



Биол. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 581. 143

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ *NERIUM OLEANDER*

Н.А. ОВАНЕСЯН, М.К. МКРТУМЯН, А. Г. ЕСАЯН

*Ереванский государственный университет,
кафедра экологии и охраны природы*

Установлено, что митотический индекс полученной на модифицированной среде Мурасиге и Скуга (МС 24) каллусной культуры олеандра *Nerium oleander* в экспоненциальной фазе роста составляет 0,78 ‰. Цитогенетическим анализом установлено, что в стационарной фазе роста в каллусных тканях преобладают паренхимные клетки, что дает основание предполагать, что в этой фазе происходит формирование и накопление вторичных метаболитов.

Ստացվել է *Nerium oleander*-ի աճման կայուն ցուցանիշներով օժտված, կայուսային հյուսվածք: Ցույց է տրվել, որ փոփոխված MS 24 միջավայրի վրա կայուսային հյուսվածքի միտոտիկ ինդեքսը աճի էքսպոնենցիալ փուլում կազմում է 0,78 ‰: Բջջագենետիկական հետազոտությունները ցույց են տվել, որ աճման ստացիոնար փուլում հյուսվածքում գերակշռում են պարենխիմատիկ բջջաները, որը հնարավորություն է տալիս ենթադրել, որ աճման այս փուլում տեղի է ունենում երկրորդային մետաբոլիտների ձևավորում և կուտակում:

Stably growing callus culture of *Nerium oleander* possessing high growth characteristics was obtained. It was shown that mitotic index of callus culture of *N. oleander* on modified Murashige and Skoog (MS 24) medium in exponential growth phase is 0.78 ‰. Cytogenetic analysis was shown that in stationary growth phase the parenchyma cells were predominate, which is suggest that in this phase the secondary metabolites are formed and accumulated.

Олеандр – каллусная ткань – митотический индекс

Возрастающее антропогенное воздействие на окружающую среду приводит к сокращению численности многих видов лекарственных растений, а также загрязнению растительного сырья различными ксенобиотиками. В качестве дополнительного источника сырья при получении продуктов вторичного метаболизма, имеющих широкое применение в медицинской, пищевой и парфюмерной промышленности, могут служить клеточные культуры растений.

Олеандр *Nerium oleander* L. является природным источником нового противоопухолевого препарата “Anvirzel”, созданного на основе водных экстрактов, содержащих сердечный гликозид олеандрин, обладающего цитотоксической активностью [14]. Нами была изучена цитотоксическая и проапоптозная активность водных экстрактов ранее полученной нами каллусной культуры *N. oleander* [7].

Культура растительных клеток, имея ряд преимуществ над традиционным сырьем (отсутствие организменного контроля, независимость от климатических условий, возможность оптимизации и стандартизации процессов, гомогенность системы), служит удобной модельной системой для изучения структуры, биосинтеза и биологической активности целевых метаболитов.

Известно, что растительные культуры *in vitro* гетерогенны и состоят из неодинаковых во многих отношениях клеток. Однако все клетки растительного организма обладают потенциальной способностью к биосинтезу вторичных метаболитов, образующихся из продуктов первичного метаболизма [5]. Вследствие тотипотентности растительных клеток, изменение внешних условий может вызвать вторичную дифференциацию, в частности, превращение меристематических клеток в паренхиматические [1]. Характер содержимого паренхиматических клеток тесно связан с выполняемыми ими функциями – синтезом и накоплением различных запасных веществ. Преобладание в каллусной ткани клеток паренхимного типа способствует синтезу и формированию вторичных веществ [4]. Следовательно, весьма важно изучить цитоморфологические и цитогенетические характеристики изучаемых каллусных тканей.

Целью нашей работы было описание ростовой активности, а также цитогенетический анализ популяций клеток каллусной ткани олеандра для дальнейшей оценки ростового и биосинтетического потенциала.

Материал и методика. Для определения размеров, видов клеток и митотического индекса отбирали каллусную ткань олеандра в экспоненциальной и стационарной фазах роста. Каллусные ткани фиксировали согласно методике Карнуа в смеси этанол – ледяная уксусная кислота (3:1). Исследования клеток проводили методом фиксации с последующим окрашиванием клеток и тканей. Для приготовления давленных препаратов ткань предварительно мацерировали 1N раствором HCl в течение 2 ч и окрашивали ацетокармином. Каллусную культуру оставляли в растворе красителя на 12-16 ч. Окрашенные клетки каллуса переносили на чистое предметное стекло в каплю 45%-ной уксусной кислоты, помещали под покровное стекло, после чего проводили микроскопирование при увеличении $\times 400$ [2, 8, 12]. Исследование клеток проводили методом светлого поля, который наиболее часто используется в цитологии для изучения окрашенных препаратов. Измерение размера клеток проводили при помощи окуляр-микрометра, цену деления которого определяли с помощью объектив-микрометра [1, 13].

Результаты и обсуждение. Подсчет числа митотических клеток в каллусной культуре *N. oleander* показал, что в экспоненциальной фазе роста митотический индекс составляет 0,78 ‰.

При микроскопическом наблюдении было обнаружено, что на агаризованной среде при оптимальных условиях культивирования в

стационарной фазе роста культуры каллусная ткань состоит из клеток, имеющих неправильную сферически-полигональную форму (рис. 1). В большинстве клеток наблюдалась хорошо развитая система вакуолей, в которых, как известно, происходит синтез вторичных метаболитов [6,11]. У молодых клеток система вакуолей развита слабо, так что можно сказать, что появление и развитие вакуолей является показателем замедления роста клеток и старения каллусной ткани. Ядра, как правило, расположены близко к клеточным мембранам, часто трудно различимы. Эти клетки, размер которых составляет 15-30 мкм, по морфологическим признакам относятся к паренхимным.

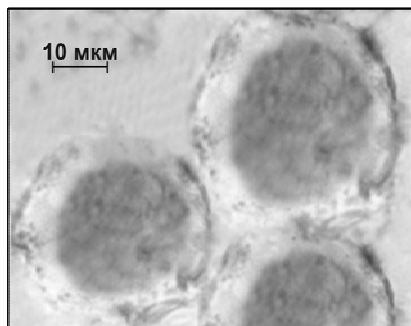


Рис 1. Паренхимные клетки в каллусной ткани *N. oleander*

При изучении давленных временных препаратов каллусной ткани олеандра были обнаружены также меристематические и трахеиподобные клетки (рис. 2, 3). Отмеченные морфологические типы клеток характерны для изолированных культур многих видов растений [9, 12]. Клетки меристематического типа преобладали в каллусной ткани *N. oleander*, находящейся в экспоненциальной фазе роста, и имели интенсивно окрашенные ядра, занимающие в клетке центральное положение. Согласно литературным данным, меристематические клетки являются активно делящимися [9].

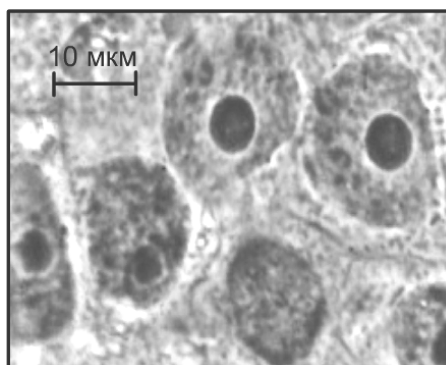


Рис 2. Клетки меристематического типа в каллусной ткани *N. oleander*

Трахеиподобные клеточные структуры, называемые также гидроцитами, являются водоносными элементами каллусных тканей. Стенки гидроцитов *N. oleander* имеют одревесневшие утолщения с окаймленными сетчатыми порами. Гидроциты имеют либо нормальные, либо дегенерирующие ядра (рис. 3).



Рис 3. Гидроциты каллусной ткани (увеличение $\times 400$) *N. oleander*

Появление гидроцитов зафиксировано уже через 48 ч после посадки эксплантов, что вполне согласуется с литературными данными [6].

Итак, в результате проведенных исследований была получена стабильно растущая каллусная культура *N. oleander*, обладающая довольно высокими ростовыми показателями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атабекова А.И., Устинов Е.И. Цитология растений. – М.: Колос., 1967.
2. Березнеговская Л.Н., Гусев И.Ф., Дмитрук С.Е., Смородин А.В., Смородин В.В., Трофимова Н.А., Пмыкова Н.А. Культура тканей алкалоидных растений. – Томск: Изд-во Томского университета, 1975.
3. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964.
4. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999.

Н.А. ОВАНЕСЯН и др.

5. Запрометов М.Н. Новые направления в физиологии растений. М.: Наука, – С. 143–162, 1985
6. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений /Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев: Наукова думка, 1980.

-
7. Ованесян Н.А., Мкртумян М.К., Гаспарян Г.Г. Биотехнология.5.07 – С. 66-71. 2007.
 8. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980.
 9. Фролова Л.В. Особенности популяций культивируемых клеток// Культура клеток растений.: Наука – С. 5-16, 1981.
 10. Холодова В.П. Рост и метаболизм углеводов в культуре тканей растений//Культура клеток растений – М.: Наука, 1982.
 11. Шевелуха В. С., Калашикова Е.А., Дегтярев С.В., Кочиева Е.З., Прокофьев М.И., Новиков М.И., Ковалев В.М., Калашиников Д.В., Сельскохозяйственная биотехнология. – М.: Высшая школа. 1998.
 12. Dixon, R., Gonzales. R. Plant cell culture. A practical approach. – USA: Oxford University Press, 1996.
 13. Doyle A. Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. Chichester. USA. JohnWiley&Sons, 1998.
 14. Duke, J.A. Handbook of Medicinal Herbs. Boca Raton.- FL: CRC Press,1985.
 15. Manna S. K., Sah N. K. Newman, R. A., Cisneros A. and Aggarwal B. B. J. of Cancer Research. 60, P. 3838-3847, 2000.

Поступила 04.06.2008