

УДК 634.23:631.53

*М.М. Серeda, Т.А. Карасева, Е.В. Луценко***МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ МАЙКАРАГАНА ВОЛЖСКОГО**

Майкараган волжский – исчезающий вид кустарника, включенный в Красную книгу Российской Федерации. Предпринята попытка найти эффективный путь микроклонального размножения майкарагана с целью получения массового посадочного материала для решения задач, связанных с репатриацией и интродукцией этого растения. Оптимальным способом микроразмножения этого кустарника является микрочеренкование путем снятия апикального доминирования. Найден эффективный способ стерилизации эксплантов. Показано, что наиболее эффективным способом деконтаминации семян майкарагана волжского является обжиг в пламене горелки. Подобрана оптимальная концентрация фитогормонов (2 мг/л 6-бензиламинопурина и 0,1 мг/л нафтилукусной кислоты) в составе среды Мурасиге-Скуга для получения наибольшего количества мериклонов. Также установлена эффективная концентрация индолилмасляной кислоты для стимуляции развития корневой системы (0,5 мг/л) в комбинации с солями, входящими в состав среды Мурасиге-Скуга.

*Ключевые слова:* майкараган волжский, микроклональное размножение, 6-бензиламинопурина, нафтилукусная кислота, сохранение редких и исчезающих видов растений.

В настоящее время методы микроклонального размножения растений благодаря своим преимуществам широко привлекаются для решения проблемы сохранения редких и исчезающих видов растений. Использование этих методов идет по двум основным направлениям: создание банков культур тканей растений и микроклональное размножение нуждающихся в охране видов для последующего пополнения живых коллекций ботанических садов либо репатриации растений в природную среду в места бывшего произрастания [1-3].

Ботанические сады и другие научно-исследовательские учреждения стран СНГ вносят существенный вклад в создание и поддержание банков стерильных культур редких видов *in vitro*, в отработку технологий микроклонального размножения и адаптации *ex vitro* охраняемых видов растений [4]. Важной проблемой, к решению которой еще не выработано единого подхода, является вопрос отбора объектов культивирования. В большинстве случаев предпочтение отдается редким видам конкретно региона в связи с относительной доступностью природного материала.

Сотрудниками Центрального сибирского ботанического сада СО РАН [1] при выборе объектов для создания микроклонов редких и эндемичных видов применялись следующие критерии:

- 1) принадлежность видов к одной из категорий редкости, принятых в Красных книгах;
- 2) практическая ценность видов – лекарственное значение, декоративные качества и т. п.;
- 3) затруднения в размножении традиционными методами.

В числе редких видов Ростовской области, отвечающих вышеназванным критериям, майкараган волжский (*Calophaca wolgarica* (L. fil.) Fisch. ex DC) (рис. 1). Это восточнопричерноморско-прикаспийский эндемик, ареал которого целиком находится в пределах бывшего СССР и охватывает Приволжскую возвышенность, степную часть бассейна Дона и Волго-Донской водораздел, Ергенинскую и Ставропольскую возвышенности. Известны отдельные местонахождения в Краснодарском крае и Крыму. За пределами России произрастает на юго-востоке Украины, также приводится для Западного Казахстана. В Красной книге Российской Федерации имеет статус 2а – вид, сокращающийся в численности. В последние годы ряд популяций вида был утрачен. Не удалось подтвердить произрастание майкарагана на территории Самарской области [5; 6]. По-видимому, вид также исчез в Ульяновской области [7]. Единственное местонахождение на территории Краснодарского края [8] в течение последних десятилетий не обследовалось, данные о его современном состоянии отсутствуют.

На территории Ростовской и Волгоградской областей, Ставропольского края популяции вида более многочисленны, однако их состояние во многих случаях вызывает опасение, степень уязвимости высока [9]. В Прикалаусском флористическом районе, где *Calophaca wolgarica* сохранился как ксеротермический реликт, он отнесен к угасающим видам, исчезновение которых происходит в результате естественного эволюционного процесса. Полное или частичное уничтожение популяций в результате распашки целины, в том числе противопожарной опашки, в ряде случаев наблюдается в пределах ООПТ [10].

Одна из причин, обуславливающих уязвимость вида, – затрудненное естественное воспроизводство. Упомянутая в литературе способность майкарагана волжского к размножению корневыми отпрысками целенаправленно не исследовалась и в настоящее время не подтверждена. Ряд источников в числе лимитирующих факторов приводит низкую семенную продуктивность вида, в частности небольшое число полностью вызревающих семян в бобах, а также немногочисленный самосев и медленное развитие [11; 12]. При этом данные по конкретным показателям семенной продуктивности майкарагана в литературе отсутствуют.



Рис. 1. Внешний вид *Calophaca wolgarica*

Не найдено надежных способов поддержания вида в культуре. В настоящее время *Calophaca wolgarica* относительно устойчиво культивируется в коллекциях ботанических садов лишь в пределах своего естественного ареала. С 1998 г. – в Ботаническом саду РГУ (ныне ЮФУ), где представлен в дендрологической коллекции и в коллекции редких и исчезающих растений Ростовской области. Последняя формируется на основе популяционного подхода; при этом площадь интродуцируемых популяций определяется в зависимости от биологических особенностей вида, посевной и посадочный материал собирается в нескольких природных популяциях, производится регулярное пополнение интродуцированной популяции новыми образцами [13]. Несмотря на перечисленные меры, число растений майкарагана в коллекции очень невелико.

В естественных условиях майкараган волжский способен вегетативно размножаться с помощью отделения частей партикулярного куста, однако это происходит довольно медленно. Из одной партикулярной системы возможно подучить 3–5 посадочных единиц в год. В условиях *in vitro* один культивируемый побег дает развитие 7–8 побегам за один пассаж.

Хозяйственная ценность майкарагана обусловлена его декоративными качествами и устойчивостью к основным лимитирующим факторам городов степной зоны юга России, где данный вид может быть использован в зеленом строительстве. Работами Б.Л. Козловского с сотрудниками майкараган волжский в ходе интродукционного испытания оценен как высокозимостойкий и высокозасухоустойчивый кустарник. Вредителями и болезнями повреждается незначительно – редко семяедами, мучнистой росой. Составлены рекомендации по использованию в зеленом строительстве Ростовской области в качестве декоративнолиственного и красивоцветущего кустарника [14; 15].

Перечисленные выше причины обуславливают актуальность включения *Calophaca wolgarica* в число видов, поддерживаемых в генных банках, в том числе в виде стерильных культур *in vitro*, и отработки технологии его микрклонального размножения. Работы в этом направлении ведутся в Волгоградском региональном ботаническом саду [16]. Однако специальных публикаций, посвященных результатам работы, найдено не было.

Целью нашей работы является разработка технологии микрклонального размножения майкарагана волжского в культуре *in vitro*. Полученные данные приводятся впервые.

### Материалы и методы исследований

В качестве исходного материала были взяты семена майкарагана волжского, собранные со взрослых коллекционных образцов Ботанического сада ЮФУ.

Использовались три схемы стерилизации. Семена промывались в проточной воде в течение 20 минут. Затем в стерильных условиях обрабатывались 70 % этиловым спиртом 2 минуты. После этого семена погружали на 1 секунду в 96 % спирт и кратковременно обжигали в пламени горелки. Далее семена переносили на питательную среду. Согласно второй схеме стерилизации семена после 2-минутной обработки в 70 % спирте, помещали в раствор 0,1 % сулемы от 5 до 20 минут. Затем отмывали трехкратно в стерильной воде по 15 минут и переносили на питательную среду. Третий режим стерилизации семян предполагал обработку семян 2,5 % раствором гипохлорида натрия от 10 до 20 минут, остальные этапы были те же, что и с сулемой.

Питательные среды готовились на базе прописи Мурасиге-Скуга. На этапе проращивания семян применяли безгормональную среду в половинной концентрации компонентов. На последующих этапах готовились среды в полной концентрации. Мультипликацию побегов проводили на среде с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП) в разных концентрациях – 0,5 мг/л, 1 мг/л, 1,5 мг/л, 2 мг/л, 4 мг/л. Для укоренения применяли индолилмасляную кислоту (ИМК) в концентрациях 0,5 мг/л, 1 мг/л и 2 мг/л.

Перед автоклавированием рН среды доводили до 5,7 с помощью 1н раствора КОН. Культуральные сосуды с растениями помещали в условия с освещением 2500 Лк и температурой 25±1 °С. Субкультивирование проводили каждые 4 недели.

### Результаты и их обсуждение

Наиболее эффективным способом поверхностной стерилизации семян майкарагана волжского оказался термический, то есть обжиг семян в пламени горелки. При использовании этой методики было получено 90 % стерильных семян. Очевидно, обжиг семян, помимо стерилизующего эффекта, обладает еще и скарифицирующим действием.

Выход стерильных и жизнеспособных семян в результате химической обработки оказался значительно ниже (табл. 1). Установлен наиболее продуктивный режим химической стерилизации семян майкарагана, это 20-минутная обработка семян 0,1 %-ным раствором сулемы. В этом случае возможно получить до 70 % стерильных жизнеспособных семян.

Таблица 1

**Результаты стерилизации семян майкарагана волжского  
в различных режимах деконтаминации**

Стерилизующий агент (способ стерилизации)	Экспозиция, мин.	Контаминированные семена, %	Стерильные семена, %	Не взошедшие семена, %
Сулема, 0,1 %	5	30	50	20
	10	25	55	20
	20	–	70	30
Гипохлорит натрия, 2,5 %	10	40	40	20
	15	40	40	20
	20	40	45	15
Обжиг	0,1	–	90	10

Индукцию развития пазушных меристем стимулировали сочетанием цитокининов и ауксинов. Комбинации различных регуляторов роста часто обладают высоким синергическим действием. При совместном использовании цитокининов с ауксинами можно добиться получения большего количества побегов или побегов большей длины [17; 18]. Синергический эффект не раз подтверждался отечественными и зарубежными учеными, а также результатами собственных экспериментов [19-21].

Выяснено, что эффективные концентрации фитогормонов для мультипликации побегов составляют соответственно НУК 0,1 мг/л, в сочетании с БАП – 2 мг/л. Коэффициент мультипликации достигал 7,5 (7,5 новых побегов на один экплант). При этом использовалась питательная среда Мурасиге-Скуга. С меньшим коэффициентом мультипликации (3,2) майкараган размножается на той же среде с комбинацией НУК (0,1 мг/л) и БАП (1 мг/л) (табл. 2).

Замечено, что уже с третьего пассажа в культуре образуется довольно много витрифицированных побегов, то есть около 30 %.

Основными факторами, вызывающими витрификацию, являются: высокая влажность в культуральных сосудах вследствие использования жидких сред, а также вследствие герметичного закрытия сосудов плотной пленкой или фольгой; богатые минеральными веществами питательные среды, содержащие значительные количества солей аммония, сахарозы и витаминов; высокие дозы регуляторов роста. В случае с майкараганом волжским витрификацию побегов в большей степени вызывают высокие концентрации фитогормонов. Так, в варианте эксперимента с комбинацией НУК (0,1 мг/л) и БАП (1 мг/л) доля витрифицированных растений составила уже 55 %. Витрификация выражалась в утолщении стебля и листьев, увеличении содержания воды, в формировании каллуса основании побегов. В целях снижения витрификации каждый третий пассаж производился на безгормональную среду с половинным содержанием солей МС. Этот способ неоднократно оправдывал себя в культивировании других растений [22].

Таблица 2

**Влияние БАП и НУК на пролиферацию побегов майкарагана волжского**

БАП, мг/л	НУК, мг/л	Число побегов на экплант
0	0	0,5 ± 0,2
0,2	0,05	0,5 ± 0,2
0,5		0,8 ± 0,3
0,7		0,6 ± 0,1
1		3,2 ± 0,2
2	0,1	7,5 ± 0,4
3		2,1 ± 0,2
4		0 ± 0,4

Также отмечено образование плотного каллуса на среде МС с комбинацией фитогормонов НУК (0,1 мг/л) и БАП (4 мг/л). Дальнейшая пересадка каллуса на среду того же состава показала эффективный рост каллусной массы. Каков морфогенный потенциал этого каллуса, покажут наши будущие исследования.

Рис. 2. *Calophaca wolgarica* в культуре *in vitro*

Полученные регенеранты (рис. 2) на 5-й неделе культивирования высаживали на среду, индуцирующую корнеобразование. Учитывая, что чаще всего для укоренения используют ИМК и НУК, были протестированы несколько концентраций этих фитогормонов. Наилучшие результаты были достигнуты на среде МС с половинной концентрацией солей МС и добавлением 0,5 мг/л ИМК. Длина корней составила в среднем 10,4 см, а количество придаточных корней оказалось равным 3,5 шт. в среднем по всем вариантам (табл. 3).

Таблица 3

**Влияние НУК и ИМК на корнеобразование майкарагана волжского**

НУК, мг/л	ИМК, мг/л	Длина корней, см	Количество корней, шт
0,5	–	9,2	2,8
–	0,5	10,4	3,5
1	–	7,8	1,9
–	1	8,5	1,8
2	–	4,2	1,2
–	2	3,5	1,3

**Заключение**

В результате экспериментов с микроклонированием *Calophaca wolgarica* установлены оптимальные условия для культивирования этого растения *in vitro*. Выяснено, что наиболее эффективным способом деконтаминации семян майкарагана является обжиг в пламене горелки. Максимальный коэффициент размножения эксплантов, представленных побегами, достигается на среде Мурасиге-Скуга с комбинацией фитогормонов НУК 0,1 мг/л + БАП 2 мг/л. Наиболее эффективной средой для укоренения регенерантов оказалась среда МС с добавлением 0,5 мг/л ИМК.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* центрального сибирского ботанического сада // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2008. Т. 12, № 4. С. 564-572.
- Дзыбов Д.С., Орлова И.Г., Атаманченко М.П. Введение в культуру *in vitro*, микроклональное размножение и реинтродукция редких и исчезающих видов растений // Экологический вестник Северного Кавказа. 2009. Т. 5, № 4. С. 66-70.
- Чернышенко О.В., Загреева А.Б. Создание природных популяций редких и исчезающих видов с помощью клонального микроразмножения // Вестн. Московс. гос. ун-та леса – Лесной вестник. 2012. № 7 (90). С. 85-87.
- Отчет Совета ботанических садов России по программе Отделения биологических наук РАН «Проблемы общей биологии и экологии: рациональное использование биологических ресурсов» по направлению 05 «Проблемы интродукции растений и сохранения генофонда природной и культурной флоры» за 2011 год. URL: <http://www.gbsad.ru/doc/inf-bull-22.pdf>
- Саксонов С.В., Ильина В.Н. Семейство Бобовые (*Fabaceae*, *Leguminosae*) Самарской области // Изв. Самар. НЦ РАН. 2006. Т. 8, № 2. С. 504-521.
- Ильина В.Н. Флора бобовых южных районов Самарской области // Фиторазнообразие Восточной Европы. 2008. № 5. С. 131-137.
- Красная книга Ульяновской области / под науч. ред. Е.А. Артемьевой, О.В. Бородина, М.А. Королькова, Н.С. Ракова; Правительство Ульяновской области. Ульяновск: Изд-во «Артишок», 2008. 508 с.
- Косенко И.С. Определитель высших растений Северо-Западного Кавказа и Предкавказья. М.: Колос, 1970. 614 с.
- Чимонина И.В. Флора Прикалауского флористического района (Центральное Предкавказье) и ее анализ: дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь, 2004. 221 с.
- Красная книга Ростовской области. Т. 2. Растения и грибы. Ростов н/Д: Правительство Ростовской области; Министерство природных ресурсов и экологии Ростовской области, 2014. 343 с.
- Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / Министерство природных ресурсов и экологии РФ; Федеральная служба по надзору в сфере природопользования; РАН; Российское ботаническое общество; МГУ им. М.В. Ломоносова; гл. редкол.: Ю.П. Трутнев и др.; сост. Р.В. Камелин и др. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2008. 855 с.

12. Красная книга Волгоградской области / Комитет охраны природы Администрации Волгоградской области. Волгоград: Волгоград, 2006. Т. 2. Растения и грибы. 236 с.
13. Шмараева А.Н., Шишлова Ж.Н. Итоги интродукции редких видов растений Ростовской области в Ботаническом саду Южного федерального университета // Современная ботаника в России: тр. XIII Съезда Рус. бот. общ-ва и конф. «Научные основы охраны и рационального использования растительного покрова Волжского бассейна». Тольятти: Кассандра, 2014. Т. 4. С. 80-82.
14. Козловский Б.Л., Огородникова Т.К., Куропятников М.В., Федоринова О.И. Ассортимент древесных растений для зеленого строительства в Ростовской области: монография. Ростов н/Д: Изд-во ЮФУ, 2009. С. 416.
15. Козловский Б.Л., Федоринова О.И. Перспективы введения в культуру *Calophaca wolgarica* (L. fil.) Fisch. в Ростове-на-Дону // Тр. Том. гос. ун-та. Сер. Биолог.: Ботанические сады. Проблемы интродукции. 2010. Т. 274. С. 202-204.
16. Доклад о состоянии окружающей среды Волгоградской области в 2008 году / ред. колл.: В.И. Новиков [и др.]; Комитет природных ресурсов и охраны окружающей среды Администрации Волгоградской области. Волгоград: Панорама, 2009. 384 с.
17. Шевелуха В.С. Рост растений и его регуляция в онтогенезе. М.: Колос, 1992. 593 с.
18. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Кочиева Е.З. и др. М.: Высшая школа, 2008. 710 с.
19. Cerovi R., Runic J. Micropropagation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) cv. Sumadinka // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1987. Vol. 51, N 9. С. 157.
20. Sorvari S., Ulvinen S., Hietaranta T., and Hiirsalmi H. Preculture medium promotes direct shoot regeneration from micropropagated strawberry leaf disks // Hort Science. 1993. Т. 28, N 1. P. 55-57.
21. Серeda М.М., Козловский Б.Л., Луценко Е.В. Перспективная технология размножения платана испанского для зеленого строительства на юго-западе ростовской области // Инженерный вестник Дона. 2014. Т. 31, № 4-1. С. 9.
22. Sharma U., Mohan J.S.S. Reduction of vitrification in in vitro raised shoots of *Chlorophytum borivilianum* Sant. & Fernand., a rare potent medicinal herb // Indian journal of experimental biology. 2006. Т. 44, N 6. P. 499.

Поступила в редакцию 01.08.15

*M.M. Sereda, T.A. Karasyova, E.V. Lutsenko*

#### MICROPROPAGATION OF CALOPHACA WOLGARICA

*Calophaca wolgarica* (L. fil.) Fisch. ex DC. is an endangered plant included into Russian Federation Red Book. The central purpose of the experiment is to establish an efficient micropropagation method for rapid multiplication of *Calophaca* planting material in order to solve problems related to repatriation and introduction of this plant. The best method of micropropagation of this shrub is micrograftage by removing the apical dominance. An optimal sterilization method of seed explants is found. It is shown that the most effective way to decontaminate seeds of *Calophaca wolgarica* is firing in the burner flame. The optimum concentration of phytohormones (2 mg.l<sup>-1</sup> BA and 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA) on MS medium was found to obtain the greatest number of mericlones. The best conditions for rooting were 1/2MS medium supplemented with 0,5 mg.l<sup>-1</sup> IBA.

**Keywords:** *Calophaca wolgarica*, micropropagation, 6-benzylaminopurine, naphthalene acetic acid, conservation of rare and endangered plant species.

Серeda Михаил Михайлович,  
кандидат биологических наук, доцент,  
зав. лабораторией клеточных и геномных технологий растений  
E-mail: seredam@yandex.ru

Карасева Татьяна Александровна,  
кандидат биологических наук, старший преподаватель  
E-mail: takaras@yandex.ru

Луценко Елена Витальевна, студент-бакалавр  
E-mail: lev-1311@yandex.ru

ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет»  
344041, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. Ботанический спуск, 7

Sereda M.M.,  
Candidate of Biology, Associate Professor  
E-mail: seredam@yandex.ru

Karasyova T. A.,  
Candidate of Biology, Senior Lecturer  
E-mail: takaras@yandex.ru

Lutsenko E.V., student  
E-mail: lev-1311@yandex.ru

Southern Federal University  
Botanicheskiy Spusk st., 7, Rostov-on-Don, Russia,  
344041