

УДК 58.085

## ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ ВОЛЧЕЯГОДНИКА БОРОВОГО (*DAPHNE CNEORUM* L.) В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

<sup>1</sup>Семенова В.А., <sup>1</sup>Карпеченко К.А., <sup>2</sup>Калаев В.Н., <sup>2</sup>Лепешкина Л.А.,  
<sup>2</sup>Муковнина З.П., <sup>2</sup>Серикова В.И.

<sup>1</sup>ФГУП «Научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции»,  
Воронеж, e-mail: victoria.semenova@gmail.com;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Ботанический сад им. проф. Б.М. Козо-Полянского Воронежского государственного  
университета, Воронеж, e-mail: vsu.botsad@mail.ru

В статье обсуждается выбор способа стерилизации, оптимизации питательных сред, необходимых для достижения максимальной скорости роста и индуцирования ризогенеза кустарничка, занесенного в Красную Книгу РФ – волчегодника бороваго (*Daphne sneorum* L.), культивируемого в ботаническом саду им. проф. Б.М. Козо-Полянского Воронежского государственного университета. Предложен полностью безгормональный способ микроклонального размножения, характеризующийся сниженным содержанием сахарозы в питательных средах, что способствует уменьшению риска возникновения соматклональной изменчивости и удешевлению процесса тиражирования больших объемов растения. Выявлено, что методика стерилизации существенным образом влияет на процесс витрификации и дальнейшего размножения стеблевых эксплантов. Подобран оптимальный состав питательных сред для максимальной элонгации, увеличения коэффициента мультипликации и укоренения растений. Выявлено, что для размножения волчегодника бороваго необходимо использовать первичные экспланты с удаленным апексом.

**Ключевые слова:** микроклональное размножение, жизнеспособный эксплант, питательная среда

## THE PECULIARITIS OF REPRODUCTION OF *DAPHNE CNEORUM* L. IN VITRO

<sup>1</sup>Semenova V.A., <sup>1</sup>Karpechenko K.A., <sup>2</sup>Kalaev V.N., <sup>2</sup>Lepeshkina L.A.,  
<sup>2</sup>Mukovnina Z.P., <sup>2</sup>Serikova V.I.

<sup>1</sup>Research Institute of Forest Genetics and Plant Breeding, Voronezh,  
e-mail: victoria.semenova@gmail.com;

<sup>2</sup>Botanical garden of Voronezh state university by the name of professor  
B.M. Kozo-Polyansky, Voronezh, e-mail: Dr\_Huixs@mail.ru

In this article the choice of a way of sterilization and optimization of the nutrient mediums necessary for achievement of the maximum growth and stimulation of root formation of a low shrub *Daphne cneorum* L. cultivated in the Botanical garden of the Voronezh state university is discussed. *Daphne cneorum* L. is brought in the Red Book of the Russian Federation as a vanishing species. A method of microclonal reproduction without hormones characterized by the lowered maintenance of sucrose in nutrient mediums is offered. This way leads to reduction of risk somaclonal variability and reduces the cost of derived plant material. The sterilization technique essentially influencing process of a vitrification and the further reproduction of stem explants is revealed. The optimal composition of nutrient mediums for maximum elongation is selected. Increase in the multiplier and the rooting of plants is picked up. The need for primary explants remote apex for reproduction of *Daphne cneorum* L. is established.

**Keywords:** micro clonal reproduction, viable explant, culture medium

Метод клонального микроразмножения имеет ряд преимуществ перед традиционными способами размножения. Это получение генетически однородного посадочного материала, свободного от вирусов; высокий коэффициент размножения растений, трудновоспроизводимых традиционными методами; возможность проведения работ в течение круглого года и другие. Метод основывается на явлении тотипотентности – свойстве клеток реализовывать генетическую информацию ядра, обеспечивающую их дифференцировку, а также развитие до целого организма. Таким образом, становится возможным регенерировать полноценное растение.

Выбор *Daphne sneorum* L. (*Daphne julia* K.-Pol.) – волчегодника бороваго в каче-

стве объекта исследования продиктован необходимостью сохранения вида, занесенного в Красную Книгу Российской Федерации [2]. Данный вид относится к редким эндемикам флоры России. В Воронежской области он весьма успешно интродуцирован в ботаническом саду Воронежского государственного университета [4]. Однако в результате детального анализа литературных данных не было обнаружено работ по микроклональному размножению волчегодника бороваго.

Целью работы явилось создание безвирусной коллекции клонов волчегодника бороваго (*Daphne sneorum*) для сохранения ценных генотипов *in vitro* и ускорения процесса воспроизведения особо охраняемого вида. Для достижения поставленной цели необходимо было выбрать способ стерили-

зации, оптимизировать питательные среды, необходимые для достижения максимальной скорости роста и индуцировать ризогенез.

### Материалы и методы исследования

Волчегодник боровой, или Юлии относится к семейству *Thymelaeaceae* (Волчниковые), насчитывающему в своем роду около 50 листопадных, полу- и вечнозеленых видов, обитающих в Европе, Азии и Северной Африке [2]. На территории Центрального Черноземья он встречается в Горшеченском, Мантуровском, Тимском, Ястребовском районах Курской области [1]. В Нечерноземье – в Брянской области. Растет на склонах с меловой подпочвой, меловыми обнажениями, реже по борovým пескам.

Волчегодник боровой – низкорослый вечнозеленый кустарничек, высотой 20–30 см, в диаметре до 1 м. Ветви его покрыты темно-бурой корой. Листья кожистые, длиной 0,8–2 см, многолетние, обратно-яйцевидные, сверху темно-зеленые, снизу сизоватые, собраны на верхушке ветвей в мутовки [3]. Многочисленные побеги заканчиваются соцветием – ложная головка с 10–25 мелкими цветками, источающими сильный приятный аромат. Венчик трубчатый от светло- до темно-розового цвета, около 0,5 см в диаметре. Плод – костянка, 6–7 мм длиной, 3–6 мм шириной. Зрелые плоды окружены прозрачным желтоватым околоплодником.

Цветение волчегодника начинается в первых числах мая и продолжается 20–30 дней в зависимости от погодных условий. В этот период растения напоминают розовые подушки. Со второй половины лета бывает вторичное цветение, но менее обильное.

Размножают волчегодник боровой свежесобранными семенами либо полуодревесневшими черенками, которые укореняют в первой половине лета. Растения волчегодника хорошо переносят пересадку в возрасте 1–3-х лет. Позже у них развивается мощный веретеновидный корень, с годами уходящий на глубину более полутора метров.

Исследования проводили на растительном материале, выращенном в ботаническом саду им. проф. Б.М. Козо-Полянского Воронежского госуниверситета.

В начале опыта в сентябре двухлетнее растение волчегодника из открытого грунта было переведено в условия закрытого грунта с контролируемым показателями температурного и светового режимов. При температуре воздуха 26 °C выше нуля, а также стандартных световых условиях (16-часовой фотопериод) растение нормально развивалось. Спустя 3 месяца волчегодник обильно цвел и имел множество ювенильных побегов. По достижении длины побегов 3–5 см от них отрезали апикальную часть и стерилизовали.

С целью получения жизнеспособных эксплантов волчегодника были проведены 3 варианта обработки верхушечных (ювенильных) участков стебля. Начальной стадией первых двух вариантов являлась 20-минутная промывка проточной водой для удаления сапрофитной микрофлоры. Последующие стадии включали: в первом варианте стерилизацию обработку мертиолятом (0,015%) и бытовым отбеливателем «Белизна» (4%); во втором варианте – этиловым спиртом (96%). Третий вариант стерилизации исключал длительную промывку проточной водой и включал обработку только 96%-м этиловым спиртом. После стерилизации экспланты отмыва-

ли стерильной дистиллированной водой в течение 10 минут на качалке.

Концы проростков отрезали, нарезали их на отрезки с 3–4 междоузлиями и помещали в стерильные контейнеры на широко используемых питательных средах MS и BТМ, различающихся по количественному составу макросолей и сахарозы, гормонов и активированного угля.

Субкультивирование, микрочеренкование и укоренение проводили на вышеуказанных питательных средах.

### Результаты исследования и их обсуждение

При микроклональном размножении волчегодника борового серьезной проблемой является витрификация растительного материала как на начальных, так и на более поздних этапах клонирования. Было предположено, что явление связано со стерилизацией первичных эксплантов. Поэтому на первой стадии работы исследовались различные варианты получения стерильных растений. Так, было показано, что при стерилизации мертиолятом в сочетании с «Белизной» наблюдается 100%-я витрификация растений, они практически не растут и со временем погибают. Аналогичное явление наблюдалось и при стерилизации, включающей удаление сапрофитной микрофлоры путем длительного промывания проточной водой с последующей обработкой неразбавленным этиловым спиртом. И только третий вариант стерилизации – кратковременное погружение растений в 96%-й спирт – оказался оптимальным для волчегодника борового. При этом растения давали 100%-ю выживаемость и полное отсутствие витрификации (рис. 1). Данный факт позволяет предположить, что удлинение процедуры стерилизации приводит к излишнему обводнению растений и, как следствие, вызывает процесс витрификации эксплантов *Daphne sneorum*.

Стандартная методика микроклонального размножения требует использования гормонов роста хотя бы на первых стадиях введения эксплантов в условия *in vitro*. Так, с целью удлинения пробирочных растений и увеличения коэффициента мультипликации была использована низкосолева среда 1/2 WPM, дополненная 0,2 мг/л БАП и 0,1 мг/л ГА<sub>3</sub>. После разрастания базальной части экспланта начинался рост адвентивных побегов по типу куста, достигающий в течение 4 недель количества 7–10 шт. на микрорастение. Побеги изолировали и помещали либо на безгормональные среды, либо (для дальнейшего увеличения коэффициента мультипликации) на 1/2 WPM, дополненную вышеуказанными гормонами (рис. 2).

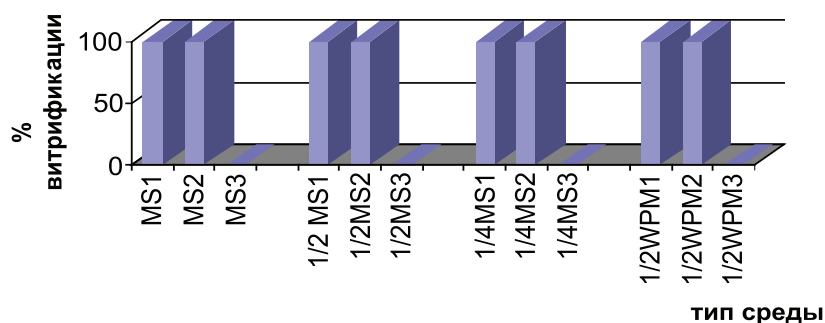


Рис. 1. Влияние метода стерилизации и состава питательных сред на процесс витрификации *Daphne speogit*. Обозначения: MS, 1/2 MS, 1/4 MS – среда Мурасиге и Скуга с разным набором макроэлементов; 1/2 WPM – среда для размножения древесных растений. 1 – длительная промывка проточной водой с дальнейшей обработкой мертиолятом + белизной; 2 – с обработкой 96% спиртом; 3 – стерилизация только 96% спиртом

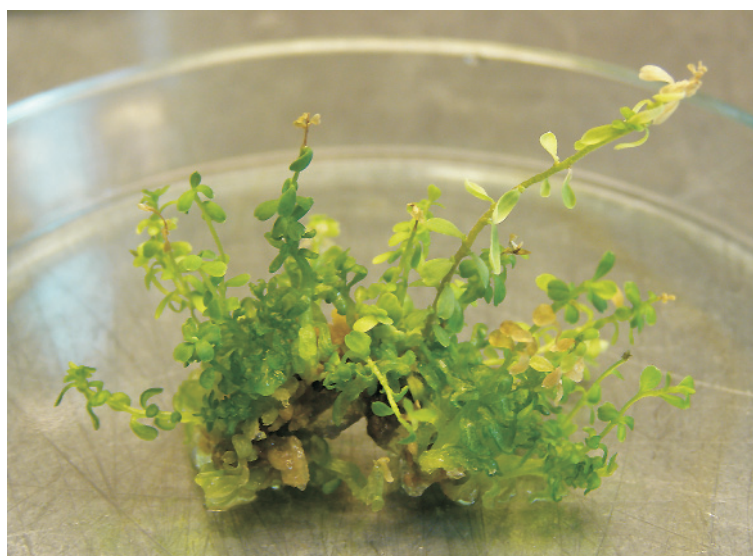


Рис. 2. Микрклонально размноженные растения *Daphne speogit*

Укоренение эксплантов происходило спонтанно в течение 3 недель на всех типах безгормональных сред: с активированным углем или без него, на 1/2 или 1/4 по макроэлементам MS. Однако часть растений укоренилась только после длительного выдерживания их на средах, дополненных 3 мг/л ИМК.

Отсутствие фитогормонов в процессе микрклонального размножения позволяет снизить проявления соматоклональной изменчивости.

Было обнаружено, что, во-первых, удлинение растений на безгормональных средах превышает их рост на среде с гормональными добавками. Во-вторых, элонгация на среде 1/4 MS превышает рост на среде 1/2 MS. Максимальный месячный прирост на данной среде составил 3–4 см, что в несколько раз превышает величину прироста в условиях открытого грунта (3–10 см за вегетационный период). После удлинения микрочеренки разрезали на 1–2 см сегменты и помещали на среды того же состава (рис. 3, 4).

Необходимо отметить, что экспланты, содержащие верхушечную точку роста, росли несколько медленнее, по сравнению с эксплантами, не имеющими последней. Часто наблюдалось явление апикального усыхания, характерное для размножения дуба черешчатого. Поэтому для лучшего размножения волчегонника бороваго необходимо использовать первичные экспланты с удаленным апексом.

#### Заключение

Предложенный способ микрклонального размножения волчегонника бороваго выгодно отличается отсутствием гормонов роста на всем протяжении цикла и сниженным содержанием сахарозы в питательных средах, что способствует уменьшению риска возникновения соматоклональной изменчивости и удешевлению процесса тиражирования больших объемов растения. Размножение волчегонника осуществляли в культуре стеблевых ювенильных эксплантов.

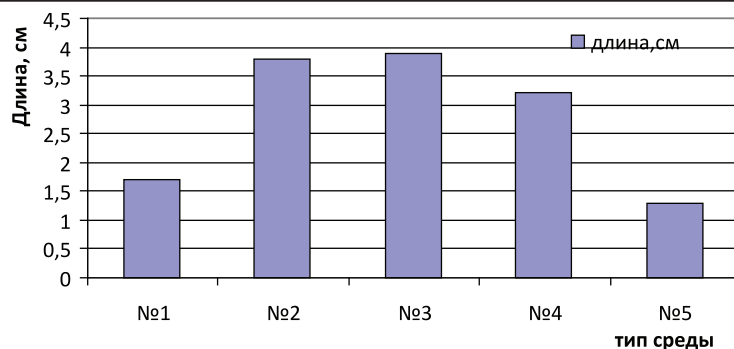


Рис. 3. Зависимость роста эксплантов от типа питательной среды.

Обозначения: № 1 – MS; № 2 –  $\frac{1}{2}$  MS;  
 № 3 –  $\frac{1}{4}$  MS; № 4 –  $\frac{1}{2}$  WPM + 0,2 БАП + 0,1 ГА<sub>3</sub>; № 5 –  $\frac{1}{2}$  BTM + 0,2 БАП + 0,1 ГА<sub>3</sub>

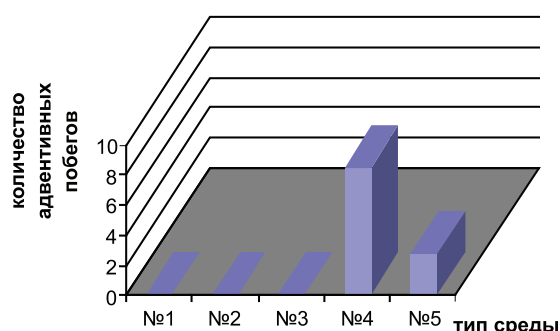


Рис. 4 Зависимость количества адвентивных побегов от типа питательной среды.

Обозначения: № 1 – MS; № 2 –  $\frac{1}{2}$  MS;  
 № 3 –  $\frac{1}{4}$  MS; № 4 –  $\frac{1}{2}$  WPM + 0,2 БАП + 0,1 ГА<sub>3</sub>;  
 № 5 –  $\frac{1}{2}$  BTM + 0,2 БАП + 0,1 ГА<sub>3</sub>

Изучение особенностей введения в культуру *in vitro* волчегородника бороваго приобретает большое значение и по другим причинам. Имеются данные, что волчегородник содержит различные соединения (включая биологически активные вещества), которые находят широкое применение в фармакологии [5]. Таким образом, применение метода микроклонального размножения позволит решить актуальную проблему быстрого воспроизведения редкого эндемика и сохранения его путем введения в широкую культуру.

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. Виноградов И.П., Голицын С.В., Денисова Л.В. Ботанические памятники природы Центрально-Черноземных

областей // Бюллетень Охрана природы и заповедное дело в СССР. – М.: Академия наук СССР. – 1960. – №5. – С. 3–37.

2. Красная книга Российской Федерации (растения, грибы). – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 855 с.

3. Маевский П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. – 10-е изд. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 600 с.

4. Рущкий И.А., Преснякова М.А. Волчегородник Юлии – новое декоративное растение в культуре. – Воронеж: ВГУ, 1965. – 26 с.

5. Tosun A. Chemical constituents and biological activities of *Daphne* L. species // J. Fac Pharm. – 2006. – Vol. 35, №1. – P. 43–68.

#### References

1. Vinogradov I.P., Golitsyn S.V., Denisova L.V. Botанические памятники природы Central'no-Chernozemnykh oblastej [Botanical nature monuments of Central Chernozem regions], Bulletin of Environmental Protection and preservation work in the USSR, 1960. no. 5, pp. 3–37.

2. Krasnaja kniga Rossijskoj Federacii (rastenija, griby) [The Red Book of Russian Federation (plants and fungi)]. Moscow, KMK Publ., 2008. 855 p.

3. Maevskij P.F. Flora srednej polosy evropejskoj chasti Rossii [The flora of central European part of Russia]. Moscow, 2006. 600 p.

4. Ruckij I.A., Presnjakova M.A. Volchejagodnik Julii – no-voe dekorativnoe rastenie v kul'ture [Daphne Julia – new ornamental plant in the culture]. Voronezh, VSU Publ., 1965. 26 p.

5. Tosun A. Chemical constituents and biological activities of *Daphne* L. species, J. Fac Pharm. 2006. Vol. 35. no. 1, pp. 43–68.

#### Рецензенты:

Ершова А.Н., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биологии растений и животных естественно-географического факультета ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный педагогический университет», г. Воронеж;

Корнеева О.С., д.б.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и биохимии ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», г. Воронеж.

Работа поступила в редакцию 06.04.2012.