

УДК 581.121.1.

СПЕЦИФИКА МОРФОГЕНЕЗА ИЗОЛИРОВАННЫХ СТРУКТУР РЕДКИХ РАСТЕНИЙ ДАГЕСТАНА IN VITRO

Алиева З.М., Мартемьянова В.К., Юсуфов А.Г.

Дагестанский государственный университет им. В.И. Ленина, Махачкала,
e-mail: maminamariamka@mail.ru

Конкретизированы условия роста, формирования каллуса, корней, почек и побегов у аналогичных и гомологичных изолированных структур редких видов растений *in vitro*. Отмечена специфика реализации морфогенетического потенциала у структур одного и того же растения и разных видов. Процессы роста и морфогенеза у объектов имеют генетическую и онтогенетическую детерминацию. Выявлены особенности морфогенеза у эксплантов разного происхождения, факторов, влияющих на рост, формирование каллуса, корней, почек и побегов у эксплантов *Scabiosa gumbetica* L., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss, *Astragalus karakugensis* Bunge, *Corylus colurna* L., *Tanacetum akinfiewii* (Alexeenko) Tzvelel. Узловые экспланты у большинства объектов формировали побеги и каллус, только у катрана отмечены различия между ростом побега и активностью пролиферации (каллусообразование) эксплантов, что проявлялось в интенсивности роста побегов без закладки каллуса. При культивировании эксплантов узлов наблюдали формирование новых пазушных почек вблизи исходной. Это способствовало увеличению числа пассируемых эксплантов (копеечник, скабиоза, катран). Количество таких почек менялось в зависимости от состава среды. На среде с преобладанием БАП отмечено увеличение их числа, а в вариантах с ИМК отмечена тенденция к формированию корней. У некоторых объектов удалось конкретизировать возможности использования эксплантов семядолей (лещина), черешков и пластинок листьев (копеечник, катран). При этом отмечено образование на них каллуса с дальнейшей дифференциацией в нем корней и почек. Экспланты семядолей зрелых семян лещины проявляют активность не только к росту, но и дифференциации корней и почек, тогда как у незрелых плодов редко формировали даже каллус.

Ключевые слова: морфогенез, экспланты, регуляторы роста, редкие растения, *in vitro*

SPECIFICS MORPHOGENESIS ISOLATED STRUCTURE DAGHESTAN RARE PLANTS IN VITRO

Alieva Z.M., Martemjanova V.K., Yusufov A.G.

Dagestan State University, Lenin, Makhachkala, e-mail: maminamariamka@mail.ru

The conditions of growth, the formation of callus, roots, buds and shoots are made specific at similar and homologous isolated structures of rare species of plants *in vitro*. The specificity of the morphogenetic potential in the structures of the same plants and different types is marked. The processes of growth and morphogenesis objects have a genetic and ontogenetic determination. Peculiarities of morphogenesis in explants of different origin, the factors affecting the growth, the formation of callus, roots and shoots in kidney explants *Scabiosa gumbetica* L., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. Ex Boiss, *Astragalus karakugensis* Bunge, *Corylus colurna* L., *Tanacetum akinfiewii* (Alexeenko) Tzvel. *Crambe giberosa* L. Nodal explants most objects formed shoots and callus, only *crambe* marked differences between the growth of shoot and proliferative activity (callus) explants, which was manifested in the growth rate of shoots without callus bookmarks. When cultured explants nodes observed the formation of new axillary buds near the source. This has contributed to an increase in the number of explants cultivated (*hedysarum*, *scabiosa*, *crambe*). Number of kidney varied depending on the medium composition. On Wednesday with a predominance of BAP noted an increase in their number, and in cases with IBA was a tendency to the formation of roots. With some unable to specify the possibility of using cotyledon explants (*corylus*), stalks and leaves of plates (*hedysarum*, *crambe*). At the same time they observed the formation of callus with a further differentiation it roots and buds. Cotyledon explants of mature seeds Filbert show activity not only growth but also kidney, and the differentiation of roots, whereas the immature fruit is rarely even callus formed.

Keywords: morphogenesis, explants, growth regulators, rare plants, *in vitro*

Изучению морфогенеза изолированных структур *in vitro* посвящена большая литература по разным объектам, анализ которой выходит за рамки данного сообщения. Однако при этом всегда возникал вопрос, связанный с необходимостью объяснения природы различий в морфогенезе у объектов и структур [3, 7]. К тому же специфика реализации процессов регенерации у разных изолированных структур одного индивидуума и разных видов не вызывает сомнений, хотя ее природа остается неизученной. Для выяснения вопроса о роли генетической и онтогенетической природы реализации морфогенеза сравнивали осо-

бенности регенерации эксплантов аналогичных и гомологичных структур генетически отдаленных редких растений, таких как *Scabiosa gumbetica* L. (скабиоза гумбетовская), *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss (копеечник дагестанский), *Astragalus karakugensis* Bunge (астрагал каракугинский), *Corylus colurna* L. (лещина древовидная), *Tanacetum akinfiewii* (Alexeenko) Tzvel (пижма Акинфиева), *Crambe giberosa* L. (катран бугорчатый)

Целью работы было выявление специфики морфогенеза у эксплантов разного происхождения, факторов, влияющих на рост, формирование каллуса, корней,

почек и побегов у эксплантов перечисленных выше видов, что имеет особое значение для оптимизации условий микроклонального размножения и определяет перспективы их дальнейшего сохранения и воспроизведения.

Материалы и методы исследования

Объектами исследований служили растения, занесенные в Красную книгу РД [5], предоставленные сотрудниками кафедры ботаники ДГУ и ДНЦ РАН. Исходным материалом для исследований служили пазушные почки; экспланты узлов с почками; черешков; пластинок листьев; у лещины – семядоли плодов и зеленые побеги.

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, затем несколько раз промывали водопроводной и 2–3 раза – дистиллированной водой. Перед стерилизацией (8 минут в 0,1 %-м растворе сулемы – HgCl₂) 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. Экспланты помещали на питательную среду Мурасиге – Скуга (МС) с разным соотношением регуляторов роста цитокининовой и ауксиновой природы (ИМК – индолилмасляная кислота, БАП – 6-бензиламинопурин, ГК – гибберелловая кислота, Кн – 6-фурфуриламинопурин (кинетин)), для разнонаправленной индукции морфогенеза роста побегов, получения каллусных тканей и закладки корней. Асептику обеспечивали по общепринятой методике в условиях ламинар-бокса [3, 4]. Показателями состояния эксплантов служили: выживаемость, рост, формирование каллуса, корней, почек и побегов, которые оценивали по 3-балльной системе. Для роста: «–» исследования не проводились, «0» – рост отсутствует, «1» – прирост экспланта не превышает его изначальной величины, «2» – прирост экспланта равен его изначальной величине, «3» – прирост экспланта превышает его изначальную величину. Для морфогенеза: «–» исследования не проводились, «0» – реализация

морфогенеза отсутствует, «1» – слабая реализация морфогенеза, «2» – средняя реализация морфогенеза, «3» – высокая реализация морфогенеза. Условные показатели «слабая», «средняя» и «высокая» устанавливались относительно общего количества культивированных эксплантов (100%) к количеству с реализованным морфогенетическим потенциалом (1–33% «слабая реализация»; 34–66% «средняя реализация»; 67–100% «высокая реализация»).

Результаты исследования и их обсуждение

Работа с новыми объектами всегда упирается в необходимость поиска благоприятных условий культивирования материала [4], что имеет не только прикладное значение, но и важно для познания общей природы явлений и процессов регенерации растений [6]. Эта задача упростилась в связи с расширением возможностей применения изолированных клеток, тканей и органов *in vitro*. Тем не менее информация о морфогенетических проявлениях у растений далеко не полная. Среди изученных объектов только для лещин, астрагалов и гинкго встречаются некоторые сведения об их укореняемости стеблевыми черенками. У астрагала потенции реализуются только у гипокотильных черенков и отрезков зеленых не одревесневших побегов [1].

Экспланты разных структур одного и того же растения и разных объектов проявляли неодинаковую тенденцию к морфогенезу. Особенности реализации морфогенетического потенциала эксплантами отражены в табл. 1 и 2. Для общей характеристики морфогенеза объектов использована условная величина регенерационного потенциала отдельных эксплантов – R (среднее значение суммы показателей состояния эксплантов).

Таблица 1

Результаты морфогенеза эксплантов

Объекты	Экспланты	Показатели жизнеспособности эксплантов				
		Рост	Дифференция			
			Каллус	Побег	Корни	R
1	2	3	4	5	6	7
<i>Crambe gibberosa</i> L.	Первичное культивирование					
	узлы	3	0	3	0	1,0
	листья	3	0	0	0	0
	черешки	1	1	0	0	0,3
	корень	3	0	3	2	2,0
	Пассирование					
	узлы	3	3	3	2	2,6
	листья	3	0	0	1	0,3
	черешки	3	2	1	1	1,3
	корень	3	2	0	3	1,6
каллус	2	-	0	0	0	

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
<i>Hedysarum daghestanicum</i> <i>Rupr. ex Boiss</i>	Первичное культивирование					
	узлы	3	2	3	0	1,6
	листья	2,5	0,5	0	0	0,1
	черешки	2,6	2	0	0	0,6
	корень	0	0	0	0	0
	Пассирование					
узлы	3	2	3	2	2,3	
<i>Astragalus karakugensis</i> Bunge	Первичное культивирование					
	узлы	3	3	3	0	2,0
	Пассирование					
	узлы	3	3	3	0	2,0
	листья	3	2	2	0	1,3
	черешки	2,5	3	2	0	1,6
	каллус	3	0	1	0	0,5
<i>Astragalus lehmannianus</i> Bunge	Первичное культивирование					
	узлы	3	1,5	3	0	1,5
	Пассирование					
	узлы	3	0	3	0	1,0
	листья	3	0	0	0	0
черешки	2	1,5	0	0	0,5	
<i>Scabiosa gumbetica</i> L.	Первичное культивирование					
	узлы	1	3	0	2	1,6
	Пассирование					
	узлы	3	3	3	2	2,0
корень	2	0	3	3	2,0	
<i>Corylus colurna</i> L.	Первичное культивирование					
	узлы	2	1	0	0	0,3
	почки	2	0	0	0	0
	листья	1	0	0	0	0
	черешки	1	0	0	0	0
	Пассирование					
	почки	1	0	0	0	0
<i>Tanacetum Akinfiewii</i> (Alexeenko) <i>Tzvelev</i>	Первичное культивирование					
	узлы	3	0	2	0	0,6
	Пассирование					
узлы	3	0	2	0	0,6	

У эксплантов узлов побегов катрана, скабиозы, копеечника, астрагалов и лещины наблюдали рост пазушных почек и формирование каллуса. Однако только у эксплантов узлов катрана и копеечника отмечено формирование корней при пассировании побегов (табл. 2). Интересны данные пассирования каллусов ряда объектов, у которых отмечено формирование корней, почек и роста побегов из-за реализации тотипотентности каллусной ткани ввиду слабой специализации и как результат генетической гетерогенности, возникающей при делениях [3].

Узловые экспланты у большинства объектов формировали побеги и каллус,

только у катрана отмечены различия между ростом побега и активностью пролиферации (каллусообразование) эксплантов, что проявлялось в интенсивности роста побегов без закладки каллуса. При культивировании эксплантов узлов наблюдали формирование новых пазушных почек вблизи исходной. Это способствовало увеличению числа пассируемых эксплантов (копеечник, скабиоза, катран). Количество таких почек менялось в зависимости от состава среды. На среде с преобладанием БАП отмечено увеличение их числа, а в вариантах с ИМК отмечена тенденция к формированию корней. У некоторых объектов удалось конкретизировать возможности

использования эксплантов семядолей (лещина), черешков и пластинок листьев (копеечник, катран). При этом отмечено образование на них каллуса с дальнейшей дифференциацией в нем корней и почек.

Экспланты семядолей зрелых семян лещины проявляют активность не только к росту, но и дифференциации корней и почек, тогда как у незрелых плодов редко формировали даже каллус [2].

Таблица 2

Особенности роста и морфогенеза у исходных эксплантов и при пассировании

Дифференциация культивируемых эксплантов	Объекты						
	Катран	Скабиоза	Пижма	Копеечник	Астрагал		Лещина
					Лемана	Каракугинский	
	Первичное культивирование узловых эксплантов						
Почки	3	3	2	3	3	3	2
Корни	3	0	0	0	0	0	0
Каллус	0	3	0	2	0	3	1
Рост побегов из пазушных почек	3	3	1	3	3	3	1
	Пассирование узловых эксплантов						
Почки	3	3	3	3	3	3	–
Корни	3	2	0	3	0	0	–
Каллус	3	3	0	2	0	3	–
	Пассирование эксплантов каллусов						
Корни	3	3	–	0	–	0	–
Почки	3	3	–	2	–	3	–
Побеги	3	3	–	2	–	0	–

Различия в росте и формировании корней проявляли не только экспланты семядолей, но и изолированные зародышевые почки плодов лещины разной зрелости и сроков хранения. В связи с этим возникает вопрос о возможности реализации тотипотентности клеток *in vitro* для разных видов растений и при черенковании [3]. Структуры одного растения и разных объектов обнаруживают различия в морфогенезе из-за специфики наследственной и онтогенетической природы их организации. Некоторые структуры (гомологичные и аналогичные образования) характеризуются наличием разной морфо-физиологической организации, что оказывает влияние на специфику реализации процессов их роста и морфогенеза. Специфика их организации и метаболизма важна как показатель их специализации, что влияет на жизнеспособность в изолированной культуре. Отсюда проявление тотипотентности клеток растений определяется не только наследственной детерминацией видов и форм, но уровнем и направлением специализации самих структур, причины которой видоспецифичны для разных объектов. Более того, даже у одних и тех же видов и форм растений разные структуры

in vitro проявляют различия в реализации морфогенеза [10]. Подобные и мало еще изученные особенности видов являются одной из причин трудности анализа вопроса происхождения и эволюции явлений регенераций у растений. Эта же задача не решена и в отношении эволюции указанных процессов у животных, хотя она привлекала внимание давно [8, 9]. Отсюда возникает необходимость анализа экологических и онтогенетических причин указанных различий.

Выводы

Итак, информации по филогенетическим предпосылкам, оказывающим влияние на реализацию процессов регенераций у растений, пока недостаточно. Более известны значения структурных, возрастных изменений, содержания эндогенных регуляторов роста в тканях, состава питательной среды и уровня специализации органов для процессов регенерации. Об этом приходится напоминать в связи со сложностью управления процессами морфогенеза эксплантов при микроклональном размножении применительно к отдельным объектам и структурам, чему, и посвящены материалы статьи.

Список литературы

1. Абачев К.Ю. Адаптация проростков и ювенильных растений у астрагалов к условиям песчаных пустынь // Бот. журнал. – 1986. – № 1. – С. 1382–1388.
2. Алиханова А.А. Естественное вегетативное возобновление лещины обыкновенной и потенции к регенерации ее изолированных структур: автореф. канд. дис. – М.: ТСХА, 2009. – 26 с.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнология на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 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. Красная книга республики Дагестан / под ред. Г.М. Абдурахманова. – Махачкала: Республиканская газетно-журнальная типография, 2009. – 552 с.
6. Кренке Н.П. Регенерация растений. – М.-Л.: Изд-во АНССР, 1950 – 667 с.
7. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. – СПб.: СПб Г.У., 2010. – 238 с.
8. Юсуфов А.Г. Культура изолированных листьев. – М.: Наука, 1988. – 103 с.
9. Юсуфов А.Г., Магомедова М.А. Происхождение, эволюция и роль процессов регенерации у растений // Научная мысль Кавказа. – 2009. – № 2. – С. 55–65.
10. Юсуфов А.Г., Алиханова А.А. Специфика дифференциации каллусов лещины и ее влияние на морфогенез их эксплантов // Вестник ДНЦ РАН, Естеств. науки. – Махачкала 2005. – С. 65–67.

References

1. Abachev K.Ju. Adaptacija prorostkov i juvenil'nyh rastenij u astragalov k uslovijam peschanyh pustyn // Bot. zhurnal, 1986. no. 1. pp. 1382–1388.

2. Alihanova A.A. Estestvennoe vegetativnoe vozobnovlenie leshhiny obyknovnoy i potencii k regeneracii ee izolirovannyh struktur // Avtoreferat kand. diss., M.: TSHA, 2009. 26 p.

3. Butenko R.G. Biologija kletok vysshih rastenij in vitro i biotehnologija na ih osnove. M.:FBK-PRESS, 1999. 160 p.

4. Kalinin F.L., Sarnackaja V.V., Polishhuk V.E. Metody kul'tury tkanej v fiziologii i biohimii rastenij. Kiev: Naukova dumka, 1980. 448 p.

5. Krasnaja kniga respubliki Dagestan / pod red. Abdu-rahmanova G.M. Mahachkala: Respublikanskaja gazetno-zhurnal'naja tipografija, 2009. 552 p.

6. Krenke N.P. Regeneracija rastenij. M.-L. Izd. ANSSR, 1950 667 p.

7. Lutova L.A. Biotehnologija vysshih rastenij. SPB.: SPB G.U., 2010. 238 p.

8. Jusufov A.G. Kul'tura izolirovannyh list'ev M.: Nauka, 1988. 103 p.

9. Jusufov A.G., Magomedova M.A. Proishozhdenie, jevoljucija i rol' processov regeneracii u rastenij // Nauchnaja mysl' Kavkaza, 2009. no. 2. pp. 55–65.

10. Jusufov A.G. Alihanova A.A. Specifika differenciacii kallusov leshhiny i ee vlijanie na morfogenez ih jeksplantov // Vestnik DNC RAN, Estestv. nauki. Mahachkala 2005. pp. 65–67.

Рецензенты:

Асадулаев З.М., д.б.н., профессор, директор УРАН Горного ботанического сада Дагестанского научного центра Российской Академии наук, г. Махачкала;

Магомедова М.А., д.б.н., профессор кафедры ботаники, зав. кафедрой ботаники Дагестанского государственного университета, г. Махачкала.

Работа поступила в редакцию 04.04.2014.