

МОРФОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ИЗОЛИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ ШАФРАНА (*CROCUS SATIVA* L.) ПРИ СУБКУЛЬТИВИРОВАНИИ

Традиционное размножение такой ценнейшей эфиромасличной культуры, как *Crocus S.L.*, дочерними клубнелуковицами не обеспечивает в настоящее время увеличивающиеся потребности мирового рынка.

Использование клеточной биотехнологии для размножения шафрана является единственной возможностью восполнения дефицита посадочного материала. Несмотря на определенные успехи в направлении биотехнологического размножения шафрана и понимание причин, ограничивающих эффективность этого методологического подхода [1], существует ряд проблем, без решения которых рентабельность биотехнологического размножения *Crocus S.L.* может быть важным лимитирующим фактором.

В настоящее время использование клубнелуковиц *Crocus S.L.* как исходного материала для каллусогенеза, эмбриогенеза и органогенеза *in vitro* является относительно эффективным подходом в биотехнологии размножения *in vitro* [2, 3].

Шафран, как геофит, с обратным биологическим циклом развития имеет по различным данным от 4-х до 6-ти этапов развития в онтогенезе [4, 5], но только на одном из них полученные каллусные клетки максимально компетентны к условиям индукции образования эмбрионных структур, которые на дальнейших этапах культивирования способны к образованию клубнелуковиц *in vitro*. Процессы каллусообразования и формирования эмбрионных структур у *Crocus S.L.* длительны во времени. Только один этап низкотемпературного стресса для стимуляции развития органогенных структур имеет продолжительность до 35 суток. Использование классических биотехнологических схем, когда полученные каллусные массы пассируются и последовательно используются для индукции морфогенеза, в данном случае оказывается неприемлемым.

Образующийся *in vitro* каллус из клубнелуковиц *Crocus S.L.* характеризуется значительной гетерогенностью, которая проявляется в морфо-

логической и структурной разнокачественности. Одновременно с образованием и ростом каллуса имеют место процессы образования эмбрионных структур, индукция ризогенеза и формирование побегов.

Таким образом, особенности биологии этого вида и его поведение в культуре *in vitro* значительно сужают границы возможностей для манипуляций с исходным эксплантом во временных рамках [6]. Одним из существенных моментов при разработке технологий размножения в культуре *in vitro* является необходимость получения длительно пассируемой культуры.

Возможность получения штаммов в процессе субкультивирования, которые характеризуются индивидуальными морфогенетическими способностями, является важнейшим условием для решения поставленных задач, исходя из факта значительной гетерогенности каллуса шафрана.

Задачей данного исследования явилось изучение степени сохранения морфогенотипических потенций при субкультивировании каллуса *Crocus S.L.* и определение минимальной каллусной массы, обеспечивающей процессы дальнейшей дифференциации.

Материалы и методы

Исходным материалом в наших исследованиях явились клубнелуковицы *Crocus S.L.* Апшеронской популяции.

В предварительных экспериментах было определено, что по способности образования каллуса и особенностям протекания процессов, сопровождающих каллусогенез из клубнелуковиц различных возрастных категорий (1–2 годичные, 3–4 годичные, 5–6 годичные), наиболее оптимальным является использование 3–4-летних клубнелуковиц. Клубнелуковицы изымались из почвы в поздно-весенний период (начало завядания и подсыхания надземных органов). Клубнелуковицы последовательно стерилизовались в 70–80 % этиловом спирте и в растворе гипохлорита натрия с 5 % содержанием действующе-

го вещества с добавлением TWEEN-20. Исходным эксплантом явились диски из срединной части клубнелуковиц толщиной 2–3 мм. Диски высаживались на агаровую среду MS [7]. Использовались варианты сред: 1) 6-бензиламинопурин (БАП) (1 мг/л) + 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) (1 мг/л) + кинетин (1 мг/л); 2) БАП (2 мг/л) + 6-нафтилуксусная кислота (НУК) (0,5 мг/л), агар – 0,7–0,8 %; сахароза – 30 г/л; pH среды – 5,6–5,8. Высаженный материал культивировался в темноте при 21°C и относительной влажности 70–80 %.

Результаты и обсуждение

Проведенные эксперименты показали, что каллусообразование происходило различно в зависимости от гормонального состава среды. Наиболее интенсивно эти процессы имели место на среде, содержащей БАП и НУК (вариант 2). На этой среде наблюдалось интенсивное образование морфогенного каллуса. Одним из факторов, определяющих индукцию образования эмбрионных структур, является степень дифференцировки первичного каллуса, которая выражается в различной компетентности клеток к гормональному фону. Так, участки с морфогенным каллусом отличались большей скоростью роста и характеризовались образованием эмбрионных структур по всей площади исходного экспланта (рис. 1).

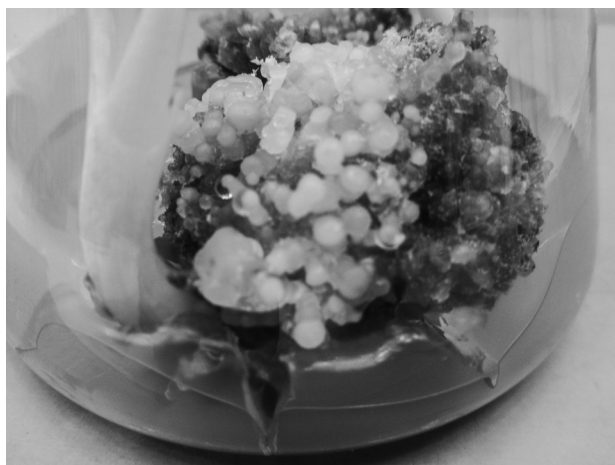


Рис.1. Индукция образования каллуса из дисков клубнелуковиц *Crocus S.L.* на среде БАП (2 мг/л) + НУК (0,5 мг/л)

Природа первичного экспланта (в данном случае поперечный срез клубнелуковицы), его состояние, соотношение гормональных индукторов, во многом определяли морфогенную активность каллусных культур и их морфолого-

стологические особенности. Сформировавшийся каллус в зависимости от вариантов среды различался по степени его гетерогенности.

Особенностью каллусогенеза из тканей клубнелуковиц *C. sativa* L. является сильная зависимость этих процессов от температурного фактора. На одном и том же гормональном фоне при 15°C (нижняя оптимальная граница культивирования), 21°C и 25°C (верхняя температурная граница) структурная гетерогенность и в конечном счете морфогенная активность каллусных культур *Crocus S.L.* и их направленность имеют значительную вариабельность.

В зависимости от параметров культивирования одновременно в культуре шафрана *in vitro* наблюдается реализация разнокачественных процессов: образование морфогенных и неморфогенных каллусов, ризогенез, образование и развитие эмбрионных структур, индукция образования побеговых структур.

В научной литературе отсутствует описание стабильности каллусных систем *Crocus S.L.* относительно морфогенного потенциала при субкультивировании. По прошествии 5–6 месяцев культивирования культуры масса каллусных клеток обоих вариантов была разделена на 3–4 примерно равные части и пересажена на свежую питательную среду. На данной стадии экспериментов применялась следующая схема переноса каллуса по типам питательных сред: вариант 1 → вариант 1; вариант 1 → вариант 2; вариант 2 → вариант 2; вариант 2 → вариант 1.

Субкультивирование резко изменило ход и направленность процессов развития изолированной культуры *Crocus S.L.* Так, при переносе клеточных масс, культивируемых на среде, содержащей БАП + 2,4-Д+кинетин (вариант 1), на ту же среду, наблюдалось торможение всех процессов развития. Потеря жизнеспособности в большинстве случаев сопровождалась переходом тканей в некротическое состояние. Только 12 % пересаженных каллусов сохраняли жизнеспособность, причем восстановление процессов развития начинало происходить через 3 месяца культивирования и морфологически каллусные массы кардинально отличались от первоначальных (рис. 2).

Субкультивирование на среде с БАП + НУК (вариант 2→вариант 2) сопровождалось стимуляцией роста каллуса, а образование морфогенных структур получило свое продолжение и интенсивное развитие. Субкультивирование с использованием этого варианта среды демонстрировало значительное увеличение образования эмбрио-

генных структур и их готовность к органогенезу (рис. 3).

Субкультивирование вариант 1 → вариант 2 мало изменяло ход морфогенетических процессов, но по интенсивности уступало схеме вариант 2 → вариант 2.

Субкультивирование по схеме вариант 2 → вариант 1 было наиболее катастрофично для каллусных масс. Только 1 % от пассированных каллусов был способен сохранять жизнеспособность.

Весьма возможно, что столь драматическое изменение программы развития или, другими словами, неспособность ее реализации в связи с многостадийностью и сложностью связана именно с влиянием цитокининового фона.

Выводы

Таким образом, эксперименты с субкультивированием каллусных клеток, полученных из клубнелуковиц шафрана *Crocus S.L.*, позволили определить их минимальную массу, обеспечивающую сохранение ростовых процессов. Продемонстрировано возможность сокращения во вре-

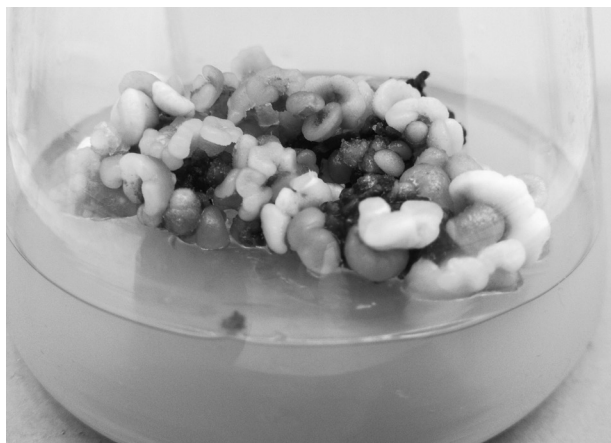


Рис. 3. Субкультивирование каллуса *Crocus S.L.* по схеме: вариант 2 → вариант 2 (БАП (2 мг/л) + НУК (0,5 мг/л))

мени процесса культивирования, что может привести к увеличению коэффициента размножения. Определены условия, обеспечивающие субкультивирование с одновременным сохранением тенденций морфогенетических процессов, реализации морфогенеза на этапе органогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Karagoyzov T.H., Mammadova M.H., Asadova S.Sh., Azizov I.V. A new approach to biotechnology of saffron (*Crocus sativus* L.) // Global Journal Inc. (USA). – 2015. – 15, Issue 6, (Ver 1.0). – P. 1–3.
2. Fernández J.A., Abdullaev F. Foreword and Preface [Электронный ресурс] // Online articles of I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology. – 2004. – Режим доступа: http://www.ishs.org/ishs-article/650_0.
3. Fernández J.A. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron // Recent Research in Developmental Plant Science. – 2004. – 2. – P. 127–159.
4. Zubor A.A., Surbnyi G., Gyxri Z., Borbily G., Prokisch J. Molecular biological approach of the systematic of *Crocus sativa* L. and its allies // Acta Hort. – 2004. – 650. – P. 85–93. doi: 10.17660/ActaHortic.2004.650.8.
5. Карагезов Т.Г., Асадова С.Ш., Мамедова М.Г., Азизов И.В. Морфогенез и органогенез шафрана (*Crocus sativa* L.) *in vitro* // «Plant Physiology as a Theoretical Basis for Innovative Agriculture and Phytobiotechnologies» International scientific conference and School for young scientists. Kaliningrad. – 2014. – 1. – P. 232–234.
6. Карагезов Т.Г., Мамедова М.Г., Асадова С.Ш., Азизов И.В. Некоторые проблемы и перспективы биотехнологического размножения шафрана (*Crocus S.L.*) // Факторы экспериментальной эволюции организмов. – 2015. – 17. – С. 179–182.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – 15. – P. 473–497.

KARAGEZOV T.H., ISMAILOVA Q.I., MAMEDOVA M.H.

Institute of Molecular biology and Biotechnology of Natl. Acad. Sci. of Azerbaijan, Azerbaijan, AZ 1073, Baku, Ave. Metbuat, 2A, e-mail: qaragezovt@mail.ru

MORPHOGENETIC POTENTIAL OF ISOLATED SAFFRON (*CROCUS SATIVA* L.) CULTURE DURING SUBCULTIVATION

Aim. To study the possibility of subculturing of isolated culture. To study the preservation of morphogenetic capacity of isolated culture. **Methods.** *In vitro* methods for the induction of morphogenesis and organogenesis of *Crocus S.L.* are used. **Results.** The conditions of morphogenetic capacity preservation of *Crocus S.L.* cell culture under subculturing were identified. **Conclusions.** The possibility of subculturing of isolated *Crocus* cells *in vitro* was demonstrated. The obtained results enable to increase the propagation coefficient of *Crocus S.L.* *in vitro*.

Keywords: *Crocus S.L.*, *in vitro*, morphogenesis, embryogenesis, subculturing.