

УДК 57.086.83(477.75):582.736/.736.3

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ СЕМЯН ЯЗВЕННИКА КРЫМСКОГО (*ANTHYLLIS TAURICA* JUZ.) И ПРОЦЕССА ИХ ПРОРАСТАНИЯ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Ляхова И.В., Теплицкая Л.М.

*Таврический национальный университет им. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: inna_lyahova79@mail.ru*

Приведены результаты исследования морфологических и морфометрических особенностей зрелых семян эндемичного вида крымской флоры Язвенника крымского. Показана возможность массового получения сеянцев в условиях стерильной культуры. Подобраны оптимальные условия культивирования и стимуляции процесса прорастания семян язвенника крымского *in vitro*.

Ключевые слова: бобовые, язвенник крымский, культура тканей, культура клеток.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в Крыму под угрозой исчезновения находятся не только отдельные виды, а также отдельные роды и семейства растений. Многие представители крымской флоры включены в приложение II Конвенции по международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой исчезновения, в Европейский список животных и растений находящихся под угрозой исчезновения (1991), Глобальный Европейский список (2002), Международную Красную книгу (МСОП) и Красную книгу Украины (1996) [1-4]. Среди многочисленных представителей крымской флоры в критическом состоянии находятся растения, относящиеся к лекарственным, декоративноцветущим, эндемичным и реликтовым видам [1-4]. В последние годы эти растения стали предметом неконтролируемого сбора и незаконной коммерческой деятельности.

В реализации стратегии сохранения растительных ресурсов все шире используются биотехнологические методы, основанные на выращивании изолированных клеток, тканей и органов на искусственных питательных средах в контролируемых условиях *in vitro*. Сегодня эти методы заняли место в комплексе мероприятий, направленных на поддержание биологического разнообразия. Успехи, достигнутые в области культивирования клеток и тканей растений *in vitro*, привели к разработке эффективных технологий размножения растений и создания генетических банков.

Язвенник крымский является эндемичным видом крымского полуострова [5]. Местонахождения его часто страдают из-за хозяйственной деятельности. Поэтому остро стоит вопрос о сохранении данного вида и поиске различных мероприятий по

его охране и размножению [6]. Несмотря на принимаемые в настоящее время меры, охрана язвенника крымского, остается малоэффективной.

В связи с этим целью работы было изучение морфологических особенностей семян *Anthyllis taurica* и разработка приемов культивирования их в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования были зрелые семена Язвенника крымского (*Anthyllis taurica* Juz.), собранные из природных популяций нижнего плато Чатыр Дага.

При выполнении экспериментальной работы использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре тканей растений [7, 8]. Для соблюдения антисептики работу по введению семян в культуру выполняли в условиях ламинарного бокса БП-4-005. Семена стерилизовали 96% и 70% этиловым спиртом, препаратом «Брадофен»-50% (время экспозиции 10-15 мин). После стерилизации материал промывали трижды дистиллированной водой.

Стерильные семена в условиях бокса очищали от семенной оболочки и эксплантировали на поверхность агаризованной питательной среды Уайта, модифицированной по составу и концентрации фитогормонов.

Таблица 1

Модифицированная питательная среда Уайта

Компоненты	Фитогормоны	Мг/л	Мг/л
KNO ₃		80,0	
MgSO ₄		750,0	
Ca(NO ₃) ₂ ·7H ₂ O		300,0	
Na ₂ SO ₄		200,0	
NaH ₂ PO ₄ ·xH ₂ O		19,0	
KCl		65,0	
KI		0,75	
H ₃ BO ₃		1,5	
MnSO ₄ ·4H ₂ O		5,0	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		3,0	
NaMoO ₄		0,001	
CuSO ₄ ·5H ₂ O		0,01	
Fe ₂ (SO ₄) ₃		2,5	
Никотиновая к-та		0,05	
Пиридоксин		0,01	
Тиамин		0,01	
Глицин		3,3	
	Кинетин		2,0
	ИУК		0,5
	БАП		5,0
Агар-агар		5,0-7,0	
Сахароза		2000,0	
pH		5,6-5,8	

Автоклавирование осуществляли при 1,0 атм., в течении 40 мин.

Культуральные сосуды помещали в условия термостатированного помещения (+26-28⁰С) на стеллажи в СУВРе. Освещение осуществляли с помощью люминисцентных ламп ЛФР-159, при 16-часовом фотопериоде. Освещенность составляла 3000-4000 люкс, относительная влажность 60-70%.

Для получения достоверных результатов опыты проводили в трехкратной повторности, в каждом варианте было 10 культуральных сосудов.

Размеры семян определяли под микроскопом МБС-1А с помощью окулярной линейки. Объем выборки составлял 30 штук.

Математическая обработка результатов экспериментов проводили с использование пакета прикладных программ Microsoft office (Excel Statica 1.0) для Windows XP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Язвенник крымский *Anthyllis taurica* Juz. произрастает на известняковых и меловых склонах предгорья и южного макросклона Крымских гор (рис 1).



Рис. 1. *Anthyllis taurica* в фазу плодоношения

Плоды бобы светло-коричневые, односемянные, яйцевидные (суженные сверху) или округлые, ассиметричные (как бы срезанные утолщенным брюшным швом), с шиловидным носиком 3,5-4 мм длиной, 2,5-3 мм шириной, голые, покрытые густой сеткой жилок (рис. 2). Семена обратнойцевидные или почти овальные, слегка сдавленные с боков, 1,5-2,5 мм длиной, гладкие, слабо блестящие или матовые, коричневые, к верхушке оливковые (рис. 3). Семенной рубчик округлый, светлый, диаметром 0,2 мм. Корешок зародыша не выделяется, его длина равна 1/2 длины семядолей. Халаза в виде бугорка. На ранних стадиях развития семени все клетки наружного интегумента находятся в состоянии дифференциации, и заполнены питательными веществами. Снаружи спермодерма покрыта эпидермой,

которая иногда достигает довольно большой толщины (до 400 мкм). Клетки эпидермы с утолщенными стенками, сильно вытянуты в периклинальном направлении, склероподобны и возникают из наружной эпидермы интегумента. Спермодерма развивается из наружного интегумента. В зрелом семени спермодерма состоит лишь из изменившихся остатков наружного интегумента семязачатка с сохранившимися клетками двух наружных слоев.



Рис. 2. Зрелый плод *Anthyllis taurica*



Рис. 3. Зрелое семя *Anthyllis taurica*

Семена *A. taurica* имеют особенность в формировании оболочки – образование светлой линии в наружной эпидерме. Светлая линия, которая проходит несколько выше середины семени, представляет собой особенно плотную и более прозрачную зону оболочки. Под эпидермой имеется однорядный слой гиподермы, её клетки вытянуты в длину незначительно. По мере развития семени межклеточные пластинки, склеивающие боковые стенки клеток, разрушаются; сами стенки отодвигаются друг от друга и приобретают своеобразную форму, напоминающую песочные часы. Такая форма клеток гиподермы специфична только для представителей семейства бобовых [9, 10].

Среди тканей, составляющих семенной рубчик, наиболее своеобразны двойная палисадная эпидерма, трахеидный остров и астероидная ткань. Палисадная эпидерма является остатком фуникулуса. Наружную часть площадки семенного рубчика занимают остатки фуникулуса (семяножки) в виде одного слоя плотно сомкнутых друг с другом клеток, которые носят название верхней или наружной, палисадной эпидермы рубчика. Она переходит непосредственно в палисадную эпидерму спермодермы, покрывающую все семя одним слоем. Оба слоя эпидермы рубчика рассекает на две равные доли и следующую вдоль семенного рубчика щель, в которую упирается своеобразное тело, состоящее из трахеид, и поэтому называемое трахеидным островом. Трахеиды относительно коротки и представляют собой несколько вытянутые паренхимные клетки, снабженные спиральными или сетчатыми утолщениями. Трахеидный остров – это выпячивание ткани фуникулуса в области спермодермы. Однако он не связан непосредственно с сосудистым пучком, идущим по фуникулусу в семя. По обеим сторонам от трахеидного острова расположена так называемая астероидная ткань, которая выделяется большими межклетниками и разнообразием форм клеток, снабженных отростками; межклетники наполнены воздухом. За астероидной тканью внутрь семени идёт ряд

слоёв клеток. Обращают на себя внимание весьма своеобразные клетки расположенные за палисадной эпидермой. Они соединены между собой лишь своими концами, средняя часть остаётся свободной, образуя межклетники. Этот слой обычно называют гиподермой. За гиподермой идет так называемый питательный слой, состоящий из клеток, нередко довольно значительно сплюснутых. В семени в клетках питательного слоя находятся питательные вещества. Для *Fabacea* выделяют так называемый кольцевой ариллус [10]. Последний представляет собой тонкое, легко отделяющееся от семени, сухое кольцо, окружающее семенной рубчик, и являющееся остатком ткани периферической части семени. Семя к моменту созревания состоит из спермодермы (семенной кожуры), зародыша и остатков эндосперма.

Зрелый зародыш семени имеет массивные семядоли, подсемядольное колено, корешок и почечку. В почечке хорошо дифференцированы два примордиальных листа и первые настоящие листья.

Как указывает Терёхин (1996) *A. taurica* относится к растениям с минимальным количеством эндосперма. Дифференцированный зародыш занимает почти всю полость семени. Запасные питательные вещества сосредоточены в клетках и тканях зародыша [11].

Как правило, морфологические особенности семян отражаются и в морфометрических параметрах. Проведенный нами анализ морфометрических параметров семян *A. taurica* урожая 2009 года показал незначительные колебания их размеров и массы (табл. 2).

Таблица 2

Весовые и морфометрические характеристики зрелых семян *Antyllis taurica*

Суммарный вес 100 семян (мг)	Масса одного семени (мг)	Длина одного семени (мм)	Ширина одного семени (мм)
474,79 ± 0,11	4,70 ± 0,04	2,46 ± 0,03	1,40 ± 0,01

Наиболее важными показателями качества и жизнеспособности семян являются их всхожесть и энергия прорастания. Одним из этапов нашей работы было изучение прорастания семян язвенника крымского, в условиях *in vitro*.

Семена очищали от семенной кожуры и культивировали на 3 вариантах питательной среды Уайта отличающихся составом и концентрацией фитогормонов: ИУК, БАП, кинетина.

Первые признаки развития обнаруживались уже через одни сутки культивирования. Семена набухали, увеличивались в размерах, наблюдался активный рост главного корня. На 3 сутки культивирования наблюдалось развитие семядольных листьев. Появление первой пары настоящих листьев обнаруживалось на 7-10 сутки (табл. 3, рис. 4).

Таблица 3

Основные этапы развития зародышей и проростков язвенника крымского на питательной среде

1-й день	3-й день	5-й день	7-10-й день
Увеличение размеров зародыша, набухание семядолей, длина корня 1,5-2,0 см	Образование семядольных листьев, длина корня 2,0-3,5 см	Высота микропобега: 3,5-4,0 см, корень- 5,0-7,0 см	Появление первой пары настоящих листьев и боковых корешков. Высота микропобега: 3,5-4,0 см, корень-5,0-7,0 см

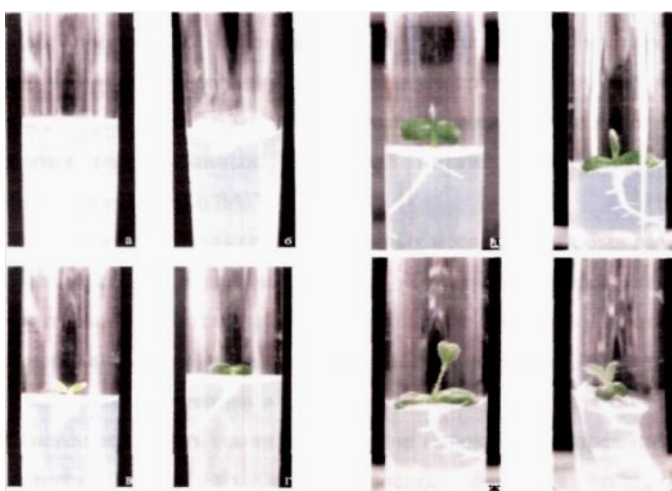


Рис. 4. Последовательные этапы развития сеянцев в культуре изолированных семян *A. taurica* на питательной среде Уайта.

Через 18 суток культивирования сеянцы имели три пары настоящих листьев и хорошо развитые главный и боковые корни.

Исследования показали, что нормальное развитие сеянцев наблюдалось только в том случае, если на питательную среду эксплантировали семена без признаков морфологических аномалий. Зародыши, имеющие небольшие точечные некротические участки, на вторые-третьи сутки культивирования останавливались в развитии и в дальнейшем погибали.

В результате исследований было выявлено влияние регуляторов роста на процесс прорастания семян в условиях *in vitro*. Были использованы модифицированные питательные среды Уайта, дополненные кинетином, БАП и ИУК в различных концентрациях. Исследования показали, что введение

фитогормонов в питательные среды приводило в основном к аномальному развитию. Это проявлялось в увеличении размеров семядольных листьев, в ингибировании развития корневой системы и микрорастений в целом. Однако, максимальный выход нормальных проростков наблюдался при эксплантации семян на модифицированную питательную среду Уайта, дополненную кинетином 2мг/л и ИУК 0,5мг/л. Установлено преимущество использования питательной среды Уайта с кинетином по сравнению с БАП.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены морфологические и морфометрические особенности зрелых семян язвенника крымского *Anthyllis taurica* Jyz., которые характерны для рода *Anthyllis*.
2. Подобраны оптимальные условия получения асептической культуры семян язвенника крымского. Лучшие результаты были получены при стерилизации семян 50% раствором брадофена при экспозиции 10-15 мин.
3. Подобран состав питательной среды для развития полноценных проростков язвенника крымского при культивировании семян *in vitro*. Максимальный выход нормальных проростков наблюдался при эксплантации семян на модифицированную питательную среду Уайта, дополненную кинетином – 2 мг/л и ИУК- 0,5 мг/л.

Список литературы

1. Голубев В.Н. Биологическая флора Крыма / В.Н. Голубев. – Ялта : ГНБС. – 1996. – 86 с.
2. Дидух Я.П. Карадагский природный заповедник / Я.П. Дидух, Ю.Р. Шеляг-Сосонко – Киев, 1982. – 186 с.
3. Червона книга України. Рослинний світ / [ред. Ю.Р. Шеляг-Сосонко]. – К: Українська енциклопедія, 1996. – 680 с.
4. Оценка угроз биоразнообразию Крыма / [Ю.Р. Шеляг-Сосонко, Я.П. Дидух, В.Г. Ена, В.С. Тарасенко] // Природа. – 1988. – № 1–2. – С. 2–4.
5. Ена А.В. Феномен флористического эндемизма и его проявления в Крыму : автореф. дис. на соискание науч. степени доктора биол. наук : спец. 03.00.04 «Ботаника» / А.В. Ена. – К., 2008. – 30 с.
6. Вопросы развития Крыма. Научно-практический дискуссионно - аналитический сборник Вып. 13. // Материалы к Красной книге Крыма. – Симферополь. :Таврия-плюс, 1999. – С 8–9.
7. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений и биотехнология на их основе / Р.Г. Бутенко. – М. : ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
8. Калинин Ф.Л. Технология микрклонального размножения растений / Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. – К. : Наукова Думка, 1992. – 488 с.
9. Эсау К. Анатомия семенных растений / Эсау К. – М. : Мир, 1980. – 558 с.
10. Яковлев Г.П. Бобовые земного шара / Яковлев Г.П. – Л.: Наука, 1991. – 144 с.
11. Терёхин Э.С. Семя и семенное размножение / Терёхин Э.С. – СПб : Мир и семья. – 1996. – 377 с.
12. Овчаров К.Е. Физиологические основы всхожести семян / Овчаров К.Е. – М., 1969. – 305 с.

Ляхова И.В. Вивчення морфологічних особливостей насіння заячої конюшини кримської (*Anthyllis taurica* Juz.) і процесу його проростання в умовах *in vitro* / І.В. Ляхова, Л. М. Теплицька // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62), № 4. – С. 137-144.

Наведено результати дослідження морфологічних і морфометричних особливостей зрілого насіння ендемічного виду кримської флори заячої конюшини кримської. Показана можливість масового отримання сіянців в умовах стерильної культури. Підібрано оптимальні умови культивування та стимуляції процесу проростання насіння заячої конюшини кримської *in vitro*.

Ключові слова: бобові, заяча конюшина кримська, культура тканин, культура клітин.

Lyahova I. The study of morphological characteristics of seeds *Anthyllis taurica* Juz. and their germination process *in vitro* / I. Lyakhova, L. Teplitskaya // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – Vol. 23 (62), No 4. – P. 137-144.

The results of the study of morphological and morphometric features of mature seeds of endemic species of Crimean flora *Antyllis taurica* Juz. are listed here. The possibility of mass production of seedlings in sterile culture is shown. The optimal conditions for the cultivation and stimulation of germination of the *Antyllis taurica* Juz. *in vitro* are selected.

Keywords: Fabaceae, *Antyllis taurica* Juz., tissue culture, cell culture.

Поступила в редакцію 28.11.2010 г.