



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



ОБРАЗОВАНИЕ КАЛЛУСОПОДОБНЫХ СТРУКТУР НА ПОВЕРХНОСТИ КЛУБНЕЙ – ОСНОВА ИНВАЗИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА ТЛАДИАНТЫ СОМНИТЕЛЬНОЙ (*THLADIANTHA DUBIA*, CUCURBITACEAE)

Швец Д.Ю.¹, Кулуев Б.Р.^{1,2}¹Башкирский государственный университет, Уфа²Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, УфаE-mail: shvetsdasha99@yandex.ru

FORMATION OF CALLUS-LIKE STRUCTURES ON THE SURFACE OF TUBERS IS THE BASIS OF THE INVASIVE POTENTIAL OF MANCHU TUBERGOURD (*THLADIANTHA DUBIA*, CUCURBITACEAE)

Shvets D.Yu.¹, Kuluev B.R.^{1,2}¹Bashkir State University, Ufa,²Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences. UfaE-mail: shvetsdasha99@yandex.ru

Тладианта сомнительная *Thladiantha dubia* Bunge – многолетнее травянистое растение из семейства тыквенных (Cucurbitaceae), обладающее высоким инвазионным потенциалом на антропогенно нарушенных территориях благодаря своей повышенной способности к вегетативному размножению через клубни. В ходе наблюдений за вегетативным размножением инвазионных форм данного растения на поверхности его клубней впервые обнаружены опоясывающие каллусоподобные структуры, из которых интенсивно происходило формирование как побегов, так и корней, с дальнейшей регенерацией растений. Вероятно, у *T. dubia* в процессе эволюции выработался механизм индукции на поверхности клубней процессов дедифференциации (каллусообразования) и органогенеза, что позволяет данному инвазионному виду стремительно распространяться в обрабатываемых человеком землях посредством небольших кусочков клубней.

Ключевые слова: вегетативное размножение, инвазионное растение, каллус, каллусообразование, культура *in vitro*, тладианта сомнительная, *Thladiantha dubia*

Thladiantha dubia Bunge (Manchu tubergourd) is a perennial herb from the Cucurbitaceae family, which has a high invasive potential in anthropogenically disturbed areas due to its increased ability to grow vegetatively through tubers. During observations of vegetative propagation of invasive forms of *T. dubia*, we discovered on the surface of tubers the appearance of encircling callus-like structures, from which the formation of both shoots and roots, with the further regeneration of plants. Probably *T. dubia* in the process of evolution has developed a mechanism for the induction of dedifferentiation and organogenesis processes on the tubers surface, which allows this invasive species to spread rapidly in cultivated lands through small pieces of tubers.

Keywords: invasive plant, callus, callus formation, *in vitro*, Manchu tubergourd, *Thladiantha dubia*, vegetative propagation

Поступила в редакцию: 16.06.2019

DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-2-201-207](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-2-201-207)

ВВЕДЕНИЕ

Тладианта сомнительная *Thladiantha dubia* Bunge – многолетнее травянистое растение из семейства тыквенных (Cucurbitaceae). Естественный ареал вида занимает северо-восточные районы Китая и юг Приморского края России. *T. dubia* является двудомным растением и опыляется, по всей видимости, только специфичной дикой пчелой из рода *Stenoplectra* [Токарев и др., 2013]. Вероятнее всего, эта особенность стала одной из причин чрезвычайно сильного развития у данного вида природной способности к вегетативному размножению через клубни. Более того, благодаря такому способу размножения растения этого вида могут переживать холодные зимы в виде клубней и поэтому могут распространяться севернее своего обычного ареала обитания. По-видимому, именно способность к активному вегетативному размножению за счет образования на подземных

побегах цепочек корневых клубней лежит в основе высокого инвазионного потенциала этого вида. *T. dubia* произрастает во многих регионах России и зарубежных стран, в том числе на гораздо более северных территориях, чем его природный ареал [Борисова, 2008; Силаева и др., 2010; Alegro et al., 2010; Кулуев и др., 2019]. За счет быстрого подземного размножения инвазионные популяции тладианты сомнительной могут покрывать довольно большие площади (до 10–12 м²), образуя густую и быстро увеличивающуюся в объеме массу. Механическая обработка почвы и ручная прополка способствуют ускоренному ее размножению, что, может быть, обусловлено отбором в инвазионных популяциях быстро размножающихся агрессивных форм. Всё это побудило в последние годы относить *T. dubia* к опасным и трудноискоренимым сорнякам [Баранова и др., 2015; Кулуев и др., 2019].

Ранее нами впервые на территории Республики Башкортостан были обнаружены и начаты исследования наиболее крупных инвазионных популяций тладианты сомнительной в четырех селах Нуримановского района, причем наибольшее распространение данное растение получило в селе Укарлино (55°1'53" с. ш. 56°29'3" в. д.). В данном районе мы в течение двух летних сезонов (2017-2018 гг.) наблюдали за огородами, которые, несмотря на постоянную ручную прополку и выкапывание клубней, полностью зарастали *T. dubia* (рис. 1а, б).

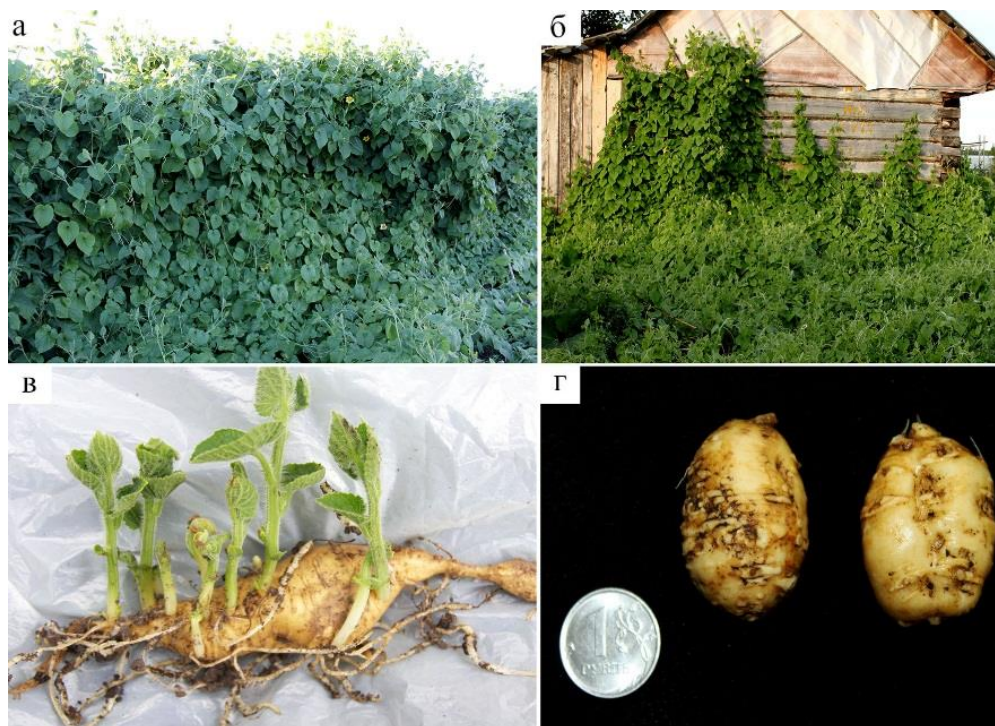


Рис. 1. а, б – забор и огород, полностью заросшие тладиантой сомнительной (Нуримановский район Республики Башкортостан); в – образование побегов и корней на поверхности клубня *T. dubia*; г – клубни *T. dubia*. Масштаб: 1-рублевая монета

Наиболее быстро тладианта распространялась в тех огородах, где при вспашке плугом случайно нарушались места компактного произрастания этого растения и кусочки клубней оказывались разбросанными по всему участку. Тладианта также распространялась из огорода в огород кусочками клубней, которые налипали вместе с почвой на плуг трактора. По наблюдениям местных жителей, даже нескольких небольших кусочков клубня было достаточно, чтобы через несколько лет огород зарастал тладиантой сплошным зеленым ковром. Новые огороды и сады продолжали заражаться тладиантой и естественным путем через довольно длинные (до нескольких метров) подземные цепочки клубней, но с меньшей скоростью, чем при механической обработке почвы. Особенностью клубней тладианты по

сравнению с таким наиболее известным клубненосным растением, как картофель, было то, что на каждом из них образовывалось гораздо большее количество побегов (рис. 1в). Также, в отличие от клубней картофеля, на поверхности клубней гладианты не визуализировались покоящиеся почки (рис. 1г).

Ранее мы провели предварительное исследование вегетативного размножения *T. dubia*, доказав способность гладианты размножаться небольшими кусочками клубней [Кулуев и др., 2019]. Однако оставался без ответа вопрос, в чем же заключаются особенности клубней гладианты, которые позволяют этому растению демонстрировать более высокие показатели вегетативного размножения, чем большинство других растений. Исходя из этого, целью настоящего исследования явилось морфологическое наблюдение за образованием побегов и корней на кусочках клубней как *in vivo*, так и *in vitro* для выяснения особенностей вегетативного размножения данного сорного растения, а также возможность микрклонального размножения *T. dubia* на листовых и клубневых эксплантах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Для опытов по изучению побего- и корнеобразования были использованы клубни инвазионной формы *T. dubia*, собранные в селе Укарлино (55°1'53" с. ш. 56°29'3"в. д.) Нурымановского района Республики Башкортостан в августе 2018 г. Через два месяца клубни промывали мыльной водой, затем водопроводной водой и 2-3 раза споласкивали дистиллированной водой. Каждый клубень разделяли на 3-4 кусочка и помещали в вегетационные сосуды объемом 200 мл, с увлажненной фильтровальной бумагой, и сверху закрывали пластиковой крышкой. Вегетационные сосуды держали в световой комнате при температуре 25°C и интенсивности света около 4 клк. В течение 10 сут по мере высыхания фильтровальной бумаги в каждый вегетационный сосуд добавляли дистиллированную воду.

Для исследования регенерации корней и побегов на клубневых эксплантах *T. dubia* в условиях *in vitro* клубни тщательно промывали мыльной, водопроводной и 2-3 раза дистиллированной водой. Затем каждый клубень разделяли на 5-6 кусочков и переносили в чашки Петри. Всего использовано 25 чашек Петри.

Кусочки клубней стерилизовали путем последовательной обработки с помощью 70% этилового спирта (5 мин) и 20% «Белизны» с добавлением 5 мкл детергента Tween 20 (20 мин). Использовали «Белизну» (БашБытПром, Россия), представляющую собой 15% раствор гипохлорита натрия. Далее кусочки клубней промывали дистиллированной водой 6-7 раз.

После стерилизации кусочки клубней высаживали на среду Мурасиге-Скуга (МС) без добавления сахарозы, содержащую витамины В5 по Гамборгу (1 мг/л никотиновой кислоты, 1 мг/л пиридоксина, 0.5 мг/л тиамин, 2 мг/л глицина), 100 мг/л инозитола, 25 мг/л антибиотика цефотаксима без добавления фитогормонов. Часть клубней высаживали на ту же питательную среду с добавлением 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 2.5 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК) при pH 5.6-5.8.

В качестве эксплантов для культуры *in vitro* использовали кусочки листьев здорового растения *T. dubia* одномесячного возраста, выращенного в лабораторных условиях на почвенном грунте. За сутки до отделения листьев донорное растение обильно поливали водой. Стерилизацию листьев осуществляли путем последовательной обработки с помощью 70% этилового спирта (15 сек) и 10% «Белизны» с добавлением 5 мкл Tween 20 (10 мин). Затем листья промывали стерильной дистиллированной водой 5 раз, разрезали стерильным скальпелем на экспланты размером 0.5 x 0.5 см, удалив крупные жилки и побелевшие края,

переносили на среду МС, содержащую витамины В5 по Гамборгу, 100 мг/л инозитола, 3% сахарозы, 0.8% агара, 1 мг/л БАП, 0.1 мг/л НУК, рН 5.6-5.8. Чашки Петри с эксплантами держали один месяц в световой комнате при температуре 25°C и интенсивности света 4 клк. Один раз в неделю экспланты пересаживали на свежую среду того же состава.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании клубней в вегетационных сосудах с фильтровальной бумагой появление покоящихся или пробуждающихся почек на их поверхности зафиксировать не удалось даже через один месяц инкубации. В то же время на поверхности клубней уже через 2-3 сут инкубации начинали формироваться опоясывающие структуры, которые мы идентифицировали как каллусоподобные структуры (рис. 2а). Через неделю инкубации именно из этих каллусоподобных структур начинали появляться как побеги, так и корни (рис. 2б, в). Необходимо отметить, что каллусоподобные структуры формировались на поверхности клубней чаще в виде упорядоченных поясков, расположенных стопками, хотя были видны и отдельные “точки каллусообразования”. Разрезание клубней на маленькие кусочки оказывало стимулирующее влияние на образование таких каллусоподобных структур (на поверхности целых клубней такие пояски также всегда образовывались, но в меньшем количестве). Почти из каждой каллусоподобной структуры происходило интенсивное формирование побегов и корней, причем количество последних всегда было меньше (рис. 2в, г).

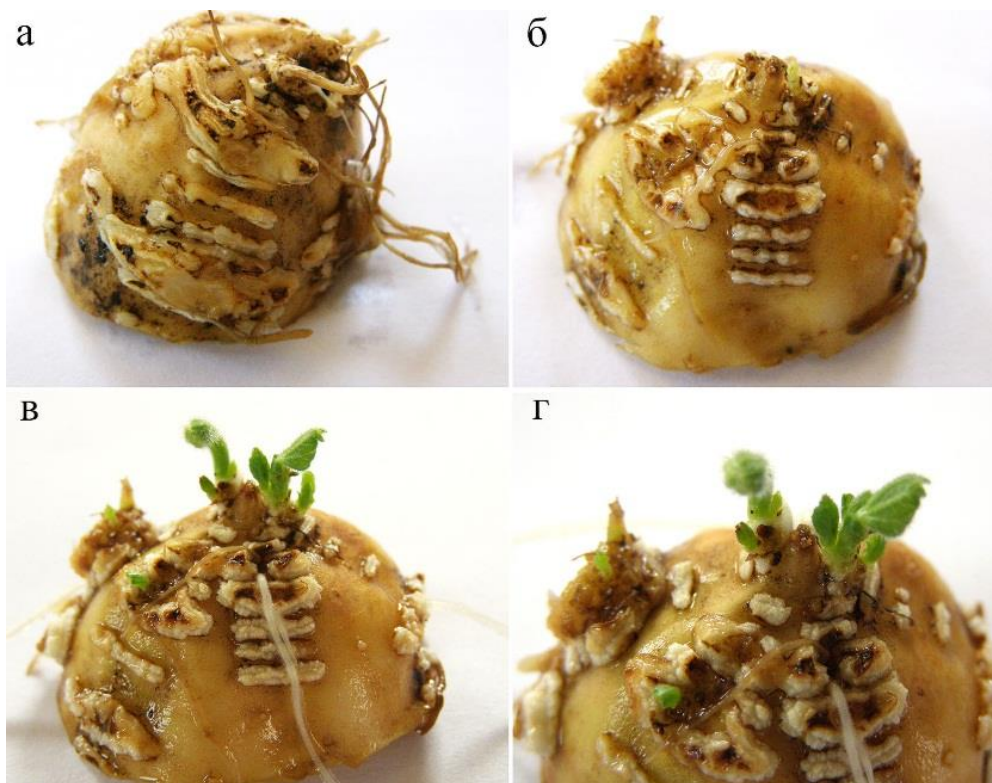


Рис. 2. Размножение *T. dubia* кусочками клубней в вегетационных сосудах с фильтровальной бумагой: а, б – образование корней на 7 сут инкубации; в, г – образование побегов и листьев на 10 сут инкубации

Чтобы подтвердить наши выводы о появлении побегов и корней именно из каллусоподобных структур, провели подробные морфологические наблюдения за этими процессами при помощи бинокля с 16-кратным увеличением. Было подтверждено, что на поверхности клубней образуются структуры, по своим внешним признакам и особенностям

роста напоминающие каллус, и регенерация растений происходила именно из этих структур (рис. 3).

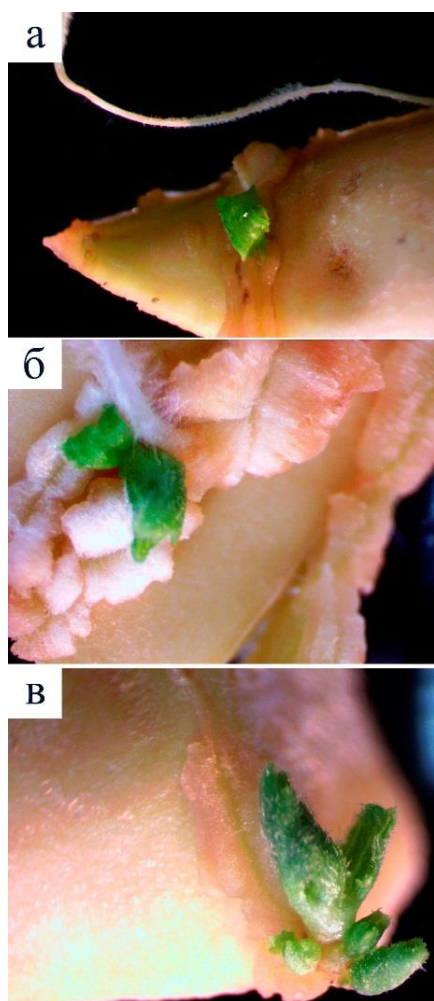


Рис. 3. Образование каллусоподобных структур (а) на поверхности кусочков клубней *T. dubia* и регенерация растений из этих структур (б, в). Прижизненные наблюдения. X16

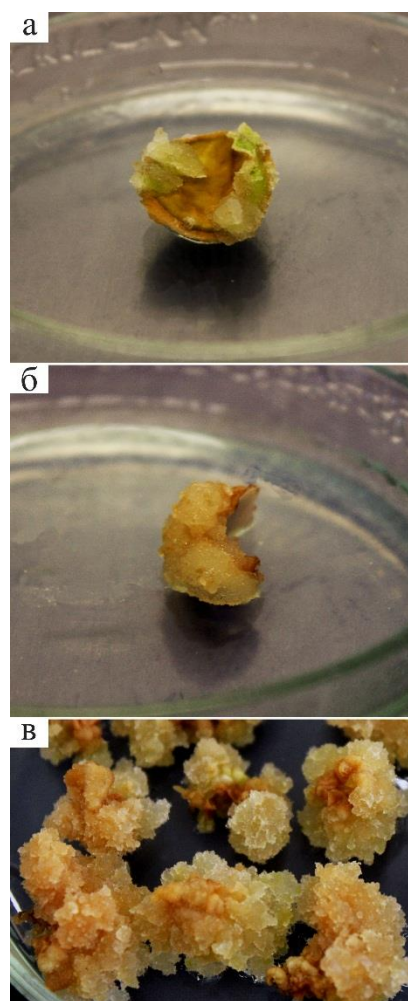


Рис. 4. Каллусообразование *T. dubia* в условиях *in vitro*: а, б – на поверхности эксплантов клубней; в – на поверхности листовых эксплантов

Дальнейшие исследования способности к вегетативному размножению у *T. dubia* проведены в условиях *in vitro*. Несмотря на довольно жесткие условия стерилизации, в условиях *in vitro* лишь 4 чашки Петри из 25 с кусочками клубней не заросли колониями грибов и бактерий в течение одного месяца культивирования. Через одну неделю культивирования на среде МС без фитогормонов оставшиеся стерильными кусочки клубней начинали покрываться каллусоподобными структурами и затем полностью ими зарастали (рис. 4а, б). Однако даже через один месяц культивирования формирование побегов и корней в каллусоподобных структурах не индуцировалось. После переноса кусочков клубней на среду МС с БАП и НУК побеги и корни на клубнях также не образовывались, по крайней мере, в течение двух месяцев культивирования. При пересаживании отдельных каллусоподобных структур с поверхности кусочков клубней на свежую среду МС с 0.5 мг/л БАП и 2.5 мг/л НУК, появления побегов и корней в условиях выполненных экспериментов добиться также не удалось.

Мы предположили, что повышенная природная способность к вегетативному размножению у тладианты может проявиться высокой способностью и к микроклональному размножению в условиях *in vitro* при использовании стандартной среды МС с добавлением БАП и НУК. Действительно, по краям листовых эксплантов в условиях *in vitro* через две

недели инкубации наблюдали обильное образование каллусоподобных структур, но ни геммогенеза, ни ризогенеза на такой питательной среде не происходило, по крайней мере, в течение трех месяцев инкубации. В итоге все листовые экспланты полностью покрывались каллусоподобными структурами (рис. 4в). Часть каллусоподобных структур была пересажена на новую среду МС, содержащую 0.6 мг/л БАП, 2 мг/л НУК, витамины В5 по Гамборгу, 100 мг/л инозитола, 3% сахарозы, 0,8% агара [Кулуев и др., 2017]. Однако и при таких условиях культивирования получить побеги и корни нам пока не удалось.

Хорошо известно, что в условиях *in vitro* при действии различных фитогормонов на поверхности растительных тканей индуцируется образование каллуса, который в зависимости от изменения соотношения ауксинов и цитокининов в питательной среде развивается по пути геммо- или ризогенеза [Skoog, Miller, 1957]. Каллус может образовываться также и в условиях *in vivo*, к примеру, на раневой поверхности растений. Однако по транскриптому и по своим физиологическим особенностям каллусы, индуцированные фитогормонами *in vitro*, и каллусы, индуцированные поранением *in vivo*, сильно различаются [Ikeuchi et al., 2013]. Различают также каллус, индуцированный бактериями (к примеру, агробактериями), и каллус, индуцированный межвидовой гибридизацией. В каждом из этих случаев исследователи имеют дело с разными типами каллуса, хотя визуально они могут не отличаться. В подробном обзоре [Ikeuchi et al., 2013] приводятся только эти четыре типа каллуса, однако нельзя исключать того, что в растительном мире могут быть обнаружены и другие типы. В данной работе мы представляем информацию о совершенно новом типе каллусоподобных структур, образующихся на поверхности как нативных, так и разрезанных клубней у инвазионных форм *T. dubia*. Нам не удалось найти в литературе какую-либо информацию о таких каллусоподобных структурах, образующихся на поверхности клубней не только тладианты, но и других видов растений. Обнаруженные нами каллусоподобные структуры не относятся к каллусам, индуцированным повреждением, так как они образуются на совершенно неповрежденной поверхности (кожице) как разрезанных, так и целых клубней. Более того, такие каллусоподобные структуры образуются только при сохранении кожицы клубней, при ее же удалении кусочек клубня, по нашим наблюдениям, теряет способность к регенерации и погибает.

Можно полагать, что в процессе эволюции у *T. dubia* выработался механизм индуцируемой дедифференциации (каллусообразования) и органогенеза на разных участках поверхности клубней, и именно этот механизм лежит в основе активного вегетативного размножения у инвазионной формы этого вида. На данный момент неизвестно, является ли образование обнаруженных нами каллусоподобных структур особенностью только инвазионных популяций *T. dubia* или же это характерно и для дикорастущих популяций данного растения. Однако не вызывает сомнения, что способность к образованию каллусоподобных структур, наряду с другими особенностями этого растения [Кулуев и др., 2019], лежит в основе высокого инвазионного потенциала данного растения, благодаря чему тладианта сомнительная быстро распространяется в обрабатываемых человеком землях небольшими кусочками клубней. Описанные нами процессы образования каллусоподобных структур заслуживают дальнейшего исследования, в том числе в условиях *in vitro*. Нам удалось ввести кусочки клубней тладианты в асептическую культуру, и они полностью покрывались каллусоподобными структурами даже без добавления в среду МС фитогормонов и сахарозы, однако не давали побегов и корней. Можно предполагать, что это тоже является особенностью клубней тладианты, которые в условиях *in vitro* продемонстрировали повышенную способность к каллусообразованию.

Из эксплантов листьев нам не удалось получить новых побегов. До наших исследований тладианта сомнительная в культуру *in vitro* не вводилась, поэтому для успешного формирования побегов из эксплантов клубней и листьев этого растения требуются дальнейшие эмпирические исследования по подбору концентраций фитогормонов и иного состава питательных сред. Также мы не обнаружили ни одной работы, где была бы показана успешная регенерация растений семейства тыквенных из листовых эксплантов, предварительно выращенных в почвенных условиях. Имеются сведения, что успешная регенерация проростков огурца *Cucumis sativus* (L.) происходит из эксплантов семядолей и гипокотилей в присутствии БАП (3 мг/л) и ИУК (0.5 мг/л) [Ugandhar et al., 2015]. Однако данная методика не подходит в случае с инвазионными популяциями тладианта сомнительной, так как для этого растения совершенно не характерно семенное размножение, и семян *T. dubia* нам до сих пор получить не удалось, несмотря на проведение искусственного опыления [Кулуев и др., 2019].

Таким образом, тладианта сомнительная активно размножается вегетативно небольшими кусочками клубней благодаря способности индуцировать органогенез на поверхности клубней через образование каллусоподобных структур. По-видимому, именно такая особенность размножения лежит в основе высокого инвазионного потенциала этого растения.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Агидель» и УНУ «КОДИНК» в рамках государственного задания АААА-А19-119021190011-0 ИБГ УФИЦ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранова О.Г., Бралгина У.Н. Инвазионные растения во флоре Удмуртской республики // Вестник Удмуртского университета. Серия биология. Науки о земле, 2015. Т. 25, вып. 2. С. 31–3.
2. Борисова Е.А. Адвентивная флора Ивановской области. Иваново: Ивановский государственный университет, 2007.
3. Кулуев Б.Р., Круглова Н.Н., Зарипова А.А., Фархутдинов Р.Г. Основы биотехнологии растений. Уфа: Башкирский государственный университет, 2017. 245 с.
4. Кулуев Б.Р., Швец Д.Ю., Голованов Я.М., Пробатова Н.С. Тладианта сомнительная (*Thladiantha dubia*, Cucurbitaceae) в Башкортостане – опасный сорняк с высоким инвазионным потенциалом // Российский журнал биологических инвазий, 2019. Т. 22, вып. 1. С. 66–78.
5. Силаева Т.Б., Кирюхин И.В., Чугунов Г.Г., Левин В.К., Майоров С.Б., Письмаркина Е.В., Агеева А.М., Варгот Е.В. Сосудистые растения Республики Мордовия (конспект флоры). Саранск: Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, 2010. 352 с.
6. Токарев Д.В., Агеева А.М. *Thladiantha dubia* Bunge (Cucurbitaceae): из Красной книги СССР в Черную книгу флоры // Огарев-online, 2013. №11.
7. Alegro A., Bogdanović S., Rešetnik I., Boršić I. *Thladiantha dubia* Bunge (Cucurbitaceae), new alien species in Croatian flora // Natura Croatica. 2010. V. 19. P. 281–286.
8. Ikeuchi M., Sugimoto K., Iwase A. Plant callus: mechanisms of induction and repression // Plant Cell. 2013. V. 25. P. 3159–3173.
9. Skoog F., Miller C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro // Symp. Soc. Exp. Biol. 1957. V. 11. P. 118–130.
10. Ugandhar T., Venkateshwarlu M., Gousia Begum, Srilatha T., Jaganmohanreddy K. *In Vitro* plant regeneration of Cucumber (*Cucumis sativum* (L.)) from cotyledon and hypocotyl explants // Science Research Reporter. 2011. V. 1. P. 164–169.