

УДК 582.475.4:581.143

ПРОЦЕССЫ МОРФОГЕНЕЗА В ДЛИТЕЛЬНО КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КАЛЛУСАХ БОЯРЫШНИКА ПОЯРКОВОЙ (*CRATAEGUS POJARKOVAE* KOSSYCH)

Попкова Л.Л.¹, Теплицкая Л.М.²

¹ЮФ "Крымский агротехнологический университет" НАУ, Симферополь, Украина,
e-mail: ophris97@rambler.ru

²Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь, Украина,

Изучены процессы морфогенеза в длительно культивируемых в условиях *in vitro* каллусах боярышника Поярковой. Дана цитоморфологическая и гистологическая характеристика разных типов каллусных культур боярышника.

Ключевые слова: боярышник Поярковой, каллус, морфогенез, *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время приоритетным направлением охраны природы является сохранение биологического разнообразия и, в частности, редких эндемичных видов. Одним из эндемиков Крыма и Карадага, популяция которого находится под угрозой исчезновения, является боярышник Поярковой (*Grataegus pojarkovae* Kossyich). Боярышник Поярковой внесен в «Европейский Красный список животных и растений, находящихся под угрозой исчезновения» (1991), глобальный Европейский список (2002), Международную Красную книгу (МСОП) и «Красную книгу Украины» (1996). Данный вид боярышника отличается нетребовательностью к почвам, значительной засухоустойчивостью, крупными (до 2,5-3 см в диаметре) плодами желтой окраски, обладающими ценными пищевыми и лекарственными свойствами. Растение боярышника Поярковой весьма декоративно и может использоваться в озеленении, а его плоды представляют интерес для использования в медицине [1 – 3].

Однако возобновление популяции боярышника Поярковой крайне низкое. Лимитирующими факторами естественного возобновления являются нерегулярное плодоношение, низкая всхожесть семян и длительный период их прорастания (280-400 дней), уничтожение значительной части урожая плодов грызунами [4]. Поэтому для сохранения уникального генотипа помимо мониторинга и охранных мероприятий естественной популяции необходимо разрабатывать методы его ускоренного размножения и культивирования.

Современными эффективными методами размножения растений являются биотехнологические методы, основанные на культивировании изолированных органов и тканей в условиях *in vitro*. Многие редкие, исчезающие виды содержат витамины, биологически активные вещества, ценные для применения в качестве лекарственных средств. Однако источником этих продуктов могут являться как растения-регенеранты, выращенные в условиях *in vitro*, так и собственно культура клеток. Каллусные культуры часто используют как резерв для микроклонального размножения и получения вторичных метаболитов [5, 6]. Изучение каллусных культур, регулирование процессов морфогенеза в них позволяет использовать генотип редких видов для различных прикладных аспектов селекции и сохранения видов.

Целью данной работы являлось изучение процессов морфогенеза в длительно культивируемых каллусных культурах боярышника Поярковой для сохранения генотипа редкого вида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для проведения исследований служили вегетативные почки боярышника Поярковой, семена с зародышами и нераскрывшиеся бутоны. При проведении исследований использовали общепринятые в биотехнологии методы [6, 7].

С целью получения асептических эксплантов, перед помещением на питательные среды были использованы следующие режимы стерилизации: 50 % р-р брадофена, 1 мин., 80 % р-р этанола, 30 сек, 3 % р-р перекиси водорода; 80 % р-р этанола, 30 сек., 0,3 % р-р перекиси водорода; слабо розовый р-р KMgO_4 , 80 % р-р этанола, 3 % р-р перекиси водорода. Стерилизацию материала проводили в условиях ламинар-бокса с последующей промывкой стерильной дистиллированной водой 3 раза по 5 минут в объемах не менее 100 мл. Количество асептических эксплантов при этом составляло 65-80%. Асептические экспланты (зародыши, почки без кроющих чешуй, тычинки, пыльники) помещали по одному на агаризованные питательные среды (Мурасиге-Скуга, Гамборга). На каждый вариант питательной среды было высажено по 30 эксплантов определенного типа в трёхкратной повторности. Культуральные сосуда с эксплантами содержались в фитолюминостате, где поддерживалась температура 22-25⁰С, относительная влажность воздуха 60-70% и освещенность 1,5-2 клк. После пересадки первичного каллуса на свежую среду субкультивирование осуществлялось не ранее чем через 24-36 месяцев.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что растения из рода боярышник имеют лекарственное и хозяйственное значение. Уже в конце 18 века была отмечена высокая терапевтическая эффективность от применения различных частей боярышника при заболеваниях центральной нервной и сердечно-сосудистой систем. Препараты боярышника применяют при функциональных расстройствах сердечной деятельности, гипертонической болезни, климактерическом неврозе, атеросклерозе. Положительные результаты лечения препаратами боярышника гипертонической болезни на ранних стадиях обусловлены как сосудорасширяющим, спазмолитическим действием, так и способностью растения положительно влиять

на уровень венозного давления и эластичность сосудистой стенки артериол и капилляров. В медицине используют плоды, цветы и листья боярышника [8]. В плодах содержатся флавоноиды, каротиноиды, дубильные и пектиновые вещества, сапонины, гликозиды. Жидкий экстракт плодов входит в состав препарата «кардиовален». Препараты из листьев действуют преимущественно на нервную систему как успокоительное средство, но при этом вызывают повышение артериального давления. Поскольку полезные вещества часто содержатся в культурах клеток и органов, то весьма целесообразно получение и изучение каллусных культур боярышника.

В результате экспериментов были получены каллусные культуры из вегетативно-генеративных почек, зеленых семядолей проростков, развивающихся в условиях *in vitro*, пыльников и тычиночных нитей [9, 10]. Однако каллусные культуры, полученные из генеративных органов, генетически нестабильны, в них чаще наблюдается образование гаплоидов и эмбрионидных структур. Поэтому именно каллусные культуры из вегетативных органов, в которых были обнаружены меристемоподобные клетки и ранние этапы дифференцировки, использовались для активного наращивания биомассы, длительного культивирования и экспериментов по морфогенезу.

Изучение способности к каллусогенезу показало, что лучше всего каллус образовывался из почек боярышника Поярковой. Оптимальной питательной средой для первичного каллусообразования из почек являлась среда МС-1, содержащая 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП. Через 11-1 суток, преимущественно на раневых поверхностях появлялся первичный каллус, представляющий собой рыхлую массу светло-зеленых клеток. После активного нарастания в течение 30-40 суток первичные каллусные культуры переносили на свежие питательные среды. Установлено, что для длительного культивирования также хорошо подходит среда МС-1, на которой даже через 24 и 36 месяцев отмечалось нарастание каллусной массы. Также для длительного культивирования каллуса была отобрана среда Гамборга. Исследования показали, что наибольшее влияние на процессы морфогенеза при длительном культивировании каллуса боярышника Поярковой (табл. 1), оказывают тип среды и концентрация фитогормонов.

Из испытанных нами питательных сред по прописям Мурасиге-Скуга и Гамборга для поддержания процессов морфогенеза при длительном культивировании более перспективной является среда МС-1 (табл.), на которой отмечаются процессы каллусогенеза, гистогенеза и эмбриоидогенеза. На питательной среде по прописи Гамборга, дополненной 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП (В-5), отмечены процессы каллусогенеза и гистогенеза (табл.).

При исследовании совместного влияния минеральной основы и состава регуляторов роста в среде культивирования показано, что для развития изучаемых процессов, более благоприятной является среда Мурасиге и Скуга. Так, на среде по прописи Мурасиге и Скуга, дополненной, 2,4-Д в концентрации 1,0 мг/л, и БАП, в концентрации 0,1 мг/л (МС-1), происходит активное образование первичного и вторичного каллуса. Культивируемые на ней клетки, обладают высокими показателями активности, способны к образованию элементов проводящей системы

(гистогенезу), а так же образованию соматических зародышей (эмбриогенезу). На среде МС-2 дополненной 2,4-Д в концентрации 2,0 мг/л, и БАП, в концентрации 0,2 мг/л (МС-2) отмечались только процессы каллусогенеза.

Таблица.
Влияние содержания фитогормонов в питательных средах на процессы морфогенеза при длительном культивировании в каллуса боярышника Поярковой

Вариант среды	Тип и концентрация регуляторов роста в среде, мг/л		Морфогенетическая реакция		
	2,4-Д	БАП	калусогенез	гистогенез	эмбриогенез
МС-1	1,0	0,1	+	+	+
МС-2	2,0	0,2	+	—	—
В-5	0,1	1,0	+	+	—

Примечание: + - наличие процессов; — - отсутствие процессов.

В результате исследований установлено, что длительно культивируемые каллусные культуры боярышника Поярковой, полученные из вегетативных почек, способны к образованию следующих типов каллуса:

- бугристого серовато-коричневого каллуса, не способного к гистогенезу и эмбриогенезу (рис.1);
- зеленого каллуса, способного к морфогенезу (рис. 2);
- матового каллуса способного к эмбриогенезу (рис. 3).



Рис. 1. Внешний вид серовато-коричневого бугристого каллуса.

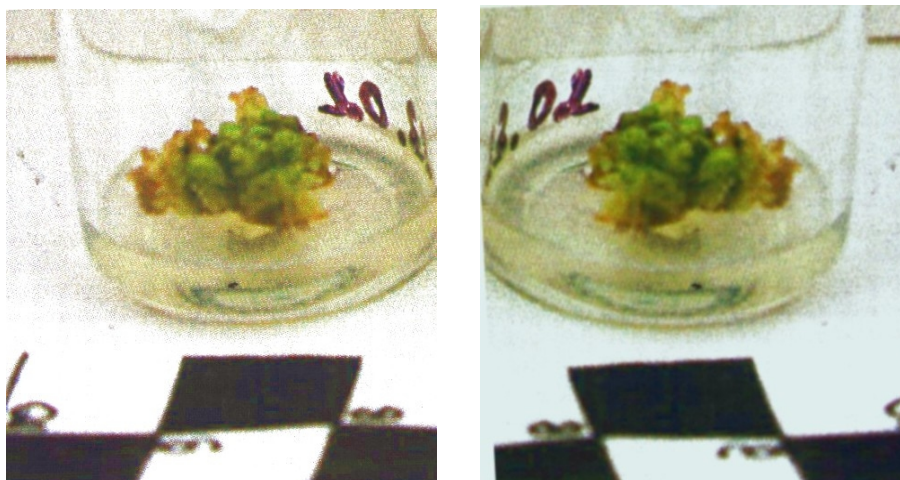
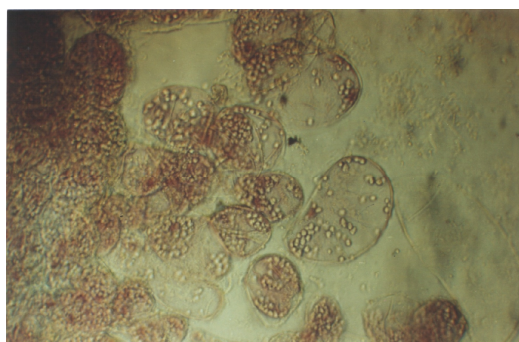
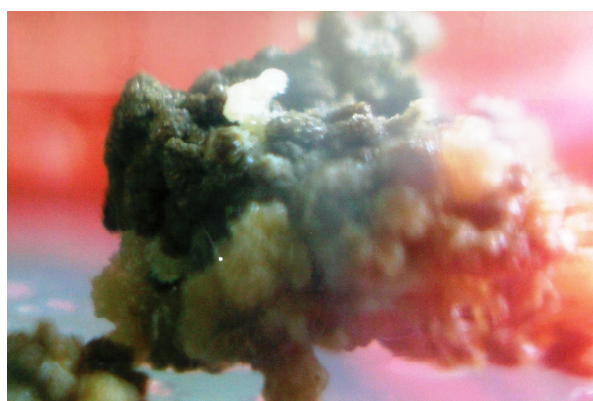
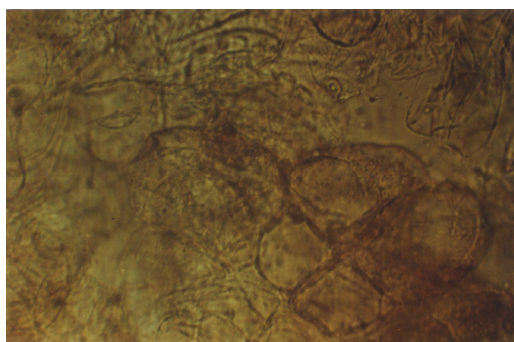


Рис. 2. Внешний вид зеленого каллуса с листовидными выростами, полученный из почек боярышника Поярковой.



а



б

Рис. 3. Внешний вид матового каллуса с эмбриоидоподобными структурами и его цитоморфология : а – клетки содержащие крупные гранулы (предположительно крахмал); б – четырехклеточный эмбрионид.

Для более детального выяснения, различий между образующимися типами каллусных культур, проводились цитологические и гистологические исследования.

Результаты цитологического исследования бугристого серовато-коричневого каллуса показали, что он состоит из скоплений структур, отходящих от общего центра в виде «звезды». Данные структуры содержат элементы проводящей системы, на концах выступов расположены зоны меристемоподобных клеток. Эти зоны, возможно, обеспечивают нарастание каллусной массы клеток и не являются апикальными меристемами, обеспечивающими процесс регенерации. Аналогичное строение каллусных тканей, не обладающих способностью к регенерации характерно для различных видов растений [5, 6]. Отсутствие апикальных меристем (при данных условиях культивирования) и эмбриоидоподобных клеток обуславливает отсутствие у данного типа каллуса способности к регенерации органов.

В результате цитологических исследований каллусных культур второго типа (зеленого цвета, способных к образованию листоподобных выростов), было отмечено, что очаги с процессами морфогенеза представляют собой достаточно организованные образования. Поверхностные клеточные слои этих образований состоят из мелких клеток меристематического типа. Клетки более глубоких слоев, крупнее по размеру, их ядра и цитоплазма окрашиваются слабее, чем у клеток поверхностных слоев. В глубине очагов морфогенеза заметна дифференцировка проводящей системы. Формирование новых очагов морфогенеза происходит путем образования выростов, состоящих из таких же мелких, интенсивно окрашивающихся клеток, отпочковывающихся от «старого» очага морфогенеза. Помимо образования очагов морфогенеза в поверхностных слоях клеток происходит формирование листовидных выростов и апикальных меристем побегов.

Гистологическое исследование матового каллуса светлого цвета показало, что он состоит из клеток с сильно окрашивающимися ядрами и цитоплазмой с крупными гранулами, сходными по внешнему виду с крахмальными зёрнами (рис.3, а). Такие клетки характерны для каллусов, обладающих эмбриоидогенными потенциями. Данные клетки окрашивались ацетокармином значительно сильнее по сравнению с клетками очагов морфогенеза. На срезах белого матового каллуса обнаружены многоклеточные образования, напоминающие эмбриоидоподобные структуры (рис.3, б). Эти образования различались между собой размерами и степенью дифференциации и представляли, вероятно, разные стадии эмбриогенеза. Они возникали, очевидно, из поверхностных клеток каллуса. В процессе их развития отмечены стадии многоклеточной дифференциации точек роста. Необходимо отметить, что на некоторых срезах были обнаружены единичные эмбриоиды среди рыхло расположенных паренхимных клеток каллусных тканей, соседствовавших с белым матовым каллусом. Эти эмбриоиды могли возникать либо из эмбриоидогенных клеток, отделившихся от белого матового каллуса, либо из клеток данного рыхлого каллуса. В последнем случае выявленный факт представляет значительный интерес, так как показывает принципиальную возможность получения у боярышника Поярковой эмбриогенного каллуса, который

может быть использован для получения клеточных культур, способных к регенерации.

Таким образом, проведенные гистологические исследования каллусных культур полученных из почек боярышника Поярковой показали, что каллусы отличаются как морфологической, так и гистологической гетерогенностью. Разные типы образований различаются по анатомическому строению, клеточной организации, которая определяет их морфогенетические потенции. Развитие растений-регенерантов может происходить по пути органогенеза (геммогенеза), а так же по пути эмбриоидогенеза.

Глобулярные структуры, возникающие из очагов меристем, а также матового каллуса имеют строение эмбриоидов. Листовидные выросты на поверхности очагов морфогенеза образуются в результате деятельности апикальных меристем почки. Это указывает на то, что определенные типы каллусной культуры обладают как эмбриоидогенными, так и органогенными потенциями. Конкретная реализация их морфогенетических потенций зависит от ряда факторов, в том числе от органа, из которого получен каллус и условий его культивирования, в частности от фитогормонального состава среды [5, 7].

При размножении растений через каллусную культуру всегда существует вероятность получения форм не идентичных исходному генотипу, в результате нестабильности каллусных клеток. Поэтому обязательным этапом в процессе исследований является цитогенетический анализ полученных каллусных культур для установления их сходства с донорными растениями.

Изучение цитоморфометрических параметров каллусных клеток боярышника Поярковой показало, что каллусная ткань различается как по цвету, форме, консистенции, так и по типу клеток, имеющих различные морфометрические показатели.

На питательной среде Мурасиге-Скуга, дополненной 2,4-Д в концентрации 1,0 мг/л и БАП в концентрации 0,1 мг/л (МС-1), развивался каллус состоящий из трех типов клеток: меристемоподобных, паренхимоподобных и гигантских, различающихся размерами клеток и их ядер. Из данных представленных в таблице 2 видно, что меристемоподобные клетки имеют небольшие размеры, большую часть которой занимает ядро, вытянутой формы. При этом ядерно-плазменное соотношение приближается к 0,12 что по данным литературы соответствует высокой ядерной активности клеток.

Паренхимоподобные клетки данной каллусной ткани имеют размеры, превышающие размеры меристемоподобных, что и позволило выделить их в отдельный тип клеток. Размеры у данного типа клеток превышают размеры предыдущего типа почти в три раза, размеры ядер, при этом остаются примерно таким же. Объем исследуемого типа клеток по сравнению с меристематическими значительно увеличивается, а ядерно-плазменное соотношение данного типа клеток снижается с 0,118 до 0,0016. Данные изменения могут свидетельствовать, что у этих клеток происходят процессы первичной дифференцировки, снижение уровня ядерной активности до «стандартного» уровня метаболизма.

В каллусной ткани, полученной на модифицированной среде МС-1, был выделен третий морфологический тип клеток – гигантские. Средние линейные размеры и объем клеток значительно увеличиваются, происходит увеличение размеров и объема ядер. Основным показателем функциональной активности клеток (их ядерно-плазменное соотношение) при этом понижается.

Таким образом, меристематические клетки характеризуются высоким ядерно-клеточным соотношением, у паренхимных клеток этот показатель несколько ниже. Минимальным ядерно-клеточным отношением характеризуются гигантские клетки. Эти изменения свидетельствуют о функциональной активности данного типа клеток, что может быть связано с особенностями роста каллуса на разных типах модифицированных питательных сред.

Изучение каллусных тканей, полученных на среде МС-2 с 2,0мг/л 2,4-Д и 0,2мг/л БАП, показало, что клетки на основании их размеров можно так же разделить на три типа: меристемоподобные, паренхимоподобные и гигантские. Изучение линейных размеров и объемов и ядер клеток данных типов показало, что они отличаются от аналогичных типов, полученных на среде МС-1 несколько большими размерами. Так, размеры меристемоподобных клеток полученных на среде МС-2 превышали размеры клеток такого же типа полученных на среде МС-1 на 7-10 единиц. Размеры ядер у данных типов клеток, незначительно снижались по сравнению с клетками, полученными на среде МС-1. Такие изменения размеров клеток и ядер, вызывали почти трехкратное снижение показателя функциональной активности клеток – ядерно-плазменного соотношения. Возрастание линейных размеров клеток при снижении размеров ядер отмечалось так же и у клеток паренхимного типа, что в свою очередь отражалось на снижении ядерно-плазменного соотношения. Такая же зависимость прослеживается и для клеток гигантского типа, полученных на среде МС-2.

Изучение каллуса, полученного на модифицированной среде Гамборга, показало, что в данной ткани, можно выделить только два типа клеток: меристематического и паренхимоподобного. Размеры клеток каллуса меристематического типа существенно не изменялись, по сравнению с клетками, полученными на среде МС-1. При этом за счет изменений в размерах паренхимоподобных клеток, происходило значительное снижение ядерно-плазменного соотношения по сравнению с каллусными культурами, полученными на среде МС-1.

Таким образом, в результате проведенных исследований оптимизированы условия получения и длительного культивирования каллуса из вегетативных органов боярышника Поярковой, определены питательные среды для индукции морфогенеза в длительно культивируемом каллусе. Для длительного культивирования оптимальной является среда Мурасиге-Скуга (МС-1). Культивируемые на ней клетки обладают высокими показателями активности, наблюдаются начальные этапы каллусо-, гисто- и эбриоидогенеза. Показано, что цитоморфологическая характеристика разных типов каллуса может служить критерием его морфогенетических потенций.

ВЫВОДЫ

1. Все гибриды нового поколения, взятые нами для изучения, проявили высокую ростовую активность на фоне засоления средней степени (NaCl 100 мМ).
2. Среди исследованных генотипов солеустойчивыми оказались гибриды Веселка МВ, Шаланда МВ и Одесский 385 МВ, а солечувствительными к хлоридному засолению – гибриды Одесский 375 МВ и ОдМа 310 МВ.
3. Разница в локализации ионов Na^+ между солеустойчивыми и солечувствительными гибридами была наиболее выражена в гомогенате и клеточном соке тканей надземной части.
4. Барьерная роль корней как адаптивная реакция организменного уровня на солевой стресс была более выражена у солеустойчивых гибридов.

Список литературы

1. Голубев В.Н. Биологическая флора Крыма / Голубев В.Н. – Ялта, 1996. – 86 с.
2. Дидух Я.П. Карадагский природный заповедник / Я.П. Дидух, Ю.Р. Шеляг-Сосонко – Киев, 1982. – 186 с.
3. Червона книга України. Рослинний світ. / [ред. Ю. Р. Шеляг-Сосонко]. – К. : Українська енциклопедія, 1996. – 680 с.
4. Летухова В.Ю. Современный ареал исчезающего вида боярышника Поярковой / В.Ю. Летухова // Труды Никит. Ботан. Сада. – 2001. – Т. 120. – С. 73–79.
5. Бутенко Р.Г. Биология высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе : учебное пособие / Бутенко Р.Г. – М. : ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
6. Здруйковская-Рихтер А.И. Культура изолированных зародышей и генеративных органов как метод селекции плодовых растений / А.И. Здруйковская-Рихтер // Тканевые и клеточные культуры в селекции растений. – М. : ВАСХНИЛ, 1979. – С. 57–70.
7. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
8. Темная Л.Д. Перспективы использования некоторых видов *Crataegus* в плодоводстве / Л.Д. Темная // Актуальные проблемы ботаники : Тезисы молодежной конференции ботаников стран СНГ. – Апатиты, 1993. – С.12–125.
9. Попкова Л.Л. Сохранение уникального генотипа боярышника Поярковой (*Crataegus pojarkovae* Kossykh) методом каллусных культур / Л.Л. Попкова, Л.М. Теплицкая // Тематич. сборник науч. трудов «Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана». – Симферополь, 2005. – Вып.15. – С. 147–152.
10. Попкова Л. Л. Изучение морфогенеза в каллусной культуре редкого эндемичного вида *Crataegus pojarkovae* Kossykh / Л. Л. Попкова, Л. М. Теплицкая // Тематич. сборник науч. трудов «Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана». – Симферополь, 2006. – Вып.16. – С. 9–17.

Попкова Л.Л. Процеси морфогенезу в тривало культивуємих калусах гліді Пояркової (*Crataegus pojarkovae* Kossykh) / Попкова Л.Л., Теплицька Л.М. // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2009. – Т. 22 (61). – № 4. – С. 135-144.

Досліджені процеси морфогенезу в тривало культивуємих в умовах *in vitro* калусах гліді Пояркової. Наведені цитоморфологічні та гистологічні характеристики різних типів калусних культур.

Ключові слова: глід Пояркової, калус, морфогенез, *in vitro*.

Popkova L.L. Process of morphogenesis in long cultivating callus of Pojarkova hawthorn (*Crataegus pojarkovae* Kossykh) / Popkova L.L., Teplitckaya L.M. // Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2009. – V.22 (61). – № 4. – P. 135-144.

Process of morphogenesis in long cultivating *in vitro* callus of Pojarkova hawthorn are investigated. Cytomorphological and histological characteristics of different types of callus of hawthorn are presents.

Key words: Pojarkova hawthorn, callus, morphogenesis, *in vitro*.

Поступила в редакцию 10.12.2009 г.