

# БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

---

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского

Биология. Химия. Том 4 (70). 2018. № 2. С. 3–10.

УДК 57.085.23

## ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР *CRAMBE MARITIMA* L. И ИХ ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Бугара И. А.<sup>1</sup>, Омельченко А. В.<sup>1</sup>, Газель Е. В.<sup>1</sup>, Кирилин К. О.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия

<sup>2</sup>Медицинская академия им. С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского»

E-mail: bia.05@mail.ru

Показана возможность получения каллусных культур *C. maritima* при культивировании листовых эксплантов на питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л кинетин. Используемая питательная среда была эффективна для дальнейшего пассирования каллуса. На основании цитологических исследований первичных и пассируемых каллусных культур *C. maritima* показано присутствие в них клеток меристематического типа, клеток паренхимного типа, различающихся по размеру, а также трахеальных элементов.

**Ключевые слова:** *Crambe maritima* L., каллусная культура.

### ВВЕДЕНИЕ

Катран приморский – *Crambe maritima* L. относится к семейству Brassicaceae, является литоральным видом, произрастающим на прибрежных песках, галечниках, ракушечниках. Естественный ареал распространения – Северная, Центральная и Восточная Европа, Средиземноморье, Черноморское побережье Кавказа. На территории Республики Крым охраняется в Ялтинском горнолесном, Карадагском, Казантипском и Опукском природных заповедниках, национальном природном парке «Тарханкутский» и других особо охраняемых природных территориях [1]. Введен в культуру в Ботаническом саду Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского [2]. Также *C. maritima* внесен в европейский Красный список сосудистых растений [3], в список дикорастущих растений, которые могут служить генетическим материалом для улучшения ценных сельскохозяйственных культур [4].

Интерес практического применения *C. maritima* основан на биохимических особенностях вида, связанных с содержанием флавоноидных гликозидов и потенциально антимикробных глюкозинолатов [5, 6]. Несмотря на то, что *C. maritima* не является фармакопейным растением и в настоящее время не входит в Государственный реестр лекарственных средств РФ, перспективным является

применение его в медицинской практике в качестве фитотерапевтического средства. В этой связи является актуальной разработка биотехнологических методов получения клеточных культур, способных к синтезу и накоплению биологически активных веществ, с возможностью последующего использования их при разработке косметических и лекарственных препаратов.

Выполненные ранее исследования по биотехнологии *C. maritima* были связаны с решением вопросов оптимизации составов питательных сред для получения каллусных и суспензионных культур и дальнейшей регенерации растений [7]. При этом авторы отмечали, что индукцию каллусообразования и последующую регенерацию микропобегов возможно получить на питательной среде, содержащей бензиламинопурин, индолилуксусную кислоту и кинетин. Для индукции корнеобразования адвентивные микропобеги переносили на питательную среду, дополненную индолилмасляной или индолилуксусной кислотами [8]. Вместе с тем введение в состав питательной среды 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты приводило к образованию светло-зеленого, неморфогенного каллуса [7]. Питательные среды, дополненные бензиламинопурином и кинетином, также были эффективны для прямой регенерации укорененных микропобегов из различных типов эксплантов вегетативных органов *C. maritima* [4].

Вместе с тем исследований, посвященных изучению вопросов получения и пассирования каллусных культур *C. maritima*, ранее не проводилось. Поэтому актуальным является подбор составов питательных сред для индукции каллусообразования и пассирования каллуса *C. maritima*, а также проведение изучения цитологических особенностей каллусных культур.

Цель настоящего исследования – получение каллусных культур *C. maritima* и их цитологическое описание.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили растения *C. maritima*, полученные из семян, собранных в Сакском районе Республики Крым в 2017 году. Семена проращивали в чашках Петри на бумажных фильтрах с добавлением 10 мл дистиллированной воды. Перед посадкой проводили поверхностную обработку семян 1 % раствором перманганата калия в течение 10 минут. Чашки Петри с семенами помещали в инкубатор на 7 суток при температуре 25 °С без освещения. После 7 суток проростки переносили в пластиковые стаканчики на 200 мл с субстратом из почвы и агроперлита. Полив растений проводили по мере необходимости, но не реже 2-х раз в неделю.

Подготовку посуды, инструментов, питательных сред и растительного материала проводили по методике, общепринятой в работах по культивированию изолированных клеток, тканей и органов растений [9].

Для культивирования листовых эксплантов и получения каллусных культур *C. maritima* использовали агаризованную питательную среду Мурасиге и Скуга [10], содержащую 2,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) и 0,5 мг/л кинетина. Приготовленную питательную

среду разливали в химические пробирки 16x150 П-1 по 10 мл и по 30 мл в колбы Эрленмейера на 100 мл, автоклавировали при температуре 115 °С в течение 25 минут.

Поверхностную стерилизацию эксплантов проводили 7 % раствором гипохлорита натрия в течение 15 минут с последующей промывкой в трех сменах автоклавированной дистиллированной воды, по 15 минут в каждой. После стерилизации листовые пластинки разрезали на сегменты размером 5x10 мм. Помещение эксплантов на питательную среду выполняли в ламинарном боксе MSC Advantage™ Thermo Fisher Scientific II класса биологической безопасности. Культивирование эксплантов проводили в инкубаторе лабораторном Climacell™ MMM Medcenter Einrichtungen GmbH при 16-ти часовом фотопериоде, освещенности 70 % от максимальной, влажности 60 %, температуре световой фазы 26 °С, темновой – 22 °С. Один цикл культивирования (пассаж) составлял 45 суток.

Для цитологических исследований каллусных культур *C. maritima* готовили временные давленные препараты участков каллуса, размером не более 2,0 мм, которые 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 получения монослоя клеток каллусные культуры мацерировали в 1 Н растворе HCl в течение 10 минут при температуре 60 °С. Препараты анализировали под микроскопом Olympus CX53. Объем выборки составлял не менее 30 клеток каждого типа.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первые признаки каллусообразования в культуре листовых эксплантов *C. maritima* на питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л БАП и 0,5 мг/л кинетин, визуально обнаруживались на 12–14 сутки культивирования. Каллус начинал образовываться в местах среза, а также на поверхности листовых сегментов. Формирующийся каллус отличался средней плотностью и характеризовался светло-зеленой окраской. Через 45 суток культивирования размер сформировавшегося каллуса был достаточный для переноса на свежую питательную среду (рис. 1).

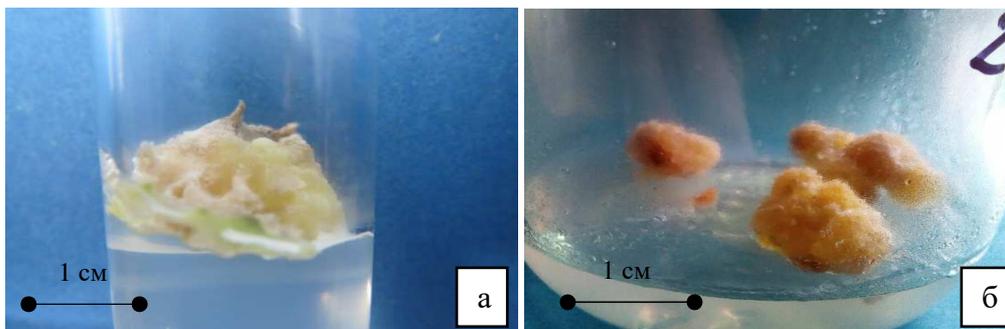


Рис. 1. Первичный каллус (а) и пассируемый каллус (б) *Crambe maritima* L. (питательная среда Мурасиге и Скуга, содержащая 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л кинетина)

Цитологические исследования каллусных тканей 0-пассажа *C. maritima* позволили установить наличие в них клеток меристематического и паренхимного типов, а также трахеальных элементов (адвентивных трахеид) (рис. 2.).

Клетки меристематического типа первичного каллуса располагались крупными скоплениями в местах локализации трахеальных элементов (рис. 2, а), отличались небольшими размерами  $21,3 \pm 2,7$  мкм, имели крупное ядро (рис. 2, б). Клетки паренхимного типа, составляющие основную массу каллуса, характеризовались значительно более крупными размерами –  $123,5 \pm 5,4$  мкм, имели округлую форму, пристенно расположенную цитоплазму, мелкие ядра. В некоторых клетках паренхимного типа обнаруживались зерна запасного крахмала (рис. 2, в). Особо следует отметить выявленные нами в первичном каллусе меристематические узлы, центральная часть которых представлена активно делящимися клетками, а периферия – клетками паренхимного типа (рис. 2, г).

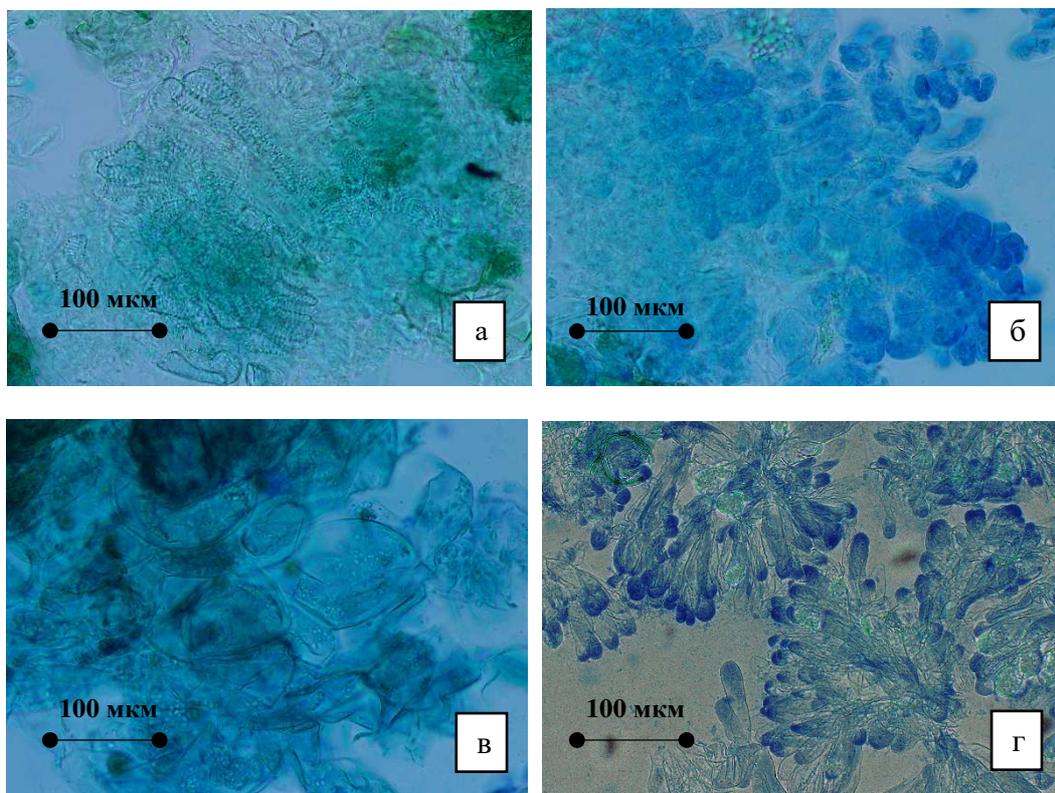


Рис. 2. Морфология клеток каллусной культуры *Crambe maritima* L. 0-пассажа: а – трахеальные элементы, б – клетки меристематического типа, в – клетки паренхимного типа, г – меристематические узлы

Исследования цитологических особенностей каллусных культур *C. maritima* I-пассажа выявили наличие клеток паренхимного типа различного размера, клеток

меристематического типа, а также трахеальных элементов (рис. 3). Размеры клеток меристематического типа достигали  $23,7 \pm 1,9$  мкм, располагались они крупными скоплениями (рис. 3, а).

Клетки паренхимного типа характеризовались округлой формой и были представлены двумя классами, в зависимости от размера (рис. 3, б). Размеры клеток первого класса достигали  $72,8 \pm 4,3$  мкм, второго класса –  $211,4 \pm 8,1$  мкм. В цитоплазме некоторых клеток паренхимного типа более крупных размеров обнаруживались зерна запасного крахмала.

Трахеальные элементы располагались одиночно, небольшими группами и крупными скоплениями длиной  $712,4 \pm 17,4$  мкм и шириной  $194,7 \pm 4,3$  мкм, обеспечивая тем самым высокую плотность каллусной культуры (рис. 3, в, г).

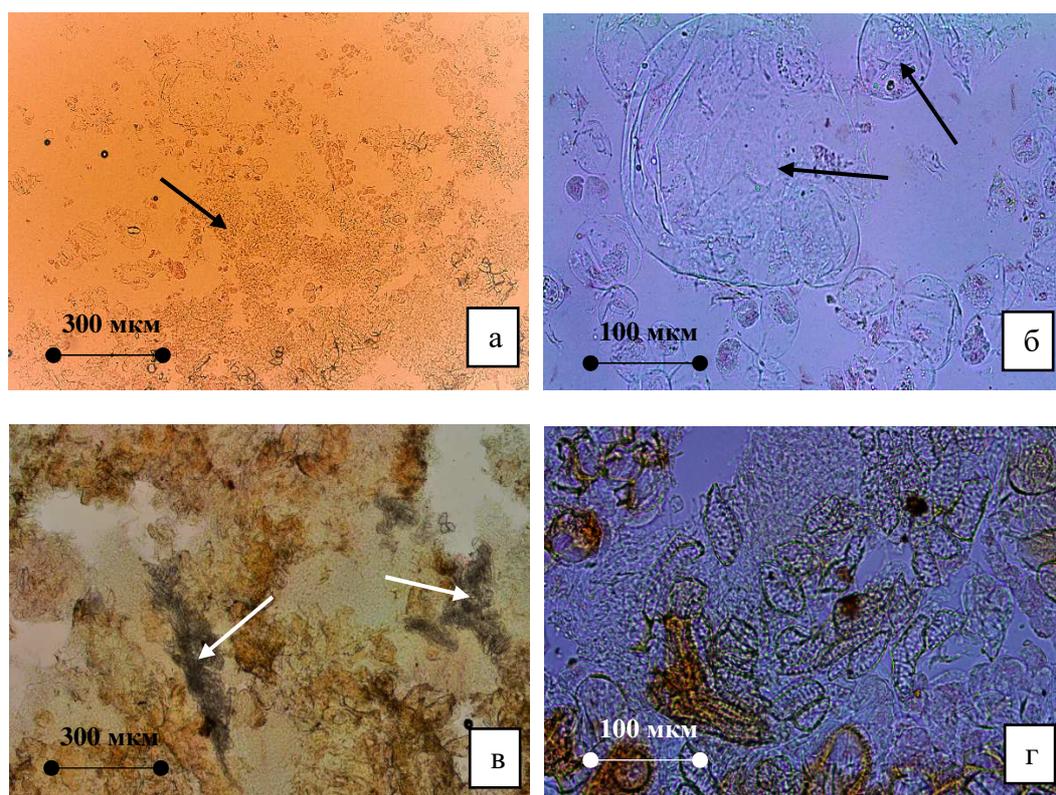


Рис. 3. Морфология клеток каллусной культуры *Crambe maritima* L. I-пассажа: а – общий вид клеток каллусной культуры, б – клетки паренхимного типа различного размера, в – скопления трахеальных элементов, г – трахеальные элементы.

Таким образом, проведенные нами исследования показали принципиальную возможность получения и дальнейшего пассирования каллусных культур *C. maritima* с использованием питательной среды Мурасиге и Скуга, дополненной

2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л кинетин. Выявленные цитологические особенности первичных каллусных культур, связанные с образованием меристематических узлов, свидетельствуют об активной пролиферации клеток, что проявляется в высокой интенсивности роста каллусных культур. Присутствие в первичном и пассируемом каллусе специализированных клеток паренхимного типа, выполняющих запасающие функции, может служить основанием для дальнейших исследований, связанных с разработкой приемов получения биологически активных веществ на основе каллусных и суспензионных культур.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Подобраны условия индукции каллусообразования и дальнейшего пассирования каллуса *C. maritima* на питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л кинетин.
2. Выявлены цитологические особенности первичных и пассируемых каллусных культур *C. maritima*, показано присутствие в них клеток меристематического типа, клеток паренхимного типа, различающихся по размеру, а также трахеальных элементов.

Работа выполнена в рамках реализации проекта программы развития ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского» на 2015–2024 годы: «Разработка новой междисциплинарной модульной магистерской программы «Биотехнология, биохимия и биоинформатика».

#### Список литературы

1. Красная книга Республики Крым: Растения, водоросли и грибы / отв. ред. А. В. Ена, А. В. Фатерьяга. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2015. – 480 с.
2. Михайлова О. А. Современное состояние популяций *Crambe maritima* L. в Крыму / О. А. Михайлова // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27 (66), № 5. – С. 94–101.
3. Bilz M. European Red List of Vascular Plants / M. Bilz, S. P. Kell, N. Maxted, R. V. Lansdown // Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2011. – P. 142.
4. Пушкарьова Н. О. Розробка способів мікроклонального розмноження та вивчення впливу культивування *in vitro* на біохімічні властивості та генетичну мінливість рослин рідкісних видів роду *Crambe*: дис... на здоб. наук. ступеня канд. біол. наук. / Пушкарьова Н. О. – 2017. – 155 с.
5. Adarsh Pal Vig Bio-protective effects of glucosinolates – A review / Adarsh Pal Vig, Geetanjali Rampal, Tarunpreet Singh Thind, Saroj Arora // LWT - Food Science and Technology. – 2009. – N 42. – P. 1561–1572.
6. Anushree Sanyal Biological Flora of the British Isles: *Crambe maritima* / Anushree Sanyal, Guillaume Decocq // Journal of Ecology. – 2015. – 103. – P. 769–788.
7. Drew R. L. K. Generation of Seakale (*Crambe maritima* L.) plantlets by tissue culture / R. L. K. Drew, Jane R. Fellows // Annals of Botany. – 1986. – V. 58. – P. 179–181.
8. Peron J. Y. *In vitro* propagation of *Crambe maritima* / J. Y. Peron, E. Regnier // Canadian Journal of Botany – 1987. – 65(1). – P. 72–75.
9. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
10. Murashige T. The revised medium for rapid growth, and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. A. Skoog // Phisiol. Plant. – 1962. – V.15, №13. – P. 473–497.

THE CALLUS CULTURES OF *CRAMBE MARITIMA* L. RECEIVE AND THEIR  
CYTOLOGICAL CHARACTERISTICS

*Bugara I. A., Omelchenko A. V., Gazel E. V., Kirilin K. O.*

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russian Federation*  
*E-mail: bia.05@mail.ru*

*Crambe maritima* L. belongs to the family of Brassicaceae. Natural distribution area of Northern, Central and Eastern Europe, the Mediterranean, the Black Sea coast of the Caucasus, the Republic of Crimea. Introduced *C. maritima* to the culture in the Botanical Garden of the Crimean Federal University named V.I. Vernadsky. *C. maritima* entered in the European Red List of Vascular Plants, a list of wild plants that can serve as a genetic material for improving valuable crops.

The interest of the practical application of *C. maritima* was founded on the biochemical features of the species associated with the content of potentially flavonoid glycosides and antimicrobial glucosinolates. In this connection, the development of biotechnological methods for obtaining cell cultures capable of synthesizing and accumulating biologically active substances, with the possibility of their subsequent use in the development of cosmetic and medicinal products, is topical.

When using the Murashige and Skoog medium supplemented with 2,0 mg/l of 2,4-D, 0,5 mg/l of 6-BAP and 0,5 mg/l of kinetin, the callus formation in leaf explant the *C. maritima* were visually detected on 12–14 days of cultivation. The emerging callus differed in average density and was a light green color.

The cytological studies showed that cells of meristematic type were located in large clusters in places of localization of tracheal elements, differed in small sizes  $21,3 \pm 2,7 \mu\text{m}$ , and a large nucleus. The cell size of the parenchymal type in primary callus was  $123,5 \pm 54 \mu\text{m}$ . Two classes, depending on the size, represented parenchymal cells of callus of the first passage. The sizes of the first class cells reached  $72,8 \pm 4,3 \mu\text{m}$ , the second class  $211,4 \pm 8,1 \mu\text{m}$ . We also showed the presence in the callus cultures of *C. maritima* 0-passage and I-passage of tracheal elements forming large clusters.

**Keywords:** *Crambe maritima* L., callus culture.

References

1. *Krasnaya kniga Respubliki Krym rasteniya vodorosli i griby*. Otv. Red. A. V. Ena, A. V. Fateryga, 480 p. (It. 'Arial', Simferopol, 2015).
2. Mihajlova O. A. *Sovremennoe sostoyanie populyacij Crambe maritima L. v Krymu*, Uchenye zapiski Tavricheskogo nacionalnogo universiteta im V. I. Vernadskogo, seriya-Biologiya, Himiya, **27 (66)**, 5, 94 (2014).
3. Bilz M., Kell S. P., Maxted N., Lansdown R. V. *European Red List of Vascular Plants*, 134 p. (Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2011).
4. Pushkarova N. O. *Rozrobka sposobov mikroklonalnogo rozmnozheniya ta vivchennya vplivu kultivuvannya in vitro na biohimichni vlastivosti ta genetichnu minlivist roslin ridkisnih vidiv rodu Crambe* (Dis. na zdob. nauk. stupenya kand. boil. nauk., 155, 2017).
5. Adarsh Pal Vig, Geetanjali Rampal, Tarunpreet Singh Thind, Saroj Arora *Bio-protective effects of glucosinolates – A review*, LWT – Food Science and Technology, **42**, 1561 (2009).

6. Anushree Sanyal, Guillaume Decocq Biological Flora of the British Isles: *Crambe maritima*, *Journal of Ecology*, **103**, 769 (2015).
7. Drew R. L. K., Jane R. Fellows Generation of Seakale (*Crambe maritima* L.) plantlets by tissue culture, *Annals of Botany*, **58**, 179 (1986).
8. Peron J. Y., Regnier E. In vitro propagation of *Crambe maritima*, *Canadian Journal of Botany*, **65** (1), 72 (1987).
9. Kalinin F. L., Sarnackaya V. V., Polishchuk V. E. *Metody kultury tkanej v fiziologii i biohimii rastenij*, 488 p. (Naukova Dumka, Kiev, 1980).
10. Murashige T., Skoog F. A., Murashige T. The revised medium for rapid growth, and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant*, **15** (13), 473 (1962).