

УДК 57.085.23

Морфогенез в каллусной культуре катрана приморского – *Crambe maritima* L.

Ковальчук Д. И., Бугара И. А., Омельченко А. В., Котов С. Ф., Ржевская В. С.

Институт биохимических технологий, экологии и фармации Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского
Симферополь, Республика Крым, Россия
dara.kovalchuk@mail.ru; bia.05@mail.ru; omelchenko_tnu@mail.ru; sfktv@mail.ru; viktoriyar45@mail.ru

В статье представлены данные по получению каллусных культур катрана приморского (*Crambe maritima* L.), индукции морфогенеза, получению растений-регенерантов и их последующей реинтродукции. Для получения каллусных культур в культуре листовых эксплантов *C. maritima* использовали агаризованную питательную среду Мурасиге и Скуга, в которую были добавлены следующие вещества: 6-БАП – 0,5 мг/л, 2,4-Д – 2,0 мг/л и кинетин – 0,5 мг/л. Сформированный каллус характеризовался светло-зеленой окраской. По мере культивирования каллусной культуры окраска изменялась до светло-коричневой или даже коричневой. Показано, что для индукции морфогенеза, каллусные культуры пассировали на питательную среду Мурасиге и Скуга, содержащую 6-БАП – 5,0 мг/л и ИУК – 0,5 мг/л. Признаки морфогенеза проявлялись в закладке листьев и развитии корневой системы. Отмечаются результаты проведённых цитологических исследований каллусных тканей *C. maritima*, которые показали наличие клеток меристематического и паренхимного типов различных размеров и формы. Также указываются условия содержания полученных растений-регенерантов, смена субстрата по мере культивирования растений в условиях лаборатории. Через 100 суток культивирования в лабораторном помещении, опытные образцы растений *C. maritima* в осенний период переносили в условия природного растительного сообщества (пгт. Прибрежное, Сакский район, Республика Крым) для дальнейшего наблюдения. Растения в ходе исследований проявляли признаки роста и развития, что свидетельствует об удачном опыте реинтродукции.

Ключевые слова: *Crambe maritima*, культура изолированных клеток, тканей и органов *in vitro*, морфогенез в каллусной культуре, цитологические исследования, растения-регенеранты, реинтродукция.

ВВЕДЕНИЕ

Crambe maritima L. (катран приморский) – вид, принадлежащий семейству Brassicaceae и произрастающий на прибрежных песках, галечниках, ракушечниках, проявляющий свойства ценофоба. Популяции как многочисленные (более 3000 экземпляров), так и небольшие (несколько десятков растений). На территории Республики Крым ареал распространения – побережья Чёрного и Азовского морей. Ввиду своего «редкого» статуса *C. maritima* является охраняемым растением в заповедниках, а также иных особо охраняемых природных территориях Крыма. Охраняемый статус растения обусловлен разрушением мест произрастания вследствие рекреации и строительства в прибрежной зоне, сбором соцветий для букетов, слабой конкурентоспособностью вида, низкой всхожестью семян и жизненностью проростков (Красная книга..., 2015).

C. maritima не является фармакопейным растением, однако, данный вид можно считать перспективным для использования в медицине. Практическое применение и значение *C. maritima* связано со способностью накапливать потенциально антимикробные глюкозинолаты, основным из которых является эиппрогоитрин. Содержание эиппрогоитрина в этиолированных проростках достигает 80–85 % и 95 % в семенах. Также, в проростках были идентифицированы шесть других глюкозинолатов (прогоитрин, глюконапин, глюкобрассикапан, синалбин, глюконастуртин и глюкобрассицин), вместе с тем, только пять из них были идентифицированы в семенах (Sanyal, Decocq, 2015).

Учитывая биохимический состав, растение перспективно для использования в качестве лекарственного сырья при разработке антибактериальных препаратов. Вместе с тем,

охраняемый статус растения не позволяет получать лекарственное растительное сырьё при культивировании в промышленных масштабах.

Выполненные авторами ранее исследования по культивированию *C. maritima in vitro* были связаны, в основном, с разработкой методов получения каллусных культур, решением вопросов индукции морфогенеза, а также биохимическими и генетическими исследованиями растений-регенерантов (Bowes, 1976; Drew, Fellows, 1986; Peron, Regnier, 1987; Fusheng, Peron, 1998; Пушкарёва, 2017). Однако, работ, связанных с адаптацией растений-регенерантов в условиях природных растительных сообществ до настоящего времени не проводилось.

В связи с этим является актуальной разработка эффективных биотехнологических приёмов размножения *C. maritima* на основе культивирования клеток, тканей и органов растений *in vitro* для решения вопросов сохранения данного вида, массового размножения и последующей реинтродукции.

Цель настоящего исследования – индукция морфогенеза в каллусной культуре катрана приморского (*C. maritima*) и получение растений-регенерантов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Подготовку посуды, инструментов, питательных сред и растительного материала, проводили по методике, общепринятой в работах по культивированию изолированных клеток, тканей и органов растений (Калинин и др., 1980).

В качестве эксплантов использовали молодые листья растений *C. maritima*. Для поверхностной стерилизации эксплантов применяли 15 % раствор гипохлорита натрия. Обработку проводили в течение 14 минут на магнитной мешалке при скорости вращения 300 об/мин, предварительно нарезав листья на сегменты и поместив в марлевый «узелок» вместе с магнитным перемешивающим элементом.

Для получения каллусных культур использовали агаризованную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС), содержащую 6-бензиламинопурин (6-БАП) – 0,5 мг/л, 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) – 2,0 мг/л и кинетин – 0,5 мг/л (Murashige, Skoog, 1962). С целью индукции морфогенеза, каллусные культуры пассировали на агаризованную питательную среду МС, содержащую 6-БАП – 5,0 мг/л и индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) – 0,5 мг/л.

Приготовленные питательные среды разливали по 30 мл в культуральные сосуды объемом 250 мл и автоклавировали при температуре 115 °С в течение 25 минут.

После поверхностной стерилизации, экспланты промывали в трех сменах автоклавированной дистиллированной воды, по 15 минут в каждой, разрезали на сегменты размером 5x10 мм и помещали на поверхность питательной среды. Работу выполняли в ламинарном боксе MSC Advantage™ Thermo Fisher Scientific II класса биологической безопасности.

Культивирование эксплантов, каллусных культур и растений-регенерантов на ранних этапах онтогенеза проводили в инкубаторе лабораторном Climacell при 16-ти часовом фотопериоде, освещенности 70 % от максимальной, влажности 60 %, температуре световой фазы 26 °С, темновой – 22 °С.

Изучение путей дифференциации клеток каллусной культуры на ранних этапах морфогенеза, проводили с использованием временных давленных препаратов участков каллуса. Фрагмент каллусной ткани размером не более 2,0 мм помещали на предметные стекла и окрашивали в 0,1 % растворе метиленового синего в течение 5 минут, а также в 2 % растворе ацетокармина в течение 10 минут. Для того, чтобы получить монослой клеток, каллусные культуры мацерировали в 1 Н растворе HCl в течение 10 минут при температуре 60 °С. Затем препараты анализировали под микроскопом Olympus SKX53. Объем выборки составлял не менее 30 клеток каждого типа (Бугара и др., 2018).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании листовых эксплантов *C. maritima* на питательной среде МС, содержащей 6-БАП – 0,5 мг/л, 2,4-Д – 2,0 мг/л и кинетин – 0,5 мг/л начальные признаки каллусообразования визуально обнаруживались на 12–14 сутки культивирования. Первичный каллус образовывался в местах среза и на поверхности экспланта. Сформированный каллус отличался средней плотностью и характеризовался светло-зеленой окраской (рис. 1а).

По мере дальнейшего роста каллусной культуры наблюдалось изменение окраски до светло-коричневой или даже коричневой. Через 45 суток культивирования, каллусные культуры пассировали на агаризованную питательную среду МС, содержащую 6-БАП –



Рис. 1. Морфогенез в каллусной культуре катрана приморского – *Crambe maritima*
 а – каллусообразование в культуре вегетативных органов: питательная среда Мурасиге и Скуга, содержащая 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л кинетина; б – морфогенез в каллусной культуре: питательная среда Мурасиге и Скуга, содержащая 6-БАП – 5,0 мг/л и ИУК – 0,5 мг/л; в – морфогенез в культуре каллусных тканей: 1 – каллусная ткань; 2 – закладка листовой пластинки. Ув. 600×; д – *C. maritima* (растение-регенерант), возвращённое в природные условия; е – проростки *C. maritima* на 50 сутки культивирования в субстрате из почвы и песка в соотношении 1:1. Одно деление масштабной линейки – 1 см; ф – растения *Crambe maritima* на 90 сутки культивирования в субстрате из почвы и песка в соотношении 1:3. Одно деление масштабной линейки – 1 см.

5,0 мг/л и ИУК – 0,5 мг/л, для индукции морфогенеза, как одного из ключевых этапов биотехнологического процесса, направленного на сохранение и размножение растений. Первые признаки морфогенеза визуально обнаруживались через 25–30 суток и были связаны с закладкой листьев и развитием корневой системы (рис. 1b).

Были проведены цитологические исследования каллусных тканей *S. maritima* 0- и I- пассажей.

Исследования цитологических особенностей каллусных культур 0-пассажа показали наличие в них клеток меристематического и паренхимного типов, а также трахеальных элементов (адвентивных трахеид). Клетки меристематического типа первичного каллуса располагались крупными скоплениями в местах локализации трахеальных элементов. Клетки паренхимного типа составляли основную массу каллуса и имели округлую форму.

Цитологические исследования каллусных тканей I-пассажа выявили наличие клеток паренхимного типа, имеющих округлую форму, клеток меристематического типа, которые располагались крупными скоплениями, а также трахеальных элементов, характеризующихся одиночным расположением, либо расположением небольшими группами и крупными скоплениями (рис. 1c).

Через 60 суток культивирования *in vitro* растения-регенеранты извлекали из культуральных сосудов и переносили в пластиковые стаканы с субстратом из смеси песка, почвы, агроперлита в соотношении 3:1:1. Стаканы с растениями-регенерантами располагали в условиях лабораторного помещения с температурой 20 °С. Для создания повышенной влажности первые 15 суток, их накрывали стеклянными колпаками. Полив проводили по мере необходимости, но не реже двух раз в неделю. Следует отметить смену субстрата по мере культивирования (рис. 1 e, f). Далее проростки переносили в субстрат из почвы и песка в соотношении 1:1 (50 сутки культивирования). На 90 сутки культивирования снова производили смену субстрата: из почвы и песка в соотношении 1:3. Таким образом, данные манипуляции были проведены с целью подбора субстрата, наиболее близкого по составу к природному.

Через 100 суток культивирования в лабораторном помещении, 10 растений *S. maritima* в осенний период переносили в условия природного растительного сообщества (пгт. Прибрежное, Сакский район, Республика Крым). В ходе дальнейшего наблюдения зафиксировано развитие растений, которое проявлялось в увеличении количества листьев, размеров листовых пластин (рис. 1d).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Каллусные культуры *S. maritima* были получены при культивировании листовых эксплантов на питательной среде МС, содержащей 6-БАП – 0,5 мг/л, 2,4-Д – 2,0 мг/л и кинетин – 0,5 мг/л. Цитологические исследования каллусных тканей *S. maritima* 0- и I- пассажей показали наличие клеток меристематического и паренхимного типов различных размеров и формы. Через 45 суток культивирования *in vitro*, каллусные культуры пассировали на питательную среду МС, содержащую 6-БАП – 5,0 мг/л и ИУК – 0,5 мг/л, для индукции морфогенеза. Первые признаки морфогенеза визуально обнаруживались через 25–30 суток. Через 60 суток культивирования растения-регенеранты извлекали из культуральных сосудов и переносили в пластиковые стаканы с субстратом из смеси песка, почвы, агроперлита в соотношении 3:1:1. Через 100 суток культивирования в лабораторном помещении, 10 растений *S. maritima* были перенесены в условия природного растительного сообщества. В ходе дальнейших наблюдений было отмечено развитие растений, которое проявлялось в увеличении количества и размеров листьев.

Таким образом, проведенные нами исследования показали возможность использования культуры *S. maritima in vitro*, для получения первичного и пассируемого каллуса с последующей индукцией морфогенеза. Перспективы применения данного способа размножения заключаются в восстановлении популяций редких и исчезающих растений, для которых характерны сложности с вегетативным размножением и низкая всхожесть семян.

Список литературы

- Бугара И. А., Омельченко А. В., Газель Е. В., Кирилин К. О. Получение каллусных культур *Crambe maritima* L. и их цитологическая характеристика // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология, химия. – 2018. – Т. 4 (70), № 2. – С. 3–10.
- Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
- Красная книга Республики Крым. Растения, водоросли и грибы / [Отв. ред. д. б. н., проф. А. В. Ена и к. б. н. А. В. Фатерыга]. – Симферополь: ООО «ИТ «АРИАЛ», 2015. – 480 с.
- Пушкарьова Н. О. Розробка способів мікротонального розмноження та вивчення впливу культивування *in vitro* на біохімічні властивості та генетичну мінливість рослин рідкісних видів роду *Crambe*: дис. ... канд. біол. наук: спец. 03.00.20 Біотехнологія. – Київ: Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, 2017. – 155 с.
- Bowes B. G. *In vitro* morphogenesis of *Crambe maritima* L. // Protoplasma. – 1976. – Vol. 89. – P. 185–188.
- Drew R. L. K., Fellows J. R. Generation of Seakale (*Crambe maritima* L.) plantlets by tissue culture // Annals of Botany. – 1986. – Vol. 58, iss. 2. – P. 179–181.
- Fusheng L., Peron J.-Y. Study of the dynamics of nutritional elements in seakale (*Crambe maritima* L.) during growth // Acta Horticulturae. – 1998. – Vol. 467. – P. 215–226.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth, and bioassays with tobacco tissue culture // Plant Physiology. – 1962. – Vol. 15, N 13. – P. 473–497.
- Peron J.-Y., Regnier E. *In vitro* propagation of *Crambe maritima* // Canadian Journal of Botany. – 1987. – Vol. 65, N 1. – P. 72–75.
- Sanyal A., Decocq G. Biological Flora of the British Isles: *Crambe maritima* // Journal of Ecology. – 2015. – Vol. 103, N 277. – P. 769–788.

Kovalchuk D. I., Bugara I. A., Omelchenko A. V., Kotov S. F., Rzhetskaya V. S. Morphogenesis in the callus culture of *Crambe maritima* L. // Ekosistemy. 2023. Iss. 33. P. 73–77.

The article presents the data of the production of the callus cultures of *Crambe maritima* L., the induction of morphogenesis, the production of regenerated plants and their subsequent reintroduction. To obtain of the callus cultures in the culture of leaf explants of *C. maritima*, agar nutrient medium of Murashige and Skoog was used, to which the following substances were added: 6-BAP – 0.5 mg/l, 2,4-D – 2.0 mg/l and kinetin – 0.5 mg/l. The formed callus was characterized by a light green colour. As the callus culture was cultivated, the colour changed to light brown or even brown. It was shown that for the induction of morphogenesis, callus cultures were passaged on nutrient medium of Murashige and Skoog containing 6-BAP – 5.0 mg/l and IAA – 0.5 mg/l. Signs of morphogenesis were evident in the laying of the leaves and the development of the root system. The results of the conducted cytological studies of the callus tissues of *C. maritima* showed the presence of cells of meristematic and parenchymal types of various sizes and shapes. The conditions for keeping the obtained regenerated plants and changes of the substrate during laboratory plants cultivation are also indicated. In autumn, after 100 days of cultivation in the laboratory, experimental specimens of *C. maritima* were transferred to a natural plant community (settlement Pribrezhnoye, Saksy district, the Republic of Crimea) for further observation. During the research the plants demonstrated signs of growth and development, proving successful reintroduction.

Key words: *Crambe maritima*, the culture of isolated cells, tissues, and organs *in vitro*, morphogenesis in the callus culture, cytological investigations, the regenerated plants, reintroduction.

Поступила в редакцию 20.12.22

Принята к печати 30.12.22