

the highest accumulation capacity for heavy metals (Al, As, Cr, Ni, Pb, Sr, V) and Arsenicum, macroelements (Ca and Mg), and also trace elements (Co, Fe, Li, Mn, Mo and Zn). On the contrary, *Evernia prunastri*, colonizing branches of trees accumulates the highest levels of iodine and selenium. It was shown that accumulation levels of different elements by the mentioned lichens are not only species-specific but also are regulated by peculiarities of habitat (open area, forest canopy) and abiotic factors (humidity, temperature). The results may be considered as background values of elements in lichens for the studied environmentally friendly territories.

Key words: lichens; elemental composition; environment; specially protected nature conservation areas

БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК [582.998.3-116]:57.085.2

DOI: 10.25684/NBG.boolt.130.2019.04

ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ *CODONOPSIS LANCEOLATA* (SIEBOLD.&ZUCC.) BENTH. & HOOK. FIL. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Ольга Ивановна Молканова, Дарья Александровна Егорова,
Ольга Васильевна Королева, Юрий Николаевич Горбунов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук
127276, г. Москва, Ботаническая ул., 4
E-mail: molkanova@mail.ru

Впервые регенеранты *Codonopsis lanceolata* (Siebold.&Zucc.) Benth. & Hook. fil. получены через прямой органогенез из пазушных меристем без стадии каллусообразования. Изучено влияние минерального состава питательной среды, регуляторов роста, их концентраций на регенерацию микропобегов. Показано положительное влияние совместного применения цитокининов и ауксинов на регенерацию микропобегов *C. lanceolata*.

Ключевые слова: *Codonopsis lanceolata*; лекарственное растение; клональное микроразмножение; морфогенетический потенциал

Введение

Кодонопсис ланцетный (*Codonopsis lanceolata* (Siebold.&Zucc.) Benth. & Hook. fil.) – многолетняя лиана из семейства колокольчиковых (Campanulaceae Juss.). Этот вид широко используется в традиционной медицине, так как характеризуется широким спектром лекарственных свойств. *C. lanceolata* обладает антиоксидантной, противовоспалительной и противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью. Биологически активные вещества кодонопсиса регулируют сокращение сердечных мышц, пищеварительные процессы, а также участвуют в процессах клеточного роста. Данное растение используют для лечения бронхита, астмы, кашля, туберкулеза, диабета, диспепсии и психоневроза. Лечебные настои *C. lanceolata* рекомендуют при онкологических заболеваниях и при различных воспалительных процессах. В лечебных целях в основном применяют корни, которые содержат углеводы, стерины (бета-ситостерин), тритерпеновые сапонины, кумарины, липиды (фосфолипиды и триглицериды). В стебле содержатся флавоноиды (апигенин, лютеолин). Хотя в традиционной медицине имеется информация о применении многих видов *Codonopsis*, наиболее часто сообщалось о биологической активности *C. pilosula* Franch. и *C. lanceolata*, что подтвердило их ценность в качестве лекарственных растений [6, 10].

Род *Codonopsis* включает 42 вида двудольных травянистых многолетних

растений, преимущественно обнаруженных в Центральной, Восточной и Южной Азии [10]. *C. lanceolata* распространен на острове Кунашир, а также в южной части Дальнего Востока России: Амурской области, Хабаровском и Приморском крае. Далее ареал вида простирается на юг, охватывая Монголию, Корею и Китай. *C. lanceolata* включен в "Красную книгу Сахалинской области". Имеет статус Е(2) – угрожаемый вид и охраняется в природном заповеднике "Курильский". Лимитирующими факторами являются малая численность островной популяции и нарушение среды обитания [1].

C. lanceolata растет в долинах и на заливных лугах, возле рек, на опушках лесов и песчаных грунтах. Растение имеет стержневой, мясистый, удлинённый корень. Длина гладких, вьющихся стеблей достигает 2 м. Расположенные пучками листья широколанцетные или ромбические, без опушения. Цветки колокольчатые, снаружи зеленоватые, внутри буро-фиолетовые, мраморно-пятнистые. Цветет в июле – августе. Цветы – гермафродиты, семена созревают с сентября по октябрь. Плоды – трехгнездные, обратноконические, сизоватые коробочки. Семена крылатые [3, 6]. Отмечено, что семена близкородственных видов *Codonopsis* обладают светочувствительностью и не требуют стратификации, однако предварительное охлаждение усиливает их прорастание в тепле на свету [5]. В исследованиях В.К. Ghimire, С.М. Shin, С.Н. Li и др. [8] было показано, что общий процент всхожести семян *C. lanceolata* в условиях *in vivo* составил около 49,5%, в условиях *in vitro* на безгормональной питательной среде МС (Murashige and Skoog, 1962) [13] – 37,3% и на питательной среде МС с добавлением 3 мг/л гиббереллиновой кислоты – 76,0%. В целом семена характеризуются низкой энергией прорастания из-за плотной семенной оболочки.

В настоящее время из-за истощения естественной среды обитания и высокого рыночного спроса большинство корней получают от культивируемых растений. В Китае и Корее кодонопсис ланцетный выращивают на плантациях, искусственно стимулируя рост корня [14]. При этом ценность такого корня определяется его размером (подобно корням женьшеня). В ООО «ССХП «Женьшень» Унечского района Брянской области было показано, что *C. lanceolata* можно успешно культивировать и в условиях средней полосы России [6].

Однако существует ряд трудностей, связанных с получением большого количества саженцев данного растения. Семенное размножение затруднено из-за медленного развития и низкой жизнеспособности сеянцев [9]. Имеются сообщения о культивировании клеток и тканей некоторых представителей рода *Codonopsis in vitro*. Разработан протокол клонального микроразмножения *C. pilosula*. Наибольшее количество микропобегов было получено на питательной среде МС, содержащей 1 мг/л БАП (6-безиламинопурина) и 1 мг/л НУК (1-нафталинуксусная кислота). В дальнейшем регенеранты после стадии ризогенеза были успешно адаптированы к условиям *ex vitro* [14]. В работе В.К. Ghimire и др. [9] отмечается, что для получения микропобегов *C. lanceolata* чаще всего использовали адвентивное побегообразование и соматический эмбриогенез. Была показана возможность размножения *C. lanceolata* микроклубнями *in vitro*, которую целесообразно использовать для воспроизводства элитных клонов и сохранения гермоплазмы вида ввиду длительности культивирования (более 4 месяцев) [11].

Разработка эффективных методов клонального микроразмножения несомненно актуальна для сохранения и устойчивого воспроизводства *C. lanceolata*.

Цель исследования – разработка приемов клонального микроразмножения *C. lanceolata*. Задачи заключались в изучении регенерационных способностей и морфогенетического потенциала растения в культуре *in vitro* и определении наиболее оптимального состава питательной среды на основных этапах культивирования. В

настоящей работе впервые в условиях *in vitro* получены аксиллярные микропобеги *C. lanceolata*, развивающиеся из уже существующих пазушных меристем растения. Активация деятельности клеток пазушных меристем происходила через прямой органогенез, минуя стадию каллусообразования, что является важным в отношении данной культуры, так как молекулярные маркеры выявили значительную генетическую нестабильность в растениях кодонопсиса ланцетного, регенерированных из каллуса [14].

Материалы и методы

В качестве объекта исследования был выбран дикорастущий вид *C. lanceolata*. Семена для экспериментов были собраны с растений в 2015 году в ООО «СХП «Женьшень» Унечского района Брянской области (д. Пески). Введение семенного материала в условия *in vitro* производили согласно общепринятым рекомендациям [2]. Для предварительной стерилизации семян использовали раствор фунгицида системного действия «Фундазол» в концентрации 2% (5 – 7 мин) и 70%-ный этанол (C_2H_5OH) (5 – 10 сек). Семена стерилизовали в 7%-ом растворе гипохлорита кальция ($Ca(ClO)_2$) в течение 20 мин, затем переносили на безгормональную питательную среду МС и проращивали *in vitro* на свету. В качестве эксплантов использовали проростки с удаленными корнями.

На стадии пролиферации изучали влияние минерального состава питательных сред МС, QL (Quoirin and Lepoivre, 1977) [15], WPM (Woody Plant Medium) [12] и B5 [7] на регенерацию и размножение микропобегов *in vitro*. В качестве источника цитокинина использовали БАП в концентрации 0,5 мг/л. Для изучения влияния гормонального состава среды на рост и развитие растений использовали питательную среду МС, дополненную БАП в концентрации 0,5; 1,0; 1,5 мг/л и ИУК (индолилуксусная кислота) в концентрации 0,05 мг/л. В качестве контроля использовали безгормональную среду МС. Растения-регенеранты выращивали на свету при температуре 23 – 25°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности 3000 лк.

Опыты проводили в 3-кратной повторности, по 10 микропобегов в каждом варианте. На стадии размножения измеряли длину микропобегов, подсчитывали их количество и рассчитывали коэффициент размножения. Обработку полученных данных проводили путем расчетов с использованием пакета статистического анализа приложения Microsoft Excel и программы PAST (Palaeontological Statistics). Расчет показан в средних арифметических величинах и доверительных интервалах. Доверительность оцениваемых показателей принимали на уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты стерилизации показали, что выбранная схема стерилизации, включающая предварительный этап с 2%-ым раствором «Фундазола» и 70%-ным раствором этанола (C_2H_5OH) и основной этап с 7%-ым раствором гипохлорита кальция (20 мин), является эффективной для обеззараживания семян *C. lanceolata*. При этом процент стерильных проростков составил 53%. Прорастание семян наблюдали через 5 – 7 суток после помещения на питательную среду. Развитие проростков из семян отмечено после двух недель культивирования.

Сравнительный анализ влияния различных минеральных основ на количество микропобегов показал, что данный показатель варьировал слабо (коэффициент вариации составил 21,0%). Разница оказалась несущественной при сравнении результатов, полученных на питательных средах QL и B5, МС и WPM (табл. 1).

Таблица 1

Влияние минерального состава питательных сред на морфометрические показатели *Codonopsis lanceolata*

Питательная среда	Высота микропобега, мм	Число микропобегов на эксплант, шт.	Коэффициент размножения
МС	27,1±1,9	1,8±0,1	3,1±0,4
QL	13,3±0,3	1,3±0,1	1,5±0,1
B5	10,0±0,8	1,1±0,1	1,9±0,2
WPM	10,8±0,3	1,8±0,2	1,8±0,1

При этом максимальный коэффициент размножения (3,1±0,4), наибольшую высоту (27,1±1,9 мм) и лучшее развитие микропобегов наблюдали на питательной среде МС, на которой проводили все дальнейшие опыты (рис. 1).

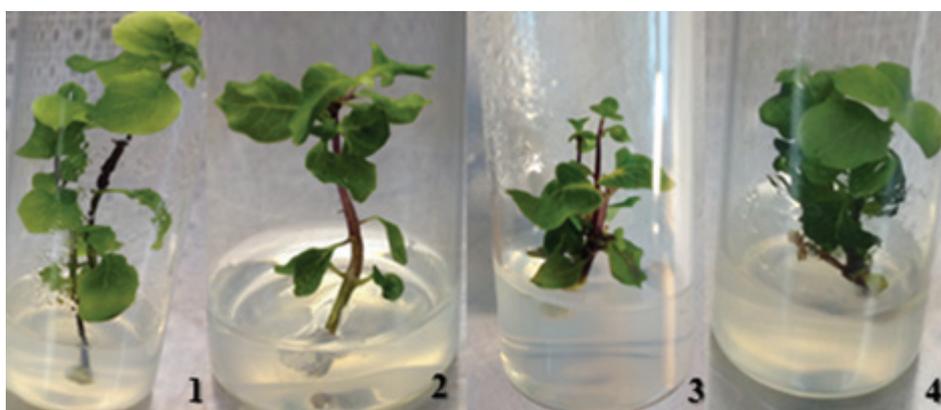


Рис. 1 Микропобеги *C. lanceolata* на питательной среде: 1 - МС; 2 - QL; 3 - B5; 4 – WPM

Значительное влияние на реализацию морфогенетического потенциала оказывают компоненты питательной среды, особенно регуляторы роста. Правильный подбор и оптимальные соотношения цитокининов и ауксинов являются весьма существенными для поддержания устойчиво пролиферирующей культуры *in vitro* [4]. Морфометрические показатели развивающихся регенерантов зависели от концентрации регуляторов роста в питательной среде. В процессе исследования на первом этапе были выявлены наиболее оптимальные концентрации БАП на стадии собственно размножения (табл. 2).

Таблица 2

Влияние концентрации БАП на морфометрические показатели *Codonopsis lanceolata*

Концентрация БАП, мг/л	Высота микропобега, мм	Число микропобегов на эксплант, шт.	Коэффициент размножения
Контроль	23,5±1,0	1,4±0,1	2,3±0,1
0,5	26,9±2,4	1,9±0,1	3,7±0,3
1,0	19,5±1,1	1,5±0,2	2,6±0,2
1,5	14,1±1,3	1,7±0,2	2,7±0,2

Наибольшие значения коэффициента размножения (3,7±0,3) и высоты микропобегов (26,9±2,4) были достигнуты на питательной среде МС с добавлением 0,5 мг/л БАП. Максимальное количество микропобегов наблюдали на питательных средах, содержащих 0,5 мг/л и 1,5 мг/л БАП.

Для многих видов растений было установлено увеличение регенерационного потенциала при культивировании на средах, сочетающих ауксины и цитокинины [4]. В случае *C. lanceolata* также наблюдали достоверное повышение коэффициента размножения и высоты микропобегов при культивировании на питательных средах, содержащих разные концентрации БАП в сочетании 0,05 мг/л ИУК (рис. 2 – 3).

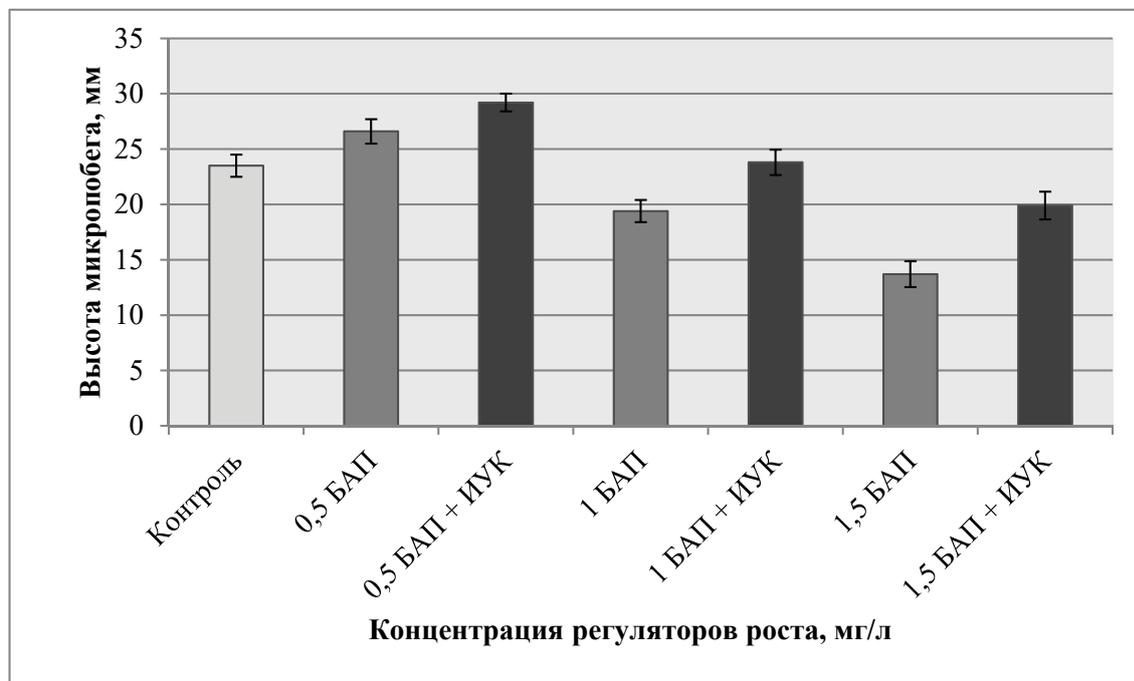


Рис. 2 Влияние регуляторов роста на высоту микропобегов *Codonopsis lanceolata*

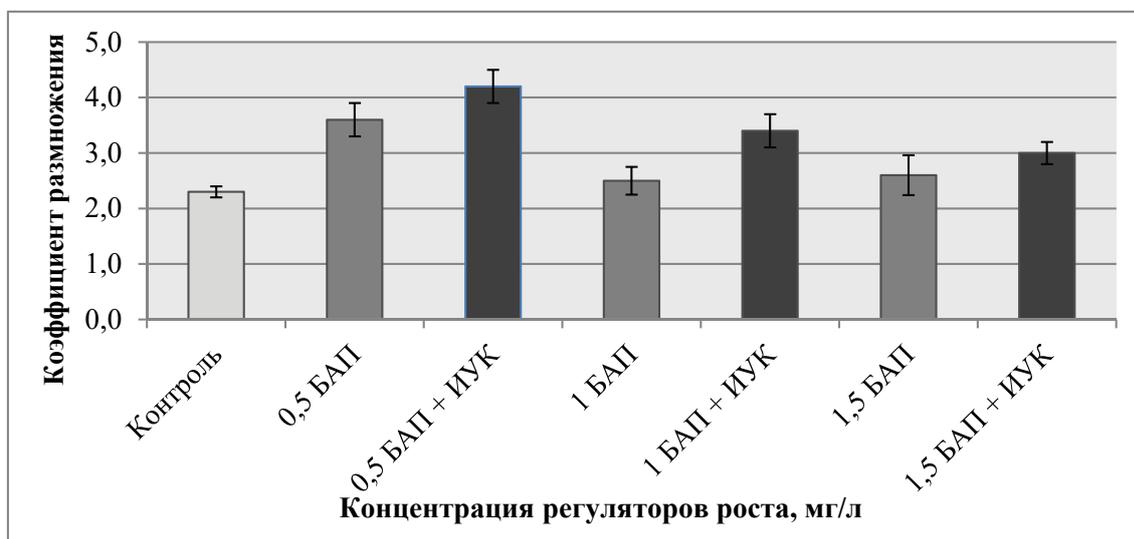


Рис. 3 Влияние регуляторов роста на коэффициент размножения *Codonopsis lanceolata*

При этом лучшие показатели регенерационной активности (высота микропобега $29,5 \pm 0,5$ мм) и коэффициент размножения ($4,3 \pm 0,3$) отмечали на питательной среде, содержащей 0,5 БАП и 0,05 мг/л ИУК. Высокую частоту побегообразования *C.lanceolata* наблюдали на питательной среде, содержащей 0,5 БАП и 0,05 мг/л ИУК. В

среднем образовывалось $2,9 \pm 0,1$ побегов на эксплант. Между остальными вариантами существенных различий обнаружено не было (рис. 4).

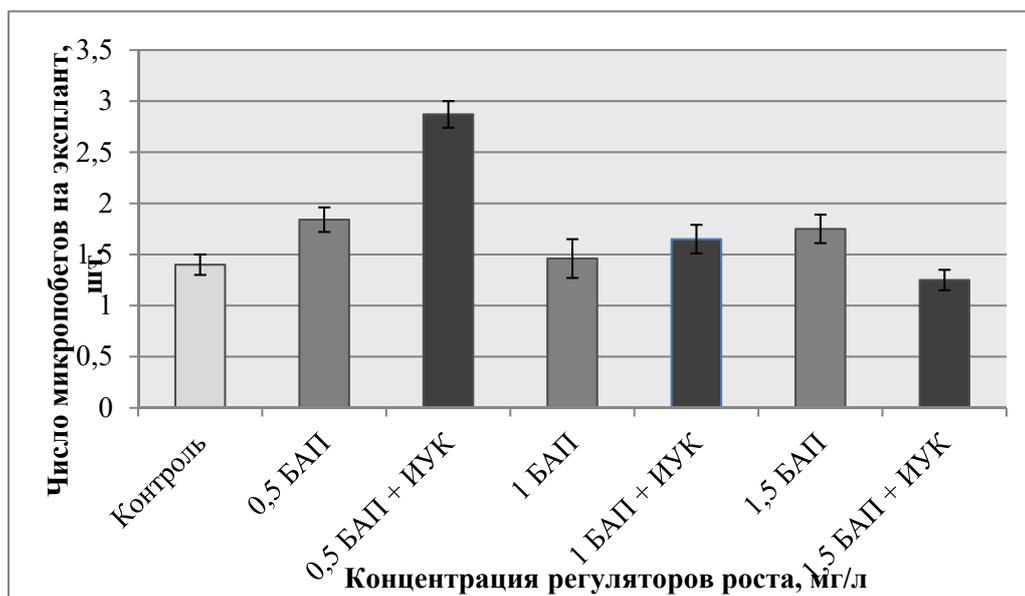


Рис. 4 Влияние регуляторов роста на количество сформировавшихся микропобегов *Codonopsis lanceolata*

При длительном культивировании (50 – 60 суток) растений *C. lanceolata* на питательных средах в основании микропобега формировались микроклубни до 0,5 – 1,0 см и происходил спонтанный ризогенез (рис. 5).



Рис. 5 Формирование микроклубней в основании микропобегов и спонтанный ризогенез *Codonopsis lanceolata in vitro*

Выводы

Таким образом, впервые разработаны отдельные этапы клонального микроразмножения *C. lanceolata*. Показана возможность получения регенерантов *C. lanceolata* через прямой органогенез. Установлено, что на этапе микроразмножения

наиболее эффективно использовать питательную среду МС, содержащую 0,5 мг/л БАП и 0,05 мг/л ИУК. Полученные данные свидетельствуют о возможности успешного использования в размножении *C. Lanceolata* культуры *in vitro* с целью сохранения и реинтродукции этого вида в природе, а также для создания промышленных плантаций данного растения.

Благодарности

Работа выполнена при частичной поддержке в рамках программы "Научные основы технологии сохранения *ex situ* редких видов растений и оценки инвазионного потенциала чужеродных видов на особо охраняемых природных территориях" (№ 118032990188-8) и рамках ГЗ ГБС РАН «Биологическое разнообразие природной и культурной флоры: фундаментальные и прикладные вопросы изучения и сохранения» (№ 118021490111-5).

Список литературы

1. Баркалов В.Ю. (составитель) Красная книга Сахалинской области: Растения. – Южно-Сахалинск: Сахалинское книжное издательство, 2005. – 348 с.
2. Бутенко Р.Г., Гусев М.В. Клеточная инженерия. – М.: Высшая школа, 1987. – 127 с.
3. Ефремов А.П., Шретер А.И. Травник для мужчин. – М.: Асададь, 1996. – 352 с.
4. Муратова С.А. Соловых Н.В., Терехова В.И. Индукция морфогенеза из изолированных соматических тканей растений. – Мичуринск: Изд-во МичГАУ, 2011. – 107 с.
5. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н.. Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Ленинград: Наука, 1985. – 343 с.
6. Торилов В.Е., Мешков И.И. Особенности выращивания и элементный состав корней кодонопсиса ланцетного (*Codonopsis lanceolata*) // Дальневосточный аграрный вестник. – 2017. – № 2(42). – С. 41 – 45.
7. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – Vol. 46, № 5. – P. 417 – 421.
8. Ghimire B.K., Shin C.M., Li C.H., Ching I.M., Lee D.W., Kim H.Y., Kim N.Y., Lim J.D., Kim J.K., Kim M.J., Cho D.H., Lee S.J., Yu C.Y. Effect of Gibberlin and light on germination of seeds of *Codonopsis lanceolata* Benth. // Korean Journal of Medicinal Crop Science. – 2006. – Vol. 14. – P. 303 – 306.
9. Ghimire B.K., Shin C.M., Li C.H., Kim N.Y., Chung I.M., Lim J.D., Kim J.K., Kim M.J., Cho D.H., Yu C.Y. High frequency plant regeneration from leaf, petiole and internode explants of *Codonopsis lanceolata* Benth. // Korean Journal of Medicinal Crop Science. – 2007. – Vol. 15. – P. 73 – 81.
10. He J.Y., Ma N., Zhu S., Komatsu K., Li Z.Y., Fu W.M. The genus *Codonopsis* (Campanulaceae): a review of phytochemistry, bioactivity and quality control // Journal of Natural Medicines. – 2015. – Vol. 69. – P. 1 – 21.
11. Kim J.A., Moon H.K., Choi Y.E. Microtuber formation from *in vitro* *Codonopsis lanceolata* plantlets by sugar // Journal of Plant Biotechnology. – 2013. – Vol. 40. – P. 147 – 155.
12. McCown, B.H. and Lloyd, G. Woody Plant Medium (WPM) – a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species // HortScience. – 1981. – Vol. 16. – P.453 – 453.
13. Murashige T., Skoog F. Arevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – № 43. – P. 473 – 497.

14. *Slupski W., Tubek B., Matkowski A.* Micropropagation of *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. by axillary shoot multiplication // *Acta biologica Cracoviensia. Series: Botanica.* – 2011. – Vol. 53, №2. – P. 87 – 93.

15. *Quoirin M., Lepoivre P.* Improved medium for in vitro culture of *Prunus* sp. // *Acta Hortic.* – 1977. – № 78. – P. 437 – 442.

Статья поступила в редакцию 08.11.2018 г.

Molkanova O.I., Egorova D.A., Koroleva O.V., Gorbunov Y.N. Features of *in vitro* propagation in *Codonopsis lanceolata* (Siebold. & Zucc.) Benth. & Hook. fil. // *Bull. of the State Nikita Botan. Gard.* – 2019. – № 130. – P. 35-42.

For the first time *Codonopsis lanceolata* (Siebold. & Zucc.) Benth. & Hook. fil. regenerants were obtained through direct organogenesis from axillary meristems without the stage of callus formation. The effect of the mineral composition of the culture medium, growth regulators, and their concentrations on the regeneration of microshoots were studied. The positive effect on the morphogenetic capacity of joint use of cytokinins and auxins is shown.

Key words: *Codonopsis lanceolata*; medicinal plant; clonal micropropagation; morphogenetic capacity

АГРОЭКОЛОГИЯ

УДК 631.445.9:631.452:633.865

DOI: 10.25684/NBG.boolt.130.2019.05

О КЛАССИФИКАЦИИ СКЕЛЕТНЫХ АГРОКОРИЧНЕВЫХ ПОЧВ НИЗКИХ ТАКСОНОВ И ИНТЕГРАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЯХ ИХ ПЛОДОРОДИЯ

Николай Евдокимович Опанасенко, Анна Павловна Евтушенко

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита, Никитский спуск, 52
E-mail: anna_yevtushenko@mail.ru

Обоснована и предложена классификация скелетных и карбонатных агрокоричневых почв низких таксонов. Установлены информативные интегральные показатели плодородия агрокоричневых почв для оценки их пригодности для парковых декоративных растений (на примере Никитского сада).

Ключевые слова: *скелетные агрокоричневые почвы; классификация; плодородие почв; декоративные деревья*

Введение

Скелетные почвы в целом имеют разнообразные наименования: каменистые [7], литогенные [3], фрагментарные [1], примитивные [11], примитивно-аккумулятивные [4], щебенчатые [9], первичные неполные [21], аккумулятивно-литоморфные [23] и многие другие.

За этими и другими понятиями кроется глубокий научный смысл: подчеркивается первичный характер выветривающегося материала, выражается тесная связь почв с горной породой, отмечается малая мощность и слабая дифференцированность почвенной толщи, отражается аккумулятивный характер органического вещества, указывается на остатки литосферы в педосфере. Но некоторые термины некорректны [примитивные, аномальные и др.], неопределенны, громоздки, устарели или даже вносят путаницу в существо вопроса. Так, например, все почвы литогенны, а литогенными бывают различия между почвами, вызванные влиянием