

Оригинальная статья / Original article
УДК 581.527.4.017.53
DOI: 10.18470/1992-1098-2022-4-30-39

Естественное и микрклональное воспроизведение палеоэндемика Дагестана *Scabiosa gumbetica* Boiss.

Аида И. Аджиева, Зарина М. Алиева, Вера К. Мартемьянова

Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия

Контактное лицо

Аида И. Аджиева, кандидат биологических наук, доцент, кафедра ботаники, Дагестанский государственный университет; 367000 Россия, г. Махачкала, ул. Магомеда Гаджиева, 43а. Тел. +79633726499
Email saricum@rambler.ru
ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7621-5898>

Формат цитирования

Аджиева А.И., Алиева З.М., Мартемьянова В.К. Естественное и микрклональное воспроизведение палеоэндемика Дагестана *Scabiosa gumbetica* Boiss. // Юг России: экология, развитие. 2022. Т.17, N 4. С. 30-39. DOI: 10.18470/1992-1098-2022-4-30-39

Получена 22 июля 2022 г.

Прошла рецензирование 13 сентября 2022 г.

Принята 20 сентября 2022 г.

Резюме

Цель. *Scabiosa gumbetica* Boiss. – палеоэндемичный петрофильный вид внутригорий Дагестана, что делает актуальным его комплексные исследования. Работа посвящена выявлению состояния тантаринской ценопопуляции вида и изучению потенциала возобновления особей в полевых, лабораторных условиях и в культуре *in vitro*.

Материал и методы. Многолетние популяционные исследования *S. gumbetica* с использованием геоботанических методов проводились в окрестностях селения Тантари Гумбетовского района Дагестана. Виталитетное состояние особей определяли по методу Злобина, степень состояния жизненности особей – по Ишбирдину. Введение объекта в культуру *in vitro* обеспечивали по общепринятой методике.

Результаты. Широкий диапазон варьирования признаков особей *S. gumbetica* характеризует дифференцированность экотопов. Виталитетный анализ особей обнаружил депрессивные тенденции развития ценопопуляции с невысокой степенью их выраженности. Показано высокое значение потенциальной и низкое – реальной семенной продуктивности, которая недостаточна для успешного семенного возобновления в природных популяциях. Потенциал вегетативного возобновления особей успешен, что возмещает недостатки семенного возобновления. Разработана схема клонального микроразмножения *S. gumbetica* путем культивирования узловых эксплантов на среде Мурасиге-Скуга с добавлением ИМК, НУК, БАП, кинетина.

Заключение. Низкая реальная семенная продуктивность и депрессивные тенденции виталитета особей в тантаринской ценопопуляции *S. gumbetica* свидетельствуют о необходимости разработки методов для ее сохранения. Здесь перспективными могут стать биотехнологические методы. Исследования обосновали и продемонстрировали возможности микрклонального воспроизведения путем прямого органогенеза.

Ключевые слова

Популяционные исследования, виталитет популяции, *Scabiosa gumbetica*, микрклональное размножение, культура *in vitro*.

Natural and microclonal reproduction of the Dagestan paleoendemic *Scabiosa gumbetica* Boiss.

Aida I. Adzhieva, Zarina M. Alieva and Vera K. Martemyanova

Dagestan State University, Makhachkala, Russia

Principal contact

Aida I. Adzhieva, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Department of Botany, Dagestan State University; 43a Magomed Gadzhieva St, Makhachkala, Russia 367000. Tel. +79633726499

Email saricum@rambler.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7621-5898>

How to cite this article

Adzhieva A.I., Alieva Z.M., Martemyanova V.K. Natural and microclonal reproduction of the Dagestan paleoendemic *Scabiosa gumbetica* Boiss. *South of Russia: ecology, development*. 2022, vol. 17, no. 4, pp. 30-39. (In Russian) DOI: 10.18470/1992-1098-2022-4-30-39

Received 22 July 2022

Revised 13 September 2022

Accepted 20 September 2022

Abstract

Aim. As a paleoendemic petrophilic species of the foothills of Dagestan *Scabiosa gumbetica* Boiss, its comprehensive studies are relevant. This work is devoted to the identification of the state of the Tantari cenopopulation of the species and the study of the renewal potential of individuals in the field, in laboratory conditions and through in vitro culture.

Material and Methods. Long-term population studies of *Scabiosa gumbetica* using geobotanical methods were carried out in the vicinity of the village of Tantari in the Gumbetovsky district of Dagestan. The vital state of individuals was determined by the Zlobin method, while the degree of vitality of individuals was determined according to Ishbirdin. The introduction of the subject into in vitro culture was done according to the generally accepted methodology.

Results. A wide range of variation in the characteristics of *S. gumbetica* individuals characterises the differentiation of ecotopes in which it occurs. The vital analysis of individuals revealed depressive tendencies in the development of the cenopopulation with a low degree of severity. A high value of potential and a low value of real seed productivity were shown – insufficient for successful seed renewal in natural populations. The potential of vegetative renewal of individuals was confirmed, which compensates for the low productivity of natural seed renewal. A scheme of clonal micro-multiplication of *S. gumbetica* was developed by cultivating nodal explants on a Murashige-Skuga medium with the addition of IBA, NAA, BAP and kinetin.

Conclusion. Low real seed productivity and depressive tendencies of the vitality of individuals in the Tanari cenopopulation of *S. gumbetica* indicate the need to develop methods for its conservation. Biotechnological methods can be promising. Studies have substantiated and demonstrated the possibilities of microclonal reproduction by direct organogenesis.

Key Words

Population studies, population vitality, *Scabiosa gumbetica*, microclonal reproduction, in vitro culture.

ВВЕДЕНИЕ

Scabiosa gumbetica Boiss. – палеоэндемичный и специфичный для известняков внутригорий и аридных северных предгорий Дагестана вид, описан А.П. Овериным в 1861 году из района Гумбета. Еще Н.И. Кузнецов [1] писал о нем, как о третичном реликте скал и подвижных каменистых субстратов, выходов на поверхность материнских известняковых пород (750–1650 м н. у. м.), «излюбленных» экотопов нагорных ксерофитов [2].

Популяционные исследования этого оригинального вида на территории дагестанских гор находятся на начальной стадии. Предварительные наблюдения показывают, что изучаемые в разных участках внутригорий республики ценопопуляции этого вида по доминированию особей в среднем генеративном возрастном состоянии относятся к нормальному типу, когда максимум приходится на это состояние [3]. В то же время ряд авторов указывает на угрожаемое состояние ценопопуляций этого вида, связывая его с ограниченным естественным возобновлением особей [4; 5]. Так, З.З. Шахбановой [5] при анализе реальной семенной продуктивности *S. gumbetica* по разным локалитетам Дагестана было выявлено крайне низкое количество семян, обладающих всхожестью и способных дать жизнеспособные проростки (1.70 штук на корзинку в ценопопуляции окрестностей Чиркейского водохранилища и 2.11 штук на корзинку – в ценопопуляции окрестностей селения Хариколо при общем количестве семян в корзинке 21.3 и 27.8 соответственно). Такая низкая реальная семенная продуктивность особей может привести к сокращению естественного ареала вида [5]. В связи с вышесказанным проведен анализ виталитетного состояния особей *S. gumbetica* во внутригорном (Центральном) Дагестане на примере модельной ценопопуляции окрестностей селения Тантари Гумбетовского района (*locus classicus*) для оценки морфогенетического потенциала и возможностей микроклонального размножения особей этого оригинального нагорно-ксерофитного вида.

Для изучения и сохранения редких видов растений все более широко применяются биотехнологические методы [6; 7], однако они лишь начинают разрабатываться в отношении редких и ценных видов растений Дагестана [8]. Скабиоза остается мало изученным объектом в этом отношении, встречаются лишь отдельные сведения по видам этого рода [9]. Ранее нами была налажена методика непрямого органогенеза *S. gumbetica* через каллусную культуру [10]. Поэтому в задачи настоящего исследования входила и разработка способа прямого органогенеза для дальнейшего возможного использования его результатов в поддержании ботанических коллекций редких видов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение ценопопуляции *S. gumbetica* окрестностей селения Тантари Гумбетовского района Дагестана в полевые сезоны 2013–2020 гг. было связано с использованием общепринятых для горных условий республики [11–15] геоботанических подходов: закладкой учетных площадей на трансектах, расположенных поперек склонов с типичными сообществами

нагорных ксерофитов, изучением проективного покрытия субстрата особями, выраженного в процентах, определением обилия особей (по Друде), выяснением роли особей в естественных фитоценозах. Полевой материал собирали в первых числах июля (массовое цветение особей) и в конце июля (массовое плодоношение особей). Учетной единицей выбрана средневозрастная генеративная особь, выборка составила 50 штук; выкопка особей для определения фитомассы осуществлялась в 15 площадях с учетом всех местообитаний: каменистые склоны, травянистые склоны, скалы, обочины грунтовых дорог).

Промеры и взвешивания осуществляли в лабораторных условиях. Семенную продуктивность генеративного побега определяли анализом всхожести семян или общей его продуктивности – «коэффициент семенификации» [16], что колеблется в широких пределах и отражает процент всхожих семян от числа цветков на корзинку.

Виталитетное состояние особей в изучаемой ценопопуляции определяли методом Ю.А. Злобина [17], в качестве учетных были выбраны мерные и счетные параметры – высота генеративного побега, число листьев в розетке, длина листа розетки, длина листа генеративного побега, диаметр корзинки в цветении, число цветков в корзинке, число оборотных листьев корзинки, число семян на корзинку, длина семянки, вес семянки. Эти данные вносились в виде массивов в электронные таблицы и обрабатывались с помощью возможностей аппарата математической статистики для выявления частот разных показателей

(среднее арифметическое \bar{X} , его ошибка $S_{\bar{X}}$, коэффициент вариации $CV\%$, ошибка опыта $S_{\bar{X}\%} = \frac{S_{\bar{X}}}{\bar{X}} \cdot 100\%$).

При определении виталитета особей в выборке были отобраны указанные выше признаки, особи распределяли по трем размерным классам (а – крупные, б – средние, с – мелкие), при этом границами деления служили числа в интервале $\bar{X}_r = \bar{X} \pm tS_{\bar{X}}$.

После построения доверительных интервалов, выявляли показатель качества (виталитета) особей в популяции (Q) в зависимости от соотношения групп особей в размерных классах по формуле $Q=(a+b)/2 >, <, =$.

Степень процветания или депрессивных тенденций морфометрических параметров особей изучаемой ценопопуляции определяли по формуле

$$I_Q = \frac{(a+b)}{2c} \quad [18].$$

В качестве исходного материала для введения в культуру *in vitro* использовали зеленые побеги средневозрастных генеративных особей *S. gumbetica*, полученные с растений тантаринской ценопопуляции в местах их естественного произрастания. Асептику обеспечивали по общепринятой методике в условиях ламинар – бокса [6; 19]. Побеги замачивали в мыльной воде с добавлением 2–3 капель твин-80 в течение 10–15 минут, несколько раз промывали водопроводной и 2–3 раза – дистиллированной водой, стерилизовали в течение 8 минут в 0,1%-м растворе сулемы ($HgCl_2$) и

затем трехкратно (15, 10 и 5 минут) промывали в дистиллированной воде. После стерилизации выделяли узловые экспланты и помещали их на питательную среду Мурасиге-Скуга (МС), содержащую разные дозы регуляторов роста: индолилмасляной кислоты (ИМК), нафтилуксусной кислоты (НУК), 6-бензиламинопурина (БАП) и кинетина. Эксперименты проводили в контролируемых условиях в климатической камере Sanyo MLR (16 часовой фотопериод, температура 23–25°C, влажность 70–75%). Оценку состояния эксплантов проводили по показателям выживаемости (% живых эксплантов от их общего числа в варианте), роста, активности процессов каллусообразования и морфогенеза. Рост оценивали по количеству эксплантов (в процентах от общего их числа в варианте), у которых наблюдали увеличение размеров, а также визуально в баллах (0–3): рост отсутствует («0»), прирост экспланта не превышает («1»), равен («2») или превышает («3») его изначальную величину. Каллусообразование оценивали в процентах (доля эксплантов, у которых наблюдали формирование каллуса, в % от общего числа эксплантов в варианте), и баллах, отражающих степень его развития (1 – начало закладки, 2 – слабое покрытие раневой поверхности, 3 – мощное развитие). Эффективность клонального размножения оценивали по количеству новообразованных побегов.

В связи с ограниченностью исходного материала для первичного введения в культуру *in vitro* было использовано 10 побегов. Дальнейшие опыты проведены в 10–20 кратной биологической повторности, результаты приведены в виде средних значений и их стандартных ошибок.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экотопы произрастания нагорных ксерофитов во внутригорьях Дагестана, традиционно считаются «неудобьями», то есть местами, где температурные, горно-экспозиционные, почвенные и другие условия не позволяют растительному покрову иметь сплошной характер размещения, в этой связи наши геоботанические исследования в окрестностях с. Тантари, естественно, выявили низкую степень проективного покрытия почвы на изучаемых площадках особями *S. gumbetica* (от 5 до 25%). Наименьшего обилия особи достигали в несомкнутых сообществах скал и каменистых склонов. В то же время, размеры средневозрастных генеративных особей в этих экотопах были довольно крупными. Наименьшими размерами и наибольшим обилием характеризовались особи изучаемого вида в условиях каменистых лугов. Видимо, при наличии нормальных почвенных условий для развития особей изучаемого вида в ценопопуляции становится много, что сопровождается миниатюризацией их размеров. Но даже при наибольшем обилии и во время массового цветения особи никогда не перекрывают органы друг друга и не аспектируют в ценозах. Таким образом, ценотическая роль изучаемого растения в сообществах указанной территории чаще всего ассектаторная, что уже было отмечено немного ранее [3]. Особи размещаются на изучаемой территории группами, контагиозно, что хорошо заметно даже без специальных исследований.

Исследования тантаринской ценопопуляции *S. gumbetica* выявили некоторые особенности варьирования учетных признаков. Средневозрастные

генеративные особи в выборке изучаемой ценопопуляции отличаются широким диапазоном коэффициента вариации. Мы связываем это с гетерогенностью экотопов. Несмотря на произрастание на склонах южной экспозиции и каменистом их характере, места произрастания особей изучаемого вида все же заметно различаются по степени крутизны склона, подвижности субстрата (неподвижный или сильно подвижный), соседствующим видам. Видимо, это и приводит к разбросу значений признаков. Умеренный коэффициент вариации зафиксирован для признаков «диаметр корзинки в цветении», «число оборотных листьев корзинки», повышенный – для признаков «длина листа розетки», «длина листа генеративного побега», «число цветков в корзинке», «число семян на корзинку», «длина семянки», «высокий – у признаков «высота генеративного побега» и «вес семян» и очень высокий – у признаков «число листьев в розетке». Среди всех учтенных признаков наименее вариабельны те, которые имеют отношение к соцветиям изучаемого растения. Выборка, взятая для анализа, достоверно отражает генеральную совокупность, так как ошибка опыта в вариантах колеблется в пределах от 1,8 до 4,5 по разным параметрам (табл. 1), что не превышает уровень пяти процентов.

Жизненность, или виталитет особей, определяющий устойчивое, нормальное их существование в популяциях, у *S. gumbetica* в тантаринской ценопопуляции демонстрирует невысокое качество процессов жизнедеятельности. Использованный для виталитетного анализа способ одномерной оценки метрических признаков с ранжированием показаний и разделением выборки на три группы продемонстрировал указанные выше тенденции. Так, по пяти учетным признакам в ценопопуляции преобладают крупноразмерные и среднеразмерные особи (табл. 2). Степень процветания (виталитета) особей по этим параметрам колеблется от 1,2 до 7,8. Преимущественно это признаки, связанные с генеративными органами (табл. 2). По пяти другим учетным признакам: «высота генеративного побега», «число листьев в розетке», «число оборотных листьев корзинки», «число семян на корзинку», «длина листа генеративного побега» в выборке изучаемой ценопопуляции преобладают мелкоразмерные особи. Эти пять признаков с депрессивными тенденциями развития у особей имеют степень выраженности в рамках от 0,8 до 0,4 (табл. 2). Вычисленный по всем десяти признакам усредненный уровень виталитета *S. gumbetica* в популяции окрестностей селения Тантари показывает его депрессивный характер с небольшой степенью выраженности этих тенденций.

Как известно, высокое виталитетное состояние особей в популяциях растений не всегда трактуют как устойчивость их развития, особенно если популяция составлена ассектаторами [17]. В то же время, депрессивные явления, наблюдаемые в популяционной жизни *S. gumbetica* в Тантаринском локалитете уже не один год подряд, не могут не настораживать, учитывая отсутствие таких ярко выраженных тенденций в ценопопуляциях других территорий Внутригорного Дагестана [17].

Полученные данные подчеркивают недостаточность материала нескольких лет полевых наблюдений и сборов для качественного и полного

изучения особенностей популяционной жизни *S. gumbetica* в данном локалитете; первые также указывают на необходимость систематического мониторингового изучения состояния вида во временных промежутках, сопоставимых с продолжительностью его большого жизненного цикла. Думаем, что продолжительные исследования в этом направлении важны также для научного обоснования необходимости охраны данного вида в определенных локалитетах республики.

Для характеристики репродуктивной биологии вида обязательным показателем является определение продукционных характеристик его ценопопуляций (репродуктивный успех, репродуктивное усилие, урожайность) или отдельных особей (семенная продуктивность, биомасса репродуктивных органов и др.). Высокие показатели продукционного процесса характерны для изучаемого вида в отношении потенциальной семенной продуктивности: 631,7 семян на особь, условно-реальная продуктивность – 626 семян на особь, что составляет 99% от потенциальной. В то же время, реальная семенная продуктивность, под которой мы понимаем число всхожих семян на растение, крайне низкая, а целенаправленное изучение всхожести семян в лабораторных условиях выявило коэффициент семенной продуктивности в пределах 0–9%, что явно

недостаточно для семенного возобновления в природных популяциях *S. gumbetica*. В этом плане весьма важен потенциал вегетативного возобновления особей изучаемого вида в ценопопуляции. На учетных площадях, начиная с виргинильного возрастного состояния, у особей появляются рамы с вегетативными побегами – розетками. Наибольшее их количество на особь было характерно для сенильного, средневозрастного генеративного и старого генеративного состояний, гораздо меньшее количество рамы наблюдается у виргинильных или молодых генеративных особей изучаемого вида в тантаринской ценопопуляции (табл. 3). Недостаток семенного возобновления, таким образом, здесь возмещается возможностями вегетативного возобновления. Это важно и в плане фотосинтетической активности, ведь у особей *S. gumbetica* отсутствуют или ограниченное количество (2–4) мелких листьев на генеративном побеге.

Выявленные нами низкая реальная семенная продуктивность и элементы депрессивных тенденций при оценке виталитета особей в изучаемой ценопопуляции *S. gumbetica* свидетельствуют о необходимости разработки методов для ее сохранения, и здесь перспективными могут стать биотехнологические методы, в частности, микроклонального размножения путем прямого органогенеза.

Таблица 1. Данные морфометрических исследований средневозрастных генеративных особей *Scabiosa gumbetica* в тантаринской ценопопуляции

Table 1. Indicators morphometric study of middle-aged generative individuals *Scabiosa gumbetica* in Tantari coenopopulation

Параметры / Parameters	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$S_{\bar{X}}\%$	$CV\%$
Число листьев в розетке, см Number of leaves in rosettes, sm	9,9±0,3	3,0	42,5
Длина листа розетки, см Length of leaves in rosettes, sm	5,2±0,2	3,8	25,7
Длина листа генеративного побега, см Length of leaves in generative shoots, sm	3,4±0,1	2,9	25,3
Диаметр корзинки в цветении, см Diameter of flowering floscules, sm	2,9±0,1	3,4	18,9
Число цветков в корзинке, шт Number of flowers in floscules, pcs	22,4±1,0	4,5	21,3
Число оберточных листьев корзинки, шт Number of wrapping leaves of floscules, pcs	9,8±0,2	2,0	15,5
Число семян на корзинку, шт Number of seeds in floscules, pcs	22,2±0,4	1,8	24,5
Длина семянки, мм Length of seeds, mm	2,8±0,1	3,6	23,7
Вес семянки, мг Weight of seeds, mg	7,9±0,2	2,5	30,5

Примечание: $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ – среднее арифметическое и ошибка среднего арифметического,

$$S_{\bar{X}}\% = \frac{S_{\bar{X}}}{\bar{X}} \cdot 100\% \text{ – ошибка опыта, } CV\% \text{ – коэффициент вариации}$$

Note: $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ – arithmetic mean and error of arithmetic mean, $S_{\bar{X}}\% = \frac{S_{\bar{X}}}{\bar{X}} \cdot 100\%$ – error of experiment,

$CV\%$ – coefficient of variation

Экспланты *S. gumbetica* обладали высокой жизнеспособностью в культуре *in vitro*, их рост и выживаемость на среде МС с добавлением БАП (0.5 мг/л), ИМК и БАП (0.5: 2.5 мг/л), а также кинетина

(0.5 и 2.5 мг/л) достигали 100 % (табл. 4). Во всех вариантах через 4–6 недель культивирования отмечали закладку и рост адвентивных почек (рис. 1). Наибольшее количество экплантов (100%), сформировавшихся

ровавших почки, было отмечено на среде с кинетином (0.5 мг/л). При повышении его содержания в среде до 2,5 мг/л показатель снижался в 3 раза, составляя уже

33%. В вариантах с введением БАП или совместным введением БАП и ИМК почки формировались у 33–43% эксплантов.

Таблица 2. Данные определения виталитета Тантаринской ценопопуляции *Scabiosa gumbetica*

Table 2. Indicators definitions of vitality Tantari coenopopulation of *Scabiosa gumbetica*

Параметры / Parameters	Определение виталитета особей ценопопуляции Vitality of individuals in coenopopulation		
	Границы деления выборки Range of samples	Процент особей классов a/b/c Percentage of individuals in classes a/b/c	Степень виталитета Degree of vitality
Высота генеративного побега, см Height of generative shoots, sm	24,5–21,1	39/16/45	0,6
Число листьев в розетке, шт Number of leaves in rosettes, pcs	10,5–9,3	32/11/57	0,4
Длина листа розетки, см Length of leaves in rosettes, sm	6,0–4,4	14/62/24	1,6
Длина листа генеративного побега, см Length of leaves in generative shoots, sm	3,6–3,2	33/18/49	0,5
Диаметр корзинки в цветении, см Diameter of flowering floscules, sm	3,1–2,7	21/52/27	1,4
Число цветков в корзинке, шт Number of flowers in floscules, pcs	25,2–19,6	30/48/22	1,8
Число оберточных листьев корзинки, шт Number of wrapping leaves of floscules, pcs	10,2–9,4	26/34/40	0,8
Число семян на корзинку, шт Number of seeds in floscules, pcs	23,0–21,4	38/10/52	0,5
Длина семянки, см Length of seeds, sm	3,0–2,6	57/14/29	1,2
Вес семянки, мг Weight of seeds, mg	8,3–7,5	66/28/6	7,8
Виталитетное состояние особей ценопопуляции в целом State of vitality of individuals in coenopopulation in general		36/29/35 Депрессивное / Depression	0,9

Таблица 3. Интенсивность вегетативного размножения особей *Scabiosa gumbetica* в тантаринской ценопопуляции

Table 3. Intensity of vegetative propagation of individuals of *Scabiosa gumbetica* in the Tantari coenopopulation

Возрастное состояние Age status	Количество, шт Number, pcs		
	Рамет на особь Ramets per individual	Розеток на рамету Rosettes in ramets	Розеток на особь Rosettes per individual
Виргинильное Virginal	6,0±0,3	19,7±0,5	118,2
Молодое генеративное Young generative	5,0±0,2	9,8±0,6	49,0
Средневозрастное генеративное Middle-aged generative	16,8±1,0	26,9±0,6	451,9
Старое генеративное Old generative	8,0±0,2	30,0±0,3	240,0
Сенильное Senile	8,2±0,3	24,5±0,9	196,0

В среднем во всех вариантах почки на узлах без формирования каллуса развивались в количестве 3–5 на эксплант, при этом активность роста из них побегов зависела от гормонального состава среды. Так, на среде с ИМК и БАП рост отмечен только у 14%, с БАП – у 33% (рис. 1), а с 0.5 мг/л кинетина – у всех 100% эксплантов. В то же время на среде с более высоким (2.5 мг/л) содержанием кинетина рост побегов

полностью подавлялся. В варианте с НУК (0.5 мг/л) выживаемость эксплантов составила лишь 20%. У всех эксплантов в варианте с кинетином (0.5 мг/л) происходила закладка в среднем около 5 почек на эксплант (коэффициент мультипликации 1:5) с дальнейшим ростом 3–4 побегов. В вариантах с НУК у 20–30% происходила закладка почек без роста побегов (табл. 4).

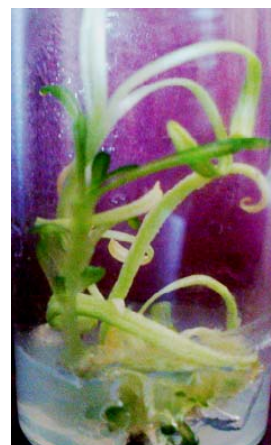
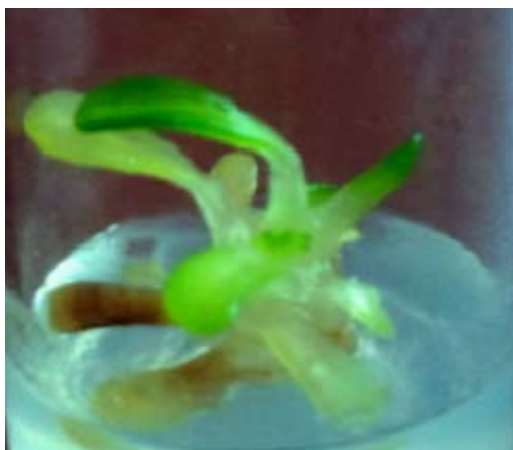


Рисунок 1. Состояние узловых эксплантов *Scabiosa gumbetica* при первом пассировании на 25 и 55 сутки культивирования на среде МС+ БАП (0.5 мг/л)

Figure 1. Condition of nodular explants of *Scabiosa gumbetica* during the first passage on the 25th and 55th days of cultivation on MS+ BAP medium (0.5 mg/l)

Таблица 4. Морфогенез узловых эксплантов *Scabiosa gumbetica*

Table 4. Morphogenesis of nodal explants of *Scabiosa gumbetica*

Вариант Variant	Выживаемость, % Survival, %	Рост Growth		Каллус Callus		Морфогенез, % Morphogenesis, %		
		%	балл score	%	балл score	корни roots	почки (% / шт.) buds (% / pieces)	
I пассаж / I passage								
1	100	100	2.9±0.1	0	-	0	43 / 3	14
2	100	100	2.8±0.2	0	-	0	33 / 3	33
4	100	100	2.8±0.2	0	-	0	100 / 5	100
5	100	66	0.8±0.4	0	-	0	33 / 1	0
6	20	100	1.7±0.2	100	2.0±0.3	0	20 / 5	0
II пассаж / II passage								
2	100	80	2.5±0.3	34	1.0±0.1	0	80 / 4	80
III пассаж / III passage								
2	90	100	2.9±0.2	100	1.8±0.2	0	100 / 4	100
IV а пассаж / IV a passage								
3	80	100	2±0.3	100	2.3±0.4	0	80	80
IV б пассаж / IV б passage								
3	100	100	0.8±0.1	100	2.7±0.2	80	0	0

Примечание: Варианты культивирования: МС+ ИМК + БАП (0.5:2.5 мг/л) (1), МС+ БАП (0.5 мг/л) (2), МС+ ИМК (0.5 мг/л) (3), МС + кинетин (0.5 мг/л) (4); МС+ кинетин (2.5 мг/л) (5); МС + НУК (0.5 мг/л) (6); а – без предобработки, б – с предобработкой ИМК

Note: Cultivation options: MS+ BAP + BAP (0.5:2.5 mg/l) (1), MS+ BAP (0.5 mg/l) (2), MS+ BAP (0.5 mg/l) (3), MS + kinetin (0.5 mg/l) (4); MS+ kinetin (2.5 mg/l) (5); MS + NAA (0.5 mg/l) (6); a – without preprocessing, b – with IBA preprocessing

На следующем этапе, на 25-е сут. культивирования, полученные побеги-регенеранты использовали для микроочеренкования (этап собственно микроразмножения). Узловые экспланты, культивируемые на среде МС + БАП (0.5 мг/л), характеризовались высокими показателями выживаемости, роста и морфогенеза (табл. 4, второй пассаж, рис. 2). Отмечена мультипликация побегов, развитие 3–6 и более почек и разворачивание листьев у 80% эксплантов (коэффициент мультипликации, соответственно, 1:3–1:6), у 20% эксплантов наблюдалось побурение и дальнейшее отмирание. У

34% эксплантов (от общего числа жизнеспособных) наблюдалась закладка рыхлой, оводненной каллусной ткани светло-бежевого цвета с легко отделяющимися друг от друга участками.

Далее побеги вновь подвергали микроразмножению: узловые экспланты размером 5–10 мм, полученные на побегах второго пассажа, пересаживали на среду МС+ БАП (0.5 мг/л) (рис. 3а) (третий пассаж), а затем параллельно на два варианта среды: МС+БАП (0.5 мг/л) (рис. 3б) и МС+ИМК (0.5 мг/л) (четвертый пассаж). При высокой выживаемости эксплантов здесь отмечена и высокая активность

формирования почек, достигающая 80–100%, с последующим ростом побегов. Однако в целом экспланты узлов побеги скабиозы характеризовались некоторым снижением жизнеспособности при длительном пассировании. Так, выживаемость в третьем пассаже составила 90%, четвертом – 80%

(табл. 4), тогда как при первичной посадке достигала 100%. При этом у всех жизнеспособных эксплантов с зеленой окраской наблюдалась интенсивная пролиферация каллуса и закладка пазушных почек с последующим ростом из них побегов.

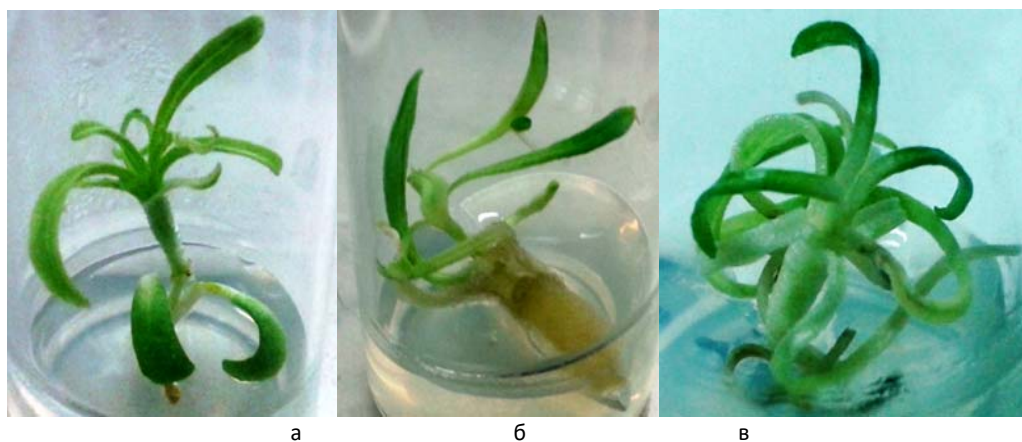


Рисунок 2. Узловые экспланты *Scabiosa gumbetica* при втором пассировании в варианте МС+ кинетин (2.5 мг/л) (а); МС+ НУК (0.5 мг/л) (б); МС+ кинетин (0.5 мг/л) (в) на 60 сутки культивирования

Figure 2. *Scabiosa gumbetica* nodular explants during the second passage in the variant MS + kinetin (2.5 mg/l) (a); MS+ NAA (0.5 mg/l) (b); MS+ kinetin (0.5 mg/l) (c) on the 60th day of cultivation

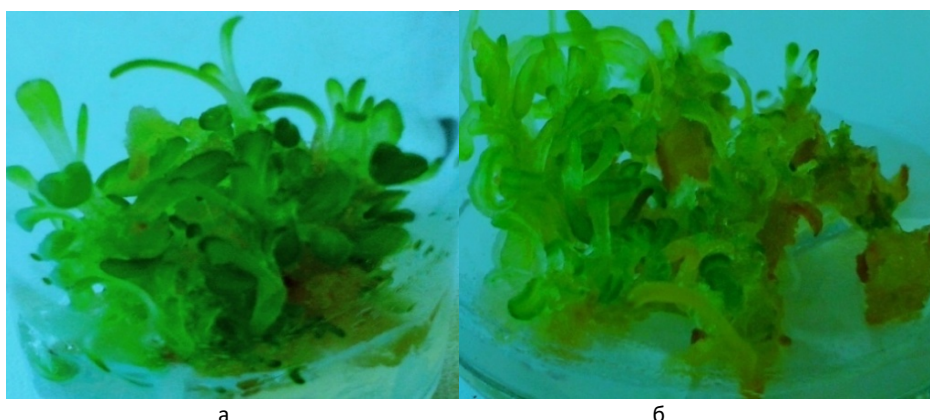


Рисунок 3. Узловые эксплантов *Scabiosa gumbetica* третьего (а) и четвертого (б) пассажей на 55 сутки культивирования на среде МС+БАП (0.5 мг/л)

Figure 3. *Scabiosa gumbetica* nodular explants of the third (a) and fourth (b) passages on the 55th day of cultivation on MS+BAP medium (0.5 mg/l)

Для индукции ризогенеза часть эксплантов после достижения побегами размеров 2 см перед культивированием на среде с ИМК (0.5 мг/л) обрабатывали 1% раствором ИМК в течение 1 часа. Все экспланты узлов скабиозы с предобработкой ИМК на 55 сутки характеризовались высокой выживаемостью, закладкой рыхлой, активно растущей, покрывающей всю поверхность побега оводненной каллусной ткани коричневого цвета с легко отделяющимися друг от друга участками при слабом росте самого побега. У 80% эксплантов с сильно разросшейся каллусной тканью, наблюдалась закладка в среднем 4-х корней на эксплант (табл. 4, IVб). Выживаемость у всех эксплантов при четвертом пассировании составила 80%, при этом интенсивность роста и способность к морфогенезу на среде с БАП у них были выше, чем на среде с ИМК (табл. 4 II–IVа).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введен в культуру *in vitro* редкий, нуждающийся в охране вид – *Scabiosa gumbetica*, генеративные особи которого имеют невысокое качество виталитета в тантаринской ценопопуляции и слабо возобновляются генеративным путем в природных условиях; разработана схема его микроклонального размножения. Выбраны оптимальные условия для повышения морфогенетического потенциала эксплантов изучаемого растения и определены условия для увеличения его посадочного материала.

Перспективы анализа возможностей реализации семенного и вегетативного возобновления *S. gumbetica* связаны с изучением не только состояния популяций этого палеоземного вида в типичных условиях его распространения, но и потенциальной выживаемости потомства микроклонального воспроизведения в соответствующей им природной среде.

БЛАГОДАРНОСТЬ

На этапе обсуждения идеи и планирования хода исследования авторы руководствовались ценными советами и рекомендациями д.б.н., профессора А.Г. Юсуфова (1930–2018).

ACKNOWLEDGMENT

The authors were guided by the valuable advice and recommendations of Doctor of Biological Sciences, Professor A.G. Yusufov (1930–2018), at the stage of discussing the idea and planning the course of the study.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Кузнецов Н.И. Нагорный Дагестан и значение его в истории развития флоры Кавказа // Известия Императорского Русского географического общества. 1910. XLVI (VI). С. 213–260.
2. Львов П.Л. Редкие и исчезающие виды растений Дагестана // Бюллетень Главного ботанического сада 1976. N 102. С. 102–106.
3. Бийболатова З.А., Аджиева А.И. Онтогенетическая структура ценопопуляций эндемичного дагестанского вида *Scabiosa gumbetica* Boiss. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014. N 10. С. 43–47.
4. Литвинская С.А., Муртазалиев Р.А. Кавказский элемент во флоре Российского Кавказа: география, созоология, экология. Краснодар. 2009. 439 с.
5. Шахбанова З.З. Популяционные исследования репродуктивной сферы *Scabiosa gumbetica* Boiss. // Сборник статей Всероссийской научной конференции «Модернизация науки и образования», Махачкала, 2015. С. 144–146.
6. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК – ПРЕСС, 1999. 160 с.
7. Молканова О.И., Горбунов Ю.Н., Ширнина И.В., Егорова Д.А. Применение биотехнологических методов для сохранения генофонда редких видов // Ботанический журнал. 2020. Т. 105. N 6. С. 610–619. DOI: 10.31857/S0006813620030072
8. Алиева З.М., Мартеньянова В.К., Юсуфов А.Г. Специфика морфогенеза изолированных структур редких растений Дагестана *in vitro* // Фундаментальные исследования. 2014. N 6. С. 58–62.
9. Масленников А.В., Сорокина С.С., Филиппова С.С. Редкий охраняемый вид скабиоза исетская (*Scabiosa isetensis* L.) как объект клеточных технологий // Материалы Всероссийской научной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии». Чебоксары: ИД «Среда», 2019. С. 34–37.
10. Мартеньянова В.К., Алиева З.М. Морфогенез эксплантов зеленых побегов скабиозы гумбетовской (*Scabiosa gumbetica* Boiss.) *in vitro* и ее микроразмножение // Биотехнология. 2014. N 3. С. 62–66.
11. Ахмедова З.М., Бабаева Д.Р., Шахбанова З.З., Магомедова Б.С. Изучение пространственного размещения особей *Onobrychis majorovii* на массиве Сарыкум (Дагестан) // Материалы международной конференции «Флора и заповедное дело на Кавказе: история и современное состояние изученности». Пятигорск, 22–25 мая 2019. С. 18–19.
12. Яровенко Е.В. Некоторые исследования популяции хохлатки таркинской (*Corydalis tarkiensis* Prok (Fumariaceae) DC.) на территории Нараттюбинского хребта (Дагестан) // Ботанический вестник Северного Кавказа. 2016. N 1. С. 82–90.
13. Аджиева А.И. Изучение метрических параметров в сарыкумской ценопопуляции эспарцета Майорова // Тезисы докладов III Всероссийской научной конференции

- «Закономерности распространения, воспроизведения и адаптаций растений и животных», Махачкала, 2021. С. 28–29.
14. Гаджиева Н.Н., Аджиева А.И. Первичные итоги исследования чиркейской ценопопуляции *Onosma sericea* Willd. // Вестник Дагестанского государственного университета. Серия 1. Естественные науки. 2022. Т. 37. Вып. 1. С. 95–101. DOI: 10.21779/2542-0321-2022-37-1-95-101
 15. Муртазалиева П.М. Виталитетный анализ Сачадинской ценопопуляции *Salvia Beckeri* (Trautv.) // Материалы VI Всероссийской конференции с международным участием «Горные экосистемы и их компоненты», Нальчик, 11–16 сентября 2017. С. 59–61.
 16. Ходачек Е.А. Семенная продуктивность и урожай семян растений в тундрах Западного Таймыра // Ботанический журнал. 1970. N 55. С. 995–1010.
 17. Злобин Ю.А. Популяционная экология растений: современное состояние, точки роста. Сумы. 2009. 263 с.
 18. Ишбирдин А.Р., Ишмуратова М.М., Жирнова Т.В. Стратегии жизни ценопопуляции *Cephalanthera rubra* (L.) Rich. на территории Башкирского Государственного заповедника. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2005. N 1(9). С. 85–98.
 19. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка, 1980. 448 с.

REFERENCES

1. Kuznetsov N.I. Mountain Dagestan and its importance in the history of the Caucasian flora. Izvestiia Imperatorskogo Russkogo geograficheskogo obshchestva [News of the Imperial Russian Geographical Society]. 1910, XLVI (IV), pp. 213–260. (In Russian)
2. Lvov P.L. Rare and endangered species of plants of Dagestan. Biulleten Glavnogo Botanicheskogo Sada [Bulletin of the main botanical garden]. 1976, no. 102, pp. 102–106. (In Russian)
3. Biibolatova Z.A., Adzhieva A.I. Ontogenetic spectrum coenopopulations endemic Dagestan kind *Scabiosa gumbetica* Boiss. Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamentalnykh issledovanii [International Journal of Applied and Fundamental Research]. 2014, no. 10, pp. 43–47. (In Russian)
4. Litvinskaya S.A., Murtazaliev R.A. *Kavkazskii element vo flore Rossiiskogo Kavkaza: geografiya, sozologiya, ekologiya* [The Caucasus Element within the Flora of the Russian Caucasus: Geography, Sozology, Ecology]. Krasnodar, 2009, 439 p. (In Russian)
5. Shakhbanova Z. Z. Populyatsionnye issledovaniya reproductivnoi sfery *Scabiosa gumbetica* Boiss. [Population investigations of reproductive sphere of *Scabiosa gumbetica* Boiss.]. In: *Sbornik statei Vserossiiskoi nauchnoi konferentsii «Modernizatsiya nauki i obrazovaniya»* [Digest of articles of All-Russian Scientific Conferences «Modernization science and education», Makhachkala, 2015]. Makhachkala, 2015, pp. 144–146. (In Russian)
6. Butenko R.G. *Biologiya kletok vysshikh rastenii in vitro i biotekhnologii na ikh osnove* [Biology of higher plant cells *in vitro* and biotechnology based on them]. Moscow, FBK – PRESS, 1999, 160 p. (In Russian)
7. Molkanova O.I., Gorbunov Yu.N., Shirnina I.V., Egorova D.A. Application of biotechnological methods for preserving the gene pool of rare species. *Botanical Journal*, 2020, vol. 105, no. 6, pp. 610–619. (In Russian) DOI: 10.31857/S0006813620030072
8. Alieva Z.M., Martem'yanova V.K., Yusufov A.G. Specificity of morphogenesis of isolated structures of rare plants of Dagestan *in vitro*. Fundamental'nye issledovaniya [Fundamental research]. 2014, no. 6. pp. 58–62. (In Russian)
9. Maslennikov A.V., Sorokina S.S., Filippova S.S. Redkii okhranyaemyi vid skabioza isetskaya (*Scabiosa isetensis* L.) kak ob"ekt kletochnykh tekhnologii [A rare protected species of

scabiosa isetensis (*Scabiosa isetensis* L.) as an object of cellular technologies]. *Materialy Vserossiiskoi nauchnoi konferentsii «Fundamental'nye i prikladnye issledovaniya po prioritetsnym napravleniyam bioekologii i biotekhnologii»*, Cheboksary, 2019 [Materials of the All-Russian Scientific Conference "Fundamental and Applied Research in Priority Areas of Bioecology and Biotechnology"]. Cheboksary, "Sreda" Publ., 2019, pp. 34–37. (In Russian)

10. Martemyanova V.K., Alieva Z.M. Morphogenesis of explants of green shoots of *Scabiosa gumbetica* Boss. *in vitro* and its micropropagation. *Biotehnologiya* [Biotechnology]. 2014, no. 3, pp. 62–66. (In Russian)

11. Ahmedova Z.M., Babaeva D.R., Shahbanova Z.Z., Magomedova B.S. Izuchenie prostranstvennogo razmeshcheniya osobei *Onobrychis majorovii* na massive Sarykum (Dagestan) [Study of spatial placement of *Onobrychis majorovii* individuals on the Sarykum massif (Dagestan)]. *Materialy mezhdunarodnoi konferentsii «Flora i zapovednoe delo na Kavkaze: istoriya i sovremennoe sostoyanie izuchennosti»*. Pyatigorsk, 22–25 maya 2019 [Materials of the international conference "Flora and Conservation in the Caucasus: history and current state of knowledge". Pyatigorsk, May 22–25, 2019]. Pyatigorsk, 2019, pp. 18–19. (In Russian)

12. Yarovenko E.V. Some studies of the population of the *Corydalis Tarkinskyi* (*Corydalis tarkiensis* Prok (Fumariaceae DC.) on the territory of the Narat'yubinsky ridge (Dagestan). *Botanicheskii vestnik Severnogo Kavkaza* [Botanical Bulletin of the North Caucasus]. 2016, no. 1, pp. 82–90. (In Russian)

13. Adzhieva A.I. Izuchenie metriceskikh parametrov v sarykumskoi tsenopopulyatsii espartseta Maiorova [Study of metric parameters in the Sarykum coenopopulation of *Onobrychis majorovii*]. *Tezisy dokladov III Vserossiiskoi nauchnoi konferentsii «Zakonomernosti rasprostraneniya, vosproizvedeniya i adaptatsii rastenii i zhivotnykh»*,

Makhachkala, 2021 [Abstracts of reports of the All-Russian scientific conference «Patterns of distribution, reproduction and adaptation of plants and animals», Makhachkala, 2021]. Makhachkala, 2021, pp. 28–29. (In Russian)

14. Gadzhieva N.N., Adzhieva A.I. Primary results of the study of the Chirkei coenopopulation *Onosma sericea* Willd. *Bulletin of Dagestan State University. Series 1. Natural sciences*, 2022, vol. 37, iss. 1, pp. 95–101. (In Russian) DOI: 10.21779/2542-0321-2022-37-1-95-101

15. Murtuzaliev P.M. Vitalitetnyi analiz Sachadinskoi tsenopopulyatsii *Salvia Beckeri* (Trautv.) [Vital analysis of the Sachada coenopopulation of *Salvia Beckeri* (Trautv.)]. *Materialy VI Vserossiiskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem «Gornye ekosistemy i ikh komponenty»*, Nal'chik, 11–16 sentyabrya 2017 [Proceedings of the VI All-Russian Conference with international participation "Mountain ecosystems and their components", Nalchik, 11–16 September 2017]. Nalchik, 2017, pp. 59–61. (In Russian)

16. Khodachek E.A. Seed productivity and seed yield of plants in the tundra of Western Taimyr. *Botanicheskii zhurnal* [Botanical Journal]. 1970, no. 55 (7), pp. 995–1010. (In Russian)

17. Zlobin Yu.A. The theory and practice of evaluation vital composition of plants. *Botanicheskii zhurnal*. [Botanical Journal]. 1989, no. 74 (6), pp. 769–781. (In Russian)

18. Ishbirdin A.R., Ishmuratova M.M., Zhirnova T.V. Strategies of life seedlings of *Cephalanthera rubra* (L.) Rich. on the territory of the Bashkir State nature reserve. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo* [Bulletin of the Nizhny Novgorod University]. 2005, no. 1(9), pp. 85–98. (In Russian)

19. Kalinin F.L., Sarnackaya V.V., Polishchuk V.E. *Metody kul'tury tkanei v fiziologii i biokhimii rastenii* [Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry]. Kiev, Naukova dumka Publ., 1980, 448 p. (In Russian)

КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Авторы совместно работали над проведением экспериментов и обсуждением результатов. Аида И. Аджиева выполнила популяционные исследования. Зарина М. Алиева и Вера К. Мартемьянова провели эксперименты в культуре *in vitro*. Все авторы в равной степени участвовали в написании рукописи, и несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата или других неэтических проблем.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The authors worked together to conduct the experiments and discuss the results. Aida I. Adzhieva carried out population studies. Zarina M. Alieva and Vera K. Martemyanova undertook the *in vitro* culture experiments. All authors are equally participated in the writing of the manuscript and are responsible for plagiarism, self-plagiarism and other ethical transgressions.

NO CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Аида И. Аджиева / Aida I. Adzhieva <https://orcid.org/0000-0002-7621-5898>

Зарина М. Алиева / Zarina M. Alieva <https://orcid.org/0000-0002-7722-7399>

Вера К. Мартемьянова / Vera K. Martemyanova <https://orcid.org/0000-0001-7517-5671>