

# БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

---

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского

Серия «Биология, химия». Том 21 (60). 2008. № 1. С. 44-52.

УДК 633.822:581.143.6

## МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР МЯТЫ

Бугара И.А., Бугара А.М.

Исследованы морфология клеток и содержание ДНК в интерфазных ядрах каллусных культур мяты сорта Симферопольская 200, индуцированных в культуре *in vitro* молодых листьев. Установлено, что каллусные культуры характеризовались высоким уровнем гетерогенности по морфологии клеток и содержанию ДНК в интерфазных ядрах.

Ключевые слова: мята, каллусная культура, ДНК.

### ВВЕДЕНИЕ

Процессы каллусообразования и морфогенеза уже давно привлекают исследователей в области физиологии, биохимии, генетики и селекции растений. Количество публикаций, посвященных этим вопросам, быстро возрастает, расширяется спектр привлекаемых для исследования видов. Экспериментально созданная модель каллусообразования, с последующей индукцией морфогенеза *in vitro*, является удобным объектом для исследования закономерностей дедифференциации и вторичной дифференцировки, генетической изменчивости культивируемых клеток, механизмов реализации генетической информации при гисто- и морфогенезе [1 – 3].

В области теоретических и прикладных исследований каллусогенеза можно выделить несколько основных направлений. Отметим лишь два из них, которые в настоящее время разрабатываются и на видах рода *Mentha*. Первое – изучение биотрансформации и биосинтеза веществ вторичного метаболизма в каллусных (суспензионных) культурах в связи с перспективой их использования для получения некоторых ценных продуктов [4 – 5]. Второе – исследование генетической изменчивости клеток в каллусных культурах и механизмов регуляции морфогенеза с целью индукции соматональных вариантов и получения нового исходного материала для селекции [6 – 7].

Работы в данных направлениях должны базироваться на углубленном изучении морфологических, цитологических и цитогенетических особенностей каллусных культур. Несмотря на проводимые ранее исследования по получению каллусных культур различных генотипов мяты, мало внимания уделялось исследованию их цитологических особенностей. Это не позволяло достоверно оценить морфогенные потенции каллусных культур и уровень генетической изменчивости клеток. В этой связи целью настоящей работы являлось изучение некоторых морфологических и

цитохимических особенностей каллусных культур мяты, индуцированных из молодых листьев *in vitro*.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для проведения исследований служили растения мяты сорта Симферопольская 200 (*Mentha canadensis* К 59 (4n) x *M. aquatica* К 6). Молодые листья длиной 0,7 – 1,0 см изолировали с донорных растений, поверхностно обрабатывали препаратом брадофен в течение 5 минут и промывали в трех сменах автоклавированной дистиллированной воды. Экспланты помещали на поверхность модифицированной агаризованной питательной среды Мурасиге и Скуга [8], дополненной 0,5 мг/л кинетина, 0,5 мг/л БАП, 2,0 мг/л 2,4-Д. В качестве культуральных сосудов использовали химические пробирки 2x20 см, содержащие 10 мл питательной среды. Экспланты инкубировали в условиях термостатированного помещения при температуре 25-27°C, освещенности 2-3 тыс. люкс, 16-часовом фотопериоде и относительной влажности воздуха 60-70%.

Для морфологических и цитохимических исследований, каллусные культуры, находящиеся в стационарной фазе роста, фиксировали по Карнуа и готовили временные давленные препараты. Морфологию каллусных клеток исследовали под микроскопом МРІ-5 на препаратах окрашенных метиленовым синим [9]. Для цитохимического выявления ДНК в интерфазных ядрах каллусных клеток препараты окрашивали антибиотиком оливомицином [10]. Количество ДНК в ядрах каллусных клеток определяли на цитофлуориметре, состоящим из микроскопа ЛЮМАМ-И2 и фотометрической насадки ФМЭЛ-1. Объем выборки при цитохимических исследованиях составлял 50 ядер. Содержание ДНК в интерфазных ядрах выражали в условных единицах. В качестве эталона, принятого за 2С, служило содержание ДНК в ядрах эпидермальных клеток молодых листьев. Результаты цитохимических исследований обрабатывали статистически и представляли в виде гистограмм.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цитологические исследования показали, что каллусные культуры мяты состояли из гетерогенной клеточной популяции. В них обнаруживались клетки меристематического типа, различных размеров и формы, клетки паренхимного типа, элементы сосудистой системы, а также запасующие клетки. Клетки меристематического типа располагались, как правило, крупными скоплениями в местах расположения трахеид (рис. 1).

Для них были характерны изодиаметрическая форма крупные ядро и ядрышко, слабо вакуолизированная цитоплазма. Интерфазные ядра клеток меристематического типа отличались характерной хроматиновой структурой. В них достаточно четко обнаруживался периферический хроматин, а также участки конденсированного хроматина, не контактирующие с ядерной мембраной. Ядрышко занимало значительную часть объема ядра и было окружено светлой зоной кариоплазмы. Клетки меристематического типа незначительно варьировали по размерам, их диаметр составлял 30 – 40 мкм. Особо следует отметить присутствие в

кallусных культурах морфогенных участков, в которых обнаруживались эмбриоидоподобные структуры, находящиеся на различных стадиях развития. Эмбриоидоподобные структуры состояли обычно из 6-8 и до нескольких десятков клеток, располагаясь исключительно в местах локальных скоплений клеток меристематического типа.

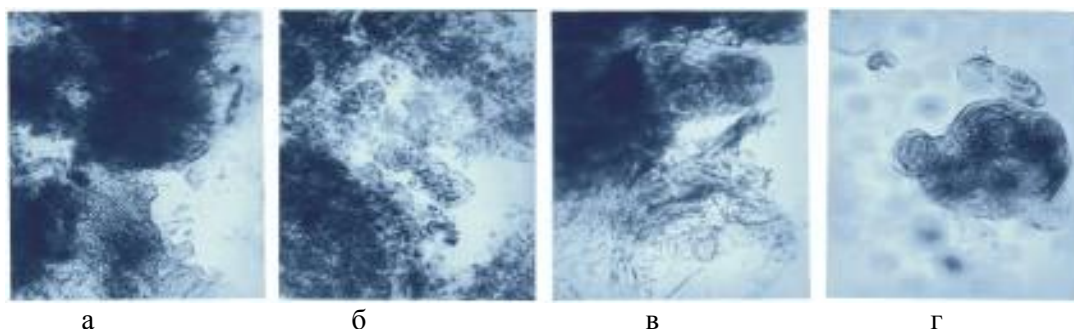


Рис. 1. Клетки меристематического типа кallусной культуры мяты сорта Симферопольская 200, индуцированной из эксплантов молодых листьев: а - локальное скопление клеток меристематического типа; б - морфология клеток меристематического типа; в, г - соматические эмбриониды на ранних стадиях развития.

В отличие от клеток меристематического типа, паренхимные клетки кallуса обнаруживали значительную вариабельность по форме и размерам (рис. 2).

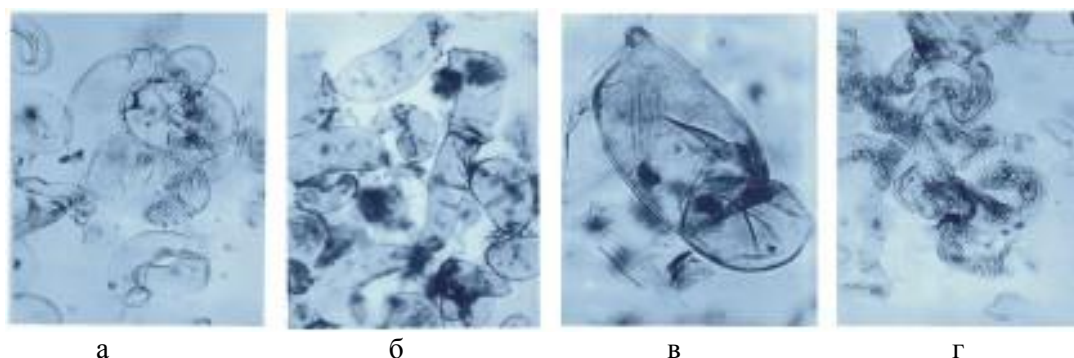


Рис. 2. Клетки паренхимного типа кallусной культуры мяты сорта Симферопольская 200, индуцированной из эксплантов молодых листьев: а, б - овальные и удлиненные клетки паренхимного типа; в - гигантская клетка паренхимного типа; г - запасающие клетки с крахмальными зернами.

Они имели округлую, овальную, удлиненную и сильно вытянутую форму. Клетки паренхимного типа по своим размерам значительно превосходили клетки меристематического типа. Предел их варьирования по длине составлял 70-420 мкм. При этом в количественном отношении в первичном и пассируемом кallусе преобладали клетки сильно удлиненной формы. Несмотря на разнообразие

паренхимных клеток по форме и размерам, они имели сходные морфологические признаки. Для них были характерны повышенная вакуолизация, а также небольшое количество цитоплазмы, расположенной пристенно и вокруг ядра.

Однако при общих морфологических признаках, характерных для клеток паренхимного типа, наблюдались некоторые отличительные особенности, проявляющиеся в морфологии интерфазных ядер. В большинстве клеток ядра имели типичную интерфазную организацию с характерным расположением глыбок хроматина и хорошо различимым ядрышком. Вместе с тем в некоторых клетках паренхимного типа обнаруживалась плотная упаковка ядерного хроматина. В данном случае детали хроматиновой структуры интерфазных ядер не просматривались, в результате чего они выглядели равномерно окрашенными гомогенными структурами. Ядрышко не выявлялось. Обычно такая структура ядерного материала была характерна для гигантских клеток паренхимного типа.

В отдельных типах клеток каллусных культур мяты обнаруживались зерна запасного крахмала. На основании данного факта мы относили этот тип клеток к запасным. Запасные клетки каллуса чаще имели сильно удлиненную форму и обычно располагались небольшими скоплениями.

С увеличением пассажа наблюдалось некоторое изменение морфологических характеристик каллусных культур. Так, в каллусных культурах III пассажа нами было отмечено уменьшение числа локальных скоплений клеток меристематического типа. Эмбриоидоподобные структуры практически не обнаруживались. Наблюдалась тенденция к стандартизации морфологических типов каллусных клеток. При этом каллусные культуры состояли преимущественно из клеток паренхимного типа различных размеров и формы, небольшие скопления клеток меристематического типа встречались относительно редко.

Таким образом, проведенные нами исследования выявили гетерогенность каллусных культур мяты по клеточному составу. Высокий уровень цитологической гетерогенности каллусных культур показан ранее для многих видов растений. При этом авторы также отмечали присутствие в каллусных культурах клеток меристематического и паренхимного типов, а также морфогенных участков каллуса, в которых наблюдалась дифференциация вегетативных почек или соматических эмбриоидов [11 – 12].

Наши исследования выявили наличие в каллусных культурах мяты эмбриоидоподобных структур, однако эти структуры в дальнейшем не развивались в растения, как на первичной питательной среде, так и при переносе каллусных культур на питательные среды для морфогенеза. Возможно, что установленный факт связан со специфическими блоками развития при соматическом эмбриогенезе. Существование таких блоков развития давно и хорошо известно и было в свое время проанализировано в ряде экспериментальных работ. Блок дальнейшего развития может проявляться как на самых ранних стадиях эмбриогенеза, так и на более поздних – глобулярной, стадии удлинения зародыша, латерального роста и в период индукции роста корней [13, 14]. Несмотря на то, что указанные авторы выдвигают различные причины, обуславливающие блокирование отдельных этапов соматического эмбриогенеза, большинство из них видят главную причину в

существовании генетических блоков развития. Более того, предполагается, что при соматическом эмбриогенезе возможно включение специфической генетической программы, обуславливающей гибель эмбриоидов на различных стадиях [15]. В этой связи можно предположить, что у мяты блокирование дальнейших этапов развития эмбриоидоподобных структур связано со сложной гибридной природой сорта Симферопольская 200, созданного на основе сочетания межвидовой гибридизации и экспериментальной полиплоидии. В таком случае для получения растений регенерантов из каллусных культур перспективным представляется использование в качестве исходного материала различных видов мяты, генотип которых не усложнён влиянием межвидовой гибридизации и полиплоидии. По крайней мере факты, свидетельствующие об отсутствии подобных блоков развития при соматическом эмбриогенезе у видов мяты и возможность получения у них растений регенерантов из каллусных культур [16] могут косвенно подтверждать такое предположение.

Для оценки уровня генетической изменчивости клеток каллусных культур мяты проводили количественные цитохимические исследования содержания ДНК в интерфазных ядрах. При проведении цитохимических исследований содержание ДНК определяли по интенсивности флуоресценции интерфазных ядер клеток меристематического и паренхимного типов (рис. 3).

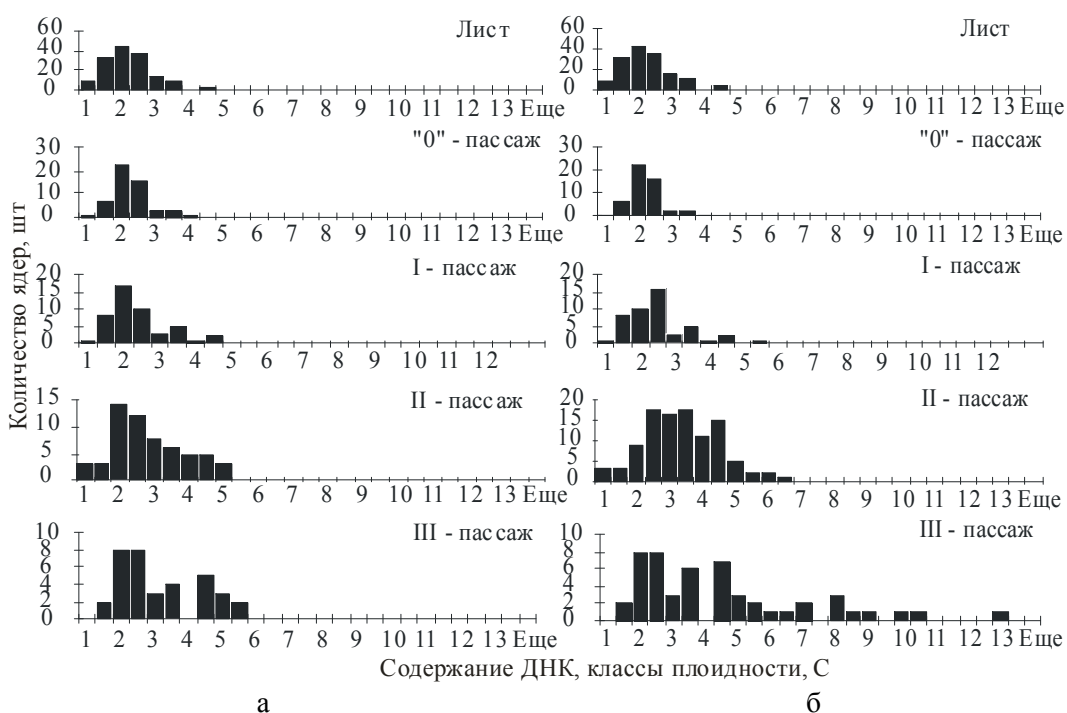


Рис. 3. Гистограммы распределения клеток эпидермиса листа, клеток меристематического (а) и паренхимного (б) типов каллусной культуры мяты сорта Симферопольская 200 по содержанию ДНК в интерфазных ядрах

Количественное определение содержания ДНК в интерфазных ядрах клеток меристематического типа в первичном каллусе ("0"-пассаж) позволило выявить закономерности, сходные с теми, которые были установлены для эпидермальных клеток молодых листьев. В данном случае основная часть популяции также состояла из клеток, содержащих в интерфазных ядрах 2С ДНК. Наряду с этим были выявлены клетки, находящиеся в S- и G<sub>2</sub>-периодах.

С увеличением пассажа наблюдалось некоторое повышение гетерогенности клеток меристематического типа по содержанию ДНК в интерфазных ядрах, при этом клетки с уровнем ДНК 2С – 4С преобладали.

Несколько иная закономерность обнаруживалась при цитохимическом анализе содержания ДНК в интерфазных ядрах клеток паренхимного типа. В данном случае сходство в гистограммах распределении клеток паренхимного типа по содержанию ДНК и клеток молодого листа наблюдалось только для первичного каллуса ("0"-пассаж). С увеличением пассажа обнаруживалась тенденция к повышению гетерогенности клеток паренхимного типа по содержанию ДНК и в III пассаже присутствовали клетки, имеющие в интерфазных ядрах количество ДНК 2С – 13С.

Таким образом, цитофлуориметрический анализ содержания ДНК в интерфазных ядрах клеток каллусных культур мяты сорта Симферопольская 200 выявил высокий уровень их гетерогенности по данному показателю. Однако эта высокая гетерогенность была свойственна в основном клеткам паренхимного типа. Клетки меристематического типа характеризовались значительно меньшим уровнем изменчивости по содержанию ДНК.

Факт высокой гетерогенности культивируемых каллусных клеток по числу хромосом хорошо известен и был в свое время детально проанализирован в целом ряде работ [17,18]. Анализ содержания ДНК в интерфазных ядрах клеток каллусных культур также выявил большое разнообразие значений С [19 – 21]. При этом указанные авторы, как правило, не отмечали высокой гетерогенности по содержанию ДНК в клетках экспланта, что подтверждается результатами наших исследований.

В настоящее время уже сложились определенные представления о механизмах, приводящих к генетической изменчивости клеток в каллусной культуре. В некоторых случаях этот процесс может быть уже заранее детерминирован типом экспланта, однако основная роль принадлежит условиям, складывающимся в процессе культивирования. При этом содержащиеся в питательной среде экзогенные фитогормоны могут индуцировать генетическую изменчивость *in vitro* [22,23]. Другая возможная причина образования в каллусной культуре клеток с высоким содержанием ДНК в ядре – действие эндогенных факторов регуляции. Несмотря на то, что это положение было сформулировано относительно давно, оно вполне удовлетворительно объясняет направленность количественных изменений ДНК в культивируемых клетках [24]. После исчерпывания пролиферативного потенциала в клетках может резко тормозиться, а затем и полностью прекращаться митотическая активность, наблюдаться "репликативное старение" культуры. В этой связи возрастание количества ДНК в культивируемых клетках является результатом постепенной утраты митотической активности, предваряющей ее полное

выключение. При этом клетки постепенно теряют способность к цитокинезу, а затем и кариокинезу, при сохранении способности к синтезу ДНК.

#### ВЫВОДЫ

1. Каллусные культуры мяты сорта Симферопольская 200 характеризуются гетерогенностью по клеточному составу. В них обнаружены клетки меристематического и паренхимного типов, а также запасающие клетки, клетки проводящей системы и эмбриоидоподобные структуры.
2. Цитохимические исследования показали присутствие в каллусных культурах мяты клеток, содержащих от 2С до 13С ДНК в интерфазных ядрах.

#### Список литературы

1. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
2. Моисеева Н. А. Молекулярные и клеточные механизмы морфогенеза в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука. – 1991. – С. 166 – 185.
3. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Биотехнология рослин: Підручник. – К.: ПоліграфКонсалтинг, 2003. – 520 с.
4. Носов А. М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиология растений. – 1999. – 46, № 6. – С. 837 – 844.
5. Носов А. М., Орешников А. В., Кондракаров О. Ф. Культуры клеток высших растений как продуценты вторичных метаболитов // 2 Съезд Биохим. о-ва РАН. - Москва. – 1997. – С. 94.
6. Бутенко Р. Г. Клеточные технологии в селекционном процессе / Состояние и развитие сельскохозяйственной биотехнологии. - Л.: 1986. – С. 29 – 38.
7. Шевелуха В. С. Проблемы и перспективы новой биотехнологии в селекции и растениеводстве / Состояние и развитие сельскохозяйственной биотехнологии. - Л.: 1986. – С. 12 – 18.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – 15, № 13. – P. 473 – 497.
9. Паушева Л. А. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980. – 304 с.
10. Бородина В. М., Сондоре О. Ю., Зеленин А. В. Использование антибиотика оливомицина для цитохимического изучения хроматина // Цитология. – 1979. – 21, № 9. – С. 103 – 104.
11. Yasuda H., Saton T., Masuda H. Rapid and frequent somatic embryogenesis from single cells of regenerated carrot plantlets // *Biosci., Biotechnol. and Biochem.* – 1998. – 62, N7. – P. 1273 – 1278.
12. Kruglova N. N., Abramov S. N., Kukso P. A. Cytological and histological investigation of wheat androgenic callus with ability to morphogenesis: Abstr. 11<sup>th</sup> Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology, Varna, 7-11 Sept, 1998 // *Bulg. S. Plant Physiol.* – 1998. – Spec. issue. – P. 38.
13. Wang Jiang-bo, Wang Yu-mei, Jia Jing-fen Индукция эмбрионного каллуса и образование соматических зародышей из эксплантов гипокотыля *Lathyrus maritimus* // *Xibei zhiwu xuebao = Acta Bot. Boreli-Occident. Sin.* – 2000. – 20, N3. – P. 325 – 375.
14. Xing G., Li S., Cui K., Wang Y. Mechanisms of plant somatic embryogenesis // *Progr. Nat. Sci.* – 2000. – 10, N9. – P. 641 – 649.
15. Yasuda H., Saton T., Masuda H. Rapid and frequent somatic embryogenesis from single cells of regenerated carrot plantlets // *Biosci., Biotechnol. and Biochem.* – 1998. – 62, N7. – P. 1273 – 1278.
16. Kukreja A. K., Dhawan O. P., Ahuja P. S., Sharma S., Mathur A. K. Genetic improvement of mints: On the qualitative traits of essential oil of in-vitro derived clones of Japanese mint (*Mentha piperascens* Holmes) // *J. Essent. oil Res.* – 1992. – 4, № 6. – С. 623 – 629.
17. Кунах В. А., Алхимова Е. Г., Войтик Л. И. Изменчивость числа хромосом в каллусных тканях и регенерантах гороха // Цитология и генетика. – 1984. – 18, №1. – С. 20 – 25.

18. Юркова Г. М., Левенко Б. А., Новожилов О. В. Уровень ploидности каллусной ткани пшеницы-однозернянки // Цитология и генетика. – 1985. – 19, №3. – С. 202 – 206.
19. Chriqui D., Bercetche J. Facteurs hormonaux et phénomènes amitotiques dans explants végétaux cultivés in vitro // Bull. Soc. Bot. Fr. Actual. Bot. – 1985. – 132, N3-4. – P. 152.
20. Долежел И., Новак Ф. И. Кариологические изменения в ходе дифференцировки клеток чеснока *Allium sativum* L. / Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986. – С. 20 – 25.
21. Cavallini A., Cremonini R., Lupi M. C., Bennici A. In vitro culture of *Bellevalia romana* L. Rchb. II. Cytological study of callus and regenerated plantlets // Protoplasma. – 1986. – 132, N1-2. – P. 58 – 63.
22. Кунах В. А. Генетическая изменчивость соматических клеток растений. 3. Каллусообразование in vitro // Биополимеры и клетка. – 1997. – 13, №15. – С. 362 – 371.
23. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. Изменчивость в процессе дедифференцировки и каллусообразования in vitro // Биополимеры и клетка. – 1998. – 14, №4. – С. 298 – 319.
24. Гаврилов Л. А., Гаврилова Н. С. Культура диплоидных клеток как объект изучения молекулярных механизмов старения // Успехи совр. биологии. – 1978. – 85. – С. 267 – 283.

Бугара І.О., Бугара О.М. Морфологічне та цитохімічне дослідження калусних культур м'яти // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2008. – Т. 21 (60). – № 1. – С. 44-52.

Досліджено морфологію клітин та вміст ДНК у інтерфазних ядрах калусних культур м'яти сорту Сімферопольська 200, індукованих у культурі in vitro молодого листя. Встановлено, що калусні культури характеризувались високим рівнем гетерогенності за морфологією клітин та вмістом ДНК в інтерфазних ядрах.

Ключові слова: м'ята, калусна культура, ДНК.

Bugara I.A., Bugara A.M. Morphological and cytological investigation callus culture of mint // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2008. – V.21 (60). – № 1. – P. 44-52.

The morphology of cells and content of DNA in interphasis nucleus of callus cultures of mint of a grade Simferopolskaya 200, induced in young leaves culture in vitro were investigated. It was shown, that callus cultures were characterized by a high level of heterogeneity on cells morphology and the content of DNA in interphasis nucleus.

Keywords: mint, callus culture, DNA.

Пост упила в редакцію 26.03.2008 г.