

## ЦИТО-ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛЛУСОГЕНЕЗА *IN VITRO* У *BRYOPHYLLUM DAIGREMONTIANUM*

©2013 А.В. Гильмаева<sup>1</sup>, С.Н. Абрамов<sup>1</sup>, В.Ю. Горбунова<sup>1</sup>,  
Г.А. Геращенко<sup>2</sup>, Н.А. Рожнова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, г. Уфа

<sup>2</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 15.0.2013

В данной работе приведены результаты цито-гистологического анализа развития каллусов *Bryophyllum daigremontianum*, полученных при культивировании *in vitro* листовых высечек.

**Ключевые слова:** *Bryophyllum daigremontianum*, каллусогенез, морфогенез, ИУК, БАП.

Для эффективного воспроизводства и рационального использования растительных ресурсов необходимо знание основных особенностей размножения растений. В основе механизмов различных способов размножения высших растений лежат явления дифференциации, дедифференциации и редифференциации клеток и изменение клеточных взаимодействий в составе целостного организма. Все эти явления связывают с функционированием меристематических (стволовых) клеток у растений [1, 2]. Из-за методических особенностей изучение процессов развития *in vivo* у *Bryophyllum daigremontianum* достаточно сложное и трудоемкое. Хорошей модельной системой являются культивируемые *in vitro* ткани и органы растений [3], в том числе и каллусы [4].

Цель работы состояла в подборе оптимального соотношения фитогормонов в составе питательной среды для индукции каллусогенеза *in vitro* у *B. daigremontianum* и цито-гистологическом анализе развития каллусов.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили каллусы *B. daigremontianum*. В качестве эксплантов использовали листовые высечки, содержащие propagулы. Высечки брали от листовых пластинок шириной 17-23 мм и длиной 40-47 мм [5].

Оптимальную концентрацию фитогормонов в питательной среде для индукции каллусогенеза определяли эмпирически. Было проанализировано 40 вариантов питательной среды Мурасиге-Скуга [6], различающихся по концентрации 6-бензиламинопурина (БАП) и индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). БАП использовали в концентрациях 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 и 1,5 мг/л. ИУК использовали в концентрациях 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0 и 2,5 мг/л. Постоянные препараты готовили по [7].

Гильмаева Алина Владиславовна, студент, e-mail: abramov-67@mail.ru; Абрамов Сергей Николаевич, к.б.н., доц., e-mail: abramov-67@mail.ru; Горбунова Валентина Юрьевна, д.б.н., проф., e-mail: obg-bspu@mail.ru; Геращенко Григорий Алексеевич, к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: aromixis@anrb.ru; Рожнова Наталья Анатольевна, к.б.н., научный сотрудник, e-mail: aromixis@anrb.ru

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы определяли оптимальное соотношение БАП и ИУК в питательной среде для индукции каллусогенеза. При этом показателем служила частота индукции каллусогенеза на различных вариантах питательной среды. Установлено, что максимальная частота индукции каллусогенеза (80-90%) отмечалась на питательной среде, содержащей 1,5 мг/л ИУК и 1,0-1,5 мг/л БАП.

Второй этап работы был посвящен цито-гистологическому анализу начальных этапов развития каллусов.

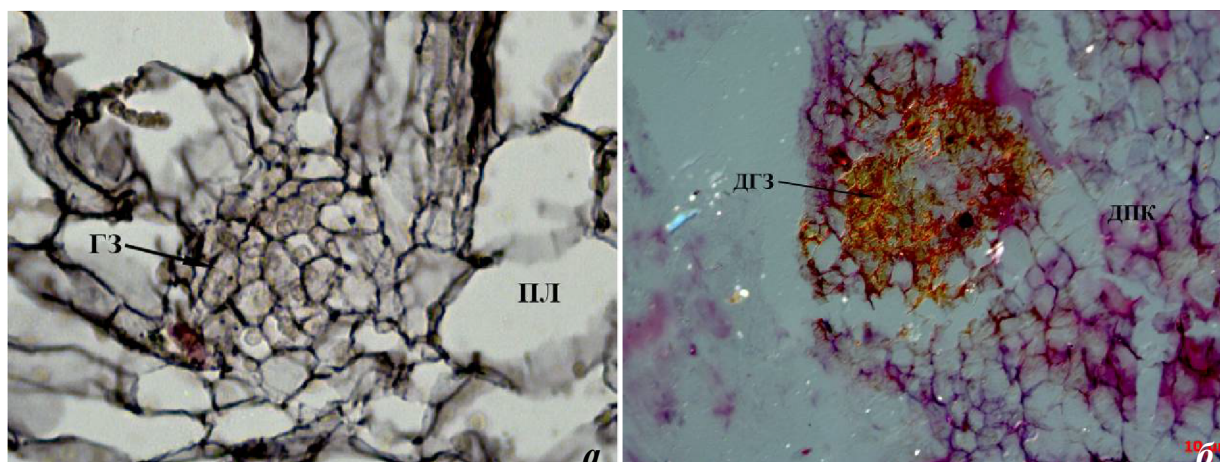
В качестве эксплантов использовали листовые высечки, содержащие propagулы в стадии глобулярного зародыша (рис. 1а). В течение первой недели культивирования эксплантов *in vitro* происходила дегенерация глобулярного зародыша и частично окружающих его тканей (рис. 1б). Возможно, это происходило вследствие избыточной концентрацией ауксинов в питательной среде, которые в больших концентрациях являются для клеток токсичными.

Появление каллусных клеток на поверхности эксплантов отмечалось на 12-14-е сут культивирования *in vitro*. Визуально каллусы представляли собой тонкий слой интенсивно делящихся недифференцированных клеток желтовато-зеленого цвета.

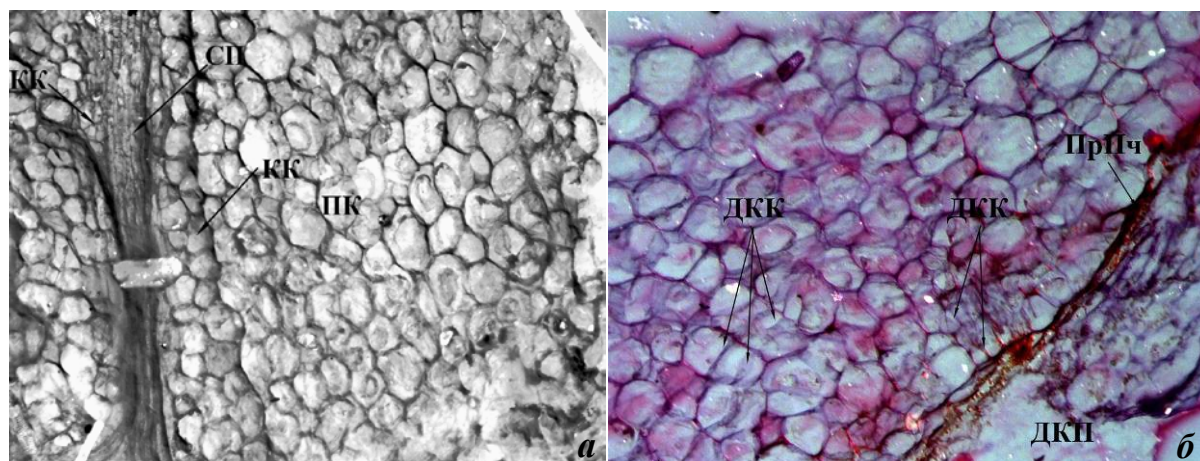
Цито-гистологический анализ показал, что каллус формируется вдоль сосудистых пучков листа и представлен мелкими интенсивно окрашенными клетками. В отличие от клеток формирующегося каллуса окружающие его клетки паренхимы листа гораздо крупнее и менее интенсивно окрашены, по видимому, за счет сильной вакуолизации (рис. 2а).

Формирование каллуса вдоль сосудистых пучков листа позволяет предположить, что каллусные клетки являются дериватами камбиальных клеток. Это объяснение кажется вполне логичным, так как после дегенерации соматического зародыша камбий представляет собой единственный источник меристематических клеток в культивируемом *in vitro* листовом экспланте.

В ходе дальнейшей пролиферации количество каллусных клеток увеличивается. В то же время клетки паренхимы листа дегенерируют (рис. 2б).



**Рис. 1.** Цито-гистологические особенности листовых эксплантов *Bryophyllum daigremontianum* в момент инокуляции на питательную среду для индукции каллусогенеза (а) и через 1 неделю культивирования *in vitro* (б). Световая микроскопия, постоянные препараты. Условные обозначения: ГЗ – глобулярный зародыш, ДГЗ – дегенерирующий глобулярный зародыш, ДПК – дегенерирующие паренхимные клетки, ПЛ – паренхима листа



**Рис. 2.** Цито-гистологические особенности начальных этапов формирования каллуса *B. daigremontianum*: а – 14-е сут культивирования *in vitro*; б – 17-е сут культивирования *in vitro*. Световая микроскопия, постоянные препараты. Условные обозначения: ДКК – делящиеся каллусные клетки, ДКП – дегенерирующие клетки паренхимы листа, КК – каллусные клетки, ПК – паренхимные клетки, ПрПч – проводящий пучок, СП – сосудистый пучок

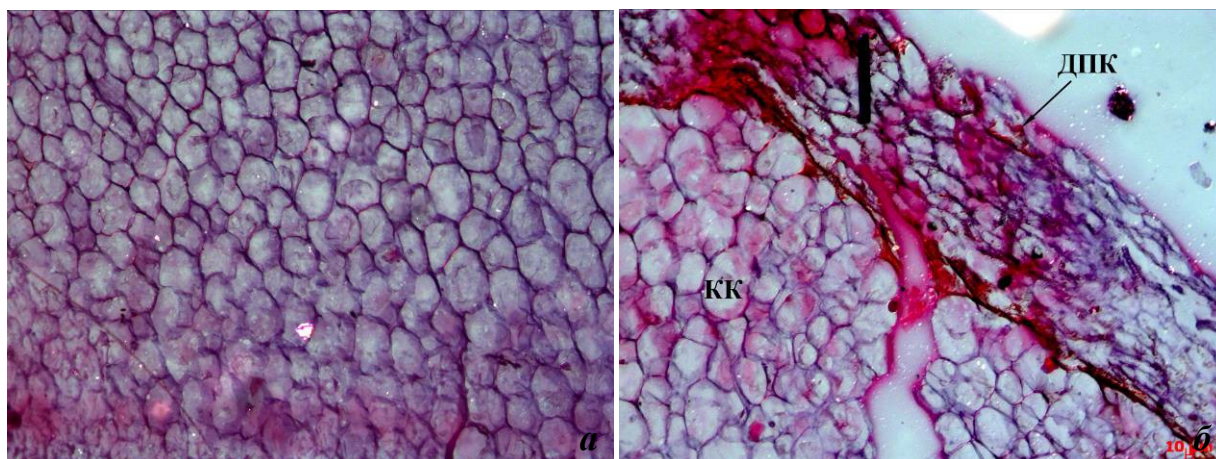
Сформированный каллус представлял собой компактную структуру. Культивируемые в темноте каллусы имели светло-желтую окраску, которая после переноса каллусов на свет изменялась на зеленую. Это свидетельствует о том, что в клетках каллусов имеются функционирующие хлоропласты, способные к фотосинтезу. Эти данные согласуются с результатами [8], которые сообщают о получении каллусов из листовых эксплантов *B. daigremontianum*.

Цито-гистологический анализ показал, что клетки сформированного каллуса имели относительно одинаковые формы и размеры (рис. 3а). Изодиаметрическая форма клеток, интенсивно окрашенная цитоплазма и плотное прилегание клеток к друг к другу характеризовали статус клеток каллуса как меристематически активных и о способности клеток каллусов к фотосинтезу.

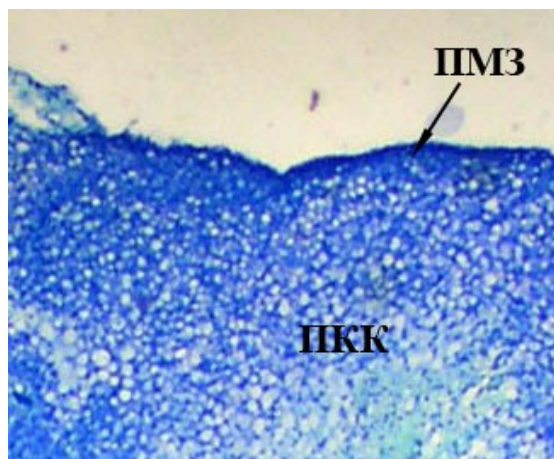
В ходе дальнейшего культивирования поверхно-

стные клетки каллуса подвергались деструкции и на поверхности каллуса образовывался гомогенный слой полисахаридной природы, интенсивно окрашивающийся при использовании гистохимической реакции Шифф-йодная кислота (рис. 3б). Известно, что такие изменения в структуре каллуса – начальный этап формирования в каллусе особой поверхностной меристематической зоны, с деятельностью клеток которой связывают процессы органогенеза и эмбриогенеза [9].

Цито-гистологический анализ показал, что такая зона обнаруживалась в каллусах на 35-е сут культивирования *in vitro* (рис. 4). Клетки поверхностной меристематической зоны имели более мелкие размеры и интенсивную окраску по сравнению с клетками каллуса, лежащими глубже, которые, в свою очередь увеличивались в размерах, вакуолизировались и приобретали характеристики парехимантозных клеток.



**Рис. 3.** Цито-гистологические особенности сформированного каллуса *V. daigremontianum*: *а* – поперечный срез компактного каллуса, 21-е сут культивирования *in vitro*; *б* – дегенерация поверхностных клеток каллуса, 28-е сут культивирования *in vitro*. Световая микроскопия, постоянные препараты. Условные обозначения: ДПК – дегенерирующие поверхностные клетки, КК – каллусные клетки



**Рис. 4.** Каллус со сформированной поверхностной меристематической зоной. Световая микроскопия, постоянные препараты. Условные обозначения: ПКК – паренхиматозные клетки каллуса, ПМЗ – поверхностная меристематическая зона

После пяти недель культивирования возникала необходимость переноса каллусов на среду для регенерации или субкультивирования. В процессе дальнейшего культивирования появились морфогенные структуры, сходные с эмбриоидами. Более подробный анализ проводится в настоящее время.

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что листовые экспланты *V. daigremontianum* способны к каллусогенезу в условиях *in vitro*.

Впервые был проведен цито-гистологический анализ развития каллусов *V. daigremontianum*. Установлено, что каллусы *V. daigremontianum* являются дериватами клеток камбия проводящих пучков листовых эксплантов. Цито-гистологический статус таких каллусов позволил охарактеризовать их как морфогенетически компетентные и способные к дальнейшему морфогенезу в условиях культуры *in vitro*. Это, в свою очередь, позволяет использовать каллусы в качестве модельной системы для изучения процессов развития и воспроизведения у *V. daigremontianum*.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 11-04-97039, № 13-04-01873 и № 13-04-01404).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батыгина Т.Б. Эмбриоидогения // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / [под ред. Т.Б. Батыгиной]. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 628–634.
2. Батыгина Т.Б. Воспроизведение, размножение и возобновление // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции / Под ред. Т.Б. Батыгиной. СПб.: Мир и семья, 2000. С. 35–39.
3. Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 6. С. 837–844.
4. Круглова Н.Н. Каллус как модель для изучения формирования структуры высшего растения // Известия Уфимского НЦ РАН. 2011. № 2. С. 32–35.
5. Абрамов, С.Н. Анализ дифференциации клеток при вивипарии у *Vryophyllum daigremontianum* (Berger) /

- С.Н. Абрамов, А.В. Бакирова, В.Ю. Горбунова, Г.А. Герашенков, Б.Н. Постригань // Материалы Международной научно-практической конференции «Роль классических университетов в формировании инновационной среды регионов». Уфа, 2009. С. 74.
6. *Murashige, T.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. N 3. P. 473-497.
7. *Паушева З.П.* Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1988. 170 с.
8. *Wilkins, M.B.* The occurrence of an endogenous circadian rhythm in a plant tissue culture / M.B. Wilkins, A.W. Holowinsky // *Plant Physiology.* 1965. V. 40. N 5. P. 907-909.
9. *Батыгина, Т.Б.* От микроспоры – к сорту / Т.Б. Батыгина, Н.Н. Круглова, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимирова. М.: Наука, 2010. 174 с.

## CYTO-HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CALLUSOGENESIS *IN VITRO* IN *BRYOPHYLLUM DAIGREMONTIANUM*

©2013 A.V. Gilmaeva<sup>1</sup>, S.N. Abramov<sup>1</sup>, V.Yu. Gorbunova<sup>1</sup>, G.A. Gerashchenkov<sup>2</sup>, N.A. Rozhnova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bashkir State Pedagogical University named after M. Akmullah, Ufa

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Sci. Center of RAS, Ufa

This paper discusses the cyto-histological analysis results of origin and development of calli, obtained by culturing *in vitro* of *Bryophyllum daigremontianum* leaf explants.

**Keywords:** *Bryophyllum daigremontianum*, callusogenesis, morphogenesis, IAA, BAP.

---

*Alina Gilmaeva*, student, e-mail: abramov-67@mail.ru; *Sergey Abramov*, Candidate of Biology, assistant professor, e-mail: abramov-67@mail.ru; *Valentina Gorbunova*, Doctor of Biology, professor, e-mail: obg-bspu@mail.ru; *Grigory Gerashchenkov*, Candidate of Biology, senior researcher, e-mail: apomixis@anrb.ru; *Natalia Rozhnova*, Candidate of Biology, researcher, e-mail: apomixis@anrb.ru