

УДК 57.085.23

DOI: <http://dx.doi.org/10.20914/2310-1202-2016-1-198-202>

Ведущий научный сотрудник О.А. Землянухина,  
профессор В.Н. Калаев, аспирант В.С. Воронина  
(Воронежский гос. ун-т) ботанический сад им. проф. Б.М. Козо-Полянского.  
тел. (473) 220–88–76  
E-mail: Dr\_Huixs@mail.ru  
профессор О.С. Корнеева  
(Воронежский гос. ун-т инж. технол.) кафедра биохимии и биотехнологии.  
тел. (473) 255–55–57  
E-mail: korneeva-olgas@yandex.ru

Leading researcher O.A. Zemlyanukhina,  
professor V.N. Kalaev, graduate V.S. Voronina  
(Voronezh state university) Botanical garden named prof. B.M. Kozo-Polyansky  
phone (473) 220–88–76  
E-mail: Dr\_Huixs@mail.ru  
professor O.S. Korneeva  
(Voronezh state university of engineering technology) Department of biochemistry and biotechnology.  
phone (473) 255–55–57  
E-mail: korneeva-olgas@yandex.ru

## **Микроклональное размножение пяти видов колокольчиков, произрастающих на территории ботанического сада им. проф. Б.М. Козо-Полянского Воронежского государственного университета**

## **Micropropagation of five species of Campanula growing on the territory of Botanical Garden named prof. B.M. Kozo-Polyansky of Voronezh State University**

*Реферат.* Разработка научно обоснованных методов размножения особо охраняемых и высоко декоративных растений, пользующихся повышенным спросом, для дальнейшего использования в озеленении, а также создание генофондов сортов и видов растений в качестве активно растущих коллекции соответствует основным направлениям Государственной координационной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года «БИО-2020». В настоящем исследовании разработаны и оптимизированы условия получения активно пролиферирующих культур 5 исчезающих видов колокольчиков *Campanula rotundifolia* L. (колокольчик круглолистный), *Campanula persicifolia* L. (к. персиколистный), *Campanula trachelium* L. (к. крапиволистный), *Campanula rapunculoides* L. (к. рапунцеливидный), *Campanula glomerata* L. (к. скученный). Оптимизированы условия ризогенеза. Изучено влияние стерилизации и различных концентраций антибиотиков (канамицин, бензилпенициллин, гентамицин, клафоран) на рост и развитие адвентивных растений. Показана необходимость использования для стерилизации помимо агентов, содержащих хлор («Белизна») и ртуть (мертиолят), растворов антибиотиков. Установлены возможные негативные эффекты добавления антибиотиков в среды для инкубации, выражающиеся в увеличении проявления соматической изменчивости, некротизации тканей, нарушении синтеза хлорофилла («смертельное отсутствие хлорофилла»), замедлению роста адвентивных побегов и др. Предложено светодиодное освещение культуральных стеллажей в условиях 16-часового периода освещения светодиодными лентами напряжением 12 В, мощностью 4.5 Вт/м (3 светодиода на 10 см ленты), общая освещенность 2500–3000 люкс. На каждой полке добавлена лента с красными фотодиодами. Полученные результаты позволяют при необходимости получить плантационные количества указанных видов колокольчиков в короткие сроки.

---

© Землянухина О.А., Калаев В.Н.,  
Воронина В.С., Корнеева О.С., 2016

Для цитирования

Землянухина О.А., Калаев В.Н., Воронина В.С., Корнеева О.С. Микроклональное размножение пяти видов колокольчиков, произрастающих на территории ботанического сада им. проф. Б.М. Козо-Полянского Воронежского государственного университета // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2016. №1. С. 198–202. doi:10.20914/2310-1202-2016-1-198-202.

For cite

Zemlyanukhina O.A., Kalaev V.N., Voronina V.S., Korneeva O.S. Micropropagation of five species of *Campanula* growing on the territory of Botanical Garden named prof. B.M. Kozo-Polyansky of Voronezh State University. *Vestnik voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernyh tekhnologij* [Proceedings of the Voronezh state university of engineering technologies]. 2016, no. 1, pp. 198–202. (In Russ.). doi: 10.20914/2310-1202-2016-1-198-202.

**Summary.** The development of evidence-based methods of reproduction of protected and highly decorative species that are in high demand for use in landscaping, as well as the establishment of gene pools of species and varieties of plants in actively growing collection corresponds to the main direction of the state coordination program for the development of biotechnology in the Russian Federation until 2020 «BIO 2020». The on-standing research developed and optimized the conditions for obtaining actively proliferating cultures of 5 disappearing species; *Campanula rotundifolia* L., *Campanula persicifolia* L., *Campanula trachelium* L., *Campanula rapunculoides* L., *Campanula glomerata* L. Optimized conditions of rhizogenesis. The effect of the different sterilization and antibiotics concentration (kanamycin, benzyl penicillin, gentamicin, klaforan) on the growth and development of adventitious plants has been studied. Solutions of antibiotics for sterilization in addition to chlorine-containing agent («Belizna») and mercury (thimerosal) are needed. The possible negative effects of the addition of antibiotics in incubation solution lead to increasing of somaclonal variation, necrosis, disturbance of chlorine synthesis («fatal lack of chlorophyll»), slow down the growth of adventitious shoots, and others. It is proposed LED lighting culture in a rack 16 hour period lighting LED strip 12 V power 4.5 W/m (3 LED 10 cm tape), general illumination of 2500–3000 lux. Each shelf is added with red tape photodiodes. The results allow, if necessary, to obtain plantation quantity of these kinds of *Campanula* in a short time.

**Ключевые слова:** колокольчики *Campanula*, стерилизация, антибиотик, микроклональное размножение, ризогенез, светодиодные стеллажи

**Keywords:** bluebell *Campanula*, sterilization, antibiotic, micropropagation, the rhizogenesis, light emitting diode shelves

На территории РФ и сопредельных стран насчитывается около 150 видов колокольчиков, из них 13 видов произрастают в средней полосе России. В основном все они относятся к редким, находящимся под угрозой вымирания видам, за счет действия антропогенного фактора (прокладка дорог, неконтролируемый сбор цветов, вырубка леса и др.). Поэтому сохранение как можно большего числа видов колокольчиков является весьма актуальной задачей. Для сохранения биоразнообразия в настоящее время наряду с традиционными методами используется способ сохранения редких и исчезающих видов растений в виде растущих коллекций в условиях *in vitro*. Цель настоящего исследования – получение активно пролиферирующих культур пяти видов колокольчиков, произрастающих на территории ботанического сада Воронежского госуниверситета для сохранения генофонда этих редких видов флоры России.

#### Материалы и методы

Исходными для получения стерильных культур были взяты растения следующих видов колокольчиков: *Campanula rotundifolia* L. (колокольчик круглолистный), *Campanula persicifolia* L. (к. персикolistный), *Campanula trachelium* L. (к. крапиволистный), *Campanula rapunculoides* L. (к. рапунцелейвидный, или к. Гроссгейма, или к. репчатый), *Campanula glomerata* L. (к. сученный).

Стерилизацию первичного материала проводили в несколько стадий, учитывая то, что растения весной низкорослые, близко расположены к почве. Участки цветоносов с листьями протирали мыльной водой, нарезали на кусочки длиной по 5–7 см и помещали на 10 минут в раствор, содержащий каплю бытового моющего средства для равномерного смачивания поверхности растений. После этого стебли промывали: в проточной воде в течение

20 минут, в дистиллированной воде 10 минут и стерилизовали в растворе, содержащем 4% бытового отбеливателя «Белизна» и 0.01–0.02% мертиолята (орто-этилртутьтиосалицилат натрия). Время стерилизации при непрерывном покачивании – 20 минут. Затем растения трижды (по 5 минут) отмывали в стерильной дистиллированной воде. Дополнительная стадия стерилизации включала помещение стеблей на 20–30 минут в раствор бензилпенициллина в концентрации 200 мг/л без последующего отмывания.

Стерильные части растения разрезали на сегменты, содержащие 1 – 2 пазушных почки, или использовали боковые листочки. Среды культивирования – Марасиге и Скуга (MS) [1], дополненная 1 мг/л бензиламинопурина (БАП), Woody Plant Medium (WPM) или 1/2 WPM [2], дополненные 0.2 мг/л БАП + 0.1 мг/л гиббереллина (ГА3). Укоренение осуществляли на 1/4 MS, содержащей 1 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК), или 1 мг/л ИМК + 1 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК), или на безгормональной 1/2 MS. Все работы проводили в стерильных условиях ламинар-бокса. Питательные среды содержали 7 г/л агара при pH 5.6–5.8, автоклавированы 20 минут при 1 атм.

Культивирование проводили на светокультуральных стеллажах в условиях 16-часового периода освещения светодиодными лентами напряжением 12 В, мощностью 4.5 Вт/м (3 светодиода на 10 см ленты), общая освещенность 2500–3000 люкс. На каждой полке добавлена лента с красными фотодиодами. Температура культивирования 23–26 °С.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Разработка научно-обоснованных методов размножения особо охраняемых и высокодекоративных растений, пользующихся повышенным спросом, для дальнейшего использо-

вания в озеленении, а также создание генофондов сортов и видов растений в качестве активно растущих коллекции соответствует основным направлениям Государственной координационной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года «БИО-2020», разработанной в соответствии с решением Правительственной комиссии по высоким технологиям и инновациям от 1 апреля 2011 г. О важности сохранения биоразнообразия свидетельствуют и другие документы мирового значения: Международная программа «DIVERSITAS» [3], принятая на Генеральной ассамблее Международного союза биологических наук при поддержке ЮНЕСКО, Международная Конвенция о сохранении биологического разнообразия [4].

В культуру ткани было введено 5 видов колокольчиков: *Campanula rotundifolia* L. (колокольчик круглолистный), *Campanula persicifolia* L. (к. персикolistный), *Campanula trachelium* L. (к. крапиволистный), *Campanula rapunculoides* L. (к. рапунцелейвидный, или к. Гроссгейма, или к. репчатовидный), *Campanula glomerata* L. (к. скученный).

Основной проблемой культивирования травянистых растений является получение стерильного материала, поскольку они контаминируются почвой. Поэтому часто случается, что даже через несколько месяцев культивирования у базальных частей растений наблюдается выделение бактериальной инфекции. Ранее была разработана методика микроклонального размножения колокольчика твердолистного (*Campanula sclerophylla* Kolak) – исчезающего вида флоры Западного Кавказа [5]. В качестве первичного экспланта авторы использовали каудексы растения, а в качестве стерилизующих агентов – гипохлорит натрия или препарат «Велтолен».

В наших условиях оказалось недостаточным применение только агентов, содержащих хлор («Белизна») и ртуть (мертиолят), поэтому мы ввели дополнительный этап стерилизации – обработка растений раствором антибиотика. В статье Шестибратова К.А. с соавторами [6] по микроклональному размножению сирени указано, что растения культивируются на питательных средах, содержащих антибиотики в концентрации от 5 до 1000 мг/л. Однако помещение растений на среды инкубации, содержащие антибиотик, приводит к увеличению проявления соматоклональной изменчивости и другим негативным факторам развития. С целью выявления наибольшей эффективности при обработке растений нами были

исследованы 4 коммерческих препарата антибиотиков: канамицин, бензилпенициллин, гентамицин, клафоран. Обработка антибиотиками не остается без последствий. Так, выяснилось, что однократная стерилизация канамицином (150–300 мг/л) вызывает в дальнейшем у микрорастений нарушение синтеза хлорофилла («смертельное отсутствие хлорофилла»), что приводит к появлению нежизнеспособных пятнистых или белых растений. Клафоран в тех же концентрациях (150–300 мг/л), которые применяются для уничтожения свободноживущих бактерий при генетической трансформации клеток, приводит к каллусообразованию и замедлению роста адвентивных побегов.

Действие гентамицина (150/300 мг/л) пролонгировано: после обработки антибиотиком растения начинают массово погибать в течение двух недель.

Поэтому оптимальной оказалась стерилизация растений раствором бензилпенициллина в концентрации 250 мг/л в течение 20 мин. Однако дополнение питательных сред этим антибиотиком в указанной концентрации приводило к постепенному некрозу тканей.

Так как колокольчики являются травянистыми растениями, то на начальных стадиях исследования была применена среда Мурасиге и Скуга, дополненная 1 мг/л БАП. Листочки без вдавливания помещали на поверхность агаризованной среды, однако на протяжении двух месяцев не происходило процессов, характерных для более мясистых листьев других растений: разрастания тканей, образования адвентивных побегов [7]. Поэтому работа продолжилась по типу получения микрорастений из пазушных почек древесных: стебель разрезался на одноузловые сегменты, которые помещали на поверхность питательной среды. На полной среде WPM, дополненной 1 мг/л БАП, наблюдался значительный процент витрифицированных растений (таблица 1), тогда как на  $\frac{1}{2}$  или  $\frac{1}{4}$  WPM развивались нормальные побеги, которые сильно кустились (рисунок 1а). Растения колокольчиков в условиях *in vitro* очень тоненькие, но даже в таком виде они могут образовывать бутоны и иногда начинать цвести (рисунок 1б).

Т а б л и ц а 1  
Количество витрифицированных растений  
на разных питательных средах

% витрификации	Питательная среда, 20 суток инкубации			
	MS	WPM	$\frac{1}{2}$ WPM	$\frac{1}{4}$ WPM
	50	30	0	0

Укоренение у микрочеренков при помещении на среду  $\frac{1}{4}$  MS, содержащую 1 мг/л ИМК, происходило в течение недели: на базальной части эксплантов образовывался клубок спутанных тонких корней (рисунок 1в). На среде MS, содержащей 2 гормона – ИМК и ИУК, образование корней шло в течение месяца, как и в безгормональных условиях. После образования корней пробирочные растения высаживали в почвосмесь, содержащую чернозем и нейтральный торф в соотношении 1:1, и помещали в минитеплицы (рисунок 2).



а – общий вид; б – цветок *in vitro*; в-образование корней

Рисунок 1. Образование адвентивных побегов и ризогенез на примере *Campanula rotundifolia* L. (колокольчик круглолистный)



Рисунок 2. Адаптированные к нестерильной почве 30-суточные растения колокольчика персиколистного

## ЛИТЕРАТУРА

1 Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures] // *Physiologia Plantarum*. 1962. № 15. P. 473–497.

2 Lloyd, G., McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture // *Proc. Inter. Plant Prop.* 1980. V. 30. P. 421–427.

3 DIVERSITAS, Mission and History, 2011 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.diversitas-international.org/about/mission-and-history>.

Одним из новшеств данной работы было использование на светокультуральных стеллажах в условиях 16-часового периода выращивания освещения не белыми люминесцентными лампами, а светодиодными лентами. На каждой полке добавлена лента с красными светодиодами. Светодиоды имеют следующие преимущества: большой срок службы (до 20–50 тысяч часов), малое потребление энергии и малое тепловыделение, что позволяет при большом количестве светокультуральных стеллажей поддерживать оптимальную температуру в растительных (23–26 °C).

Использование светодиодных лент позволило снизить температуру в растительных, значительно уменьшить потребляемую мощность и улучшить световые условия для растений. Известно, что для жизнедеятельности растений важна красная составляющая солнечного спектра: лучи длиной 600–720 нм являются основными поставщиками энергии для фотосинтеза и влияют на процессы скорости и развития растений [8]. Именно этой цели служит одна полоса светодиодов с красными лампочками.

## Заключение

В данном исследовании по размножению пяти видов колокольчиков, относящихся к редким, исчезающим видам, удалось добиться стабильно пролиферирующей на протяжении полугода культуры. Отработаны методы получения стерильного материала, показаны различия в действии антибиотиков при поверхностной стерилизации на последующий рост и развитие растений. Отработаны схемы ризогенеза, получены большие количества укорененных эксплантов, пригодных для адаптации к нестерильным условиям. При необходимости получения плантационных количеств указанных колокольчиков, работа может быть проведена в короткие сроки.

4 Конвенция о биологическом разнообразии [Электронный ресурс]. Режим доступа: [http://www.un.org/ru/documents/decl\\_conv/conventions/biodiv.shtml](http://www.un.org/ru/documents/decl_conv/conventions/biodiv.shtml), свободный.

5 Соколов Р.Н., Коломиец Т.М., Малияровская В.И. Введение в культуру *in vitro* некоторых редких и исчезающих видов флоры Западного Кавказа // *Научный журнал КубГАУ*. 2013. №94 (10). С. 1–17.

6 Патент РФ № 2457669 А01G 7/00 Способ клонального микроразмножения сирени *in vitro* / Шестибратов К.А., Салмова М.А., Алпатова А.А., Азарова А.Б. Оpubл. 10.08.2012.

7 Землянухина О.А., Обтеперанская М.С. Размножение селекционных видов *Saintpaulia* (Узумбарская фиалка) в культуре ткани // Проблемы репродуктивной биологии: тр. международ. симп. Пермь, ПГУ, 1996. С. 91–92.

8 Клешнин А.Ф., Шульгин И.А. Об оптических свойствах листьев растений // ДАН СССР. 1959. Т. 125. № 5. С. 1158–1161.

#### REFERENCES

1 Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, no. 15, pp. 473–497.

2 Lloyd, G., McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Proc. Inter. Plant Prop*, 1980, vol. 30, pp. 421–427.

3 DIVERSITAS, Mission and History, 2011. Available at: <http://www.diversitas-international.org/about/mission-and-history>.

4 Konventsiya o biologicheskom raznoobrazii [The Convention on Biological diverse]. Available at: [http://www.un.org/ru/documents/decl\\_conv/conventions/biodiv.shtml](http://www.un.org/ru/documents/decl_conv/conventions/biodiv.shtml). (In Russ.).

5 Sokolov R.N., Kolomiets T.M., Malyarovskaya V.I. Introduction to in vitro culture, which is not rare and endangered species of flora of the Western Caucasus. *Nauchnyi zhurnal KubGAU*. [Scientific journal KubGAU], 2013, no. 94 (10), pp. 1–17. (In Russ.).

6 Shestibratov K.A., Salmova M.A. Alpatova A.A., Azarov A.B. Sposob klonal'nogo mikrorazmnozheniya sireni [A method of micropropagation of lilac in vitro]. Patent RF, no. 2457669, 2012. (In Russ.).

7 Zemlyanukhina O.A., Obtemperanskaya M.S. Reproduction of breeding species of *Saintpaulia* (Violet uzumbarskiye) in tissue culture. *Problemy reproductivnoi biologii* [Problems of reproductive biology: abstract international. symp. Perm, PSU], 1996, pp 91 – 92. (In Russ.).

8 Kleshnin A.F., Shulgin I.A. On the optical properties of plant leaves. *DAN SSSR*. [Proceedings of AS USSR], 1959, vol. 125, no. 5, pp. 1158–1161. (In Russ.).