

УДК 581.4; 635.9

¹Д.Н. Сатыбалдиева*, ²С.В. Нам, ²В.К. Мурсалиева, ¹Б.К. Заядан, ³Р.М. Маммадов

¹Казахский Национальный Университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан,

²Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы, Казахстан,

³Университет Памуккале, г. Денизли, Турция,

*e-mail: dariya.sat.89@mail.ru

Введение в культуру *in vitro* крокуса алатауского *Crocus alatavicus* L.

Изучены особенности регенерации и морфогенеза в культуре изолированных тканей казахстанского вида крокуса алатауского *Crocus alatavicus* Regel et Semen. Выявлена четкая зависимость морфогенетических реакций от стадии развития исходных растений, природы и физиологического состояния первичных эксплантов. Установлено, что регенерация происходит путем активации роста имеющихся пазушных почек возобновления, закладкой адвентивных почек у основания побегов и в индуцированной каллусной ткани на сегментах клубнелуковиц.

Ключевые слова: *Crocus alatavicus*, крокус алатауский, культура тканей, *in vitro*, каллус, регенерация.

Д.Н. Сатыбалдиева, С.В. Нам, В.К. Мурсалиева, Б.К. Заядан, Р.М. Маммадов

Crocus alatavicus L. алатау бәйшешегін *in vitro* жағдайына енгізу

Жұмыстың мақсаты Қазақстан Флорасының эндемик *Crocus alatavicus* түрінің микроклондық көбейту технологияларын өңдеу үшін окшауланған ұлпаларын *in vitro* жағдайына енгізу және өсіру ерекшеліктерін зерттеу болып табылады. Окшауланған ұлпа дақылдарында алатау бәйшешегінің регенерация және морфогенез ерекшеліктері зерттелді. Морфогенетикалық реакциялардың бастапқы өсімдіктің даму фазасына, біріншілік экспланттың табиғаты мен физиологиялық күйіне тәуелділігі анықталды. Регенерация процестері жаңарған төбе бүршіктерінің белсенді өсуі, өркен негізінде адвентивті бүршіктердің және түйнек кескіндерінде каллус ұлпаларының қалыптасу жолымен өтетіні анықталды.

Түйін сөздер: *Crocus alatavicus*, алатау бәйшешегі, ұлпа дақылдары, *in vitro*, каллус, регенерация.

D.N. Satybaldiyeva, S.V. Nam, V.K. Mursaliyeva, B.K. Zayadan, R.M. Mammadov

Introduction of *Crocus alatavicus* L. in vitro culture

The aim of the research is to study the micropropagation features of *Crocus alatavicus* – the endemic species of flora of Kazakhstan. Regeneration and morphogenesis of isolated tissues and organs are investigated. The morphogenetic reactions are dependent on the initial stage of plant, nature and the physiological state of the primary explant. Regeneration occurs through the activation of growth of axillary buds existing resume, bookmark adventitious buds at the base of the shoots and induced callus tissue of corms.

Keywords: *Crocus alatavicus*, tissue culture, in vitro, callus, regeneration.

Род *Crocus* L. из семейства *Iridaceae* Juss насчитывает около 80 видов, распространенных в субтропической и умеренной зоне Средиземноморья, Средней и Восточной Европе, в Средней и Передней Азии [1].

По жизненной форме крокусы являются геофитами с эфемероидным циклом развития. Формирование геофитного габитуса и образование подземных запасующих органов, защищающих почки возобновления, позволило выработать у данных растений своеобразные приспособительные реакции и механизмы устойчивости к неблагоприятным условиям

внешней среды. В связи с этим дикорастущие крокусы обладают высоким биологическим и экономическим потенциалом, что обуславливает перспективность их использования в селекции в качестве источников ценных генов при выведении новых сортов и форм [2].

На территории Казахстана произрастают крокус алатауский *C. alatavicus* Regel et Semen. и крокус Королькова *C. korolkowii* Regel et Maw [3].

Крокус алатауский *C. alatavicus* – высокодекоративное растение, ценное очень

ранним цветением и легкостью культивирования. В природной флоре Казахстана приотрастает в Джунгарском и Заилийском Алатау, Каратау. Охраняется в заповедниках Аксу-Джабагы и Алматинском, ботанических заказниках Беркара и Каракунуз, национальных природных парках Иле-Алатау и Алтын-Эмель [4].

В настоящее время в результате хозяйственной деятельности человека оба вида находятся под угрозой исчезновения и занесены Постановлением Правительства РК в "Перечень редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений" [5].

В мировой практике для сохранения эндемичных видов применяются два подхода: *in situ* – сохранение природных популяций в естественных местообитаниях; *ex situ* – хранение гермоплазмы в банке семян и выращивание в живых коллекциях в условиях интродукции. Проведенный патентный поиск по теме исследований показал перспективность использования метода культуры тканей для сохранения и повышения продуктивности ценных видов крокуса [6, 7]. Но различные виды и даже сорта одной и той же культуры требуют особых условий выращивания, и поэтому необходима разработка индивидуальных подходов к их культивированию.

Целью исследований являлось изучение особенностей введения и культивирования *in vitro* изолированных эксплантов *C. alatavicus* для разработки технологии микроклонального размножения эндемичного вида Флоры Казахстана.

Материалы и методы

Образцы растений крокуса алатауского *C. alatavicus* были собраны на территории Алматинской области на фазе цветения в конце марта - начале апреля.

Методика культивирования эксплантов и приготовления питательных сред общепринятая [8]. Исходным материалом служили клубнелуковицы маточных растений, взятые из природных мест произрастания. В качестве эксплантов использованы сегменты клубнелуковиц, цветочные почки, различные части цветка, листьев и др. Экспланты вводились в асептические условия в марте во время цветения маточных растений и после их вегетации на этапе перехода вновь

образованных клубнелуковиц к глубокому покою.

Для получения асептической культуры в качестве стерилизующих агентов использовали 70% этиловый спирт, 50 % р-р Доместос и 0,1 % р-р сулемы $HgCl_2$ и др. После стерилизации в асептических условиях каждую клубнелуковицу делили на 4-5 сегментов размером 0,5-1 см, которые далее высаживали на питательную среду с внесением различных концентраций регуляторов роста.

Для введения в культуру *in vitro* были использованы варианты среды Мурасиге и Скуга (МС) с различными концентрациями и сочетаниями фитогормонов: 6-бензиламинопурина (БАП), нафтилуксусная кислота (НУК), 2,4 дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4 Д), индолилмасляная кислота (ИМК), кинетин.

Для культуры изолированных пыльников использовали среду МС с внесением глутамина 400 мг/л, смеси аминокислот 100 мг/л, НУК 10 мг/л, БАП 1 мг/л и повышенный уровень сахара 45 %. Для индукции клубнеобразования использовали варианты среды с повышенным уровнем сахарозы.

Пробирочный материал с эксплантами содержали в темноте при 22° С, экспланты листьев в условиях освещения при температуре 25° С. Дальнейший рост и развитие оценивали по частоте каллусогенеза, количеству эксплантов с развившимися побегами и/или микролуковицами, количеству микролуковиц или побегов на экспланте.

Результаты и их обсуждение

Выявлено, что способностью к регенерации и каллусогенезу обладают экспланты изолированные от молодых, вновь образованных клубнелуковиц при их культивировании сразу после выкопки, в середине июля. На них отмечалось одновременное образование каллуса и развитие дополнительных побегов. Прямая регенерация побегов на эксплантах происходила за счет активации роста пазушных почек, локализованных на поверхности клубнелуковиц в результате индуцирующего действия цитокинина БАП. Количество побегов варьировало от 2 до 5 на одном экспланте.

Установлено, что количество полученных побегов на первичных эксплантах в течение первого пассажа зависит от гормонального состава питательной среды. Максимальное коли-

чество побегов 14 штук было получено при культивировании эксплантов на среде МС с внесением БАП в концентрации 2 мг/л и 0,5 мг/л 2,4 Д. Дополнение среды только БАП в концентрации 6 мг/л привело к регенерации меньшего количества побегов.

Одинаковый эффект на побегообразование выявлен у вариантов которые были одинаковыми по составу фитогормонов, но отличались концентрациями: 2,0 мг/л БАП + 0,1 мг/л 2,4 Д и 1,0 мг/л БАП + 0,25 мг/л 2,4 Д, соответственно.

Формирование каллуса происходило на поверхности среза через три недели культивирования на средах содержащей разные концентрации БАП и 2,4 Д. При дальнейшем пассировании каллуса на те же варианты сред через две недели отмечалось появление адвентивных побегов в каллусной ткани.

Для дальнейшего развития посадочный материал с побегами был перенесён в условия освещения с 16 часовым фотопериодом. В этих условиях через месяц пассирования наблюдалось отрастание побегов белого цвета.

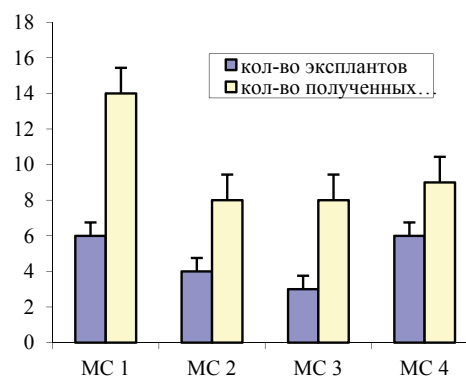
Для индукции корнеобразования полученные побеги были пересажены на варианты среды МС с 3 мг/л БАП +80 г/л сахарозы и МС с 1 мг/л ИМК +50 г/л сахарозы. В ходе культивирования отмечалось утолщение основания побегов и через две недели после пассирования были заметны клубневидные образования с усыхающими покровными чешуями, характерными для клубнелуковиц (рисунок 1).

Отмечено, что оставшиеся ткани исходных эксплантов клубнелуковиц с каллусом после отделения от них регенерированных побегов сохраняли способность к регенерации побегов. При этом, частота геммогенеза при пассировании каллусной ткани на среды БАП и 2,4 Д составляла 29 %.

Отмечено также закладка дополнительных почек у основания полученных побегов при их вторичном пассировании на среду МС с 6 мг/л БАП.

Формирование каллуса отмечено через три месяца культивирования на индуцирующей

среде МС, содержащей глютамин, аскорбиновую кислоту, БАП и НУК. При этом частота каллусообразования была низкая и не превышал 9 %. Только у одного из 11 высаженных пыльников в условиях темноты сформировался каллус плотной структуры желтоватого цвета. При дальнейшем пассировании на свежие питательные среды каллус увеличивает свою массу, но морфогенеза не отмечалось.



МС 1 – БАП 2,0 + 2,4 Д 0,5; МС 2 – БАП 2,0 + 2,4 Д 0,1; МС 3 – БАП 1,0 + 2,4 Д 0,25; МС 4 – БАП 6,0 (мг/л)

Рисунок 1 – Зависимость регенерационной способности эксплантов от гормонального состава питательной среды МС

Проведенные эксперименты показали, что в условиях *in vitro* реализация регенерационного потенциала у крокуса алатауского определяется фазой развития исходных растений, природой и физиологическим состоянием первичных эксплантов. Индукция роста пазушных почек, адвентивное побегообразование у основания побегов, образование морфогенного каллуса с последующей закладкой дополнительных побегов индуцируется на питательной среде у эксплантов вновь сформированных клубнелуковиц, изолированных на этапе их развития, когда в верхушечной почке происходит закладка вегетативных и генеративных органов.

Литература

- 1 Чекурова Г.В., Озерова С.О. Крокусы. – М: Кладезь-Букс, 2007. – 96 с.
- 2 Иващенко А.А. Тюльпаны и другие луковичные растения Казахстана. – Алматы: Две столицы, 2005. – 192 с.
- 3 Красная книга Казахстана. – Алма-Ата: Наука, 1981. – Т. 2.
- 4 Флора Казахстана. – Алма-ата: Издательство Академии наук Казахской ССР, 1958. – Т. 2. – С. 233
- 5 Перечень редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений. Постановление Правительства Республики Казахстан от 31 октября 2006 года.
- 6 Чуб В.В., Власова Т.А., Бутенко Р.Г. Физиология растений. – М.: Наука, 1994. – Т. 41. –№ 6. – с. 815–820
- 7 Iahi I., Jabeen M., Firdous N. Morphogenesis with saffron tissue culture // Plant Physiol. – 1987. – №128. – P. 227-232
- 8 Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В, Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 487 с.