

УДК [631.53:582.998.1]:575.1/2.082.542
DOI: 10.36305/0513-1634-2020-136-49-54

РАЗМНОЖЕНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ECHINACEA* MOENCH В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Ирина Леонидовна Крахмалева, Ольга Ивановна Молканова

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

Проведено сравнение регенерационного потенциала эхинацеи гибридной сорта Мама Миа с отобранным соматоклональным вариантом с вариегатными листьями на этапах собственно микроразмножения и укоренения. Изучено влияние концентрации регулятора роста 6-БАП в среде MS на образование микророзеток на этапе собственно микроразмножения. Установлен наибольший морфогенетический потенциал у отборной формы, по сравнению с исходным сортом Мама Миа. Показано, что применение на этапе укоренения питательной среды $\frac{1}{2}$ MS с добавлением ИУК в концентрации 0,3 мг/л является оптимальным для эффективного развития корневой системы представителей рода *Echinacea*.

Ключевые слова: *Echinacea Moench*; клональное микроразмножение; соматоклональная изменчивость; морфогенетический потенциал.

Введение

Род Эхинацея (*Echinacea Moench*) семейства Астровые (Asteraceae) включает по различным данным от 9 до 10 видов. Эхинацея многолетнее травянистое растение, в естественных условиях произрастающее в субтропических и умеренных зонах Северной Америки [9, 11].

Эхинацея представляет большой интерес как декоративная культура. На основе скрещивания разных видов эхинацеи выведены многие сорта и гибриды с крупными махровыми и немахровыми соцветиями, разнообразной окраской от малиновой до зеленовато-кремовой, приятным ароматом, которые широко применяют в ландшафтном дизайне. В фармакологии и народной медицине используются 3 вида: *E. purpurea* (L.) Moench, *E. angustifolia* DC. и *E. pallida* (Nutt.) Nutt., которые являются эффективными источниками лекарственных средств. Препараты на основе эхинацеи обладают противовоспалительным действием, повышают защитные силы организма, являются модуляторами иммунной системы. Помимо этого эхинацея имеет ценность как кормовая, эфиромасличная и медоносная культура [9, 11].

Для сохранения сортовых признаков эхинацею размножают вегетативными способами: делением куста и черенкованием. Но эти методы не всегда позволяют получить необходимое количество посадочного материала в сжатые сроки. Поэтому в последнее время для размножения эхинацеи все чаще используют метод клонального микроразмножения, который позволяет неограниченно размножать и сохранять малораспространенные сорта и формы в условиях *in vitro*.

Не смотря на широкое использование эхинацеи, как лекарственного и декоративного растения, в российской и зарубежной литературе было опубликовано небольшое количество работ по изучению особенностей регенерации представителей рода *Echinacea* в культуре *in vitro*, причем большинство работ было посвящено особенностям роста и развития каллусной культуры [2, 12].

При длительном культивировании *in vitro* изолированных растительных тканей и клеток возможно появление морфологической и физиологической соматоклональной

изменчивости [3, 8]. Частота спонтанных мутаций при культивировании клеток растений варьирует в зависимости от таксона в пределах 10^{-5} – 10^{-8} [10]. Среди наиболее часто встречающихся изменений морфологических признаков можно отметить следующее: вариации окраски и формы листьев, цветков, высоты растений, числа и размеров листьев. С высокой частотой появляются растения-альбиносы, полностью или частично лишенные хлорофилла [7].

На этапе собственно микроразмножения в процессе регенерации эхинацеи гибридной сорта Mama Mia был отобран самоклональный вариант с вариегатными листьями. Особенности регенерации и реализации морфогенетического потенциала эхинацеи с вариегатными листьями в культуре *in vitro* не были изучены ранее.

Цель данного исследования – изучение особенностей морфогенеза и сравнение регенерационных способностей отборной формы с исходным сортом Mama Mia на этапах собственно микроразмножения и укоренения.

Объект и методы исследований

В процессе исследования использовали общепринятые приемы с культурой изолированных тканей и органов растений и методы, разработанные в лаборатории биотехнологии растений ГБС РАН [1, 5]. В качестве объектов исследования использовали эхинацею гибридную сорт Mama Mia и отборную форму с вариегатными листьями.

Были проведены исследования на этапе собственно микроразмножения с использованием питательной среды MS (Murashige and Skoog, 1962) [16] и добавлением 6-БАП (6-бензиламинопурин) в концентрации от 0,1 до 0,5 мг/л. В качестве контроля использовали питательную среду MS без регуляторов роста. Укоренение проводили на питательной среде $\frac{1}{2}$ MS дополненной ИУК (3-индолилуксусная кислота) и ИМК (индолил-3-масляная кислота) в концентрации 0,3 и 0,5 мг/л.

Регенеранты выращивали в течение 25 дней при освещении 1500-2000 лк, 16-часовом фотопериоде и температуре 21,0-24,0°C. Исследования проводили в трех повторностях, 10 эксплантов в каждом варианте.

Обработку полученных данных проводили по общепринятым методам статистического анализа с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010 и PAST 2.17c.

Результаты и обсуждение

В настоящее время в коллекции растений *in vitro* лаборатории биотехнологии растений ФГБУН ГБС им. Н.В. Цицина РАН сохраняются и размножаются три сорта эхинацеи (*E. purpurea* Virgin, Pica Bella и гибрид (*E. paradoxa* (J.B.S. Norton) Britton x *E. purpurea* Ruby Giant) Mama Mia).

На этапе собственно микроразмножения при культивировании эхинацеи гибридной сорта Mama Mia на питательной среде MS с добавлением 6-БАП 0,8 мг/л была выделена отборная форма с вариегатными листьями. При субкультивировании отборная форма сохраняла пестрый рисунок неправильной формы на листовой пластинке (рис. 1, 2).

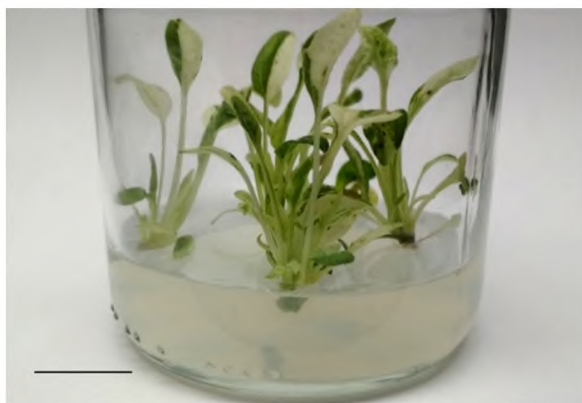


Рис. 1 Соматональный вариант с вариегатными листьями сорта Мама Миа в условиях *in vitro* (масштаб 1,0 см)



Рис. 2 Внешний вид вариегатных листьев у отборной формы сорта Мама Миа при культивировании *in vitro* (масштаб 1,0 см)

В настоящее время известно два сорта *E. purpurea* с пестрыми листьями: Sparkler и Prairie Frost. Интересно отметить, что сорт Sparkler был выведен в культуре тканей как самоклон *E. purpurea* сорта Ruby Giant, который является одной из родительских форм Мама Миа [13, 14].

В процессе культивирования была отмечена незначительная реверсия новообразовавшихся розеток с зеленой окраской листьев. Подобное явление наблюдали у вариегатных сортов *Hosta* и *Polemonium* [17].

Специфика клонального микроразмножения тесно связана с биологическими особенностями исходных растений. При разработке технологий клонального микроразмножения необходимо учитывать генотипическую специфичность растений, состав питательной среды и условия культивирования [4, 6, 15].

В результате проведенных исследований были выявлены различия в морфогенетическом потенциале отборной формы и сорта Мама Миа на этапе собственно микроразмножения (табл. 1).

Таблица 1

Влияние концентрации 6-БАП на формирование микророзеток *in vitro* эхинацеи гибридной

Концентрация 6-БАП, мг/л	Число микророзеток, шт.	
	Отборная форма	Mama Mia
0,0	1,74±0,18	1,62±0,11
0,1	2,85±0,21	2,40±0,14
0,2	3,68±0,14	2,43±0,17
0,3	4,67±0,26	3,86±0,26
0,4	4,32±0,28	3,81±0,35
0,5	4,40±0,30	4,94±0,37

С увеличением концентрации 6-БАП от 0,1 до 0,3 мг/л отборная форма характеризовалась большей регенерационной способностью по сравнению с исходным сортом. У Отборной формы максимальный коэффициент был получен при 6-БАП 0,3 мг/л (4,67±0,26 шт.), а при увеличении концентрации до 0,5 мг/л различий не было обнаружено.

Положительное влияние на число образовавшихся микророзеток при увеличении концентрации 6-БАП до 0,5 мг/л отмечено только у сорта Mama Mia (4,94±0,37 шт.).

Важно отметить, что при увеличении концентрации свыше 0,5 мг/л 6-БАП наблюдали морфологические отклонения: у отборной формы – уменьшение высоты микророзеток, обесцвечивание листовых пластинок, у сорта Mama Mia появлялись оводненные экспланты, что в дальнейшем снижало их способность к размножению и укоренению.

На этапе собственно микроразмножения при длительном культивировании (60 суток) у большинства эксплантов отборной формы и сорта Mama Mia наблюдали спонтанный ризогенез. На этапе укоренения с применением ауксинов ИУК и ИМК экспланты укоренялись уже через 2 недели. Наиболее развитую корневую систему (наибольшее количество корней и их длину) у отборной формы и сорта Mama Mia наблюдали на питательных средах ½ MS с добавлением ИУК, а при концентрации 0,3 мг/л частота ризогенеза была наибольшей (100 и 91 % соответственно) (табл. 2).

Таблица 2

Влияние типа и концентрации ауксинов на развитие корневой системы

Генотип	Тип ауксина	Концентрация ауксина, мг/л	Укоренение, %	Число корней, шт.	Длина корней, см
Отборная форма	ИУК	0,3	100	6,41±0,66	0,34±0,02
		0,5	81	6,33±0,88	0,27±0,02
	ИМК	0,3	84	2,42±0,28	0,19±0,02
		0,5	47	3,00±0,47	0,20±0,01
Mama Mia	ИУК	0,3	91	3,94±0,64	0,37±0,02
		0,5	82	5,05±0,60	0,33±0,02
	ИМК	0,3	63	1,97±0,26	0,20±0,01
		0,5	31	3,43±0,53	0,21±0,02

На этапе укоренения на питательной среде ½ MS с 0,3-0,5 мг/л ИУК у отборной формы и сорта Mama Mia наблюдали различия в формировании корневой системы. У отборной формы отмечено наибольшее число корней (6,41±0,66 и 6,33±0,88), при этом

корни были тонкие и имели антоциановую окраску. Сорт Мама Миа отличался меньшим числом корней ($3,94 \pm 0,64$ и $5,05 \pm 0,60$), но большей толщины со светло-зеленой окраской.

В настоящее время проводится опыт по сравнению адаптационной способности отборной формы и сорта Мама Миа и подбору оптимального почвенного субстрата в условиях *ex situ*.

Выводы

Проведена оценка регенерационного потенциала микрорастений эхинацеи гибридной сорта Мама Миа и выделенного соматоклонального варианта с вариегатными листьями. Установлено, что наибольшим морфогенетическим потенциалом характеризовалась отборная форма, по сравнению с исходным сортом Мама Миа.

В процессе исследования на этапе собственно микроразмножения выявлено отрицательное воздействие концентрации 6-БАП свыше 0,5 мг/л, при которой наблюдались морфологические отклонения.

Наиболее эффективно при культивировании отборной формы использовать 6-БАП в концентрации 0,2 мг/л, для сорта Мама Миа – 0,3 мг/л.

На этапе укоренения для лучшего развития корневой системы эхинацеи отборной формы и сорта Мама Миа наиболее эффективно использовать питательную среду $\frac{1}{2}$ MS с добавлением ИУК в концентрации 0,3 мг/л. Через 14 дней у отборной формы отмечено 100% укоренение микропобегов, у сорта Мама Миа – 91%. Выявлены различия в формировании корневой системы, что в дальнейшем может повлиять на приживаемость исследуемых объектов.

Работа выполнена в рамках ГЗ ГБС РАН (№18-118021490111-5)

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Дитченко Т.И., Вюйтрих А.Д. Разработка приемов депонирования *in vitro* каллусных культур эхинацеи пурпурной и эхинацеи бледной // Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям: материалы четвертой международной научно-практической интернет-конференции (Полтава, 14-15 мая 2015 г.). – Полтава, 2015. – С. 51-54
3. Лебедев В.Г., Азарова А.Б., Шестибратов К.А., Деменко В.И. Проявление соматоклональной изменчивости у микроразмноженных и трансгенных растений // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2012. – Вып. 1 – С. 153-163.
4. Молканова О.И., Королева О.В., Стахеева Т.С., Крахмалева И.Л., Мелещук Е.А. Совершенствование технологии клонального микроразмножения ценных плодовых и ягодных культур для производственных условий // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32. – № 9. – С. 66- 69.
5. Молканова О.И., Васильева О.Г., Коновалова Л.Н. Научные основы сохранения и воспроизводства генофонда ценных и редких видов растений в культуре *in vitro* // Бюллетень ГБС РАН. – 2015. – Вып. 201. – № 2. – С. 78-82.
6. Муратова С.А., Соловых Н.В., Терехов В.И. Индукция морфогенеза из изолированных соматических тканей растений. – Мичуринск: Изд-во Мичуринского госагроуниверситета. 2011. – 107 с.

7. Назаренко Л.В., Долгих Ю.И., Загоскина Н.В., Г.Н. Ралдугина Г.Н. Биотехнология растений: учебник и практикум для бакалавриата и магистратуры. – М.: Изд-во Юрайт, 2018. – 161 с.
8. Расторгуев С.Л. Изменчивость растений-регенерантов земляники, полученных методом тканевых культур // Вопросы современной науки и практики. Университет им. В.И. Вернадского. – 2008. – Том 2. – №1(11). – С. 46-47.
9. Сапарбаева Н.А. Систематический обзор рода *Echinacea* Moench // Наука и новые технологии. – 2010. – № 1 – С. 56-58.
10. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. – Киев: Наукова думка, 1990. – 280 с.
11. Abbasi B.H., Saxena P.K., Murch S.J., Liu C.-Z. *Echinacea* biotechnology: Challenges and opportunities // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. – 2007. – Vol. 43. – P. 481-492.
12. Bertoli A., Lucchesini M., Grassi A., Mensuali Sodi A., Pacifici S., Pistelli L., Ruffoni B., Pistelli L. Phytochemical characterisation of *in vitro* regenerated shoots of *Echinacea angustifolia* DC. // Acta Horticulturae. – 2009. – Vol. 812. – P. 257-264.
13. Korlipara H. *Echinacea purpurea* plant named 'Sparkler' // US Patent. – 2006. – № US PP17, 298 P2. – 3 p.
14. Korlipara H. *Echinacea* plant named 'Mama Mia' // US Patent. – 2012. – № US PP23, 172 P3. – 3 p.
15. Molkanova O., Egorova D., Mitrofanova I. Preservation Characteristics of Valuable Plant Species in In Vitro Genebanks At Russian Botanical Gardens // In Vitro. Cellular & Developmental Biology – Plant. – 2018. – Vol.54. – P. 546-547.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. – 1962. – Vol. 15(3). – P. 473-497.
17. Prakash J. Micropropagation of ornamental perennials: progress and problems // Acta Horticulturae. – 2009. – Vol. 812. – P. 289-294.

Статья поступила в редакцию 20.05.2020 г.

Krakhmaleva I.L., Molkanova O.I. *In vitro* propagation of the genus *Echinacea* Moench representatives // Bull. Of the State Nikita Botan. Gard. – 2020. – № 136. – P. 49-54.

The regenerative capacity of *Echinacea* hybrid cultivar Mama Mia and the selected somaclonal variegated variant at the propagation and rooting stages was compared. The influence of the 6-BAP concentration in the MS culture medium on the microrosette formation at the propagation stage was studied. The highest morphogenetic potential of the selected form in comparison with the cultivar Mama Mia was found. It was shown that ½ MS culture medium supplemented with 0.3 mg/L IAA was the optimal medium for effective development of the root system of the genus *Echinacea* representatives at the rooting stage.

Key words: *Echinacea* Moench; clonal micropropagation; somaclonal variability; morphogenetic potential.