

УДК 582.931.4:615.07

## **ЦИТОЛОГО – ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАЛЛУСА РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ СОРТОВ SYRINGA VULGARIS L.**

Любаковская Л.А., Гурина Н.С., Крылов Е.Ю., \*Брель Н.Г.

Витебский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, г. Витебск, просп. Фрунзе, 27, [g\\_n\\_s\\_05@mail.ru](mailto:g_n_s_05@mail.ru)

\*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Сурганова, 2в, [cbg@it.org.by](mailto:cbg@it.org.by)

### **Cytologo – histologic analysis of callus of the various origin of cultivated *Syringa vulgaris* L. grades**

Ljubakovskaja L.A., Gurina N.S., Krylov E.J., \*Brel N.G.

Vitebsk state medical university, Vitebsk, Republic of Belarus, Frunze, 27, [g\\_n\\_s\\_05@mail.ru](mailto:g_n_s_05@mail.ru)

\*Central Botanical Garden of the NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus, Surganova, 2v, [cbg@it.org.by](mailto:cbg@it.org.by)

The histologic analysis of callus various origin (sheet, floral and stem) cultivated on various nutrient mediums is carried out. The environments, containing routines and phenylalanin, raised histologic heterogeneity of callus, promoting the occurrence of meristemoids and embryoids. The highest morphogenic potential has been observed in the callus of a sheet origin.

[Oleaceae *Syringa vulgaris* L. ]

[Oleaceae *Syringa* x *hybrida*]

Введение. Использование достижений генной инженерии для создания новых форм растений требует фундаментальных знаний в области биологии растений. Основу морфогенеза, как процесса образования определенных структур, составляют процессы размножения, роста и дифференцировки клеток. Следовательно, механизмы, регулирующие эти процессы на клеточном уровне, могут рассматриваться как непосредственные причины, приводящие к определенному типу морфогенеза целого растения. Наиболее удобной модельной системой для изучения морфогенеза на клеточном уровне является культура клеток *in vitro*, способная к специфической морфогенетической реакции в ответ на экспериментальное воздействие.

Исследования в этом направлении позволят выявить характер цитологических изменений в каллусе, специфику клеточных преобразований в ходе вторичной дифференциации и оптимизировать условия получения растений - регенерантов. В большинстве случаев, каллус существующий в длительно пассируемой культуре, не способен к морфогенезу. Следовательно, возникает необходимость в поиске дополнительных экспериментальных подходов, позволяющих реализовать морфогенетический потенциал клетки в длительно пассируемой культуре. Одним из механизмов, регулирующих процессы морфогенеза, является цикличность многих метаболических процессов, стойко передающаяся от клетки к клетке в течение многих клеточных поколений. Среди вторичных метаболитов важная роль принадлежит фенольным соединениям - одним из наиболее распространенных и многочисленных классов природных соединений, активным клеточным метаболитам, определяющим фармакологические свойства растений и оказывающим влияние на различные процессы: репродукцию, ризогенез, защиту от патогенов, регуляцию процессов окислительного фосфорилирования и т.д. [1].

Цель исследования – цитолого-гистологический анализ каллусов сирени различных эпигенетических групп при культивировании на различных морфогенных средах.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования использовали стабильную каллусную культуру различного (листового, стеблевого, цветочного) происхождения *Syringa vulgaris* (L.) сорта «М.Шолохов», поддерживаемую в культуре Центрального ботанического сада НАН Беларуси, г. Минск с 2001 г. При изучении способности каллусных линий к морфогенезу использовали среды следующего состава:

1. Среда МС (Мурасиге и Скуга) с половинной концентрацией основных солей и витаминов, содержащая (мг / л): аскорбиновую кислоту -50, гидролизат казеина - 500,  $MgSO_4 \times 7H_2O$  - 185, глутамин - 500, аланин -30, аргинин - 80, аспарагин - 250, сахарозу - 30, 0,6 % агар, 13.5 мкМ 2,4-Д и 4,4 мкМ БАП, рН 5,7 до автоклавирования.

2. Среда того же состава, что и среда 1 с добавлением 6,1 мг / л рутина.

3. Среда того же состава, что и среда 1 с добавлением 1,65 мг / л фенилаланина.

4. Среда того же состава, что и среда 1 с добавлением 6,1 мг / л рутина и 1,65 мг / л фенилаланина. В качестве анализируемых промежутков взяты 15, 40 и 60 дни ростового цикла. При проведении гистологического анализа каллусы фиксировали в 10% формалине, приготовленном на фосфатном буфере, рН 7,2. Образцы дегидрировали через ряд этилового спирта (60,70,80,96°), ксилол, спирт: ксилол (1:1). Фиксированный материал заключали в гистомикс. Гистологические срезы, толщиной 6 мкм, готовили на микротоме Leica (Германия), окрашивали методом Шиффа [2], толудиновым синим [3] и гематоксилин – эозином [2,3] и обезвоживали, проводя через серию этилового спирта. Световую микроскопию проводили на микроскопе Leica 2500 (Германия).

Результаты и обсуждение. Каллусы различных эпигенетических групп (листовой, цветочный, стеблевой), культивируемые на средах 1 - 4 в течение ростового цикла отличались по морфологическим показателям. В начале роста (15 дней), на всех типах сред каллусы были рыхлые, зеленые (цветочный и стеблевой) или желто-зеленые (листовой), поверхность слабо бугристая. Такая морфологическая характеристика сохранялась на среде 1 в течение всего культурального цикла (60 дней). На средах 2,3,4, начиная с 30 и до 60 дня культивирования, они становились бугристыми, плотными и бурыми. Причем, именно бурые, плотные каллусы в дальнейшем характеризовались наличием эбриогенных структур. Значительное морфологическое разнообразие каллусов, отмечено многими исследователями для представителей и других семейств растений [4,5].

Цитолого-гистологический анализ каллуса показал, что длительно пассируемые каллусные культуры, изучаемых эпигенетических групп сирени сорта «М.Шолохов», характеризовались невысокой гетерогенностью по клеточному составу. Для всех каллусов было характерно отсутствие четко дифференцированной эпидермы, каллус представлен паренхимными, в основном, тонкостенными клетками, не имеющими строго определенной анатомической структуры и выраженной функциональной специализации. По цитологическим характеристикам экспланты отличались между собой. Так, в цветковом экспланте каллус представлен клетками разнообразной формы, среди которых достаточно много гипертрофированных, слабо вакуолизированных, ядра в крупных клетках едва заметны и слабо окрашены, тогда как в мелких клетках, ядра более окрашены. В листовом экспланте клетки каллуса изодиаметрические, от крупных до мелких по размеру, со слабо окрашенным ядром, расположенным в центре клетки, слабо вакуолизированы. Стеблевой каллус

представлен изодиаметрическими клетками, различных размеров, ядра которых хорошо окрашены, расположены в центре клетки или смещены на периферию, клетки слабо вакуолизированы. Поскольку каллус представляет собой - гетерогенную, интегрированную структуру, формирующуюся, как правило, из исходно разных клеток (генеративных или вегетативных), то и морфогенетические потенции этих клеток будут реализоваться различными путями [6]. По способности каллусных культур к реализации морфогенетического потенциала их можно разделить на морфогенные, обладающие высокой степенью гетерогенности, и неморфогенные - относительно однородные по клеточному составу. Таким образом, индуцированные из соматических тканей сирени, каллусные культуры различных эпигенетических групп в длительно пассируемой культуре, вероятно, можно отнести к неморфогенному каллусу. Получение морфогенных каллусных культур требует дополнительных экспериментальных подходов. Для инициации морфогенеза в качестве триггера нами были использованы фенольные соединения – рутин, предшественник фенольных соединений – фенилаланин и их комбинация. В качестве морфогенной среды использовали среду 1. Среды 2,3,4 модифицировали ( как указано в материалах и методах). При переносе каллусных культур на среды для индукции морфогенеза наблюдали цитологические изменения, которые были различны на средах 1 -4 . Каллусы становились более гетерогенные, в них обнаруживались клетки меристематического типа, паренхимные клетки различных форм и размеров, клетки, содержащие запасные вещества. Среди каллусных клеток нами выделены популяции, состоящие из относительно мелких клеток, сохраняющих способность к пролиферации. Такие клетки мы отнесли к меристематическому типу. Эти клетки отличались от других клеток каллуса небольшими размерами, имели, как правило, крупное ядро, плотную цитоплазму, и относительно слабо развитую систему вакуолей. При этом цитоплазма равномерно заполняла весь клеточный объём, а ядро занимало центральное положение. На всех вариантах сред меристематические клетки образовывали морфогенетические очаги, которые были представлены дву-, трех- и многоклеточными структурами – меристематоидами. Клетки меристематоидов проявляли полярность, имели большую вакуоль и ядро, оттесненное к оболочке клетки, Образование многоклеточных меристематоидов более интенсивно происходило на среде 2 и 3 в каллусе листового происхождения. На всех исследуемых средах, в каллусных культурах различного происхождения, на 15 - день культурального цикла наблюдали наличие клеток содержащих запасные вещества в виде полисахаридов (крахмальные зерна), которые окрашивались реактивом Шиффа. Наличие полисахаридов является одной из отличительных особенностей, обуславливающих специфическую рыхлую морфологию и эмбриогенный потенциал каллуса [4]. Кроме этого, присутствовали клетки, окрашенные толуидиновым синим, содержащие запасные белки. Наличие запасных веществ в клетках каллуса, может служить косвенным доказательством невысокой интенсивности мобилизации запасных веществ на различные метаболические процессы. На 40 - 60 дни культивирования, на среде 1 наблюдали наличие многоклеточных меристематоидов, однако формирования эмбриогенных структур не происходило. На средах 2,3 и 4 в течение 40 - 60 дней культурального цикла наблюдали формирование эмбриоидов. В этот период содержание запасных веществ резко уменьшилось, вплоть до их исчезновения. На среде 4 на 60 день культивирования количество питательных веществ увеличивалось, что свидетельствует о снижении морфогенетического потенциала и подтверждено наличием единичных эмбриоидов.

## **Выводы**

1. Эмбриогенным потенциалом обладают плотные, бурые каллусы, культивируемые на среде содержащей рутин и фенилаланин.

2. Каллус листового происхождения обладает более высоким морфогенетическим потенциалом, чем стеблевой и цветковый
3. На 40 день культурального цикла наблюдали наиболее высокую степень дифференцированности каллусной культуры различных эпигенетических групп.

### **Список литературы**

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. М.: Наука, 1993.- 272с.
2. Chengalrayan K., Hazra S., Gallo–Meagher M. Histological analysis of somatic embryogenesis and organo-genesis induced from mature zygotic embryo–derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.) // *Plant Science*. 2001. Vol. 161, P. 415 - 421.
3. Quiroz–Figuroa F.R., Fuentes–Cerdea C.F.J., Rojas–Herrera R., Loyola–Vargas V.M. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica* // *Plant Cell Repts*. 2002. Vol. 20, P. 1141-1149.
4. Горбунова В.Ю. Генетические предпосылки спорофитного пути развития микроспор злаков в условиях *in vitro*. Уфа: УНЦ РАН, 1993.- 104с.
5. Рахимбаев И.Р., Тивари Ш., Бишимбаева Н.К., Кушнарченко С.В., Азимова Е.Д. Биотехнология зерновых культур. Алма-Ата: Гылым, 1992.- 240с.
6. Дмитриева Н. Н. Проблемы регуляции морфогенеза и дифференциации в культуре клеток растений // *Культура клеток растений*. М.: Наука, 1981. С. 113-123.