

УДК 631.532

DOI: 10.37482/0536-1036-2020-5-38-50

ВВЕДЕНИЕ *Eucommia ulmoides* Oliv. В КУЛЬТУРУ *IN VITRO***А.В. Жигунов, д-р с.-х. наук, проф.;** *ResearcherID:* [AAK-8124-2020](https://orcid.org/0000-0001-8707-7526);*ORCID:* <https://orcid.org/0000-0001-8707-7526>**Куинь Чанг Нгуен, аспирант;** *ResearcherID:* [AAK-8702-2020](https://orcid.org/0000-0003-2749-2087);*ORCID:* <https://orcid.org/0000-0003-2749-2087>

Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет им. С.М. Кирова, Институтский пер., д. 5, Санкт-Петербург, Россия, 194021; e-mail: a.zhigunov@bk.ru

Возрастающая потребность в лекарственных средствах растительного происхождения требует изучения не только биологических ресурсов лекарственных растений, но и способов их размножения. Особенно ценны лекарственные растения, имеющие длительную историю успешного применения в традиционной медицине. К ним относится эвкоммия вязолистная (*Eucommia ulmoides* Oliv.), которая является редким реликтовым видом, произрастающим в естественных условиях в подлеске влажных субтропических лесов Китая, преимущественно в среднем течении р. Янцзы. Она выгодно отличается от большинства субтропических растений тем, что обладает значительной морозоустойчивостью и позволяет культивировать ее за пределами влажных субтропиков. С середины XX в. она широко интродуцировалась в Краснодарском крае и Республике Адыгея, успешно адаптировалась в разных экологических условиях Северо-Западного Кавказа. Для удовлетворения все возрастающего спроса на кору эвкоммии требуется закладка промышленных плантаций. Однако возникающие при ее семенном размножении трудности (двудомность вида, низкое качество пыльцы, партенокарпия, длительный покой семян, нерегулярность плодоношения, длительный ювенильный период) заставляют обращаться к современным биотехнологическим методам размножения растений. Рассматривая вопросы выращивания посадочного материала, следует сосредоточить внимание на высокоэффективных методах, обеспечивающих стабильное и массовое размножение изучаемых объектов. При этом важную роль играет разработанный и выбранный для конкретных целей путь регенерации растений *in vitro*. Эффективность использования методов биотехнологии связана с сокращением сроков получения в большом количестве вегетативного потомства трудно размножаемых растений, а также с экономией площадей, необходимых для их культивирования. По результатам проведенных исследований подобраны условия получения асептической культуры *E. ulmoides*. Наивысшая степень стерилизации сегментов побегов эвкоммии вязолистной оказалась при последовательном погружении образцов сначала в 70 %-й этанол (30 с), а затем в 0,1 %-й раствор HgCl₂ (5 мин). При такой процедуре стерилизации 63,3 % исследуемых черенков оказываются стерильными, из них 56,7 % – жизнеспособными. Определен оптимальный состав питательной среды для регенерации микропобегов *E. ulmoides*: среда Мурасиге–Скуга (MS) с дополнением 1 мг/л бензиламинопурина (БАП) + 0,2 мг/л альфа-нафтилуксусной кислоты (НУК). Лучшими питательными средами для укоренения эксплантов являются следующие: 2/3 MS + 1,5 мг/л НУК + 30 г сахарозы + 7 г агара; 2/3 MS + 1 мг/л НУК + 0,4 мг/л ИМК + 30 г сахарозы + 7 г агара.

Для цитирования: Жигунов А.В., Нгуен Куинь Чанг. Введение *Eucommia ulmoides* Oliv. в культуру *in vitro* // Изв. вузов. Лесн. журн. 2020. № 5. С. 38–50. DOI: 10.37482/0536-1036-2020-5-38-50

Ключевые слова: *Eucommia ulmoides* Oliv., микрклональное размножение, микропобег, стерилизация, регенерация, регулятор роста.

Введение

Возрастающая потребность в лекарственных средствах растительного происхождения и интерес к ним научной и народной медицины требуют серьезного изучения биологических ресурсов, в том числе перспективных лекарственных растений. Среди лекарственных средств препараты из растительного сырья составляют в настоящее время более 40 %, а среди используемых при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, болезней печени, желудочно-кишечного тракта, нервной системы их доля – около 80 %. Особенно ценны лекарственные растения, имеющие длительную историю успешного применения в традиционной медицине.

Одним из таких растений, известных в китайской медицине свыше 1000 лет, является эвкоммия вязолистная (*Eucommia ulmoides* Oliv.) – двудомное листопадное дерево, вид монотипного семейства *Eucommiaceae* (Эвкоммиевые), входящего в порядок *Garryales* (Гарриецветные). Его отдельные экземпляры могут достигать 20 м в высоту. *E. ulmoides* является представителем редкого реликтового вида, родина которого Китай [9]. В настоящее время *E. ulmoides* выращивается более чем в 10 странах Европы, Америки и Азии [10, 13, 14]. Галеновые препараты, получаемые из коры этого растения, обладают сильным гипотензивным действием, относятся к группе спазмолитических лекарственных средств, не вызывают побочных явлений и малотоксичны. Действие препаратов связано с наличием в их составе хлорогеновой и кофейной кислот и гликозида аукубина. Хлорогеновая кислота улучшает обмен веществ, а аукубин оказывает мочегонное действие, тем самым способствуя снижению артериального давления. Кроме того, они обладают также тонизирующими свойствами, придают человеку бодрость, восстанавливают силы. Современная медицина с успехом применяет настой из коры этого дерева для укрепления нервной системы и лечения гипертонии. Ежегодная заготовка коры эвкоммии для лекарственных целей только в Китае составляет более 100...120 т. Почти вся она вывозится в страны Европы [11, 20].

Во Вьетнаме *E. ulmoides* была интродуцирована в 1958–1960 гг. Пробная посадка в г. Сапе провинции Лаокай дала хорошие результаты, что позволило ее размножить и посадить в других районах Вьетнама (Винь-Фу, Лай-Чау, Тхань Хоа, Гиа Лай, Лам Донг). В 2013 г. правительство Вьетнама утвердило «Генеральный план развития фармацевтической промышленности до 2020 года и ориентировочно до 2030 года» [18]. Согласно этому плану, эвкоммия вязолистная является одним из 36 видов ценных лекарственных растений, выращивание которых требуется для развития фармацевтической промышленности и медицины Вьетнама.

E. ulmoides выгодно отличается от большинства субтропических растений тем, что обладает морозоустойчивостью. На территории царской России в открытом грунте она впервые введена в культуру на Украине (Устимовский парк, около Кременчуга) и на Северном Кавказе (Майкоп). В этих условиях 2-летние саженцы выдерживали понижение температуры до $-33,8$ °C [3]. Положительные результаты по интродукции позволили культивировать ее за пределами влажных субтропиков. С середины XX в. она широко интродуцировалась в Краснодарском крае и Республике Адыгея и успешно адаптировалась в разных экологических условиях Северо-Западного Кавказа [10].

Экономическая, экологическая и социальная значимость размножения этой культуры чрезвычайно высока, так как создание плантаций и высокотехнологичных производств для получения посадочного материала предполагает новые рабочие места для местного населения. Возникающие трудности при традиционном семенном размножении эвкоммии вязолистной (двудомность вида, низкое качество пыльцы, партенокарпия, длительный покой семян, нерегулярность плодоношения, длительный ювенильный период) заставляют обращаться к современным биотехнологическим методам. Вегетативно ее разводят зелеными черенками или отводками. Рассматривая проблемы выращивания посадочного материала, следует сосредоточиться на высокоэффективных методах, обеспечивающих стабильное и массовое получение *E. ulmoides*. Важная роль принадлежит разработанной для конкретных целей регенерации растений *in vitro*. Эффективность использования методов биотехнологии связана с уменьшением сроков получения необходимого количества растений за счет высокого коэффициента размножения в культуре *in vitro*, а также с сокращением используемых площадей под коллекциями. Решение задачи расширения источников лекарственного растительного сырья путем выращивания культуры клеток и тканей на искусственных питательных средах является очень важным направлением исследований [4, 12, 15, 16, 19].

Формирование почек *in vitro* может происходить либо из первичного экспланта (прямая регенерация), либо из каллуса (побегообразование). В обоих случаях формируется большое количество регенератов, отличительной особенностью которых является отсутствие корней. Для получения полноценных растений необходим этап укоренения [6]. Один из определяющих факторов, индуцирующих эвокацию и дифференциацию тканей и морфогенез органов растений, – ауксин, однако в ряде случаев степень влияния и качественный характер дифференциации зависит от его взаимодействия с другими веществами, в частности с цитокининами [1, 5–7]. Высокое отношение концентрации ауксинов к цитокининам вызывает ризогенез, а низкое способствует появлению почек. Однако каждый вид растений (отдельный генотип) требует самостоятельного подбора соотношения фитогормонов для индукции морфогенеза. Поэтому в настоящее время подбор экзогенного баланса фитогормонов цитокининового и ауксинового рядов является единственно доступным способом индукции и регуляции морфогенеза [17].

Выделенные кусочки ткани или отдельные клетки растений помещают на искусственную питательную среду. Если растительную клетку изолировать, то в стерильных условиях на соответствующей питательной среде она снова начинает делиться, из нее может развиваться целый растительный организм. Процесс вторичной дифференцировки можно разделить на две фазы. Первая фаза – образование в массе однородных клеток очагов регенерационной меристемы и возникновение зародышевых структур (эмбриоидов), которые напоминают настоящие и имеют зачаточную почечку и зачаточный корешок. На второй фазе происходит рост этих зародышевых структур. При этом в зависимости от соотношения фитогормонов (ауксинов и цитокининов) наблюдается преимущественный рост тех или иных органов. Процессы дифференциации и формирования органов у растений связаны с синтезом, наличием, распределением и соотношением эндогенных фитогормонов [1, 5–7].

Тип морфогенеза определяется различием в балансе экзогенных гормонов цитокининового и ауксинового рядов [17].

В настоящей статье рассматриваются результаты исследований микро-размножения и культивирования растительного материала (микропобегов – микрочеренков) *E. ulmoides* на питательных средах с различным балансом фитогормонов (ауксинов и цитокининов) [17].

Основная цель исследований – разработка и совершенствование методов культуры *in vitro* для *E. ulmoides* в целях использования в системе сохранения и воспроизводства растительных ресурсов. В соответствии с поставленной целью изучалось влияние методов стерилизации и регуляторов роста на регенерационные процессы *E. ulmoides* на стадиях собственно размножения и укоренения.

Объекты и методы исследования

Отбор черенков эвкоммии вязолистной для экспериментов проводили в питомнике Вьетнамского государственного лесотехнического университета (г. Ханой). В питомнике маточная коллекция *E. ulmoides* выращена из семян, полученных из провинции Лайтяу. Черенки размером 5...7 см нарезали на начальных этапах сезонного развития *E. ulmoides*. В этот период их контаминация значительно меньше, а повышенный гормональный фон способствует более эффективному введению в культуру *in vitro*. Предпочтение отдавалось полуодревесневшим черенкам. Эксперименты по тканевой культуре проходили на базе Института биотехнологии Вьетнамского лесотехнического университета.

Молодые верхушечные побеги несколько раз промывали в разбавленном 5 %-м мыльном растворе, затем ополаскивали дистиллированной водой. После первого этапа стерилизации нарезанные черенки расчленяли в стерильных условиях на фрагменты размером 1,5...2,0 см, каждый из которых должен иметь лист и пазушную почку. Затем микропобеги (микрочеренки) сразу же стерилизовали путем погружения их в 70 %-й раствор этанола в течение 30 с и в 0,1 %-й водный раствор $HgCl_2$ на 4, 5, 6 и 7 мин. Далее фрагменты черенков 3 раза промывали стерильной водой и помещали на питательный 0,7 %-й агар.

Для культивирования эксплантов использовали среду Мурасиге–Скуга (MS) [16]. Содержание мезоинозита и витаминов в этой среде устанавливали согласно рекомендациям [8]. Синтетические цитокинины БАП (6-бензиламинопурин), кинетин (6-фурфурилметиламинопурин) и синтетические ауксины НУК (альфа-нафтилуксусная кислота), ИМК (индол-3-масляная кислота) добавляли в разных концентрациях. Тип и концентрацию регуляторов роста варьировали в зависимости от стадии размножения и варианта опыта. Перед добавлением гелеобразующего агента рН всех сред устанавливали на уровне 5,7.

Регенеранты выращивали в культивационном помещении при температуре 20...25 °С и круглосуточном освещении 1250...1500 лк. Количество образцов с регенерацией микропобегов подсчитывали на 21-й день после стерилизации, количество эксплантов с пролиферацией почки и микропобегов с корнями – на 28-й день культивирования на питательной среде.

Качество эксплантов определяли визуально: к хорошим побегам относили экземпляры с темно-зеленой окраской и толстым стеблем; к хорошим корням – толстые, твердые экземпляры с молочно-белой окраской. Высоту микропобегов и длину корней измеряли линейкой. Для расчета статистических показателей использовали дисперсионный анализ Краскела–Уолисса с применением программного обеспечения Statistica 12 [2].

Результаты исследования и их обсуждение

Влияние продолжительности стерилизации эксплантов *E. ulmoides* на способность к регенерации микропобегов. Для стерилизации растительного материала *E. ulmoides*, взятого из питомника (молодые верхушечные побеги), использовали 70 %-й этанол в течение 30 с и 0,1 %-й водный раствор $HgCl_2$ с экспозицией 4, 5, 6 и 7 мин. Для регенерации микропобегов применяли модифицированную питательную среду MS, содержащую 0,5 мг/л БАП. Результаты стерилизации и регенерации микропобегов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние продолжительности стерилизации растительного материала на регенеративную способность эксплантов

Продолжительность стерилизации		Количество образцов				
		всего, шт.	стерильных		с регенерацией микропобегов	
70 %-й этанол, с	0,1 %-й $HgCl_2$, мин		шт.	%	шт.	%
20	4	30	7	23,3	7	23,3
30	5	30	19	63,3	17	56,7
30	6	30	24	80,0	10	33,3
30	7	30	25	83,3	6	20,0

Примечание. Полужирным шрифтом выделены способы стерилизации, оптимальные для регенерации побегов.

Наивысшая частота регенерации побегов исследуемых образцов оказалась у эксплантов в варианте стерилизации с экспозицией 5 мин в 0,1 %-м растворе $HgCl_2$ – 56,7 %. Количество стерильных образцов в хорошем состоянии при этом способе составляло 63,3 %. Наиболее эффективной процедурой стерилизации стала последовательная обработка 70 %-м этанолом с экспозицией в течение 30 с и в 0,1 %-м растворе $HgCl_2$ с экспозицией 5 мин (рис. 1, а).

С ростом продолжительности стерилизации в $HgCl_2$ до 6...7 мин количество стерильных микропобегов увеличивается с 80,0 до 83,3 % соответственно, однако количество образцов, сохраняющих способность к регенерации микропобегов, уменьшается с 33,3 до 20,0 % соответственно. Наиболее низкими были показатели регенерации побегов на эксплантах растений в варианте стерилизации в 0,1 %-м растворе $HgCl_2$ продолжительностью 7 мин – 20,0 %.

Влияние регуляторов роста на способность к регенерации микропобегов у эксплантов *E. ulmoides*. Чтобы стимулировать регенерацию микропобегов *E. ulmoides* в среду MS добавляли синтетические цитокинины БАП, кинетин и синтетический ауксин НУК в разных концентрациях.

Результаты влияния регуляторов роста на способность к регенерации микропобегов у эксплантов представлены в табл. 2.

В вариантах с добавлением НУК в состав среды MS в концентрации 0,2 мг/л и при увеличивающейся концентрации БАП с 0,5 до 1,0 мг/л микропобеги, как правило, имеют жесткие и темно-зеленые листья, но высота побегов ниже, чем в варианте без НУК.

*a**б**в**г*

Рис. 1. Состояние эксплантов *E. ulmoides* после выращивания на различных вариантах питательных сред: *a* – регенерация микропобегов через 3 (слева) и 5 (справа) недель после помещения эксплантов на среду MS; *б* – адвентивное побегообразование на среде NC5; *в* и *г* – регенерация корней у эксплантов спустя 5 недель на среде R4

Fig. 1 Condition of the *E. ulmoides* explants after cultivation on different growth media: *a* – regeneration of microshoots 3 (left) and 5 (right) weeks after placing the explants on the Murashige and Skoog medium; *б* – adventive shoot formation on the NC5 medium; *в* and *г* – regeneration of the explant roots after 5 weeks on the R4 medium

Таблица 2
Влияние регуляторов роста на способность к регенерации микропобегов у экплантов *E. ulmoides*

Вариант	Регулятор роста, мг/л			Количество экплантов			Количество микропобегов, шт.	Коэффициент мультипликации микропобегов	Средняя высота микропобегов, см	Качество экплантов
	БАП	Кинетин	НУК	с пролиферацией почки		%				
				первичных, шт.	шт.					
NC1	0,5	–	–	30	10	33,3	42	1,4 ± 0,6	1,4 ± 0,4	Неудовл.
NC2	0,5	–	0,2	30	11	36,7	42	1,4 ± 0,6	1,5 ± 0,4	Неудовл.
NC3	0,7	–	–	30	25	83,3	69	2,3 ± 0,9	2,7 ± 0,8	Удовл.
NC4	0,7	–	0,2	30	27	90,0	75	2,5 ± 0,9	2,5 ± 0,7	Хорошее
NC5	1,0	–	–	30	30	100	171	5,7 ± 1,4	4,7 ± 0,9	Хорошее
NC6	1,0	–	0,2	30	30	100	135	5,0 ± 1,2	4,1 ± 0,8	Хорошее
NC7	1,2	–	–	30	28	93,3	102	4,4 ± 1,2	3,7 ± 0,8	Удовл.
NC8	1,2	–	0,2	30	27	90,0	93	4,3 ± 1,3	3,7 ± 0,6	Хорошее
NC9	–	0,5	–	30	10	33,3	42	1,4 ± 0,8	1,2 ± 0,3	Неудовл.
NC10	–	0,5	0,2	30	8	26,7	39	1,3 ± 0,8	1,3 ± 0,4	Неудовл.
NC11	–	1,0	–	30	12	40,0	45	1,5 ± 0,8	1,0 ± 0,5	Неудовл.
NC12	–	1,0	0,2	30	15	50,0	51	1,7 ± 1,1	1,2 ± 0,5	Неудовл.
NC13	0,5	0,2	–	30	22	73,3	60	2,0 ± 0,8	2,5 ± 0,6	Удовл.
NC14	0,7	0,2	–	30	24	80,0	66	2,2 ± 0,8	2,8 ± 0,6	Удовл.
NC15	1,0	0,2	–	30	25	83,3	111	3,7 ± 1,4	2,9 ± 0,8	Удовл.
NC16	1,2	0,2	–	30	28	93,3	78	2,6 ± 0,9	2,8 ± 0,8	Удовл.

Применения: NC1–NC16 – варианты состава регуляторов роста, полужирным шрифтом выделены варианты среды, оптимальные для формирования почек.

Варианты с добавлением кинетина в концентрациях 0,5...1,0 мг/л (NC9–NC12) не пригодны для инициации регенерации микропобегов. Даже добавление в этом случае ауксина в концентрации 0,2 мг/л не улучшает их регенерацию. У побегов было много каллусной ткани, количество эксплантов, давших пролиферацию почки (26...50 %), и коэффициенты размножения (мультипликации) микропобегов (1,3–1,7 раза) были низкими. В этих вариантах наблюдалось плохое качество почек, чахлые побеги, короткие и желтовато-зеленые листья.

В вариантах (NC1–NC8) с добавлением БАП и НУК в разных концентрациях коэффициент мультипликации микропобегов колеблется в пределах 1,4–5,7, а количество эксплантов, давших пролиферацию почки, самое высокое (33...100 %). В этих вариантах экспланты крепкие и темно-зеленые (рис. 1, б).

В варианте NC5 (MS + 1 мг/л БАП) количество эксплантов, давших пролиферацию почки, составляет 100 %, коэффициент размножения побегов – 5,7, побеги хорошо развиты (зеленые, высотой 4,7 см). Этот вариант оптимален для формирования почек. В варианте NC6 (MS + 1 мг/л БАП + 0,2 мг/л НУК) коэффициент размножения микропобегов составляет 5,0, высота микропобегов – 4,1 см, количество листьев в среднем – 8,2 шт./микропобег, микропобеги хорошего состояния, большие и объемные.

В вариантах (NC13–NC16) с добавлением БАП и кинетина в разных концентрациях коэффициент мультипликации колеблется в пределах 2,0–3,7, количество эксплантов, давших пролиферацию почки, достигало 73...93 %. В этих вариантах отмечалось среднее качество почек и желтовато-зеленая окраска листьев. Однако количество эксплантов, давших пролиферацию почки, коэффициент размножения побегов и качество эксплантов уступают варианту только с добавлением БАП. Таким образом, можно считать, что добавление кинетина не подходит для улучшения способности к регенерации микропобегов у эксплантов *E. ulmoides*.

Влияние состава среды на количество и высоту микропобегов достоверно на уровне значимости 0,05 (рис. 2).

Питательные среды в вариантах NC5 (MS + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара + 1 мг/л БАП) и NC6 (MS + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара + 1 мг/л БАП + 0,2 мг/л НУК) являются лучшими для размножения микропобегов эвкоммии (см. рис. 1, б).

Влияние ауксинов на регенерацию корней у эксплантов *E. ulmoides*. На неразбавленной питательной среде MS с добавкой ИМК и НУК в разных концентрациях экспланты не укоренялись. При этом интенсивно разрасталась каллусная ткань, что способствовало регенерации побегов из каллуса. В некоторых вариантах в месте соприкосновения листа и питательной среды разрасталась каллусная ткань и из каллуса развивались корни. Поэтому опыты по укоренению микропобегов проводили на разбавленной питательной среде – 2/3 MS.

Нормально развитые микропобеги с хорошей пигментацией, высотой 3 см высаживали на питательную среду 2/3 MS с добавлением ауксинов ИМК и НУК в различных концентрациях. Через 4 недели наблюдали регенерацию корней у опытных эксплантов. Результаты зависимости регенерации корней у эксплантов от добавления ауксина приведены в табл. 3.

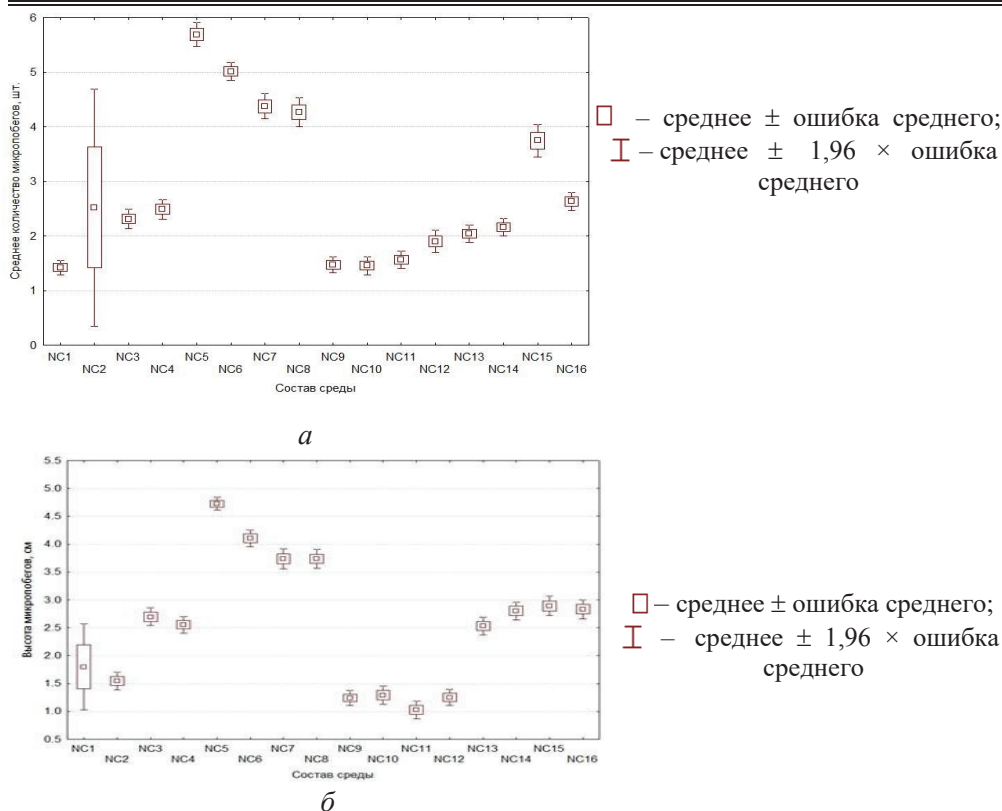


Рис. 2. Различия между образцами состава среды (NC1–NC15) по количеству (а) и высоте (б) микропобегов

Fig. 2. Differences between samples of the medium composition (NC1–NC15) in terms of the number of microshoots (a) and their height (b)

Таблица 3

Влияние ауксинов на регенерацию корней у эксплантов *E. ulmoides*

Вариант	Ауксин, мг/л		Количество микропобегов с корнями, %	Среднее количество корней на побеге, шт.	Средняя длина корня, см	Качество корней
	НУК	ИМК				
R1	0	0	0	0	0	–
R2	0,5	0	10	0,8	0,8	Удовл.
R3	1,0	0	40	1,0	0,9	Удовл.
R4	1,5	0	100	2,9	1,8	Хорошее
R5	2,0	0	70	2,9	1,3	Хорошее
R6	1,0	0,2	70	2,2	1,2	Хорошее
R7	1,0	0,4	90	2,5	2,0	Хорошее
R8	1,5	0,2	90	2,3	1,4	Хорошее
R9	1,5	0,4	70	2,1	1,2	Удовл.
R10	0	0,5	0	0	0	–
R11	0	1,0	0	0	0	–
R12	0	1,5	0	0	0	–
R13	0	2,0	0	0	0	–

Примечание. Полужирным шрифтом выделены варианты среды, оптимальные для формирования корней.

На среде 2/3 MS с добавкой НУК в разных концентрациях (варианты R1–R5) количество эксплантов, регенерирующих корни, составляло 10...100 %. В варианте R4 на питательной среде 2/3MS + 1,5 мг/л НУК количество эксплантов, регенерирующих корни, – 100 %, среднее количество корней – 2,9/побег, средняя длина корня – 1,8 см, качество корней хорошее.

В вариантах (R6–R9) на питательной среде 2/3MS с добавкой ИМК и НУК в разных концентрациях количество эксплантов, регенерирующих корни, составляет 70...90 %. В варианте R7 на питательной среде 2/3MS + 1 мг/л НУК + 0,4 мг/л ИМК количество эксплантов, регенерирующих корни, – 90 %, среднее количество корней – 2,5/побег, средняя длина корня – 2,0 см, качество корней хорошее.

На среде 2/3 MS с добавкой ИМК в разных концентрациях (варианты R10–R13) микропобеги не укоренялись, а каллусная ткань развивалась очень сильно, что способствовало более активному росту адвентивных побегов эксплантов.

Различия между образцами состава среды по количеству корней на побег и длине корня достоверны на уровне значимости 0,05 (рис. 3).

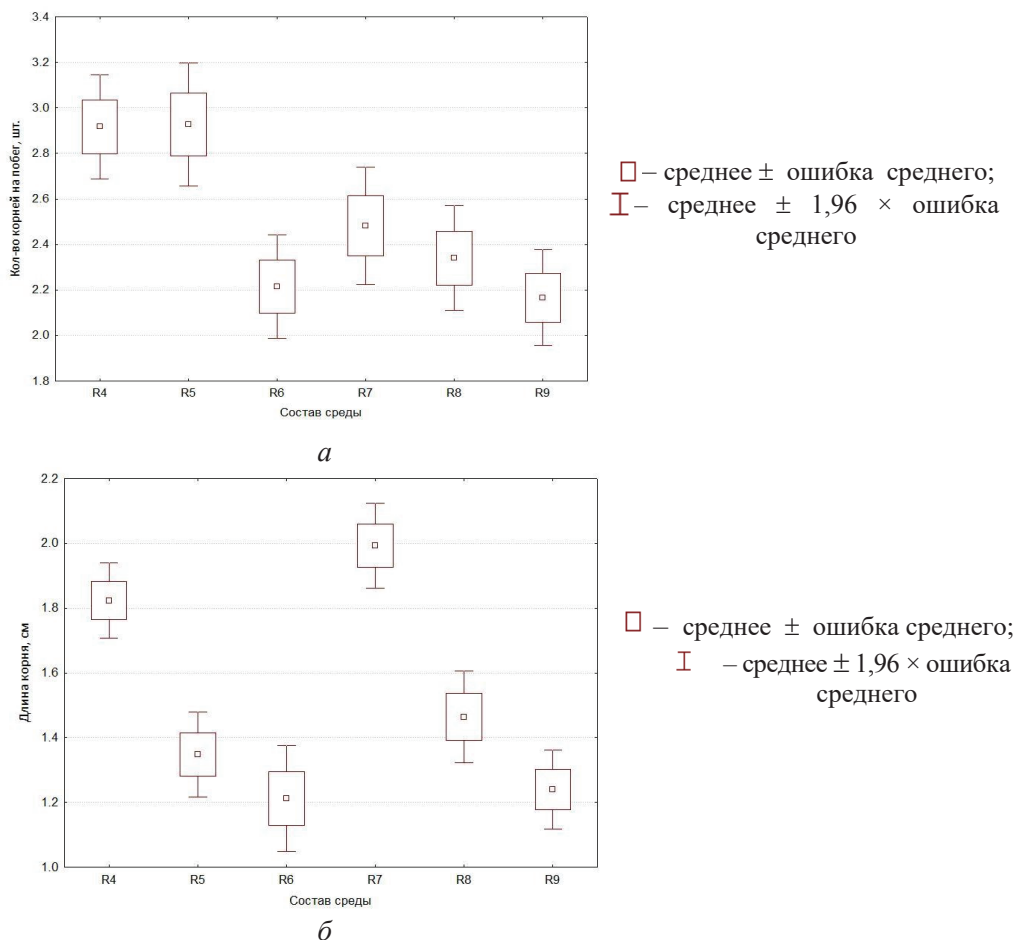


Рис. 3. Различия между образцами состава среды (NC1–NC15) по количеству (а) и длине (б) корней на побег

Fig. 3. Differences between samples of the medium composition (NC1–NC15) in terms of the number (а) and length (б) of roots per shoot

Питательные среды в вариантах R4 (2/3MS + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара + 1 мг/л НУК) и R7 (2/3MS + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара + 1 мг/л НУК + 0,4 мг/л ИМК) являются лучшими для регенерации корней у эксплантов *E. ulmoides* (см. рис. 1, в, з).

Выводы

1. Лучшей процедурой для стерилизации растительного материала (молодые верхушечные побеги) эвкоммии вязолистной является погружение материала в 70 %-й этанол на 30 с, затем в 0,1 %-й HgCl_2 на 5 мин. Частота регенерации микропобегов составила 56,7 % при их стерильности 63,33 %.

2. Определен оптимальный состав питательной сред для микро-размножения *Eucottia ulmoides* на основе среды Мурасиге–Скуга [16]: MS + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара + 1 мг/л БАП; MS + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара + 1 мг/л БАП + 0,2 мг/л НУК.

3. Питательные среды 2/3MS + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара + 1 мг/л НУК и 2/3MS + 30 г/л сахарозы + 7 г/л агара + 1 мг/л НУК + 0,4 мг/л ИМК являются лучшими из протестированных для регенерации корней эвкоммии вязолистной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В., Мейчик Н.Р., Носов А.М., Полесская О.Г., Харитонашвили Е.В., Чуб В.В. Физиология растений / под ред. И.П. Ермакова. 2-е изд., испр. М.: ИЦ Академия, 2007. 640 с. [Alekhina N.D., Balnokin Yu.V., Gavrilenko V.F., Zhigalova T.V., Meychik N.R., Nosov A.M., Poleskaya O.G., Kharitonashvili E.V., Chub V.V. *Plant Physiology*. Ed. by I.P. Ermakova. Moscow, Akademiya Publ., 2007. 640 p.]

2. Бондаренко А.С., Жигунов А.В. Статистическая обработка материалов лесоводственных исследований. СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2016. 125 с. [Bondarenko A.S., Zhigunov A.V. *Statistical Processing of Forestry Research Materials*. Saint Petersburg, Politechpress Publ., 2016. 125 p.]

3. Деревья и кустарники СССР / под ред. С.Я. Соколова. Л.: Изд-во АН СССР, 1954. Т. 3. 872 с. [*Trees and Shrubs of the USSR*. Ed. by S.Ya. Sokolov. Leningrad, AN SSSR Publ., vol. 3, 1954. 872 p.]

4. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. Киев: Наук. думка, 1992. 232 с. [Kalinin F.L., Kushnir G.P., Sarnatskaya V.V. *Technology of Microclonal Propagation of Plants*. Kiev, Naukova Dumka Publ., 1992. 232 p.]

5. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. 2-е изд. СПб.: СПбГУ, 2010. 240 с. [Lutova L.A. *Biotechnology of Embryophyta*. Saint Petersburg, SPbU Publ., 2010. 240 p.]

6. Лутова Л.А., Матвеева Т.В. Генная и клеточная инженерия в биотехнологии высших растений / под ред. И.А. Тихоновича. СПб.: Эко-Вектор, 2016. 168 с. [Lutova L.A., Matveeva T.V. *Genetic and Cellular Engineering in Biotechnology of Embryophyta*. Ed. by I.A. Tikhonovich. Saint Petersburg, Eco-Vector Publ., 2016. 168 p.]

7. Медведев С.С. Физиология растений. СПб.: БХВ-Петербург, 2013. 512 с. [Medvedev S.S. *Plant Physiology*. Saint Petersburg, BHV-Peterburg Publ., 2013. 512 p.]

8. Никитина В.В., Вишневецкая М.С. Селекция растений. Культивирование изолированных тканей и органов растений в условиях *in vitro*. СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2015. 32 с. [Nikitina V.V., Vishnevskaya M.S. *Plant Breeding. Cultivation of Isolated Tissues and Organs of Plants in vitro*: Workshop. Saint Petersburg, Politechpress Publ., 2015. 32 p.]

9. Тахтаджян А.Л. Происхождение и расселение цветковых растений Л.: Наука, 1970. 155 с. [Takhtadzhyan A.L. *The Origin and Distribution of Flowering Plants*. Leningrad, Nauka Publ., 1970. 155 p.].

10. Триль А.В. Эколого-биологические особенности эвкоммии вязолистной *Eucommia ulmoides* Oliv., интродуцированной на Северо-Западном Кавказе, и перспективы ее использования: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Майкоп, 2005. 22 с. [Tril' A.V. *Ecological and Biological Features of Eucommia ulmoides* Oliv. Introduced in the Northwest Caucasus and Prospects for Its Use: Cand. Agric. Sci. Diss. Abs. Maikop, 2005. 22 p.].

11. Эвкоммия вязолистная (*Eucommia ulmoides*) // Материалы сайта ООО «Фирма «Здоровье». Режим доступа: <http://lektrava.ru/encyclopedia/evkommiya-vyazolistnaya/> (дата обращения: 22.01.20) [*Eucommia ulmoides*. Materials of the Site ООО Firma Zdorovye].

12. Chen L.-J., Hu T.-W., Huang L.-C. A Protocol toward Multiplication of the Medicinal Tree, *Eucommia ulmoides* Oliver. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 1995, vol. 31, pp. 193–198. DOI: [10.1007/BF02632020](https://doi.org/10.1007/BF02632020)

13. Hu D., Yang Z. Study Seed Germination and Seedling Growth *Eucommia ulmoides*. *Bulletin of Plant Physiology*, 1955, vol. 6, p. 1.

14. Li Y., Zhang Z.-H., Ma X.-H. Effects of Medium Concentration on Callus Growth and Secondary Metabolites of *Eucommia ulmoides*. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2004, vol. 22, iss. 4, pp. 359–363.

15. Li Z., Wang D., Jiang Z., Tang R. Effects of Basic Media and Culture Conditions on Growth of Calluses and Production of Secondary Metabolites of *Eucommia ulmoides*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2004, vol. 24, iss. 10, pp. 1912–1916.

16. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, vol. 15, iss. 3, pp. 473–497. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)

17. Skoog F., Miller C.O. Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissue Cultures *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 1957, vol. 11, pp. 118–131.

18. The Prime Minister Decision No. 1976/QĐ-TTg of October 30, 2013, Approving the Master Plan on Medicinal Plant Development through 2020, with Orientations toward 2030. *Vietnam Law & Legal Forum*, 2013, iss. Nos 09-10, pp. 19–30.

19. Wang D., Wang Y., Li G., Li Z. Du zhong yu zhong yan jiu jin zhan – 杜仲育种研究进展 [Research Process of Breeding *Eucommia ulmoides*]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2014, iss. 8, pp. 7–10.

20. Cây đở trọng và công dụng của cây đở trọng. *Materials of the Site Y KHOA VIỆT*. Available at: <http://ykhoaviet.vn/cay-do-trong-va-cong-dung-cua-cay-do-trong-6481.html> (accessed 22.01.20).

INTRODUCTION OF *Eucommia ulmoides* Oliv. TO *IN VITRO* CULTURE

A.V. Zhigunov, Doctor of Agriculture, Prof.; ResearcherID: [AAK-8124-2020](https://orcid.org/0000-0001-8707-7526);

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8707-7526>

Q.T. Nguyen, Postgraduate Student; ResearcherID: [AAK-8702-2020](https://orcid.org/0000-0003-2749-2087);

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2749-2087>

St. Petersburg State Forest Engineering University named after S.M. Kirov, Institutskiy per., 5, Saint Petersburg, 194021, Russian Federation; e-mail: a.zhigunov@bk.ru

The increasing need for herbal medicines requires the study of not only biological resources of medical plants, but also methods for their reproduction. Of special value are the medicinal plants that have a long history of success in traditional medicine. One of such plants is

Eucommia ulmoides Oliv., which belongs to a rare relict species growing in natural conditions, for the most part, in the undergrowth of humid subtropical forests in China, mainly in the middle course of the Yangtze river. *E. ulmoides* compares favorably with most subtropical plants owing to its significant frost resistance, which makes it possible to cultivate it outside the humid subtropics. It has been widely introduced in Krasnodar Krai and in the Republic of Adygea (Russia) since the mid-20th century and successfully adapted to various environmental conditions in the Northwest Caucasus. The increasing demand for *E. ulmoides* bark can only be satisfied by laying out industrial plantations. However, the difficulties encountered in the traditional seed reproduction of *E. ulmoides* (dioecious species, pollen low quality, parthenocarpy, prolonged seed dormancy, irregular fruiting, long juvenile period, etc.) make scientists turn to modern biotechnological methods of plant propagation. While considering cultivation of planting material, we should focus on highly efficient methods that ensure stable and mass reproduction of the plants under study. An important role is played here by *in vitro* plant regeneration. The effectiveness of biotechnology methods is due to a reduction in timing of obtaining a large number of vegetative progeny of plants difficult for propagation, as well saving of the area required for their cultivation. The conditions for producing an aseptic culture of *E. ulmoides* were chosen based on the results of the studies. The highest degree of sterilization of *E. ulmoides* shoot segments was achieved when the explants were sequentially immersed first in 70 % ethanol (30 s) and then in 0.1 % mercuric chloride solution (5 min). With such a sterilization procedure, 63.3 % of the studied cuttings were made sterile, and 56.7 % of them proved to be viable. The optimal composition of the nutrient medium for regeneration of *E. ulmoides* microshoots has been determined: MS medium complemented with 1 mg/L 6-Benzylaminopurine (BAP) + 0.2 mg/L 1-Naphthaleneacetic acid (NAA). The best media for explant rooting are the following: 2/3 MS + 1.5 mg/L NAA + 30 g sucrose + 7 g agar; 2/3 MS + 1 mg/L NAA + 0.4 mg/L IBA + 30 g sucrose + 7 g agar.

For citation: Zhigunov A.V., Nguyen Q.T. Introduction of *Eucommia ulmoides* Oliv. to *in vitro* Culture. *Lesnoy Zhurnal* [Russian Forestry Journal], 2020, no. 5, pp. 38–50. DOI: 10.37482/0536-1036-2020-5-38-50

Keywords: *Eucommia ulmoides* Oliv., microclonal propagation, microshoot, sterilization, regeneration, growth regulator.

Поступила 22.01.20 / Received on January 22, 2020
