. P. 57–63.
32. Huang L. D., Van Staden J. *Salvia chamelaeagnea* can be micropropagated and its callus induced to produce rosmarinic acid // *S. Afr. J. Bot.* 2002. Vol. 68. P. 177–180.
33. Karam N. S., Jawad F. M., Arikat N. A., Shibl R. A. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa* // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2003. Vol. 73. No. 2. P. 117–121.
34. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка, 1980. 488 с.
35. Егорова Н. А., Ставцева И. В., Митрофанова И. В. Морфогенез и клональное микроразмножение *Salvia sclarea* L. *in vitro* // *Труды Никитского ботанического сада.* 2011. Т. 133. С. 41–53.
36. Паушева Л. А. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980. 304 с.
37. Егорова Н. А., Ставцева И. В. Использование биотехнологических методов для создания исходного селекционного материала у некоторых эфиромасличных растений // *Труды Кубанского государственного аграрного университета.* 2016. № 2 (59). С. 122–131.

References

1. Bochkarev N. I., Zelentsov S. V., Shuvaeva T. P., Borodkina A. P. The taxonomy, morphology and breeding of clary sage (review) // *Oil crops.* 2014. Iss. 1 (157-158). P. 165–177.
2. Pashtetskii V. S., Nevkrytaya N. V., Mishnev A. V., Nazarenko L. G. Essential oil industry in the Crimea. Yesterday, today, tomorrow. Simferopol: Publishing house “Arial”, 2018. 320 p.
3. Essential oil crops // Ed. by Tilba V. A., Kochegura A. V. Krasnodar: Prosveshcheniye-Yug, 2017. 295 p.
4. Aćimović M., Kiproviski B., Rat M., Sikora V., Popović V., Koren A., Brdar-Jokanović M. *Salvia sclarea*: chemical composition and biological activity // *Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management.* 2018. Vol. 1(1). P. 18–28.
5. Poullos E., Giaginis C., Vasios G.K. Current state of the art on the antioxidant activity of sage (*Salvia spp.*) and its bioactive components // *Planta Med.* 2020. Vol. 86(4). P. 224–238. DOI: 10.1055/a-1087-8276.
6. Kalashnikova E. A. Cell engineering of plants. Moscow: Yurayt, 2020. 333 p.
7. Remotti P. C. Somaclonal variation and *in vitro* selection for crop improvement // In book: Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement // Ed. by Mohan Jain S., Brar D. S., Ahloowalia B. S. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1998. P. 169–202.
8. Kunakh V. A. Biotechnology of medicinal plants. Genetic and physiological and biochemical basis. Kiev: Logos, 2005. 730 p.
9. Ignatova S. A. Cell technologies in plant growing, genetics and breeding of cultivated plants: tasks, opportunities, development of *in vitro* systems. Odessa: Astroprint, 2011. 224 p.

10. Bishimbaeva N. K. Somaclonal variability as a source of obtaining new forms of wheat with valuable traits // *Experimental Biology*. 2015. Vol. 55. No. 3. P. 41–46.
11. Efferth T. Biotechnology applications of plant callus cultures // *Engineering*. 2019. Vol. 5. P. 50–59. DOI: 10.1016/j.eng.2018.11.006.
12. Kruglova N. N., Titova G. E., Seldimirova O. A. Callusogenesis as an *in vitro* morphogenesis pathway in cereals // *Russian Journal of Developmental Biology “Ontogenez”*. 2018. Vol. 49. No. 5. P.273–288. DOI: 10.1134/S0475145018050038.
13. Echeverrigaray S., Carrer R. P., Andrade L. B. Micropropagation of *Salvia guaranitica* Benth. through axillary shoot proliferation // *Braz. arch. biol. technol.* 2010. Vol. 53 (4). P. 883–888. DOI: 10.1590/S1516-89132010000400018.
14. Jan T., Khatoun K. *In vitro* regeneration of *Salvia santolinifolia* // *Pak. J. Bot.* 2014. Vol. 46 (1). P. 325–328.
15. Ghanbar T., Hosseini B., Jabbarzadeh Z., Farokhzad A., Sharafi A. High-frequency *in vitro* direct shoots regeneration from axillary nodal and shoot tip explants of clary sage (*Salvia sclarea* L.) // *Bulg. J. Agric. Sci.* 2016. Vol. 22. No. 1. P. 73–78.
16. Grigoriadou K., Trikka F. A., Tsoktouridis G., Krigas N., Sarropoulou V., Papanastasi K., Maloupa E., Makris A. M. Micropropagation and cultivation of *Salvia sclarea* for essential oil and sclareol production in northern Greece // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2020. Vol. 56. P. 51–59. DOI: 10.1007/s11627-019-10040-4.
17. Santos-Gomes P. C., Seabra R.M., Andrade P. B., Fernandes-Ferreira M. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.) // *J. Plant Physiol.* 2003. Vol. 160. No. 9. P. 1025–1032. DOI: 10.1078/0176-1617-00831.
18. Yegorova N. A. Some aspects of essential oil plants biotechnology: microclonal propagation, synthesis of secondary metabolites *in vitro* // *Plant Physiology and Genetics*. 2014. Vol. 46. No. 3. P.187–201.
19. Wu C-F., Karioti A., Rohr D., Bilia A. R., Efferth T. Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of *Salvia miltiorrhiza* with cytotoxicity towards acute lymphoblastic leukemia cells // *Food Chemistry*. 2016. Vol. 201. No. 15. P. 292–297. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.01.054.
20. Grzegorzczak-Karolak I., Kuźma Ł., Skała E., Kiss A. K. Hairy root cultures of *Salvia viridis* L. for production of polyphenolic compounds // *Ind. Crops Prod.* 2018. Vol. 117. P. 235–244. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.03.014.
21. Grzegorzczak-Karolak I. Optimization of culture conditions and cultivation phase for the growth of *Salvia viridis* transformed roots and polyphenolic compound production // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2020. Vol. 142. P. 571–581. DOI: 10.1007/s11240-020-01883-6.
22. Stavtzeva I. V., Yegorova N. A. The culture of isolated sage embryos and their use in breeding. Guidelines. Simferopol: IOMP NAASU, 2011. 20 p.
23. Kintzios S. E. *Salvia* spp.: tissue culture, somatic embryogenesis, micropropagation and biotransformation // In book: *Sage: The Genus Salvia* // Ed. by Kintzios S. E. CRC Press, 2000. P. 241–250. [Electronic resource]. Access point: <https://www.routledge.com/Sage-The-Genus-Salvia/Kintzios/p/book/9789058230058> (reference’s date 05.03.2021).
24. Liu W., Chilcott C.E., Reich R. C., Hellmann G. M. Regeneration of *Salvia sclarea* via organogenesis // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2000. Vol. 36. No. 3. P. 201–206. DOI: 10.1007/s11627-000-0037-z.
25. Skala E., Wysokinska H. *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 2004. Vol. 40, No. 6. P. 596–602. DOI: 10.1079/IVP2004580.
26. Iola-Boldura O. M., Radu F., Popescu S., Borozan A. Regeneration, micropropagation, callus cultures and somatic embryogenesis of common sage (*Salvia officinalis* L.) // *Bulletin UASVM Horticulture*. 2010. Vol. 67. No. 1. P. 308–313.
27. Marconi P. L., López M. C., De Meester J., Bovjin C., Alvarez M.A. *In vitro* establishment of *Salvia hispanica* L. plants and callus // *Biotecnología Vegetal*. 2013. Vol. 13. No. 4. P. 203–207.
28. Yegorova N. A. Some aspects of essential oil plants biotechnology: callus and morphogenesis induction, use of somaclonal variability // *Plant Physiology and Genetics*. 2014. Vol. 46. No. 2. P.108–120.
29. Zotova E. P., Cherednichenko M. Yu. Studying morphogenic potential of annual clary (*Salvia viridis* L.) *in vitro* // *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. Vol. 23. No. 12. P. 52–55. DOI: 10.29296/25877313-2020-12-09.
30. Tawfik A. A., Mohamed M. F. Regeneration of salvia (*Salvia officinalis* L.) via induction of meristematic callus // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 2007. Vol. 43. No. 1. P. 21–27. DOI: 10.1007/s11627-006-9002-9.
31. Bolta Z., Baricevic D., Bohanec B., Andresek S. A preliminary investigation of ursolic acid in cell suspension culture of *Salvia officinalis* // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2000. Vol. 62. No. 1. P. 57–63.
32. Huang L. D., Van Staden J. *Salvia chamaelaganea* can be micropropagated and its callus

induced to produce rosmarinic acid // S. Afr. J. Bot. 2002. Vol. 68. P. 177–180.

33. Karam N. S., Jawad F. M., Arikat N. A., Shibl R. A. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2003. Vol. 73. No. 2. P. 117–121.

34. Kalinin F. L., Sarnatskaya V. V., Polishchuk V. E. Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry. Kiev: Naukova dumka, 1980. 488 p.

35. Yegorova N. A., Stavtzeva I. V., Mitrofanova I. V. Morphogenesis and clonal micropropagation of *Salvia sclarea* L. *in vitro* // Works of the State Nikita Botanical Gardens. 2011. Vol. 133. P. 41–53.

36. Pausheva L. A. Workshop on plant cytology. Moscow: Kolos, 1980. 304 p.

37. Yegorova N. A., Stavtzeva I. V. Use of biotechnological methods for creation initial breeding material in some essential oil plants // Proceedings of the Kuban State Agrarian University. 2016. No. 2 (59). P. 122–131.

UDC 633.81:57.085.2

Yegorova N. A., Stavtzeva I. V.

CREATION OF CLARY SAGE CULTIVAR USING CELL ENGINEERING METHODS.

1. OBTAINING OF PLANT-REGENERANTS IN CALLUS CULTURE *IN VITRO*

Summary. *To increase the efficiency in agricultural plant breeding, including clary sage – one of the main essential oil crops grown in Russia, it is necessary to use biotechnological methods. One of these techniques is based on the induction of somaclonal variability in the callus tissue culture. To develop it, it is necessary to optimize the conditions for obtaining plant-regenerants in vitro and their analysis. The aim of this work was to study the features of morphogenesis and regeneration of plants from callus cultures to develop cell technologies for creating an initial breeding material based on somaclonal variability in *Salvia sclarea* L. In the course of the research, we found that the optimal explants for obtaining morphogenic callus, from which shoots were regenerated, were segments of buds and stems with a node (isolated from seedlings in vitro). Cytological analysis of callus cultures revealed two types of morphogenesis – organogenesis (gemmogenesis) and somatic embryogenesis. The features of the morphogenic callus formation of six sage cultivars and samples during the long-term cultivation were studied. The maximum frequency of morphogenesis was noted in the 2nd passage (from 32.4 to 85.2 %, depending on the genotype). Then, to the 8–10th passage, this indicator decreased to 0.0–3.9 %. ‘S-785’ and ‘Taigan’ cultivars showed the highest morphogenesis frequency (81.5–85.2 %) and duration of callus regeneration potential (up to the 10th passage). The analysis of callus cultures of six donor plants of ‘S-785’ cultivar helped us to reveal their heterogeneity in morphogenesis induction ability. The maximum frequency of morphogenic callus formation (76.3–91.5 % in the 2nd passage) and the duration of the morphogenic potential preservation (up to the 12th passage) were observed in plants No. 3 and 9, whereas in No. 2, regeneration with a frequency of 3.6–9.7 % was observed only during three passages. Analysis of plants obtained from calli showed their variability in morphology – up to 12.5 % of the samples had deviations compared to the initial cultivar ‘S-785’ in leaf shape, inflorescence structure, flower color, etc. Somaclonal changes in morphological and economically useful traits revealed in regenerants indicate that they are promising for use in sage breeding.*

Keywords: *Salvia sclarea* L., callus, explant, in vitro, morphogenesis, passage, somaclonal variability, plant-regenerants.

Егорова Наталья Алексеевна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией биотехнологии ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»; 295493, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150; e-mail: yegorova.na@mail.ru.

Ставцева Ирина Викторовна, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»; 295493, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150; e-mail: ira563583@mail.ru.

Yegorova Natalia Alekseevna, Dr. Sc. (Biol.), head of the Laboratory of biotechnology, FSBSI “Research Institute of Agriculture of Crimea”; 150, Kievskaya str., Simferopol, 295493, Russia; e-mail: yegorova.na@mail.ru.

Stavtzeva Irina Viktorovna, Cand. Sc. (Agr.), senior researcher, FSBSI “Research Institute of Agriculture of Crimea”; 150, Kievskaya str., Simferopol, 295493, Russia; e-mail: ira563583@mail.ru.

Дата поступления в редакцию – 29.12.2020.

Дата принятия к печати – 21.01.2021.