

УДК 581.121.1.

## ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ КАТРАНА БУГОРЧАТОГО *IN VITRO*

Магомедалиева В.К.

Дагестанский государственный университет, e-mail: [taminamariamka@mail.ru](mailto:taminamariamka@mail.ru)

Изучено действие NaCl (0,5; 1%) и ПЭГ (5%) на прорастание семян, морфогенез узловых и листовых эксплантов. Концентрация NaCl (1%) полностью подавляет всхожесть семян катрана бугорчатого, а вариант 0,5% характеризовался процессами роста и морфогенеза у прорастающих семян. ПЭГ 5% подавляет ризогенез, побегообразование и закладку почек у прорастающих семян. У узловых и листовых NaCl (0,5; 1%) подавляет морфогенез и приводит к их отмиранию. ПЭГ (5%), как и NaCl (0,5; 1%), губительно действует на узловые и листовые экспланты катрана бугорчатого. Узловые экспланты характеризуются отмиранием, а выживаемость листовых эксплантов составила 20% без роста и морфогенеза. Действие БАП (0,5 и 5 мг/л) на узловые, листовые и корневые экспланты катрана бугорчатого характеризовалось 100%-й выживаемостью и ростом (0,5 мг/л). Однако у узловых эксплантов в отличие от листовых наблюдалась закладка почек и рост побегов (100%). БАП (5 мг/л) губителен для узловых эксплантов, но стимулирует рост листовых эксплантов и отмечен частичным некрозом раневой поверхности. У корневых эксплантов наблюдалась закладка почек и рост побегов. Итак, разработана методика *in vitro* тканей катрана бугорчатого и оценка устойчивости к стрессам, определен гормональный состав питательной среды для роста и морфогенеза у эксплантов побегов и семян катрана бугорчатого.

**Ключевые слова:** культура тканей, *in vitro*, клональное размножение, редкие и исчезающие виды растений, катран бугорчатый

## FEATURES OF MORPHOGENESIS AND REGENERATION CRAMBE GIBEROSA *IN VITRO*

Magomedalieva V.K.

Dagestan State University, e-mail: [taminamariamka@mail.ru](mailto:taminamariamka@mail.ru)

Studied the effect of NaCl (0,5; 1%) and PEG (5%) on seed germination, morphogenesis of node and leaf explants. NaCl concentration (1%) completely inhibits germination *Crambe giberosa*, and the version – 0,5% was characterized by processes of growth and morphogenesis in germinating seeds. 5% PEG suppressed rhizogenesis, shoot formation and bookmark kidney germinating seeds. At node and leaf NaCl (0,5; 1%) inhibits morphogenesis and leads to death of them. PEG (5%) as NaCl (0,5% of 1%) detrimental effect on the node and leaf explants *Crambe giberosa*. Nodal explants were characterized by withering away, and leaf explants of survival was 20% with no growth and morphogenesis. Action BAP (0,5 and 5 mg /l) on the node, leaf and root explants were characterized by lumpy Dogfish 100% -s' survival and growth (0,5 mg /l). However, nodal explants, in contrast to the sheet, there was a tab kidney and shoot growth (100%). BAP (5 mg /l) is harmful to the nodal explants, but stimulates the growth of leaf explants and partial necrosis of the wound. At the root explants were observed laying the growth of shoots and buds. So, the technique of *in vitro* tissue *Crambe giberosa* and evaluation of resistance to stress, hormonal determination of nutrient medium for the growth and morphogenesis in explants of shoots and seeds *Crambe giberosa*.

**Keywords:** Culture of tissues, *in vitro*, clonal reproduction, rare and vanishing species of plants, *Crambe giberosa*

В настоящее время происходит стремительное сокращение ареалов распространения и полное исчезновение редких видов растений. В связи с этим возникла необходимость разработки методов воспроизведения, сохранения и поддержания биологического разнообразия [1] путем использования методов биотехнологии для воспроизведения редких растений [2].

К редким растениям, нуждающимся в охране и репродукции, в Дагестане относится катран бугорчатый (*Crambe giberosa*) со второй категорией редкости [3]. Это многолетний, травянистый, степной гемикриптофит, обитающий в сухих степях, на каменистых склонах. Лимитирующими факторами для вида является малочисленность популяции из-за выпаса скота, хозяйственного освоения местности. Он занесен в Красную книгу Ставропольского края (2002). В условиях *ex situ* испытывается

в Горном ботаническом саду ДНЦ РАН. Необходимо выявление состояния популяций для создания специализированного ООПТ.

**Целью работы** была разработка методики выведения *in vitro* катрана бугорчатого и оценка стрессоустойчивости с использованием методов биотехнологии.

### Материалы и методы исследования

Исходным материалом для введения в культуру *in vitro* катрана бугорчатого служили семена и зеленые побеги с растений ценопопуляции Талгинского ущелья, предоставленные сотрудниками кафедры ботаники ДГУ. Стерилизацию зеленых побегов проводили в несколько этапов. Предварительно побеги замачивали в мыльной воде с добавлением 2–3 капель твин-80 в течение 10–15 минут, почистив их, несколько раз промывали водопроводной и 2–3 раза – дистиллированной водой. Перед стерилизацией в течение 8 минут в 0,1%-м растворе сулемы (HgCl<sub>2</sub>) зеленые побеги разрезали на небольшие части и парафинировали срезы для предотвращения попадания в ткани стерилизующего агента. После стерилизации экспланты побегов промывали в дистиллированной

воде поочередно в течение 5, 10 и 15 минут. Узловые экспланты помещали на питательную среду Мурасиге – Скуга (МС). Асептику обеспечивали по общепринятой методике в условиях ламинар-бокса [4, 5].

Семена катрана бугорчатого вводили в культуру *in vitro* двумя способами. В первом случае их перед стерилизацией очищали только от скорлупы (перикарп), а во втором – очищали не только от скорлупы, но и от семенной кожицы. Для стерилизации семена помещали в 70% спирт на 1 минуту, после на 10 минут – в 3% перекись водорода.

Культивирование узловых эксплантов и семян проводили в условиях 16-часового фотопериода, при температуре 23–25 °С на среде Мурасиге–Скуга (МС) с добавлением регуляторов роста ИМК и БАП, соли NaCl разной концентрации и полиэтиленгликоля (ПЭГ). Для предотвращения грибковой инфекции в среду добавляли флуконазол (50 мг/50 мл на 100 мл среды 0,5 мл раствора) [6].

Жизнеспособность эксплантов оценивали по показателям выживаемости (% выживших от общего числа эксплантов в варианте), каллусо- и корнеобразованию, визуально по мощности развития каллуса (начало закладки – 1 балл, слабое покрытие каллусом раневой поверхности – 2 балла, мощное ее покрытие – 3 балла).

### Результаты исследования и их обсуждения

Экспланты зеленых побегов катрана бугорчатого характеризовались очень низкой жизнеспособностью по сравнению с семенами, отличающимися высокой всхожестью и хорошим ростом. Культивировали узловые экспланты зеленых побегов на среде МС с добавлением ИМК (0,5 мг/л) и БАП (2,5 мг/л). Повторность опыта двукратная.

На 5–7 сутки культивирования все экспланты стали коричневыми. Прорастание у семян в варианте 2 (без покровов) наблюдалось на 6–7 сутки культивирования. На 30 сутки из всех культивированных семян (100%) формировались полноценные проростки с хорошо развитым побегом и корневой системой. У семян в варианте 1 (с семенной кожицей) не обнаружен рост даже на 90 сутки (табл. 1). Поэтому все основные исследования в дальнейшем проводились на семенах с очищенной семенной кожицей.

**Таблица 1**

Жизнеспособность семян катрана при культивировании на среде МС + ИМК (0,5 мг/л) и БАП (2,5 мг/л) без очистки (А) и с очисткой (Б) семенной кожицы

Семена	Сутки	Прорастание, %	Рост		Морфогенез, %		
			%	балл	корни	почки	побеги
А	90	0	0	0	0	0	0
Б	30	100	100	3	100	100	100

Изучение влияния регуляторов роста на прорастание семян проводилось по четы-

рем вариантам на питательной среде МС (табл. 2).

**Таблица 2**

Влияние гормонального состава питательной среды МС на прорастания семян катрана бугорчатого

Варианты	Прорастание		Рост		Морфогенез, %	
	сутки	%	%	балл	корни	побеги
1	7	100	100	3	100	100
2	10	100	100	3	100	100
3	10	75	0	0	0	0
4	10	88	0	0	0	0

**Примечание.** Варианты культивирования: среда МС + ИМК (0,5 мг/л) и БАП (2,5 мг/л) (1); МС + БАП (0,5 мг/л) (2); МС (3); МС + ИМК (0,5 мг/л) (4)

Изучено влияние NaCl (0,5 и 1%) и ПЭГ (5%) на прорастание семян катрана бугорчатого (табл. 3). На 14 сутки по всем вариантам отмечено прорастание семян. Однако следует отметить, что варианты отличались реализацией регенерационного потенциала и морфогенеза. Так, на 14 сутки у проросших семян ризогенез наблюдался только в контрольном варианте (100%) и в варианте с NaCl 0,5% (60%), а в варианте с ПЭГ 5%, где так же, как и в других вариантах

наблюдалось прорастание семян, но без закладки корней даже на 60 сутки.

Уже на 60 сутки культивирования было четко видно количество проросших семян и процессы их морфогенеза (ризогенез, закладка почек и побегообразование) в зависимости от варианта среды. В контроле на 60 сутки у всех проросших семян отмечены закладка почек и побегообразование, тогда как у семян варианта с NaCl (0,5%) – у 80%, а варианта с ПЭГ (5%) – только у 30%.

Таблица 3

Жизнеспособность семян катрана бугорчатого на 14(а) и 60 (б) сутки их культивирования

Варианты	Сроки прорастания, сутки	Прорастание, %	Рост		Морфогенез, %		
			%	балл	корни	почки	побеги
1	а	100	100	3	100	0	100
	б	100	100	3	100	100	100
2	а	80	80	2,5	60	0	80
	б	80	80	2,5	80	80	80
3	а	0	0	0	0	0	0
	б	0	0	0	0	0	0
4	а	60	60	2	0	0	30
	б	60	60	2	0	30	30

Примечание. Варианты культивирования: среда МС + ИМК и БАП – контроль (1); МС + ИМК и БАП + NaCl 0,5% (2); МС + ИМК и БАП + NaCl 1% (3); МС + ИМК и БАП + ПЭГ (5%) (4)

Также изучена жизнеспособность узловых и листовых эксплантов катрана бугорчатого на среде МС с добавлением разных концентраций ИМК, БАП, NaCl и ПЭГ (табл. 4). Так, на 10 сутки культивирования у узловых и листовых эксплантов в контроле выживаемость составила 100%, у всех эксплантов наблюдался интенсивный рост (100%). Процессы морфогенеза (закладка почек и побегообразование) происходили только на узловых эксплантах (100%), а каллусогенез отсутствовал как на листо-

вых, так и на узловых эксплантах. Устойчивость узловых и листовых эксплантов к действию NaCl (0,5 и 1%) и ПЭГ – (5%) оценивали добавлением их в питательную среду МС. Узловые и листовые экспланты на 10 сутки в варианте МС с NaCl (0,5%) сохранили зеленую окраску и высокую жизнеспособность. Однако процессы роста, каллусогенеза и морфогенеза отсутствовали, а на 60 сутки наблюдалась гибель (100%) как узловых, так и листовых эксплантов.

Таблица 4

Жизнеспособность узловых (а), листовых (б) и корневых (в) эксплантов катрана бугорчатого

Вариант среды	Экспланты	Сроки культивирования, сутки	Выживаемость, %	Рост		Морфогенез, %		
				%	балл	корни	почки	побеги
I	а	10	100	100	3	0	100	100
	б	10	100	100	3	0	0	0
II	а	10	100	0	0	0	0	0
		60	0	0	0	0	0	0
	б	10	100	0	0	0	0	0
		60	0	0	0	0	0	0
III	а	10	0	0	0	0	0	0
	б	10	0	0	0	0	0	0
IV	а	10	100	0	0	0	0	0
		60	0	0	0	0	0	0
	б	10	100	0	0	0	0	0
		60	20	0	0	0	0	-0
V	а	30	100	100	3	0	100	100
	б	30	100	100	3	0	0	0
VI	а	20	0	0	0	0	0	0
	б	20	60	100	2,5	0	0	0
	в	25	30	0	0	0	100	100

Примечание. Узловые и листовые экспланты стерильных побегов катрана бугорчатого на среде МС + ИМК (0,5 мг/л) и БАП (2,5 мг/л) (Iа,б); МС + ИМК (0,5 мг/л) и БАП (2,5 мг/л) + NaCl (0,5%) (IIа, б), МС + ИМК (0,5 мг/л) и БАП (2,5 мг/л) + NaCl (1%) (III а, б), МС + ИМК (0,5 мг/л) и БАП (2,5 мг/л) + ПЭГ (5%) (IV а,б), МС + БАП (0,5 мг/л) (Va, б). МС + БАП (0,5 мг/л) (VI а, б, в).

На среде МС с NaCl 1% уже на 10 сут-ки отмечалась 100%-я гибель узловых и ли-стовых эксплантов. Они в варианте с ПЭГ (5%), характеризовались 100% -й выживаемостью без ростовых процессов. На 60 сут-ки отмечен отмирание узловых эксплантов, тогда как выживаемость листовых составила 20%. Листовые экспланты и на 60 сутки сохранили зеленую окраску, хотя нередко отмечались почернение и высыхание листо-вой пластинки (рис. 1). Несмотря на слабую выживаемость листовых эксплантов (в от-личие от узловых) на среде МС с ПЭГ (5%), у них не наблюдался рост, закладка каллуса, почек и корней.

Наряду с изучением воздействия NaCl и ПЭГ на узловые и листовые экспланты катрана бугорчатого было исследовано вли-

яние на них БАП (0.5 и 5 мг/л). И узловые, и листовые экспланты на среде МС с БАП (0,5 мг/л) на 30 сутки характеризовались высокой выживаемостью и ростом (100%). Однако у узловых эксплантов наблюдалась закладка почек и рост побегов (100%). На среде МС с БАП (5 мг/л) на 20 сутки куль-тивирования листовые экспланты отмерли, тогда как выживаемость листовых составила 60%. Они характеризовались высокими показателями роста (100%) без морфогене-за (рис. 2, а). Листовые хотя и имели зе-леную окраску, отмечались некрозы на ране-вой поверхности (рис. 2, б). На 25 сутки культивирования у корневых эксплантов на среде МС с цитокининами в концентрации 5 мг/л наблюдали закладку адвентивных по-чек и рост побегов (рис. 3).

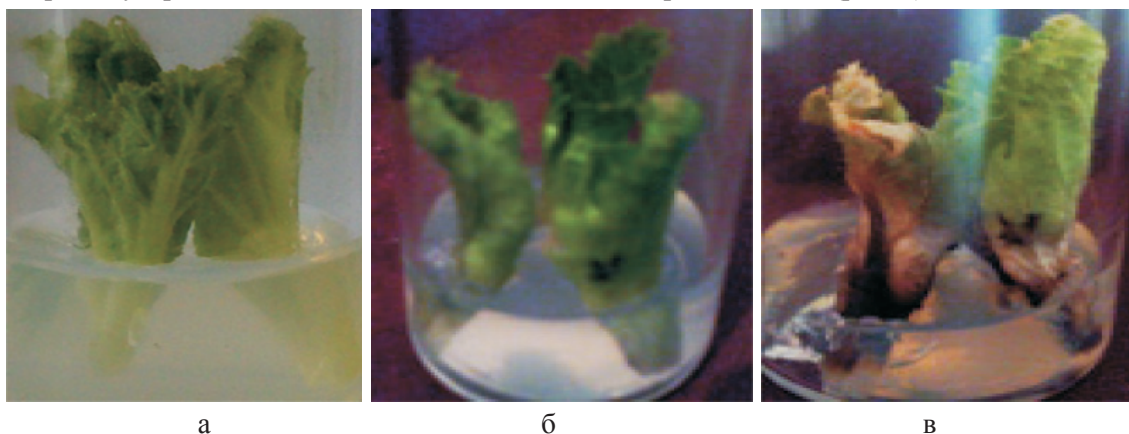


Рис. 1. Листовые экспланты стерильных побегов катрана бугорчатого, проросших из семян, при посадке (а) на 10 (б), 60 (в) сутки культивирования на среде МС + ИМК (0,5 мг/л) и БАП (2,5 мг/л) + ПЭГ 5%

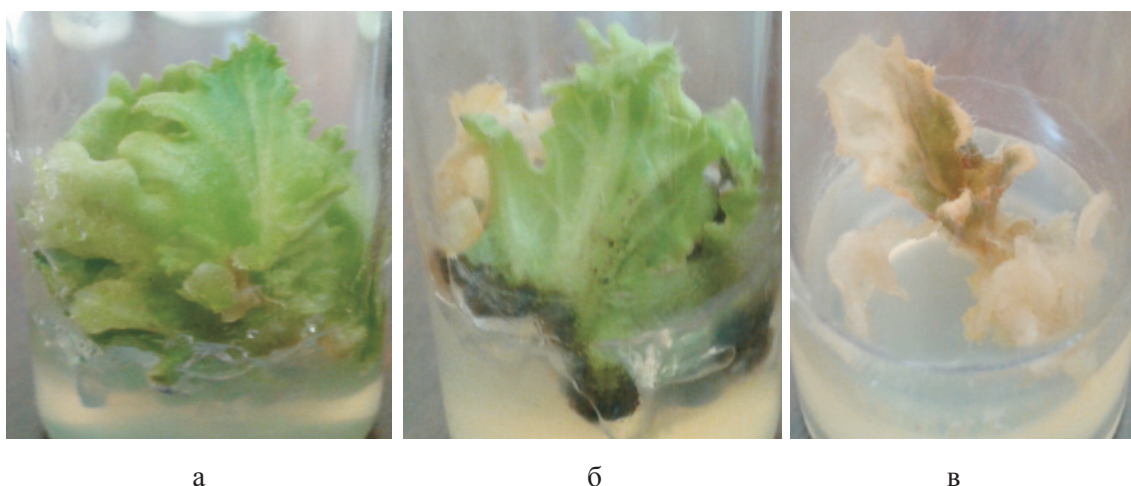


Рис. 2. Листовые (а, б, в) экспланты стерильных побегов катрана бугорчатого, проросших из семян на 20 сутки на среде МС + БАП (5 мг/л)

**Выводы**

Высокая всхожесть семян (100%) у *Crambe giberosa* достигается скарифика-

цией, что свидетельствует о покое при со-противлении покровов семени. Его снятие ведет к повышению всхожести семян.





Рис. 3. Корневые экспланты стерильных побегов катрана бугорчатого на 25 сутки на среде МС + БАП (5 мг/л)

Выявлена зависимость прорастания семян от наличия в среде регуляторов роста ИМК и БАП. В среде с содержанием гормонов прорастание наблюдалось у 100% культивированных семян, а без них – у 25%.

Изучено действие NaCl (0,5; 1%) и ПЭГ (5%) на прорастание семян, морфогенез узловых и листовых эксплантов. Концентрация NaCl (1%) полностью подавляет всхожесть семян катрана бугорчатого, а вариант 0,5% характеризовался процессами роста и морфогенеза у прорастающих семян. ПЭГ 5% подавлял ризогенез, побегообразование и закладку почек у прорастающих семян. Узловые и листовые NaCl (0,5; 1%) подавляет морфогенез и приводит к их отмиранию. ПЭГ (5%), как и NaCl (0,5; 1%), губительно действует на узловые и листовые экспланты катрана бугорчатого. Узловые экспланты характеризуются отмиранием, а выживаемость листовых эксплантов составила 20% без роста и морфогенеза.

Действие БАП (0,5 и 5 мг/л) на узловые, листовые и корневые экспланты катрана бугорчатого характеризовалось 100%-й выживаемостью и ростом (0,5 мг/л). Однако у узловых эксплантов в отличие от листовых наблюдалась закладка почек и рост побегов (100%). БАП (5 мг/л) губителен для узловых эксплантов, но стимулирует рост листовых эксплантов и характеризуется частичным некрозом раневой поверхности. У корневых эксплантов наблюдалась закладка почек и рост побегов.

Итак, разработана методика *in vitro* тканей катрана бугорчатого и оценка устойчивости к стрессам, определен гормональный состав питательной среды для роста и морфогенеза у эксплантов побегов и семян катрана бугорчатого.

#### Список литературы

1. Андреев Л.Н. Сохранение редких и исчезающих растений *in situ*: достижения и проблемы / Л.Н. Андреев,

Ю.Р. Горбунов // Изучение и охрана разнообразия флоры, фауны и основных экосистем Евразии: матер. Международ. конф. – М., 21–23 апреля 1999 г. – М.: ИПЭЭ РАН, 2000. – С. 19–23.

2. Разработка принципов сохранения и воспроизводства генетических фиторесурсов / Ю.К. Виноградова, Ю.Н. Горбунов, А.И. Макридин, О.И. Молканова, А.Н. Швецов // Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами. – М., 2005. – С. 343–351.

3. Красная книга республики Дагестан / под ред. Абдурахманова Г.М. – Махачкала: Республиканская газетно-журнальная типография, 2009. – 552 с.

4. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 448 с.

5. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК – ПРЕСС, 1999. – 160 с.

6. Талиева М.Н. Влияние иммуномодулирующего действия эпина и эпина экстра // Полифункциональное действие brassinosterоидов. – М.: НЭСТ М, 2007. – С. 307–309.

#### References

1. Andreev L.N. Sochranenie redkich I ischezayshich rasteniy in situ: dostigeniya I problem / L.N. Andreev, Y.R. Gorbunov // Mater. Megdunarod. konf. «Izuchenie I ochrana raznobraziya flor, faun I osnovnch ecosystem Evrazii». M., 21–23 aprelya 1999 M.: IPEE RAN, 2000. pp. 19–23.

2. Vinogradova Y.K., Gorbunov Y.N., Makridin A.I., Molkanova O.I., Shvecov A.N. Razrabotka principov sochranenie I vosproizvodstva genicheskikh bioresursov // Fundamentalnye osnov upravleniya biologicheskimi resursami. M., 2005. pp. 343–351.

3. Krasny kniga respubliki Dagestan / Pod red. Abdurachmanova G.M. Machachala: Reapublicanskaya gazetno gurnalnaya tipografiya, 2009. 552 p.

4. Kalinin F. L. Sarnackaya V.V., Polishuk V. E. Metod cultur tcaney v fiziologii I biochimii rastenii. Kiev: Naukova dumka, 1980. 448 p.

5. Butenko R.G. Biologiya kletok vsshich rasteniy *in vitro* I biotechnologii na ich osnove. M.: FBK PRESS, 1999. 160 p.

6. Talieva M.N. Vliyanie innunomoduliruyshego deystviya epina I epina ekstra // Polifunkcionalnoe deystvie brassinosteroidov. M.: NEST M, 2007. pp. 307–309.

#### Рецензенты:

Абдулмалик Г.Ю., д.б.н., профессор кафедры физиологии растений и теории эволюции биологического факультета Дагестанского государственного университета, г. Махачкала;

Куркиев К.У., д.б.н., профессор кафедры ботаники, генетики и селекции Дагестанского государственного аграрного университета, г. Махачкала.

Работа поступила в редакцию 01.08.2013.