

## Литература

1. Красная книга Брянской области. Растения / Сост. О.И. Евстигнеев, Ю.П. Федотов, Н.Н. Панасенко и др. – Брянск, 2004. – 272 с.
2. Красная книга Пензенской области. Т.1: Грибы и сосудистые растения / Сост. А.И. Иванов, Л.А. Новиков, А.А. Чистякова и др. – Пенза, 2002. – 160 с.
3. Красная книга Республики Мордовия. Т.1. Редкие виды растений, лишайников и грибов / Сост. Т.Б. Силаева. – Саранск, 2003. – 288 с.
4. <http://xn--80aaalyjcwczm4o.xn--c1aj2a.xn--p1ai/plant/62/>
5. <http://www.plantarium.ru/page/view/item/22760.html>
6. Губанов И. А. и др. *Lilium martagon* L. [*L. pilosiusculum* (Freyn) Miscz.] — Лилия саранка // Иллюстрированный определитель растений Средней России. В 3 т. – М.: Т-во науч. изд. КМК, Ин-т технолог. иссл., 2002. — Т. 1. – С. 466.
7. Костюкова Е.Е., Заякин В.В., Нам И.Я. Клональное микроразмножение *in vitro* для сохранения редких и исчезающих видов растений, занесенных в Красную книгу Брянской области // Сб. матер. международной научно-практической конференции молодых ученых «Современная биотехнология: фундаментальные проблемы, инновационные проекты и бионанотехнология», Брянск, 2010. – С. 71-75
8. Му-За-Чин В.В., Нам И.Я. Клональное микроразмножение лилии саранки в культуре *in vitro* // Теоретические основы применения биотехнологии, генетики и физиологии растений в современной селекции растений и растениеводстве / Материалы международной научно-практической конференции молодых ученых. Брянск, 2009. – С. 193-186.
9. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plantarum*. – №15. – P. 473-497.

### KOSTYUKOVA E.E., NAM I.Y., ZAYAKIN V.V.

*Bryansk State University named after academician I.G. Petrovsky  
Russia, 241036, Bryansk, Bezhitskaya str., 14, e-mail: iyanam1@yandex.ru, wild.biologist@mail.ru*

### COMPETENCE FOR REGENERATION ON BULBLET EXPLANTS OF RARE AND ENDANGERED PLANT OF LILIUM MARTAGON L.

**Purpose.** In this study organogenic capacity of bulblet of *Lilium martagon* L. was examined. **Methods.** The effect of different plant growth regulators on regeneration of *L. martagon* was studied on Murashige and Skoog's (MS) medium. For regeneration different plant growth regulators added to MS basal medium were used. **Results.** Our results indicate that indole acetic acid and 6- benzilaminopurine promoted shoot regeneration and root formation from bulblet explants. Plantlets were acclimatized well in a greenhouse conditions. **Conclusions.** Best results was obtained on MS basal medium with 0.25mg/l 6- benzilaminopurine and 0.5mg/l indole acetic acid.

**Key words:** *Lilium martagon* L., plant growth regulators, regeneration, bulblet explants.

### КРУГЛОВА А.Е., КРУГЛОВА Н.Н.

*Институт биологии Уфимского научного центра РАН  
Россия, 450054, г. Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: aneta@ufaras.ru*

### БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ *OXYTROPIS BASCHKIRENSIS* KNJASEV В ЭМБРИОКУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

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 [1]. Коллекции интродуцированных редких видов служат базой для их реинтродукции (репатриации) в естест-

венные местообитания и тем самым – сохранения и восстановления природных популяций [2]. В то же время, для проведения реинтродукционных работ требуется значительное количество качественных проростков интродуцированных растений. Перспективные современные способы массового получения и тиражирования редких и исчезающих растений состоят в разработке различных биотехнологий получения их проростков-регенерантов в культуре *in vitro*. Одно из

направлений таких разработок – использование метода эмбриокультуры *in vitro*, основанного на детальном знании по формированию и развитию зародыша.

Род *Oxytropis* (Остролодочник), сем. *Fabaceae* Lindl. (Бобовые), включает многие редкие эндемичные и реликтовые виды, внесенные в «Красные книги» ряда регионов России. Один из представителей этого рода остролодочник башкирский *Oxytropis baschkirensis* Knjasev (выделен из вида остролодочник сходный *Oxytropis ambigua* (Pall.) DC.) относится к группе редких

### Материалы и методы

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

Применили следующие методы исследований:

1) метод фенологических наблюдений [4]; 2) методы цитологических (светооптических) исследований [5], при этом постоянные препараты окрашивали согласно методике тройного окрашивания, просматривали и фотографировали

### Результаты и обсуждение

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

Согласно результатам цитогистологического исследования, зрелый четырёхклеточный пятиядерный зародышевый мешок (женский гаметофит) представлен развитой яйцеклеткой, двумя клетками-синергидами и центральной клеткой с двумя неслившимися полярными ядрами. Антиподы полностью дегенерированы. Перед оплодотворением яйцеклетки отмечено слияние полярных ядер центральной клетки. В клетках-синергидах большое развитие получают крючкообразные выросты, служащие для лучшего привлечения пыльцевой трубки.

Развитие зародыша начинается с формирования зиготы. Синергиды постепенно дегенерируют. Зигота после некоторого периода созревания делится поперечной перегородкой, формируя равные по размерам клетки двуклеточного зародыша. Клетки двуклеточного зародыша претерпевают поочередно деление с формированием сначала трёхклеточного, затем Т-

исчезающих эндемиков Южного Урала, включенных в «Красную книгу Республики Башкортостан» [3]. В Институте биологии Уфимского научного центра РАН ведутся интродукционные исследования этого вида, начаты работы по его реинтродукции в естественные условия местобитания.

Цель данного исследования состояла в разработке основных этапов биотехнологии получения регенерантов *Oxytropis baschkirensis* Knjasev в эмбриокультуре *in vitro*.

ли с применением светового микроскопа Axio Imager 1 (Carl Zeiss, Jena), а также с помощью цифрового микроскопа проходящего света Микровизор mVizo-103 (ООО «ЛЮМО ФОТОНИКА», Санкт-Петербург), измерения проводили при помощи шкалы окуляр-микрометра; 3) метод эмбриокультуры *in vitro* в разработке сотрудников лаборатории экспериментальной эмбриологии растений Института биологии Уфимского научного центра РАН [6]. Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Microsoft Office Excel 2003.

образного четырёхклеточного зародыша. В целом, по признакам слияния полярных ядер перед оплодотворением, поперечного деления зиготы и Т-образного расположения четырёхклеточного зародыша, ранний эмбриогенез *O. baschkirensis* проходит согласно Onagrad-типу, характерному для большинства представителей сем. *Fabaceae* [7].

Продольные и поперечные деления клеток четырёхклеточного 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 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.

В целом, эмбриогенез *O. baschkirensis* происходит без отклонений от нормы и типично

для представителей сем. *Fabaceae* (обзор [8]).

При разработке этапов биотехнологии использовали зародыши, изолированные на следующих стадиях эмбриогенеза: глобулярный (длиной 0,1–0,2 мм), торпедовидный (длиной 0,8–1,3 мм), сердечковидный (1,5–2,0 мм), зрелый (длиной 2,3–2,5 мм) зародыши. Зародыши на более ранних стадиях эмбриогенеза в экспериментах не использовали в силу их значительной миниатюрности, что представляло определенную методическую трудность.

Культивируемые зародыши инокулировали на питательную среду, составленную по прописи Murashige, Skoog [9]. Подобранный нами эмпирически фитогормональный состав питательной среды был постоянным (know how Института биологии Уфимского научного центра РАН, № 0015-2012). 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.

Так, культивирование *in vitro* глобулярных и торпедовидных зародышей приводило к формированию обводненных каллусов желтоватого цвета, неопределенной формы, рыхлой мягкой консистенции. По данным цитогистологического анализа, такой каллус пред-

ставлен рыхло расположенными крупными клетками с большими межклетниками. Немногочисленные ядра обнаружены только в клетках центральной зоны каллуса. В ходе дальнейшего культивирования каллус постепенно дегенерировал. Согласно литературным данным [6; и др.], каллусы такой морфологии и структуры относятся к неморфогенным.

В результате культивирования *in vitro* сердечковидных зародышей наблюдали формирование каллусов плотной компактной консистенции, матового белого цвета, узловатой формы. Цито-гистологический анализ показал, что клетки таких каллусов достаточно однородны, плотно прилегают друг к другу, вакуолизированы незначительно, имеют крупные ядра, занимающие центральное положение, и плотную клеточную стенку, в основном правильную изодиаметрическую форму, а в целом – меристематичны. Согласно литературным данным [6; и др.], каллусы такой морфологии и структуры следует отнести к морфогенным, способным дать начало множеству растений-регенерантов. Однако для получения регенерантов *O. baschkirensis* из сердечковидных зародышей через этап морфогенного каллуса необходимо дополнительно провести серию специальных экспериментов.

Культивирование *in vitro* зрелых зародышей приводило к прямой регенерации проростков с хорошо развитой корневой системой (рис.).

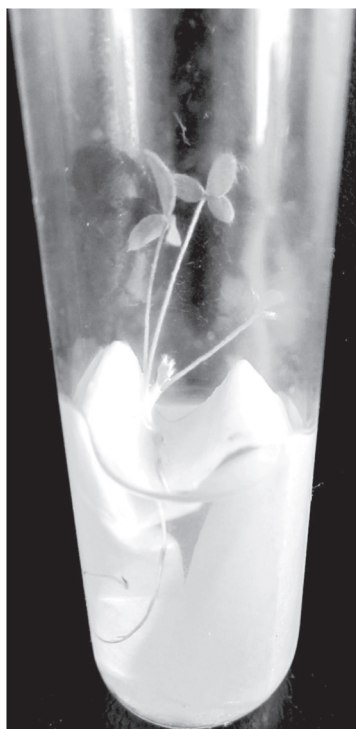


Рис. Регенерант *O. baschkirensis*, полученный в эмбриокультуре *in vitro* из зрелого зародыша. Ув. 1.8

Такой результат неудивителен, поскольку в зрелом зародыше, по-видимому, имеется определенный уровень эндогенных регуляторов роста, обеспечивающих в сочетании с другими веществами его дальнейшую нормальную дифференциацию и прорастание.

Проростки с развитой корневой системой

### Выводы

Впервые разработана биотехнология получения регенерантов *O. baschkirensis* в условиях эмбриокультуры *in vitro*.

Технология 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 и выращивание в режиме, имитирующем летний световой день. VI. Перенос регенерантов в почвенные условия

переносили из пробирок в условия *ex vitro* в стаканчики с почвенным субстратом и выращивали на лабораторной площадке в режиме, имитирующем летний световой день. Хорошо укоренившиеся проростки переносили в почвенные условия открытого грунта интродукционного питомника.

открытого грунта.

Такая технология позволяет стабильно и 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 технологию получения регенерантов через этап формирования морфогенного каллуса из сердечковидного зародыша.

Исследование поддержано грантом по Государственной научно-технической программе Академии наук республики Башкортостан на 2013-2015 гг.

### Литература

1. Стратегия ботанических садов по охране растений. – М., 1993. – 62 с.
2. Мулдашев А.А., Абрамова Л.М., Галеева А.Х., Маслова Н.В. Опыт реинтродукции редких видов растений в Республике Башкортостан // IV междунар. конф. «Биоразнообразии и биоресурсы Урала и сопредельных территорий». – Оренбург, 2008. – С. 321-324.
3. Красная книга Республики Башкортостан: в 2 т. Т. 1: Растения и грибы. – Уфа: МедиаПринт, 2011. – 384 с.
4. Бейдеман И.Н. Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ. – Новосибирск: Наука, 1974. – 155 с.
5. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. – М.: Изд-во МГУ, 2004. – 312 с.
6. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цито-гистологические аспекты. – Уфа: АН РБ, Гилем, 2011. – 124 с.
7. Анисимова Г.М. Опagrad-тип эмбриогенеза // Эмбриология цветковых растений. Т. 2. – СПб., 1997. – С. 510-512.
8. Чубирко М.М., Кострикова Л.Н. Семейство *Fabaceae* // Сравнительная эмбриология цветковых растений. Т.3. *Brumellinaceae-Tremandraceae*. – Л.: Наука, 1985. – С. 67-77.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, №3. – P. 473-497.

**KRUGLOVA A.E., KRUGLOVA N.N.**

*Institute of Biology, Ufa Scientific Center of RAS*

*Russia, 450054, Ufa, pr. Oktyabrya, 69, e-mail: aneta@ufaras.ru*

### BIOTECHNOLOGY FOR OBTAINING *IN VITRO* OF REGENERATES OF *OXYTROPIS* RARE PLANTS ON THE BASIS OF EMBRYOLOGICAL DATES

**Aims.** *Oxytropis baschkirensis* is one of the rare plants at the South Ural flora. The aim of investigation is the elaboration of main biotechnological stages to obtain the regenerants by the embryo culture *in vitro*. **Methods.** Cyto-histological investigation of development of embryo. Discovery of the optimal embryogenesis stage for the inoculation to the medium *in vitro*. Choosing the optimal ingredients of the medium and the cultural conditions *in vitro* to the stably obtaining of regenerants with developed roots. Choosing the conditions

for the growing of regenerants on the soil substrate. Obtaining the plantlets. **Results.** The main stages of biotechnology for obtaining of regenerates by the embryo culture *in vitro* have developed. The success of culture *in vitro* is completely determined by the stage of embryogenesis of the inoculated embryo. **Conclusions.** The biotechnology of obtaining of regenerants by the embryo culture *in vitro* has made at the first time. Such biotechnology should stably and valid obtaining the regenerants following the outline: one embryo – one regenerant.

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

**КУЗОВКОВА А.А.<sup>1</sup>, МАЗУР Т.В.<sup>1</sup>, АЗИЗБЕКЯН С.Г.<sup>2</sup>, РЕШЕТНИКОВ В.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2В, e-mail: [fioraia@nm.ru](mailto:fioraia@nm.ru)

<sup>2</sup>ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси»

Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 13, e-mail: [mechanochem@ifoch.bas-net.by](mailto:mechanochem@ifoch.bas-net.by)

### БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА И СЕЛЕНИТА НАТРИЯ НА КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ МНОГОКОЛОСНИКА МОРЩИНИСТОГО

Биологически активный микроэлемент селен (Se) эссенциален для одних организмов (бактерии, животные, люди) и благотворно влияет на другие (растения). В организме человека Se наряду с витаминами А, Е, и С считается одним из главных компонентов неферментативного пути антиоксидантно-антирадикальной защитной системы. Недостаточная обеспеченность организма селеном связана с этиологией многих, в том числе сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Другая важная роль Se заключается в антагонизме с тяжелыми металлами, и в ряде работ показано протекторное значение Se при накоплении в организме кадмия и ртути [1]. Во многих географических регионах (и в Беларуси) регистрируются дефицитные обеспеченности йодом и селеном, сочетающиеся друг с другом. Дефицит Se усугубляет проявления йодной недостаточности, вызывая не только тиреоидную дисфункцию, но и индуцирует некротические, фиброзные изменения в щитовидной железе, стимулирует клеточную пролиферацию [2]. В ближайшие годы содержание Se в почве будет неуклонно падать, что связано с повсеместным уменьшением содержания гумуса, закислением и загрязнением тяжёлыми металлами. Для регионов с недостатком Se в окружающей среде ВОЗ установил норму физиологического потребления от 50 до 200 мкг Se в сутки [3], для достижения которой необходима коррекция питания. В источниках питания Se находится в двухвалентной органической форме, причем в животных продуктах преобладает селеноцистеин, а в растительных — селенометионин. Одним из способов коррекции уровня

Se в продуктах питания является использование селенообогащенной кормовой базы для скота и птиц [4], а также повседневный лечебно-профилактический прием биологически активных добавок (БАД) к пище. БАД с Se могут использоваться как нутрицевтики (для восполнения Se в организме) и парафармацевтики (с фармакологической активностью для регуляции отдельных функций организма и вспомогательной терапии заболеваний). Некоторые лекарственные растения-металлофиты накапливают Se и могут использоваться как БАД. В частности, фитопрепарат Setarud, состоящий из экстрактов Se-богатых растений пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.), шиповника собачьего (*Rosa canina* L.) и крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.), применяют как иммуномодулятор в комплексной терапии вирусных болезней, в том числе и ВИЧ [5,6].

В составе удобрений, добавок в корма и в ветеринарных препаратах, как правило, используют высокотоксичный (1 класс опасности) селенит ( $\text{Se}^{4+}$ ) [7]. В последнее время в странах СНГ и за рубежом ведется поиск заменяющих селениты веществ, и поэтому проявляется повышенный интерес к медико-биологическим свойствам наночастиц нульвалентного Se (наноSe). Показано [8], что стабилизированные белком наночастицы Se с размерами 20–60 нм полностью сохраняют спектр биологической активности ионного Se, в частности, стимулируют синтез Se-содержащих ферментов, но при этом в несколько раз менее токсичны, чем селенит натрия. Применение препарата наноSe активировало систему антиоксидантной защиты ла-