

УДК 582.736.3:057.086.83/88

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ ДОННИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*MELILOTUS OFFICINALIS* (L.) PALL.) И ЕЕ ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Теплицкая Л.М., Юркова И.Н., Сидякин А.И., Жупанов И.В.

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадського, Симферополь, Украина
E-mail: vanabis@list.ru*

Исследованы особенности индукции каллусогенеза в культуре вегетативных и генеративных органов *Melilotus officinalis*. Подобранны модификации питательных сред Мурасиге и Скуга для индукции каллусогенеза. Проведен цитоморфологический анализ пассированных каллусных культур и показан их низкий морфогенетический потенциал.

Ключевые слова: *Melilotus officinalis*, каллусная культура, цитоморфологический анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Человек использует растения в хозяйственной деятельности с давних времен. Сначала в пищу, позже – как лекарственное сырьё, красители и текстильные материалы. Издавна стоял вопрос наиболее быстрого и дешевого получения растительного сырья с целью удовлетворения потребностей в нем. В наше время это позволяют сделать биотехнологические методы, которые начали развиваться с начала XX века..

Одним из перспективных направлений биотехнологии является культура растительных тканей и клеток. Клеточные технологии, основанные на культивировании *in vitro* органов, тканей и клеток растений, могут облегчить и ускорить традиционный процесс получения различных веществ растительного происхождения [1].

Наряду с основными классами соединений (белки, жиры, углеводы) в растениях также содержатся вторичные метаболиты, макро- и микроэлементы, способные оказывать существенное влияние на организм человека. Одним из перспективных микроэлементов является селен. Считают, что он обладает противораковой активностью, ранее этому элементу ошибочно приписывались канцерогенные свойства. Установлено, что селен оказывает существенное влияние на состояние сердечно-сосудистой системы. Полагают, что совместно с витамином Е он стимулирует образование антител, тем самым увеличивая иммунные силы организма [2, 3].

Содержание селена в растениях в большинстве случаев тесно связанный с его концентрацией в почве [3]. Некоторые растения способны накапливать

значительные количества этого элемента. Их называют селеноаккумуляторы. *Melilotus officinalis* является одним из перспективных аккумуляторов селена. В связи с этим актуальным является получение каллусных культур донника лекарственного и исследования влияния селена на их цитоморфологические особенности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили вегетативные и генеративные органы *M. officinalis*. В качестве эксплантов были использованы завязи, семядоли, листья, семена, стебли и корни интактного растения.

Для соблюдения условий асептики работу по введению в изолированную культуру выполняли в условиях ламинарного бокса. Поверхностную стерилизацию материала проводили 96% этанолом, 0,01 % KMnO_4 , 3 % H_2O_2 и брадофеном.

Экспланты культивировали на агаризованных модифицированных питательных средах Мурасиге-Скуга (MS) и Гамборга-Эвелеге (B5), дополненных ИУК (индолил-3-уксусная кислота), 2,4-Д (2,4-дихлорфенилуксусная кислота), 6-БАП (6-бензиламинопуридин) и кинетин. В качестве источника селена использовали Na_2SeO_3 (ч.д.а.) в концентрации 2,0 мг/л по селену. Полученный первичный каллус субкультивировали на питательные среды того же состава. Цикл выращивания культур составлял 50 суток. В качестве культуральных сосудов использовали пробирки 2x20 см, содержащие 15 мл питательной среды. Экспланты культивировали при температуре 23-25 °С в темноте. Частоту каллусообразования оценивали в процентах по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантов [4, 5].

Цитоморфологические исследования проводились на давленных препаратах по стандартным методикам [6, 7]. Для проведения цитологических исследований каллус фиксировали по Карнуа (этанол-ЛУК-хлороформ – 6:3:1 или этанол-ЛУК – 3:1) в течение 12 часов при комнатной температуре или 24 часа при температуре 4-6 °С. Фиксированный материал промывали в 3-4 порциях 70 % этилового спирта и хранили в 70 % растворе этанола.

Для окрашивания использовали 1 % раствор ацетокармина [7]. Исследования препаратов проводили на микроскопе МРІ-5, с окуляром 10x. Проведение микрофото съемки осуществляли цифровой фотокамерой Canon PowerShot A 480.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования по индукции каллусогенеза в культуре вегетативных и генеративных органов *M. officinalis* показали, что этот процесс в значительной степени зависит от условий стерилизации, состава питательной среды и типа используемого экспланта.

Результаты наших исследований показали, что оптимальным типом экспланта являются семена (рис. 1.), из введенных в культуру жизнеспособными являлись около 60%. Листья, завязи, семядоли и стебли при введении в культуру *in vitro* витрифицировались и погибали на 5-15 сутки культивирования, тогда как введенные в культуру семена оказались способными к каллусогенезу.

Таблица 1.

Подбор оптимального типа экспланта *M. officinalis*

№ п/п	Эксплант	Количество эксплантов, %		
		Погибших	Стерильных и жизнеспособных	Способных к каллусогенезу
1	Завязь	100	0	0
2	Семядоля	100	0	0
3	Лист	100	0	0
4	Семя	40	60	60
5	Стебель	98	2	2
6	Корень	100	0	0
7	Латеральные почки	0	100	0

Для получения стерильного посадочного материала *M. officinalis* нами были испробованы несколько вариантов стерилизации. С целью снижения травмирующего действия и достижения полноты стерилизующего эффекта были опробованы пять вариантов ступенчатой стерилизации исходного материала.

Стерилизацию эксплантов осуществляли по следующим схемам:

I – 96% этанол – 1 мин;

II – 0,01 % KMnO_4 – 30 мин; 3 % H_2O_2 – 3 мин;

III – 0,01 % KMnO_4 – 30 мин; 70 % этанол – 1 мин; 3 % H_2O_2 – 3 мин;

IV – 0,1 % KMnO_4 (+1 капля Tween x100 на 100 мл раствора) – 45 мин; 3 % H_2O_2 – 3 мин;

V – 100% брадофен – 5 мин.

Максимальное количество асептических эксплантов получено при стерилизации, проводимой по следующей схеме: 96% этанол в течение 1 мин. При этом жизнеспособными являлись 90% эксплантов. Остальные виды стерилизации были менее эффективны или приводили к гибели экспланта, либо к его заражению (табл. 2).

Таблица 2.

Влияние стерилентов на жизнеспособность и каллусогенез

Вариант стерилизации	Количество эксплантов, %	
	стерильных	способных к каллусогенезу
I	98	90
II	50	0
III	50	0
IV	60	0
V	60	55

Для индукции каллусогенеза у первичных эксплантов *M. officinalis* нами были использованы различные модификации базовых питательных сред Мурасиге-Скуга и Гамборга-Эвелега.

Таблица 3.

Модификации питательных сред
используемых для культивирования *M. officinalis*

№ п/п	Концентрация в среде, мг/л					Частота каллусообразования %
	Минеральная основа	6-БАП	2,4-Д	Кинетин	Сахароза	
1	В5	0,5	2	0,5	20	0
2	В5	0,5	2	-	40	0
3	МС	0,5	2	0,5	20	0
4	МС	0,5	2	-	30	60
5	МС	0,5	2	0,5	30	30
6	МС	0,5	2	-	40	0

Согласно полученным данным, максимальная жизнеспособность эксплантов (60%) была отмечена на среде МС с половинной концентрацией макро и микросолей, содержанием сахарозы 30 г/л, 6-БАП 0,5 мг/л, 2,4Д 2 мг/л, а также на среде МС с половинной концентрацией макро и микросолей 30 г/л сахарозы 6-БАП 0,5 мг/л, 2,4Д 2 мг/л, кинетин 0,5 мг/л. На этих средах наблюдались процессы каллусогенеза на 7 сутки культивирования. Для индукции каллусогенеза у первичных эксплантов *M. officinalis* были использованы различные модификации базовых питательных сред Мурасиге-Скуга и Гамборга-Эвелега.

Каллус, индуцированный из семян *M. officinalis* (рис. 2. а), имел светло-желтую окраску, характеризовался рыхлой консистенцией, был достаточно оводнен. При визуальном анализе каллусных культур нами не были выявлены признаки морфогенеза, каллус отличался относительной гомогенностью структуры. После 30 суток культивирования каллус пересаживали на свежую питательную среду. Для пассирования каллуса использовали среды того же состава что и для индукции первичного каллуса. Пассированный каллус морфологически не отличался от первичного (рис. 2. б).

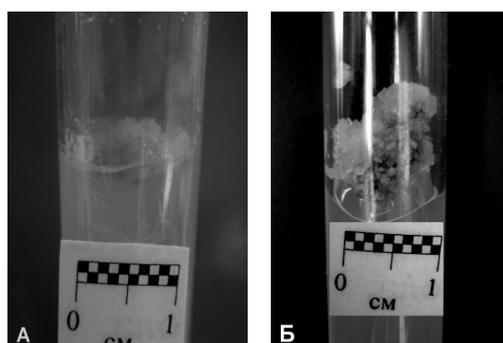


Рис. 1. Каллус *M. officinalis* а – первичный; б – пассированный

При цитоморфологическом исследовании полученных каллусных культур нами были выявлены следующие типы клеток:

- 1) паренхимного типа – различные по форме и размерам, более крупные, чем меристематические, с невысоким плазмменно-ядерным соотношением, со слабо окрашивающейся цитоплазмой и интенсивно или слабо окрашивающейся клеточной стенкой (рис. 2. а).
- 2) меристематического типа – сравнительно мелкие, изодиаметрической формы, с высоким ядерно-плазменным соотношением, интенсивно окрашенными цитоплазмой и ядром, за счет делений которых осуществляется рост каллусной культуры (рис. 2. б);

При проведении исследований также были выявлены очаги гистогенеза – трахеидоподобные элементы (рис 3.).

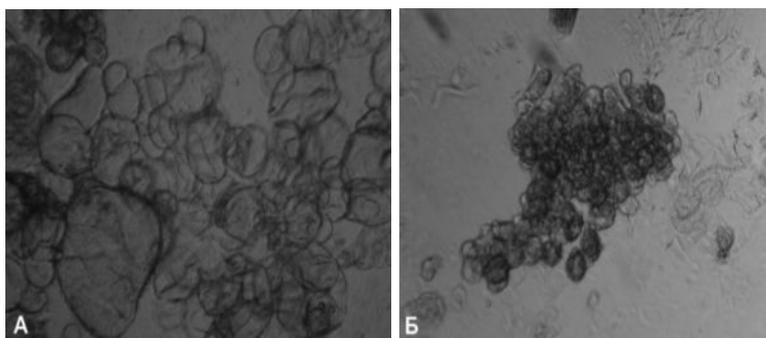


Рис. 2. Клетки каллуса *M. officinalis*: а – паренхимные, б – меристематические (ув. 10×12).



Рис 3. Трахеидоподобные элементы каллусной культуры *M. officinalis*(ув. 10×12)

Были идентифицированы следующие формы паренхимных клеток:

- а) округлые (рис. 4. а);
- б) вытянутого типа: «вытянутой» и «червеобразной» формы (рис. 4. б);
- в) гигантские (рис. 4. в).

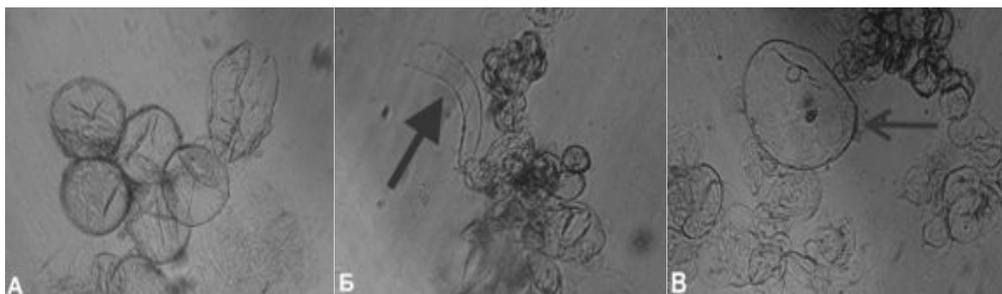


Рис. 4. Паренхимные клетки каллуса донника лекарственного: «округлые» (а), «червеобразные» (б), гигантские (в) (ув. 10×12).

Для описания физиологического состояния клеточной популяции в условиях *in vitro* нами было проведено исследование количественных соотношений различных групп клеток в составе клеточных популяций.

Было исследовано количественное соотношение различных типов клеток в одном поле зрения микроскопа у каллусов третьего пассажа, культивируемых на питательной среде без селена и на питательной среде с концентрацией селена 2 мг/л.

Полученные результаты (рис. 5.), свидетельствуют о том, что значительная часть каллуса, образование которого инициировано из семян на модифицированной среде МС, дополненной 0,5 мг/л 6-БАП, 2,0 мг/л 2,4Д, представлена округлыми клетками (80,4 %). Однако в данной каллусной культуре также присутствует определённое количество (16%) трахеидоподобных элементов. Количество клеток других типов было незначительным.

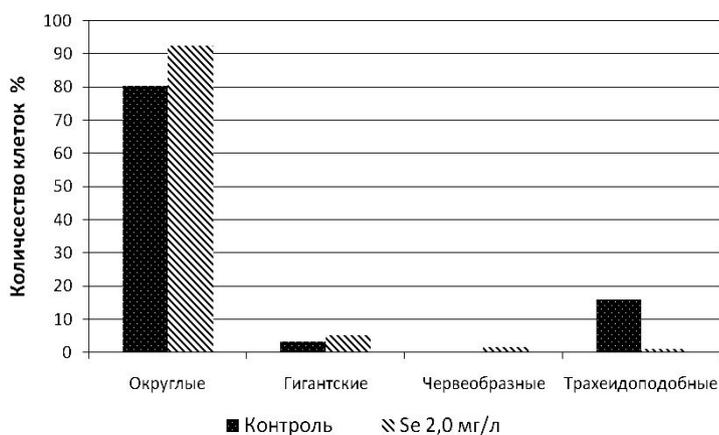


Рис. 5. Цитоморфологические параметры каллусных культур *M. officinalis*.

У каллусной культуры, выращенной на питательной среде того же состава, дополненной Se в концентрации 2,0 мг/л, цитоморфологическая картина схожая (рис 3.6.), однако, количество трахеидоподобных элементов значительно меньше, нежели у контрольного каллуса (1%), а количество округлых клеток возросло

(92,3%). Большое количество округлых клеток может говорить о способности каллуса к синтезу и накоплению вторичных метаболитов.

ВЫВОДЫ

1. Подобраны составы питательных сред для индукции каллусогенеза и получения каллусной культуры из эксплантов вегетативных и генеративных органов *Melilotus officinalis*.
2. Показано, что первичные и пассируемые каллусные культуры отличаются низким уровнем морфогенетического потенциала.
3. Показано, что основную массу клеток пассированных каллусных культур *M.officinalis* составляют паренхимные клетки округлого типа.

Список литературы

1. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р. Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
2. Запрометов М. Н. Вторичный метаболизм и его регуляция в культурах клеток и тканей растений / М. Н. Запрометов // Культура клеток растений: [сб. статей под. ред. Р. Г. Бутенко]. – М.: Наука, 1981. С 37 – 50.
3. Селен в депонирующих средах Нечерноземной зоны Европейской части России и агрохимический метод коррекции дефицита селена / Торшин С.П., Удельнова Т.М., Конова Н.И. [и др.] // Экология. - 1996. - № 4. - С. 253-258.
4. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. – К. : Наукова думка, 1980. – 488 с.
5. Культура клеток растений : [Сб. ст.] / АН СССР, Ин-т физиологии им. К. А. Тимирязева, Отв. ред. Р. Г. Бутенко. – М. : Наука, 1981. – 168 с.
6. Дженсен У. Ботаническая гистохимия: [пер. с англ. и предисл. Н.В. Цингер]. – М.: Мир, 1965. – 352 с.
7. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – М.: Колос, 1970. – 225 с.

Теплицкая Л.М. Отримання калусної культури буркуна лікарського (*Melilotus officinalis* (L.) Pall.) та її цитоморфологічні особливості. / Л.М. Теплицкая, І.М. Юркова, А.І. Сідякін, І.В. Жупанов // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2011. – Т. 24 (63), № 2. – С. 284-290.

Досліджені особливості індукції калусогенеза в культурі вегетативних і генеративних органів *Melilotus officinalis*. Підібрано модифікації поживних середовищ Мурасіге і Скуга для індукції калусогенеза. Проведено цитоморфологічний аналіз калусних культур, і показано їх низький морфогенетичний потенціал.

Ключові слова: *Melilotus officinalis*, калусна культура, цитоморфологічний аналіз.

Teplititskaya L. Receipt of callus cultures of *M. officinalis* and them cytomorphological features. / L. Teplititskaya, I. Yurkova, A. Sidiyakin, I. Zhupanov // Scientific Notes OF Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2011. – Vol. 24 (63), No 2. – P. 284-290.

The features of callus induction in the culture of vegetative and generative organs of *Melilotus officinalis* were investigate .Modifications of nutrient soil of Murashige and Skoog (MS) for callus induction were chosen. Cytomorphological analysis of transplanted callus cultures was carry out. Its morphogenetical potential low was exhibit.

Keywords: *Melilotus officinalis*, callus culture, cytomorphological analysis.

Поступила в редакцію 12.06.2011 г.