

УДК 57.085.23

**ОПЫТ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ЭХИНАЦЕИ  
УЗКОЛИСТНОЙ (ECHINACEA ANGUSTIFOLIA D.C.)**

<sup>1</sup>Землянухина О.А., <sup>1</sup>Вепринцев В.Н., <sup>1</sup>Карпеченко К.А.,

<sup>1</sup>Карпеченко Н.А., <sup>1</sup>Карпеченко И.Ю., <sup>1</sup>Кондратьева А.М.,

<sup>2</sup>Калаев В.Н., <sup>2</sup>Кузнецов Б.И., <sup>2</sup>Моисеева Е.В., <sup>2</sup>Воронин А.А.

<sup>1</sup>ФГУП «Научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции»,

Воронеж, e-mail: oz54@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж, e-mail: Dr\_Huixs@mail.ru

Разработана методика микроклонального размножения ценного растения – эхинацеи узколистной. Материал для введения в стерильную пробирочную культуру *in vitro* был взят в осенний период. Использованы два типа эксплантов: семена и выески молодых листьев. Предложена схема поверхностной стерилизации растений, включающая обработку раствором 4% «Белизны», содержащим 0,015% мертиолята. Растительный материал не содержал внутренней инфекции бактериального или грибного происхождения. В качестве базовой питательной среды использована среда Мурасиге и Скуга, дополненная бензиламинопурином в концентрации 1 мг/л. При этом на листовых сегментах начинается образование каллуса, при переносе которого на безгормональную среду того же состава образуются корни. Коэффициент мультипликации достигал 7,5 на одно растение. Процесс ризогенеза не зависит от присутствия в среде активированного угля (1%), индолмасляной или инолилуксусной кислот (0,5 – 3,0 мг/л).

**Ключевые слова:** эхинацея, культура ткани, адвентивные побеги, ризогенез

**EXPERIENCE IN ECHINACEA ANGUSTIFOLIA  
D.C. MICROCLONAL REPRODUCTION**

<sup>1</sup>Zemlianukhina O.A., <sup>1</sup>Veprintsev V.N., <sup>1</sup>Karpechenko K.A.,

<sup>1</sup>Karpechenko N.A., <sup>1</sup>Karpechenko I.Y., <sup>1</sup>Kondratieva A.M., <sup>2</sup>Kalaev V.N.,

<sup>2</sup>Kuznetsov B.I., <sup>2</sup>Moiseeva E.V., <sup>2</sup>Voronin A.A.

<sup>1</sup>Research Institute of Forest Genetics and Breeding, Voronezh, e-mail: oz54@mail.ru;

<sup>2</sup>Voronezh State University, Voronezh, e-mail: Dr\_Huixs@mail.ru

The Echinacea species, a member of the sunflower family (Compositae or Asteraceae), are native to North America and has a long history of medicinal use. The goal of this research was to establish protocol for micropropagation of Echinacea angustifolia DC. The obtained data revealed that seeds sterilization with «Belisna»:H<sub>2</sub>O (1:3) following by 70% ethanol for 30 sec gave the best results for seed germination and survival percentage. Leaf sterilization were effected with 4% «Belisna» and 0.015% merthiolat for 15 min. Leaf explants were used for callus formation. The best results for leaf were obtained with MS medium supplemented with 1.0 mg/l BA and as for seeds – with hormone free basal medium. Rooting of regenerated shoot explants was successful on Murashige and Skoog medium without the addition indole-3-butyric acid or indoleacetic acid. Culturing the regenerated shoots on MS medium supplemented with charcoal not enhanced of roots.

**Keywords:** Echinacea, culture tissue, adventives buds, rizogenesis

Эхинацея узколистная (*Echinacea angustifolia* D.C.) относится к семейству астровых (*Asteraceae* Dumort.). Род *Echinacea* по различным данным, включает в себя от пяти до девяти видов, такие как эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea* (L.) Moench), эхинацея странная (*Echinacea paradoxa* Britton), эхинацея бледная (*Echinacea pallida* Nutt) и эхинацея узколистная (*Echinacea angustifolia* D.C.). Название растения произошло от греческого слова *echinos* – колючий [5]. Эхинацея относится к лекарственным растениям, поддерживающим иммунный статус организма, то есть к неспецифическим иммуномодуляторам. Ее препараты применяют при простудах, зубной боли, укусах змей, бешенстве, раневых инфекциях и многих других, причем для медицинских целей используют растения, начиная с двухлетнего возраста.

На основе эхинацеи пурпурной и эхинацеи странной (единственный вид в роде с желтыми цветками) выведены многие сорта и гибриды, соединившие в себе лучшие черты своих родителей – крупные соцветия, великолепную окраску и приятный аромат. Помимо традиционной розово-малиновой гаммы, селекционные эхинацеи бывают оранжевыми, желтыми и белыми. Некоторые сорта обладают душистыми цветками, поникающими, махровыми, с возвышающимися венчиками.

В случае семенного размножения основных видов эхинацеи потомство сохраняет признаки родительских форм, но гибридные растения могут размножаться только вегетативно, делением куста. В связи с высокой ценностью и декоративностью видов, а также обнаружения все большего медицинского потенциала растения возни-

кает потребность в производстве его плантационных количеств. Этого можно достичь только с помощью микроклонального тиражирования, т.е. размножения в условиях *in vitro*. Публикации на эту тему удалось найти только в иностранной печати, причем исследователи при размножении разных видов эхинацеи использовали питательные среды, дополненные сочетанием нескольких гормонов [1, 6].

Целью настоящей работы была разработка метода микроклонального размножения эхинацеи в культуре ткани на примере эхинацеи узколистной.

### Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования были использованы растения эхинацеи узколистной, произрастающие на территории ботанического сада им. проф. Б.М. Козо-Полянского Воронежского государственного университета. Для введения в культуру ткани использовали как семена, так и молодые листья.

Стерилизацию семян производили с предварительным отмыванием в течение 20 мин в проточной воде в мешочках из фильтровальной бумаги. Затем выдерживали в растворе коммерческого отбеливателя «Белизна» в стерильной дистиллированной воде в соотношении 1:3, соответственно. После этого семена помещали в 70%-й этанол на 30 с. Затем семена трижды промывали дистиллированной стерильной водой и помещали на поверхность безгормональной питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) [4].

Стерилизацию листьев производили по удлиненной схеме. После протирания листьев мыльным рас-

твором, их помещали на 10 мин в раствор жидкого моющего средства «Зеленое яблоко», сходного по действию с дорогостоящим препаратом Tween, затем осуществляли отмывание от поверхностной сапрофитной микрофлоры проточной водой (20 мин). Собственно стерилизация проходила в течение 15 мин в растворе, содержащем смесь 0,015% мертиолята и 4% «Белизны», с последующим трехкратным отмыванием в стерильной дистиллированной воде (по 5 мин). Стерильные листья (высечки 2×2 см) помещали на поверхность среды Мурасиге и Скуга, дополненной 6-бензиламинопурином (БАП) в концентрации 1 мг/л.

Питательные среды были доведены до pH 5,6–5,8 и автоклавированы при 121 °C и 1 атмосферы в течение 20 мин с предварительной продувкой горячим паром (20 мин). В качестве культивационных сосудов использовали пенициллиновые пузырьки (семена), а также пластиковые контейнеры для культуры ткани Magenta Box, ASCO.

### Результаты исследования и их обсуждение

Размножается эхинацея семенами и вегетативно – делением корневища ранней весной или поздней осенью. Семена не нуждаются в стратификации, но всходят очень долго – до 40 дней, причем им требуется достаточно влаги и тепла. У эхинацеи узколистной в разные годы наблюдается большой разброс между потенциальной и реальной семенной продуктивностью. Так, в 2011 году коэффициент семенификации составил 5%. На рис. 1 показано прорастание семян эхинацеи узколистной.

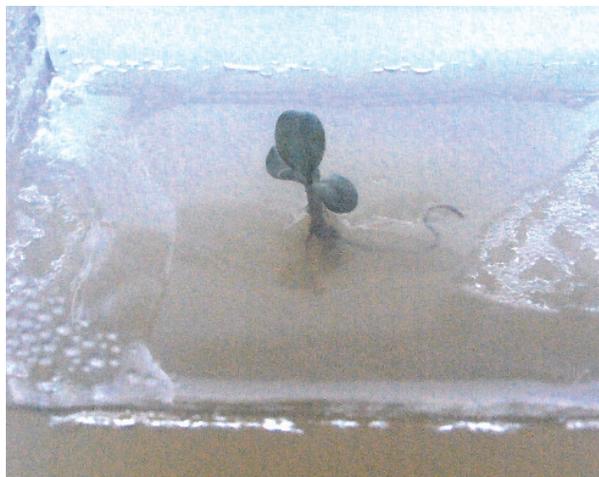


Рис. 1. Прорастание семян в культуре *in vitro* (слева) и укоренившийся проросток семян эхинацеи узколистной на безгормональной среде Мурасиге и Скуга (справа)

Вторым способом микроклонального размножения эхинацеи *in vitro* было использование высечек листьев, когда часть стерильного листа, сохраняющего главное жилкование, складется на поверхность или помещается слегка наклонно по отношению к питательной среде. В этом случае исполь-

зуется базовая среда Мурасиге и Скуга, дополненная 1 мг/л 6-бензиламинопурином. Через некоторое время (около 2 недель инкубирования) на базальной части экспланта начинается образование каллуса. При переносе таких растений на безгормональные среды начинается спонтанный ризогенез (рис. 2).



*Рис. 2. Образование ризогенного каллуса (слева) и корней (справа) на листовых высечках эхинацеи узколистной*

В течение двух-трех последующих недель у основания появляются адвентивные побеги, при изолировании и пересадке которых на безгормональные среды процесс ризогенеза продолжается одновременно с вытягиванием растений, что

показано на рис. 3. Использование для укоренения сред, содержащих индолилмасляную или индолилуксусную кислоты (0,5–3,0 мг/л), а также активированного угля (1%) не приводило к ускорению процесса регенерации.



*Рис. 3. Мультипликация побегов эхинацеи узколистной на безгормональной среде Мурасиге и Скуга*

Таким образом, в настоящем исследовании были разработаны условия регенерации, роста и образования корней у эхинацеи узколистной из двух типов эксплантов: семян и листовых высечек. Коэффициент мультипликации достигал 7,5 на одно растение. Другие авторы для микрклонального размножения эхинацеи использовали стеблевые сегменты, а в среды при укоренении добавляли активированный уголь [2, 3, 7]. Для размножения эхинацеи рядом исследователей использовался метод соматического эмбриогенеза [2, 7]. Соматический эмбриогенез является, на наш взгляд, дорогостоящим и долговременным методом, при этом растения могут обладать полезной соматической изменчивостью. С другой стороны, мутантные растения можно получить и другими методами, например, размножением в присутствии 2,4-Д.

В случае эхинацеи достаточно традиционных способов культивирования *in vitro*. В некоторых статьях отмечается контаминация семян системными грибами [3], однако в нашем случае подобного явления не наблюдалось. В общем, можно заключить, что культивирование эхинацеи в культуре ткани легко достижимо при использовании листовых высечек и семян в осеннее время или по типу размножения древесных растений в культуре стеблевых эксплантов, используя пазушные почки высоких побегов, летом в период цветения.

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. Bertoli A. Phytochemical characterization of *in vitro* regenerated shoots of *Echinacea angustifolia* DC. // Acta Hort. (ISHS). – 2009. – Vol. 812. – P. 257–264.

2. Choffe K.L. *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* L.: direct somatic embryogenesis and indirect shoot organogenesis in petiole culture // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* – 2000. – Vol. 36. – P. 30–36.

3. Koroch A.R. *In vitro* regeneration of *Echinacea pallida* from leaf explants // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* – 2003. – Vol. 39. – P. 415–418.

4. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.

5. Speroni E. Anti-inflammatory and cicatrizing activity of *E. pallida* // *J. Ethnopharmacol.*, 2002. – Vol. 79. – P. 265–272.

6. Taha H.S. *In vitro* studies and RAPD analysis of *Echinacea angustifolia* // *J. of American Science.* – 2010. – Vol. 6, № 10. – P. 781–790.

7. Zabayeda S.M.A., Saxenaab P.K. *In Vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* L.: enhancement of somatic embryogenesis by indolebutyric acid and dark pre-incubation // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* – 2003. – Vol. 39. – P. 605–612.

#### References

1. Bertoli A., Acta Hort. (ISHS), 2009, Vol. 812, pp. 257–264.  
2. Choffe K.L., *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, 2000, Vol. 36, pp. 30–36.

3. Koroch A.R., *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.*, 2003, Vol. 39, pp. 415–418.

4. Murashige T., *Physiol. Plant*, 1962, Vol. 15, pp. 473–497.

5. Speroni E. *J. Ethnopharmacol.*, 2002, Vol. 79, pp. 265–272.

6. Taha H.S., *J. of American Science*, 2010, Vol. 6, № 10, pp. 781–790.

7. Zabayeda S.M.A., Saxenaab P.K., *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 2003. Vol. 39. pp. 605–612.

#### 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.