

УДК 582.672:57.085.2

О.И. Молканова, Д.А. Егорова**НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*
ARISTOLOCHIA MANSHURIENSIS KOM.**

Aristolochia manshuriensis Kom. – реликтовая лиана, эндемик Маньчжурского флористического района с ограниченным ареалом, постепенно сокращающимся из-за антропогенного воздействия. Вид занесен в Красную книгу РФ как находящийся под угрозой исчезновения. *A. manshuriensis* трудно размножается генеративным и вегетативным способами, поэтому для получения достаточного количества материала с целью дальнейшей реинтродукции используется клональное микроразмножение. Оптимизирована методика клонального микроразмножения *A. manshuriensis* на основных этапах культивирования *in vitro*. Показано, что в качестве первичных эксплантов наиболее эффективно использовать апикальные и латеральные почки, изолированные с растений имматурных и виргинильных возрастных состояний. Максимальный коэффициент размножения ($14,84 \pm 0,8$) был получен на питательной среде Мурасиге-Скуга с добавлением 0,8 мг/л БАП и 0,05 мг/л ИУК. Оптимальная питательная среда для укоренения: $\frac{1}{2}$ МС, содержащая 3,0 мг/л ИМК.

Ключевые слова: *Aristolochia manshuriensis*, редкие виды, клональное микроразмножение, коэффициент размножения, ризогенез, генетический банк *in vitro*.

В настоящее время, наряду с традиционными способами размножения и сохранения растений *ex situ*, все большее значение имеет использование для этих целей культуры изолированных тканей и органов. Эти приемы дают возможность в кратчайшие сроки получить большое количество растений при недостатке исходного материала и получить потомство, генетически идентичное исходной форме или виду. Особую актуальность приобретают исследования по разработке методов клонального микроразмножения растений, которые в естественных условиях характеризуются низкой эффективностью размножения и ареал которых сужается, а численность резко снижается [1].

Aristolochiaceae – одно из древнейших семейств покрытосеменных. Предполагается, что они существовали еще в эоцене. В настоящее время род насчитывает порядка 350 видов. *Aristolochia manshuriensis* Kom. – крупная реликтовая лиана, эндемик Маньчжурского флористического района с ограниченным ареалом, постепенно сокращающимся из-за антропогенного воздействия. Растение распространено на Северо-Востоке Китая и Кореи. В нашей стране кирказон встречается только в Юго-Западной части Приморья [1; 2]. Вид внесен в Красную книгу РФ, имеет категорию редкости 1(E): таксоны и популяции, численность особей которых уменьшилась до критического уровня таким образом, что в ближайшее время они могут исчезнуть (таких видов насчитывается порядка сорока) [3].

Практическое применение кирказона маньчжурского в медицине возможно благодаря его химическому составу. Растение является источником таких веществ, как манжуриол, изобизиклогермакренол, ариолозид, алкалоид магнофлорин, многоядерные ароматические соединения (аристолоховые кислоты А, В и D, ариолоховые кислоты I и IV), О-метиларистолохиевая кислота, бетаситостерин. Кирказон характеризуется жаропонижающим, противоотечным, обезболивающим, кардиотоническим, противотоксическим, успокаивающим, мочегонным действием, а также способствует повышению лактации. В китайской медицине используется как кардиологическое средство, на Дальнем Востоке как болеутоляющее, а также при укусах змей [4].

Кирказон успешно выращивают во многих ботанических садах и в частных коллекциях вне его природных местообитаний. Кроме этого, *A. manshuriensis* является декоративным растением, его успешно применяют для озеленения городов [5; 6].

Специфически протекающие процессы опыления и оплодотворения у реликтов, которые изначально существовали в условиях, отличающихся от современных, обуславливают слабое завязывание плодов. К лимитирующим факторам также относится малая численность в популяции, слабая семенная продуктивность, отсутствие естественных агентов распространения семян, а также заготовка сырья для использования в народной медицине [7; 8]. С этим связано постоянное уменьшение численности кирказона маньчжурского.

Известен способ размножения кирказона маньчжурского семенами. В литературе отмечено, что семена кирказона хорошо прорастают (всхожесть до 95 %) при осеннем и весеннем посеве. Высокая степень фертильности пыльцевых зерен *A. manshuriensis*, большое количество пыльцевых зерен в

пыльниками показывают, что анатомические ограничения для семенной продукции отсутствуют. Причиной низкой завязываемости плодов является гибель бутонов на ранних стадиях развития и низкая эффективность оплодотворения, которое зависит от наличия опылителей и их активности [8].

Результаты по размножению кирказона в условиях интродукции и слабое укоренение черенков (15 %) показывают, что данный вид характеризуется низкой способностью к вегетативному размножению [1; 9].

Поскольку запасы растения в природе очень малы и постоянно сокращается ареал его естественного обитания, благодаря сочетанию методов клеточной и генетической инженерии был получен штамм культивируемых клеток кирказона. На основе этого штамма создано принципиально новое средство для лечения ишемической болезни сердца [10]. Проводились исследования по разработке отдельных этапов клонального микроразмножения кирказона. Наилучшее формирование микропобегов из пазушных почек наблюдалось на питательной среде, содержащей 0,5 мг/л БАП и 0,5 мг/л НУК [11]. Таким образом, до настоящего времени так и не определен оптимальный состав питательных сред на основных этапах клонального микроразмножения [11; 12].

Целью данной работы было усовершенствование методики клонального микроразмножения и изучение особенностей морфогенетических процессов *Aristolochia manshuriensis* Kom.

Объект и методы исследований

В работе были использованы растения *Aristolochia manshuriensis* Kom., предоставленные Отделом флоры ГБС РАН.

Подготовку эксплантов и введение их в культуру *in vitro* производили в стерильных условиях согласно общепринятым рекомендациям [17]. В качестве первичных эксплантов использовали семена, апикальные и латеральные почки, взятые с растений ювенильного, имматурного и виргинильного периодов (до 12 лет).

На стадии индукции использовали питательную среду Мурасиге-Скуга, содержащую 6-БАП в концентрации 0,3–0,5 мг/л. Регуляторами роста на стадии пролиферации стали 6-БАП (0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0 мг/л), ИУК (0,05 мг/л). Укореняли микропобеги на питательной среде МС, содержащей ½ концентрации макроэлементов, ИУК и ИМК в концентрации 3,0; 5,0 мг/л. Субкультивирование эксплантов проводилось через 3–4 недели. В качестве контроля использовали безгормональную среду МС. Адаптацию проводили с использованием мха-сфагнума и смеси песка, торфа и дерновой листовой земли в соотношении 1:1:1.

Растения-регенеранты выращивали при температуре 23–25 °С, 16-часовом фотопериоде и освещенности 3000 лк. Опыты проводились в 3-кратной повторности, по 10 эксплантов в каждом варианте. Полученные данные обрабатывали согласно общепринятым методам статистического анализа с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010.

Результаты и их обсуждение

Основными факторами, определяющими процесс органогенеза, являются: генотип, эпигенетические характеристики клеток экспланта, физиологическое состояние интактных растений, состав питательной среды и условия культивирования. Различия в реализации морфогенетического потенциала обусловлены, прежде всего, генотипическими особенностями растений. Для каждого генотипа существуют предел нормы реакции, который изменяется под воздействием экзогенных факторов [13].

Тканевая принадлежность или эпигенетические характеристики экспланта, использованные для получения культуры тканей различных культур, в значительной степени определяют морфогенетический потенциал формирующихся регенерантов. Экспланты из разных органов одного вида существенно различались по способности к регенерации в условиях *in vitro*. Результаты сравнительного анализа морфологических процессов у *A. manshuriensis in vitro* показали, что при использовании апикальной меристемы почек развитие *de novo* зачатков аксиллярных побегов, а впоследствии и растений-регенерантов, происходило более интенсивно по сравнению с таковыми при использовании апикальной меристемы из проростков.

Экспланты, взятые с имматурных и виргинильных (не старше 4–6 лет) растений *A. manshuriensis*, характеризовались более высокой способностью к пролиферации побегов по сравнению с растениями, достигшими 12 лет. Наибольшим морфогенетическим потенциалом характеризовались экспланты, взятые с 2–3-летних растений (рис. 1).

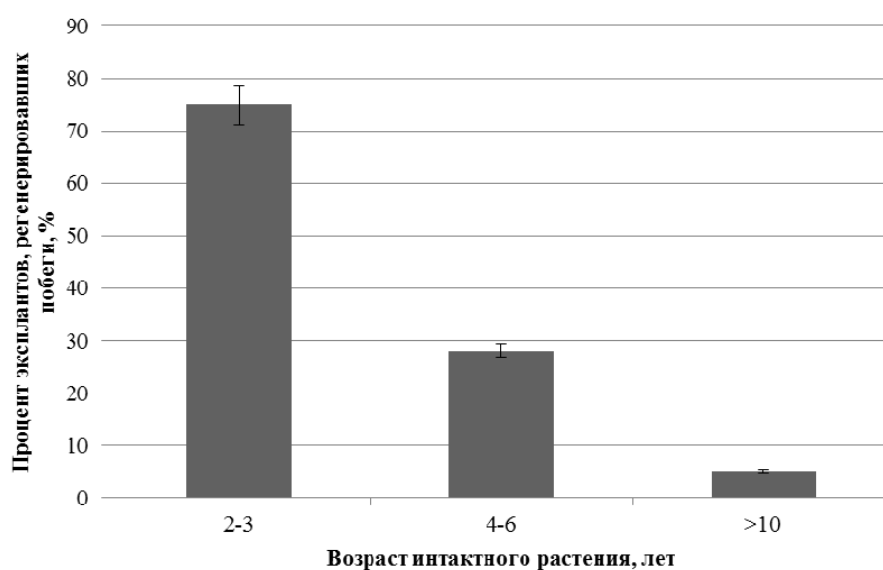


Рис. 1. Влияние возраста интактного растения на регенерационный потенциал *Aristolochia manshuriensis*

С увеличением возраста интактного растения *A. manshuriensis* жизнеспособность и органогенный потенциал меристемных комплексов *in vitro* резко падает, что согласуется с данными, полученными на представителях семейств Oleaceae, Rosaceae, Actinidiaceae [14].

На первых этапах культивирования *A. manshuriensis* отличается повышенным синтезом вторичных метаболитов, приводящим к ингибированию клеточных делений в тканях экспланта и снижению жизнеспособности растений-регенерантов. Для уменьшения фенольной интоксикации в состав питательной среды добавляли активированный уголь (300 мг/л) и аскорбиновую кислоту (50 мг/л).

На этапе собственно микроразмножения исследовали влияние регуляторов роста и их концентраций на коэффициент размножения и характер развития микропобегов. В результате проведенных исследований отмечено, что наибольшие значения морфометрических показателей были получены на питательных средах, содержащих 0,8 и 1,0 мг/л 6-БАП с добавлением 0,05 мг/л ИУК. Дальнейшее увеличение концентрации 6-БАП не дало положительного эффекта (табл. 1, рис. 2)

Таблица 1

Влияние концентрации регуляторов роста на морфометрические показатели *Aristolochia manshuriensis*

Концентрация регулятора роста, мг/л		Число побегов, шт.	Длина побегов, мм	Количество междоузлий, шт.
6-БАП	ИУК			
*		1,7 ± 0,6	23,5 ± 3,0	3,8 ± 0,6
0,5	–	2,1 ± 0,4	37,8 ± 3,1	3,8 ± 0,4
0,8	–	2,3 ± 0,4	31,1 ± 2,9	4,8 ± 0,4
1,0	–	1,9 ± 0,3	33,8 ± 2,7	3,9 ± 0,4
2,0	–	2,2 ± 0,5	30,8 ± 4,7	3,2 ± 0,4
0,5	0,05	2,6 ± 0,6	30,6 ± 3,9	3,5 ± 0,5
0,8	0,05	3,7 ± 0,3	38,8 ± 5,3	3,93 ± 0,23
1,0	0,05	3,5 ± 1,0	36,8 ± 4,0	4,1 ± 0,4
2,0	0,05	2,4 ± 0,5	36,8 ± 3,4	3,3 ± 0,3

Примечание*. Контроль – питательная среда без гормонов

Сравнительный анализ полученных данных показал, что максимальный коэффициент размножения *A. manshuriensis*, равный 14,84±0,8, достигается при культивировании на питательной среде, содержащей 6-БАП (0,8 мг/л) и ИУК (0,05 мг/л) (рис. 3).



Рис. 2. *Aristolochia manshuriensis* на стадии собственно микроразмножения

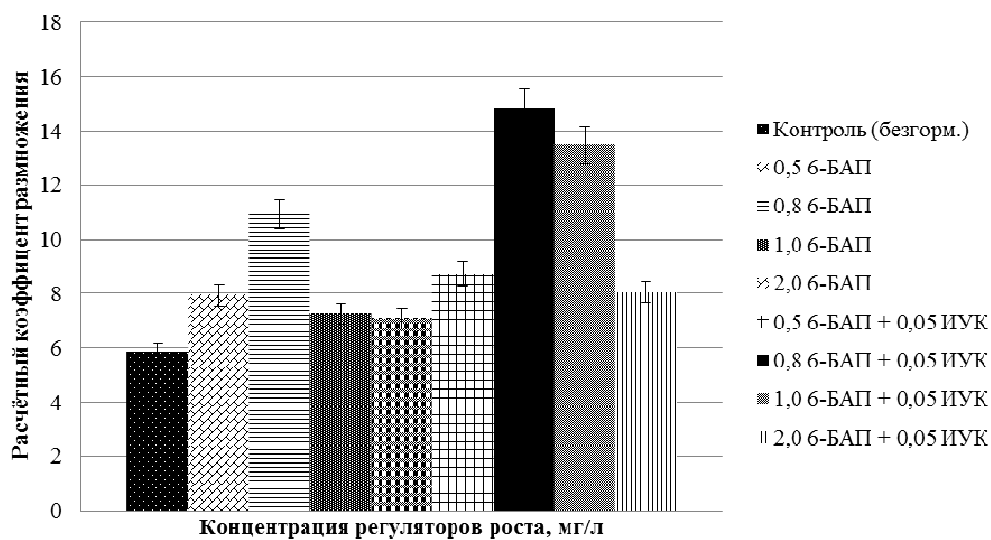


Рис. 3. Влияние концентрации регуляторов роста 6-ВАР и ИУК на расчётный коэффициент размножения *Aristolochia manshuriensis*



Рис. 4. Микропобеги *Aristolochia manshuriensis* на питательной среде МС, 0,5 мг/л 6-БАП: А) после 2 недель культивирования; Б) после 5 недель культивирования

Совместное использование ауксинов и цитокининов способствовало вытягиванию конуса нарастания, что позволило в дальнейшем проводить микрочеренкование микропобегов. Повышение концентрации цитокинина привело к появлению множества пазушных побегов. Микроразмножение происходило путем активации пазушных меристем, что является предпочтительным для размножения редких видов, поскольку позволяет поддерживать генетическую стабильность размножаемых растений.

При длительном культивировании в основании экспланта происходило образование плотного каллуса, который препятствовал побегообразованию. Одновременно с развитием основного побега формировались адвентивные почки в основании микропобега. Через 4 недели микропобег достигал 5,0–6,5 см с 2-4 междоузлиями (рис. 4).

Этап укоренения характеризовался наибольшими трудностями, что объясняется биологическими особенностями *A. manshuriensis*. При проведении данного этапа укоренения исследовали влияние индукторов ризогенеза и их концентраций на формирование корневой системы. Корни образовывались преимущественно у основания микропобегов. Наиболее оптимальным гормоном для укоренения оказалась ИМК в концентрации 3,0 мг/л: укореняемость в случае использования этого гормона максимальна ($50,00 \pm 7,1$ %) (рис. 5).

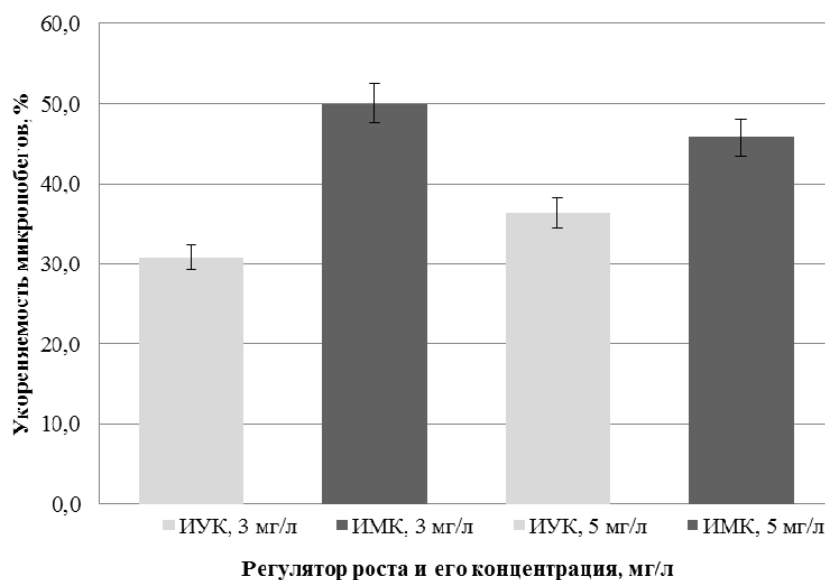


Рис. 5. Влияние концентрации ИУК и ИМК на укореняемость *Aristolochia manshuriensis*

Адаптация растений *ex vitro* представляет собой важнейший этап биотехнологического процесса. Для *A. manshuriensis* критический период для адаптации составляет первые 3 недели. Оптимальным субстратом оказалась смесь песка, торфа и дерновой листовой земли в соотношении 1:1:1, что обеспечивало частоту адаптации до 82,3 %.

Заключение

В процессе исследования был оптимизирован метод культивирования *in vitro* *Aristolochia manshuriensis* Ком. Показано, что в качестве первичных эксплантов наиболее эффективно использовать апикальные и латеральные почки, изолированные с материнских растений, относящихся к иматурным и виргинильным возрастным состояниям. Наиболее оптимальной питательной средой для клонального микроразмножения *A. manshuriensis* является МС с добавлением 0,8 мг/л БАП и 0,05 мг/л ИУК (коэффициент размножения составил $14,84 \pm 0,8$). Установлено, что наибольший процент укоренения *in vitro* (до 50,00 %) у полученных растений-регенерантов наблюдался на среде, содержащей ИМК в концентрации 3,0 мг/л.

Таким образом, применение биотехнологических методов размножения обеспечивает возможность сохранения и устойчивого воспроизводства редких и эндемичных видов в условиях *ex situ*. Полученные данные по оптимизации метода клонального микроразмножения *Aristolochia manshuriensis* позволяют получить достаточное количество посадочного материала в целях восстановления численности природных популяций и использования в ландшафтном дизайне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Наконечная О.В., Корень О.Г., Сидоренко В.С. Репродуктивная биология *Aristolochia manshuriensis* (Aristolochiaceae) в условиях интродукции // Растительные ресурсы. 2005. Вып. 3. С. 14-24.
2. Наконечная О.В., Нестерова С.В. Прimitивные признаки реликтовой лианы (*Aristolochia manshuriensis*) // Вестн. КрасГАУ. 2013. № 1. С. 40-47.
3. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2008. 855 с.
4. Куренцова Г.Э. Реликтовые растения Приморья. Л., 1968. 72 с.
5. Урусов В.М. Концепция озеленения г. Владивостока // Вестн. КрасГАУ. 2012. №11. С. 118-123.
6. Древесные растения Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН: 60 лет интродукции / ред. А.С. Демидов. М.: Наука, 2005. 589 с.
7. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства Magnoliaceae – Limoniaceae. Л.: Наука, 1984. 460 с.
8. Наконечная О.В. Биология размножения и генетическая изменчивость кирказона маньчжурского (*Aristolochia manshuriensis* Kom.) в Приморском крае: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Владивосток, 2007. 22 с.
9. Шульгина В.В. Древесные лианы и их культура в Ленинграде // Интродукция растений и зеленое строительство. М.; Л.: Изд-во Академии наук СССР, 1955. С. 157-194.
10. Булгаков В.П. Биотехнология – здоровью человека: научные достижения и первые шаги инноваций на Дальнем Востоке // Вестн. ДВО РАН. 2004. № 3. С. 93-99.
11. Доан Т.Т. Клональное микроразмножение редких и исчезающих видов растений // Изв. ТСХА. 2012. Вып. 5. С. 48-52.
12. Демиденко Е.Н., Гафицкая И.В., Михеева (Бабикова) А.В. К вопросу микрклонального размножения видов рода кирказон (*Aristolochia* L.) // Водные и экологические проблемы, преобразование экосистем в условиях глобального изменения климата. VI Дружининские чтения: материалы Всерос. конф. с междунар. участием. Хабаровск, 2016. С. 128-130.
13. Мамаева Н.А., Ветчинкина Е.М., Горбунов Ю.Н., Молканова О.И. Сохранение растений в генетических банках *in vitro*: преимущества и недостатки // Бюл. ГБС. 2008. Вып. 194. С. 141-149.
14. Молканова О.И., Васильева О.Г., Коновалова Л.Н. Научные основы сохранения и устойчивого воспроизводства генофонда растений в культуре *in vitro* // Вестн. Удм. ун-та. Сер. Биология. Науки о Земле. 2015. Т. 25, Вып. 2. С. 95-100.

Поступила в редакцию 20.03.17

O.I. Molkanova, D.A. Egorova

SOME ASPECTS OF *ARISTOLOCHIA MANSHURIENSIS* KOM. *IN VITRO* CULTIVATION

Aristolochia manshuriensis Kom. is a relict liana, endemic of the Manchurian floristic region with limited habitat, gradually shrinking due to anthropogenic impact. This species is listed in the Red Book of Russian Federation as endangered one. *A. manshuriensis* hardly multiplies generative and vegetative ways, so to obtain a sufficient amount of material for the further reintroduction purpose, clonal micropropagation is used. *A. manshuriensis* clonal micropropagation method was optimized at the main stages of *in vitro* cultivation. It is shown that the most efficient use as primary explants is the application of apical and lateral buds isolated from plant in immature and mature age states. The highest multiplication factor (14,84±0,8) was achieved on Murashige-Skoog medium with addition of 0.8 mg/l 6-BAP and 0.05 mg/l IAA. The optimum culture medium for rooting: ½ MS containing 3.0 mg/l IBA.

Keywords: *Aristolochia manshuriensis*, rare species, clonal micropropagation, multiplication factor, rhizogenesis, genetic bank *in vitro*.

REFERENCE

1. Nakonechnaya O.V., Koren' O.G. and Sidorenko V.S. [*Aristolochia manshuriensis* (Aristolochiaceae) reproductive biology in the conditions of introduction], in Rastitel'nye resursy [Plant resources], 2005, vol. 3, pp.14-24 (in Russ.).
2. Nakonechnaya O.V. and Nesterova S. V. [Primitive features of relict liana (*Aristolochia manshuriensis*)], in Vestnik KrasGAU, 2013, no. 1, pp. 40-47 (in Russ.).
3. *Krasnaya kniga Rossijskoj Federacii (rasteniya i griby)* [Red Data Book of the Russian Federation (plants and fungi)], M.: Tovarishchestvo nauchnyh izdanij KMK, 2008, 855 p. (in Russ.)
4. Kurenova G.E. *Reliktovye rasteniya Primor'ya* [Relic plants of Primorsky Krai], Leningrad, 1968, 72 p. (in Russ.).
5. Urusov V.M. [The concept of greening Vladivostok city], in *Vestnik KrasGAU*, 2012, no. 11, pp. 118-123 (in Russ.).
6. *Drevesnye rasteniya Glavnogo botanicheskogo sada im. N. V. Cicina Rossijskoj akademii nauk* [Woody plants of N.V. Tsitsin's Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences], M.: Nauka, 2005, pp. 45-46 (in Russ.).

7. *Rastitel'nye resursy SSSR* [The USSR plant resources], L.: Nauka, 1984, 460 p. (in Russ.).
8. Nakonechnaya O.V. [Reproduction and genetical variability biology of Manchurian kirkazon (*Aristolochia manshuriensis* Kom.) in Primorsky Krai], Abstract of diss. Dr. Biol. sci., Vladivostok, 2007. 22 p.
9. Shul'gina V.V. [Woody lianas and their culture in Leningrad], in *Introdukciya rastenij i zelenoe stroitel'stvo*, M.-L.: Izd-vo Akademii nauk SSSR, 1955, pp. 157-194 (in Russ.).
10. Bulgakov V.P. [Biotechnology is a human health: scientific advances and the innovations first steps in the Far East], in *Vestnik DVO RAN*, 2004, no. 3, pp. 93-99 (in Russ.).
11. Doan T.T. [Clonal micropropagation of rare and endangered plant species], in *Izvestiya TSKHA*, 2012, vol. 5, pp. 48-52 (in Russ.).
12. Demidenko E.N., Gafickaya I.V. and Miheeva (Babikova) A.V. [To a question of clonal micropropagation of kirkazon (*Aristolochia* L.) species], in *Materialy Vseross. konf. s mezhdunar. uchastiem «Vodnye i ehkologicheskie problemy, preobrazovanie ehkosistem v usloviyah global'nogo izmeneniya klimata: VI Druzhininskie chteniya»*, 28-30 sentyabrya, Habarovsk, 2016, pp. 128-130 (in Russ.).
13. Mamaeva N.A., Vetchinkina E.M., Gorbunov Yu.N. and Molkanova O.I. [Plants preservation in genetic banks *in vitro*: advantages and disadvantages], in *Byulleten' GBS*, 2008, iss. 194, pp. 141-149 (in Russ.).
14. Molkanova O.I., Vasil'eva O.G. and Konovalova L.N. [Scientific foundations of conservation and sustainable reproduction of plant gene pool *in vitro*], in *Vestn. Udm. un-ta. Ser. Biologiya. Nauki o Zemle*, 2015, vol. 25, iss. 2, pp. 95-100 (in Russ.).

Молканова Ольга Ивановна,
кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий
лабораторией биотехнологии растений
E-mail: molkanova@mail.ru

Егорова Дарья Александровна,
младший научный сотрудник лаборатории
биотехнологии растений
E-mail: dariaegor11@gmail.com

ФГБУН «Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН»
127276, Россия, г. Москва, ул. Ботаническая, 4
E-mail: info@gbsad.ru

Molkanova O.I.,
Candidate of Agriculture, Head of Laboratory
of plant biotechnology laboratory
E-mail: molkanova@mail.ru

Egorova D.A.,
Junior Researcher of plant biotechnology
laboratory
E-mail: dariaegor11@gmail.com

Main Botanical Garden RAS
Botanicheskaya st., 4, Moscow, Russia, 127276