

УДК [581.33:582.736]:470.57

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-0-2-66-70

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ РЕДКОГО ЭНДЕМИКА ЮЖНОГО УРАЛА *OXYTROPIS BASCHKIRENSIS* (FABACEAE) KNJASEV В ЭМБРИОКУЛЬТУРЕ *IN VITRO* В ЦЕЛЯХ РЕИНТРОДУКЦИИ

© А.Е. Зинатуллина, О.А. Елизарьева

Разработаны этапы биотехнологии получения в эмбриокультуре *in vitro* растений-регенерантов остролодочника башкирского *Oxytropis baschkirensis* Knjasev (Fabaceae Lindl.), редкого эндемика флоры Южного Урала, в целях реинтродукции растений в естественные местообитания. Основные этапы биотехнологии: I. Отбор экспланта (зрелый зародыш определенной длины). II. Подготовка питательной среды определенного состава. III. Инокуляция экспланта на питательную среду *in vitro*. IV. Культивирование экспланта *in vitro* в темноте при температуре +22°C. V. Получение укоренившихся регенерантов, их перенос в лабораторные почвенные условия *ex vitro* и выращивание в режиме, имитирующем летний световой день.

Подчеркивается, что критический момент разработанной биотехнологии, определяющий успешное получение регенерантов по схеме «один зародыш – один регенерант», состоит в инокуляции зародыша *in vitro* на стадии эмбриогенеза «зрелый зародыш», содержащего зачаточные корни и почечку.

Ключевые слова: эмбриокультура *in vitro*, биотехнология, *Oxytropis baschkirensis*.

Сохранение редких и находящихся под угрозой исчезновения растений как составная часть сохранения биологического разнообразия – важнейшая научная проблема. Одним из эффективных приемов сохранения, размножения и увеличения численности особей редких и исчезающих видов является их интродукция в питомники ботанических садов. Коллекции интродуцированных редких видов служат базой для их реинтродукции (репатриации) в естественные местообитания и тем самым – сохранения и восстановления природных популяций. В то же время для проведения реинтродукционных работ требуется значительное количество качественных проростков интродуцированных растений. Перспективные способы массового получения и тиражирования редких исчезающих растений состоят в разработке различных биотехнологий получения их регенерантов в культуре *in vitro*. Одно из направлений таких разработок – эмбриокультура *in vitro*, основанная на детальных данных по формированию и развитию зародыша.

Род *Oxytropis* (Остролодочник), сем. Fabaceae Lindl. (Бобовые), включает многие редкие эндемичные и реликтовые виды. Один

из представителей этого рода – остролодочник башкирский *Oxytropis baschkirensis* Knjasev (выделен из вида остролодочник сходный *Oxytropis ambigua* (Pall.) DC.) относится к группе редких исчезающих эндемиков Южного Урала, включенных в «Красную книгу Республики Башкортостан» [1]. В Уфимском Институте биологии УФИЦ РАН ведутся интродукционные и реинтродукционные исследования этого вида [2, 3]. Начато изучение морфогенеза зародыша *O. baschkirensis* [4, 5].

Цель работы состояла в разработке основных этапов биотехнологии получения регенерантов *O. baschkirensis* Knjasev в эмбриокультуре *in vitro*.

Материал и методы исследования. Использовали средневозрастные генеративные растения *O. baschkirensis*, произрастающие в интродукционном питомнике редких и исчезающих видов растений Уфимского Института биологии УФИЦ РАН (г. Уфа). Происхождение образца: Республика Башкортостан, Учалинский район, гора Микагир.

Применили следующие методы исследований: общепринятый метод эмбриокультуры

ЗИНАТУЛЛИНА Анна Евгеньевна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,

e-mail: aneta@ufaras.ru

ЕЛИЗАРЬЕВА Ольга Александровна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,

e-mail: herbariy-ib-ufa@mail.ru

in vitro и методы светооптических исследований в разработке сотрудников лаборатории экспериментальной эмбриологии растений Уфимского Института биологии УФИЦ РАН [6], при этом постоянные гистологические препараты просматривали и фотографировали с применением светового микроскопа Axio Imager 1 (Carl Zeiss, Jena). Прижизненную съемку объектов вели с использованием цифровой фотокамеры AxioCam MRc5 с программным обеспечением Axio Vision 4.7 ("Carl Zeiss", Германия). Статистическую обработку результатов вели с применением программы Microsoft Office Excel 2003.

Результаты и обсуждение. Формирование и развитие зародыша *O. baschkirensis* приходится на такие фенологические фазы, как конец цветения и начало плодоношения (с учетом частичного перекрытия этих фенофаз) (рис. 1).



Рис. 1. *Oxytropis baschkirensis* в фенологические фазы «конец цветения» и «начало плодоношения» в условиях интродукционного питомника, $\times 0.3$

Развитие зародыша начинается с формирования зиготы (рис. 2, а) путем слияния яйцеклетки и спермия. Зигота после некоторого периода созревания делится поперечной перегородкой, формируя равные по размерам клетки двуклеточного зародыша (рис. 2, б). Клетки двуклеточного зародыша претерпевают поочередно деление с формированием сначала трехклеточного, затем Т-образного четырех-

клеточного зародыша. В целом, по признакам слияния полярных ядер перед оплодотворением, поперечного деления зиготы и Т-образного расположения четырехклеточного зародыша, ранний эмбриогенез *O. baschkirensis* проходит согласно Onagrad-типу, характерному для большинства представителей сем. Fabaceae [7]. Продольные и поперечные деления клеток четырехклеточного зародыша ведут к формированию восьмиклеточного зародыша. На этой стадии из центральной клетки зародышевого мешка формируется эндосперм, который быстро и целиком поглощается развивающимся зародышем уже на следующей глобулярной стадии. Глобулярная стадия зародыша (рис. 2, в) весьма длительна, и зародыш дифференцируется достаточно поздно. По мере дальнейшего развития зародыш вытягивается в форму торпеды, а затем принимает сердцевидную форму. Постепенно формируется зрелый зародыш с зачаточными корнями (один основной и два адвентивных) и почечкой (рис. 2, г).

В целом эмбриогенез *O. baschkirensis* происходит без отклонений от нормы и типично для представителей сем. Fabaceae. Эти результаты совпадают с эмбриологическими данными, полученными нами ранее на примере этого же объекта и других представителей рода *Oxytropis* [8, 9].

При разработке этапов биотехнологии получения регенерантов использовали зародыши, изолированные на следующих стадиях эмбриогенеза: глобулярный (длиной 0.1–0.2 мм), торпедовидный (длиной 0.8–1.3 мм), сердцевидный (1.5–2.0 мм), зрелый (длиной 2.3–2.5 мм). Зародыши на более ранних стадиях эмбриогенеза в экспериментах не использовали в силу их миниатюрности, что представляет значительную методическую трудность.

Зародыши инокулировали на агаризированную питательную среду, составленную по полной прописи Мурасиге-Скуга. Подобранный эмпирически фитогормональный состав питательной среды (know how) был постоянным. Культивирование *in vitro* зародышей проводили в темноте при температуре +22°C.

Установлено, что способность культивируемых *in vitro* зародышей к формированию регенерантов в условиях выполненных экспериментов полностью зависела от стадии их развития в момент инокуляции.

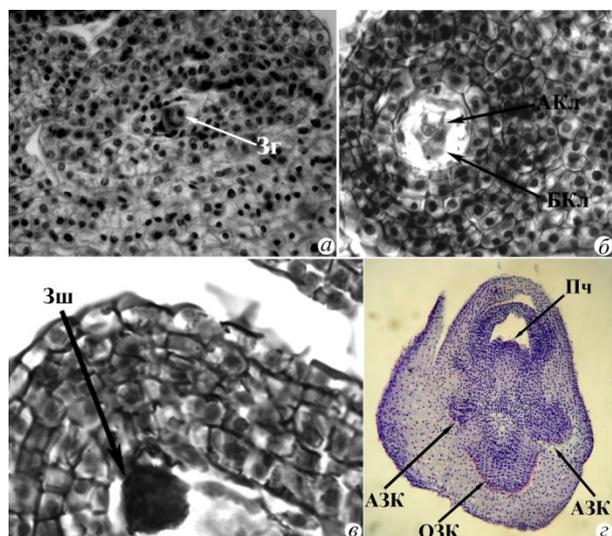


Рис. 2. Развитие зародыша *Oxytropis baschkirensis*: а – зигота (продольный срез, $\times 40$); б – двухклеточный зародыш (продольный срез, $\times 40$); в – глобулярный зародыш (продольный срез, $\times 80$); г – зрелый зародыш (продольный срез, $\times 10$). Условные обозначения: АКл – апикальная клетка; БКл – базальная клетка; Зг – зигота; Зш – зародыш; Пч – почечка, АЗК – адвентивный зачаточный корень, ОЗК – основной зачаточный корень

Так, культивирование *in vitro* глобулярных и торпедовидных зародышей приводило к формированию обводненных каллусов желтоватого цвета, неопределенной формы, рыхлой мягкой консистенции. По данным гистологического анализа, такой каллус представлен рыхло расположенными крупными клетками с большими межклетниками. Немногочисленные ядра обнаружены только в клетках центральной зоны каллуса. В ходе дальнейшего культивирования каллус постепенно дегенерировал. Каллусы такой морфологии и структуры, согласно литературным данным, относятся к неморфогенным [10]. В результате культивирования *in vitro* сердцевидных зародышей наблюдали формирование каллусов плотной компактной консистенции, матового белого цвета, узловой формы. Гистологический анализ показал, что клетки таких каллусов достаточно однородны, плотно прилегают друг к другу, вакуолизованы незначительно, имеют крупные ядра, занимающие центральное положение, и плотную клеточную стенку, в основном правильную изодиаметрическую форму, а в целом – меристематичны. Каллусы такой морфологии и структуры по

литературным данным [10] относятся к морфогенным, способным при оптимальных условиях *in vitro* и *ex vitro* дать начало множеству растений-регенерантов. Однако для получения регенерантов *O. baschkirensis* из сердцевидных зародышей через этап морфогенного каллуса необходимо провести серию дополнительных исследований.

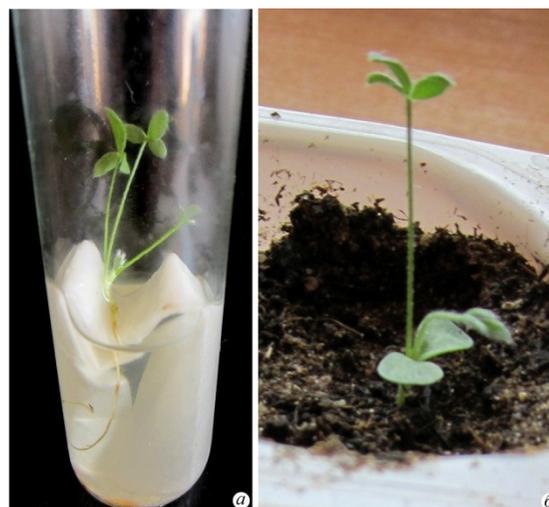


Рис. 3. Регенерант *Oxytropis baschkirensis*, полученный из зрелого зародыша, в условиях *in vitro* (а, ув. 1.8) и *ex vitro* (б, ув. 2.2)

Культивирование *in vitro* зрелых зародышей приводило к прямой регенерации проростков с хорошо развитой корневой системой (рис. 3, а). Такой результат вполне закономерен, поскольку в зрелом зародыше, как правило, имеется определенный уровень эндогенных регуляторов роста, обеспечивающих в сочетании с другими веществами его дальнейшую нормальную дифференциацию и прорастание.

Такие проростки переносили из пробирок в условия *ex vitro* в стаканчики с почвенным субстратом (рис. 3, б) и выращивали на лабораторной площадке в режиме, имитирующем летний световой день. Выявлена высокая (86%) выживаемость проростков в почвенных условиях *ex vitro*.

Таким образом, в ходе экспериментов показана возможность биотехнологического получения растений-регенерантов *O. baschkirensis* в эмбриокультуре *in vitro*. Биотехнология включает следующие принципиальные этапы: I. Отбор экспланта (зрелый зародыш определенной длины). II. Подготовка питательной среды определенного состава. III. Инокуляция экспланта

на питательную среду *in vitro*. IV. Культивирование экспланта *in vitro* в темноте при температуре +22°C. V. Получение укоренившихся регенерантов, их перенос в лабораторные почвенные условия *ex vitro* и выращивание в режиме, имитирующем летний световой день.

Данная биотехнология позволяет надежно получать регенеранты *O. baschkirensis* по схеме «один зародыш—один регенерант». В то же время для массового тиражирования растений по схеме «один зародыш—много регенерантов» следует разрабатывать биотехнологию получения регенерантов через этап формирования морфогенного каллуса из сердечковидного зародыша и экспериментального индуцирования в таком каллусе множественных очагов инициации.

Полученные гистологические данные анализировали на базе Центра коллективного пользования «Агидель» Уфимского федерального исследовательского центра РАН.

Литература

1. Красная книга Республики Башкортостан: в 2 томах. Т. I: Растения и грибы / под ред. д-ра биол. наук, проф. Б.М. Миркина. Уфа: МедиаПринт, 2011. 384 с.
2. Маслова Н.В., Елизарьева О.А., Куватова Д.Н., Асадуллина С.Ф. Интродукционное изучение редких видов рода *Oxytropis* DC. в Ботаническом саду УНЦ РАН // Изучение заповедной природы Южного Урала. Вып. 2. Уфа, 2006. С. 166–176.
3. Мулдашев А.А., Маслова Н.В., Елизарьева О.А., Галеева А.Х. Опыт реинтродукции редкого эндемичного вида *Oxytropis baschkirensis* Knjasev на Южном Урале (Республика Башкортостан) // Вестн. Оренбург. гос. ун-та. 2015. № 9 (184). С. 115–121.
4. Круглова А.Е. Эмбриология редкого эндемичного вида Южного Урала остролодочника башкирского: морфогенез зародыша // Известия Уфимского научного центра РАН. 2013. № 1. С. 61–64.
5. Зинатуллина А.Е. Сравнительная эмбриология редкого эндемичного вида Южного Урала остролодочника башкирского: морфогенез зародыша в природных условиях и при интродукции // Известия Уфимского научного центра РАН. 2014. № 1. С. 61–64.
6. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений / Н.Н. Круглова, О.В. Егорова, О.А. Сельдиминова, Д.Ю. Зайцев,

А.Е. Зинатуллина. Уфа: Гилем, Башк. энцикл., 2013. 128 с.

7. Круглова А.Е. Эмбриология растений семейства Fabaceae Lindl. (обзор проблемы) // Известия Уфимского научного центра РАН. 2012. № 3. С. 26–34.

8. Круглова А.Е., Катасонова А.А., Маслова Н.В., Круглова Н.Н. Эмбриология редкого вида Южного Урала остролодочника сходного: морфогенез семяпочки // Известия Самарского научного центра РАН. 2010. Т. 12 (33), № 1 (3). С. 727–729.

9. Круглова А.Е. Эмбриология редкого вида Южного Урала остролодочника сходного: морфогенез зародыша // Известия Самарского научного центра РАН. 2011. Т. 13 (39), № 1 (4). С. 846–848.

10. Сельдиминова О.А., Круглова Н.Н. Баланс эндогенных и экзогенных гормонов и пути морфогенеза в андроклиновых каллусах пшеницы *in vitro* // Известия Уфимского научн. центра РАН. 2015. № 1. С. 33–39.

References

1. Red Data Book of the Republic of Bashkortostan. In 2 vols. Vol. I. Plants and fungi. B.M. Mirkin (ed.). 2nd edition, amended and revised. Ufa, MediaPront, 2011. 384 p.
2. Maslova N.V., Elizaryeva O.A., Kuvatova D.N., Asadullina S.F. Introduction studies on rare species of the genus *Oxytropis* DC. in the Botanical Garden of the Ufa Scientific Centre, RAS. Izuchenie zapovednoy prirody Yuzhnogo Urala. Sbornik nauchnykh trudov. Issue 2. Ufa, 2006, pp. 166–176.
3. Muldashev A.A., Maslova N.V., Elizaryeva O.A., Galeeva A.Kh. Experience in reintroducing the rare endemic species *Oxytropis baschkirensis* Knjasev in the South Urals (Republic of Bashkortostan). Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta, 2015, no. 9 (184), pp. 115–121.
4. Kruglova A.E. Embryology of the rare endemic species *Oxytropis baschkirensis* from the South Urals: Embryo morphogenesis. Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN, 2013, no. 1, pp. 61–64.
5. Zinatullina A.E. Comparative embryology of the rare endemic species *Oxytropis baschkirensis* from the South Urals: Embryo morphogenesis under natural and introduction conditions. Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN, 2014, no. 1, pp. 61–64.
6. Kruglova N.N., Egorova O.V., Seldimiнова O.A., Zaytsev D.Yu., Zinatullina A.E. Optical microscope as a tool in plant biotechnology. Ufa, Gilem, Bashkirskaya entsiklopediya, 2013. 128 p.
7. Kruglova A.E. Embryology of plants from the family *Fabaceae* Lindl. (review on the problem).

Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN, 2012, no. 3, pp. 26–34.

8. Kruglova A.E., Katasonova A.A., Maslova N.V., Kruglova N.N. Embryology of the rare species *Oxytropis ambigua* in the South Urals: Ovule morphogenesis. Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN. 2010, vol. 12 (33), no. 1 (3), pp. 727–729.

9. Kruglova A.E. Embryology of the rare species *Oxytropis ambigua* in the South Urals:

Embryo morphogenesis. Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN. 2011, vol. 13 (39), no. 1 (4), pp. 846–848.

10. Seldimirova O.A., Kruglova N.N. Balance of endogenous and exogenous hormones and *in vitro* morphogenesis pathways in wheat endoclynic calli. Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN, 2015, no. 1, pp. 33–39.



**BIOTECHNOLOGY FOR OBTAINING REGENERANTS OF THE RARE ENDEMIC SPECIES
OXYTROPIS BASCHKIRENSIS KNJASEV (FABACEAE) FROM THE SOUTH URALS
IN *IN VITRO* EMBRYO CULTURE WITH THE PURPOSE OF REINTRODUCTION**

© A.E. Zinatullina, O.A. Elizaryeva

Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre, RAS,
69, prospekt Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

The stages of biotechnology were developed to obtain regenerated plants of *Oxytropis baschkirensis* Knjasev (Fabaceae Lindl.), a rare endemic of the South Urals, in *in vitro* embryo culture, in order to reintroduce them into their natural habitats. The basic stages include: I. Explant selection (the mature embryo of a certain length). II. Preparation of nutrient medium of definite composition. III. *In vitro* inoculation of the explant on the nutrient medium. IV. *In vitro* cultivation of the explant in the dark at a temperature of +22°C. V. Acquisition of the rooted regenerants, their *ex vitro* transfer to soil under laboratory conditions and growth in the regime simulating summer daylight hours.

It is emphasized that the crucial moment of the developed biotechnology that defines the successful acquisition of regenerants according to the scheme “one embryo–one regenerant” lies in the *in vitro* embryo inoculation at the mature embryo stage characteristic of embryonic roots and bud.

Key words: *in vitro* embryo culture, biotechnology, rare species, *Oxytropis baschkirensis*.