

# Пути морфогенеза и регенерации растений из органов цветка в условиях *in vitro* у некоторых представителей семейств *Asteraceae*, *Campanulaceae* и *Orchidaceae*

Назаров В.В., Жинкина Н.А. & Воронова О.Н.

Санкт-Петербург, ФБГУН Ботанический институт им. В.Л.Комарова РАН  
vvn22222@mail.ru

**Цель работы:** изучение в условиях культуры *in vitro* путей морфогенеза репродуктивных структур растений (на примере модельных объектов).

**Объекты исследования:** представители трех семейств цветковых растений, произрастающих на территории Ботанического сада БИН РАН: *Helianthus tuberosus* L. (*Asteraceae*), *Campanula bononiensis* L., *C. mirabilis* Albov (*Campanulaceae*) и *Cynorkis seychellarum* Aver., *Microterangis hariotiana* (Kraenzl.) Senghas (*Orchidaceae*). В качестве эксплантов использовались отдельные органы цветка - тычинки, завязь, лепестки и чашелистики, а так же интактные цветки разных стадий развития (Рис. 1 А, 3 А-В). Они выращивались на средах Мурасиге-Скуга и Фаста с добавлением БАП и НУК (Теплицкая, 2007; Пименова, Андропова, 2008).

Изученные виды обнаружили разную способность к каллусогенезу. Наиболее активно каллусообразование проходило у *Campanula* и *Helianthus*. После непродолжительного культивирования отдельных тычинок *Campanula bononiensis* наблюдались эндогенные утолщения в спорогенной части гнезд пыльника (Рис. 1 В). Спустя месяц стенка пыльника, под воздействием быстро делящихся клеток каллуса, разрывалась в местах утолщения (Рис. 1 С). При контакте с питательной средой этот каллус (**каллус первого типа**) образовывал рыхлые конгломераты из округлых крупных (до 130 - 230 мкм в диаметре) клеток (Рис. 1 D-E). Эти клетки имели тонкую прозрачную плазмолемму, крупную центральную вакуоль и хорошо заметное ядро (Рис. 1 F). Некоторые периферические клетки каллусного конгломерата после продолжительного культивирования в питательной среде удлинялись и образовывали короткие цепочки клеток. В этом случае клетки достигали 50 - 65 мкм в диаметре и 110 - 230 мкм в длину. У большинства этих цепочек наблюдалось очередное ветвление, в отдельных случаях дихотомическое (Рис. 1 G-H).

Цитологические исследования выявили, что первый тип каллуса образовывался из незрелых сильно вакуолизированных микроспор. Это было сходно с процессом получения андроклинового каллуса в условиях *in vitro* из незрелых микроспор у пшеницы в результате переключения морфогенеза с гаметофитной на спорофитную программу (Батыгина и др. 2010). Однако данный тип каллуса у *C. Bononiensis* имел несколько иной путь морфогенеза: деление вакуолизированной микроспоры начиналось после разрушения её оболочки, тогда как у пшеницы серии митотических делений стартовали внутри оболочки микроспоры, в результате чего и возникал морфогенный каллус (Батыгина и др. 2010). У *C. bononiensis* описываемый тип каллуса, напротив, был неморфогенного типа и не проявил даже способности к гистогенезу в ходе более чем 10 месячного культивирования *in vitro*.

Из камбиальных тканей тычиночных нитей, основания столбика, чашелистиков и цветоножки *Campanula bononiensis*, которые культивировались изолировано от других частей цветка, был получен **второй тип** каллуса. Этот каллус состоял из более мелких клеток с утолщенными стенками. В клетках присутствовали хлорофилльные и антоциановые пигменты (Рис. 2). Спустя месяц культивирования у каллуса второго типа обнаружилась отчетливую способность к гистогенезу. Клетки периферической части каллусных образований создавали более рыхлую ткань из относительно крупных паренхимных клеток, а в центральной зоне образовывались более мелкие клетки, из которых дифференцировались многочисленные элементы проводящей ткани. Схожие особенности обнаружены и у других цветковых растений (Теплицкая и др., 2010).

В ходе культивирования изолированных бутонов *Campanula mirabilis* наблюдалось их полное распускание и продолжительное цветение в культуре *in vitro* (в чашке Петри) (Рис. 3 А-Ж). При этом самоопыления не происходило, вероятно, потому, что и в природе *C. mirabilis* является строгим перекрестником. В конце цветения, на 18-20-й день с момента культивирования, в основании чашелистиков и верхней части завязи наблюдалось образование каллуса. Подобно каллусу первого типа у *C. bononiensis*, каллус у *C. mirabilis* также состоял из конгломерата крупных паренхимных клеток. Однако, его клетки имели непрозрачную клеточную оболочку (Рис. 3 H-J). После достижения этим каллусом определенной критической массы (5-7 мм в диаметре) на его периферических участках начинался активный геммогенез. В течение следующих 2-х недель на каждом конгломерате образовалось от 20 до 45 вегетативных побегов. Ризогенез наступал значительно позже - на 2-3-й месяц после образования каллуса (Рис. 3 K-O). Коэффициент размножения за 10 месяцев составил  $10^3$ .

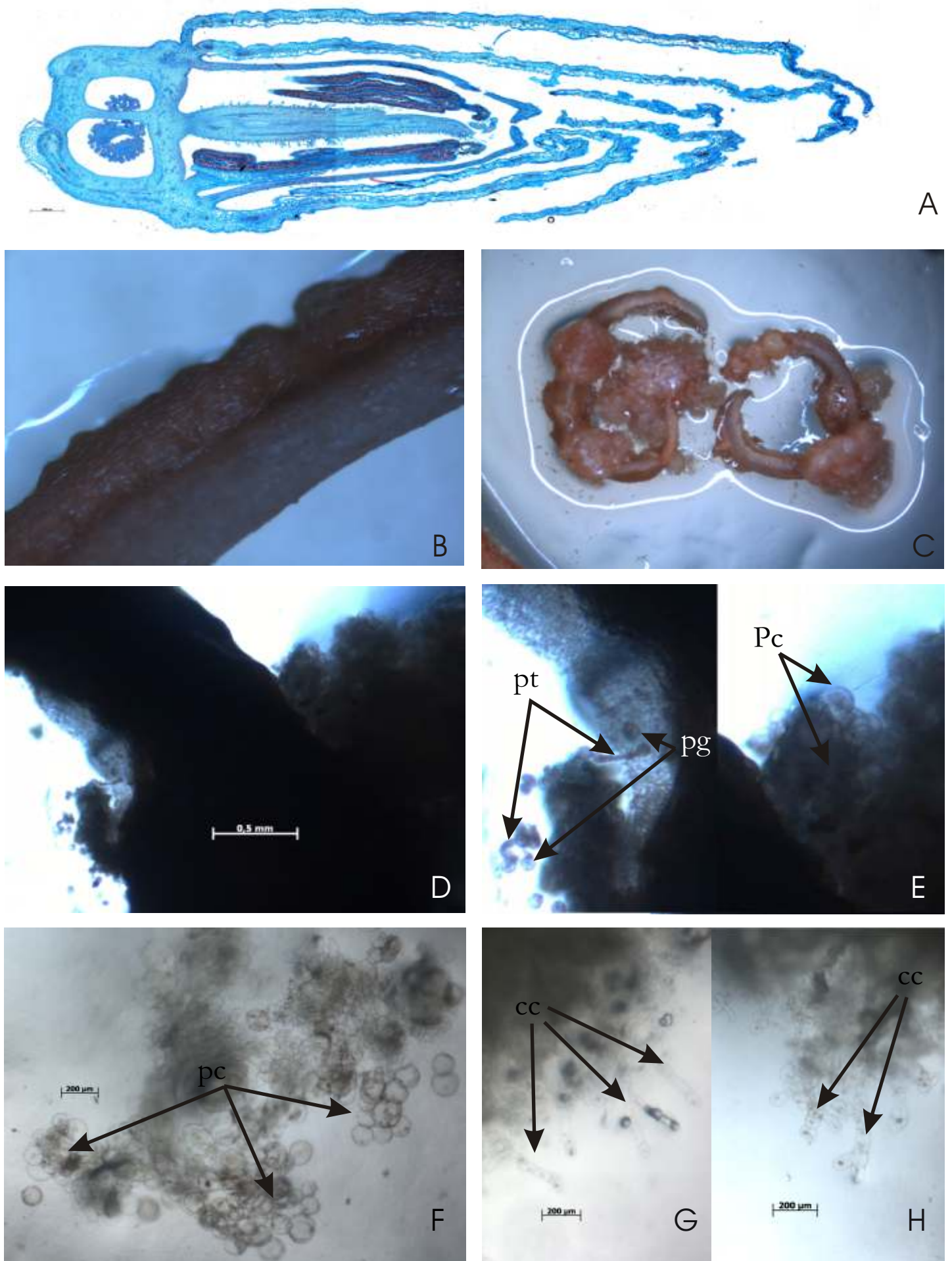


Рис. 1. Этапы инициации каллуса первого типа (микроспориальный) у *Campanula bononiensis* : **A** - Цветок на стадии бутонизации, высаженный на искусственную питательную среду; **B**- Фрагмент пыльника, культивируемого на среде (25 дней после посадки); **C-D** - Пыльники с каллусом (110 дней); **E** - Увеличенные фрагменты фотографии "D" с пыльцевыми трубками и клетками каллуса; **F** - Рыхлые конгломераты каллусных клеток (160 дней); **G-H** - Цепочки каллусных клеток (дихотомически разветвляющиеся и без ветвления) (160 дней); **cc** - цепочки клеток, **pt** - пыльцевые трубки, **pc** - пыльцевой каллус, **pg** - пыльцевые зёрна.

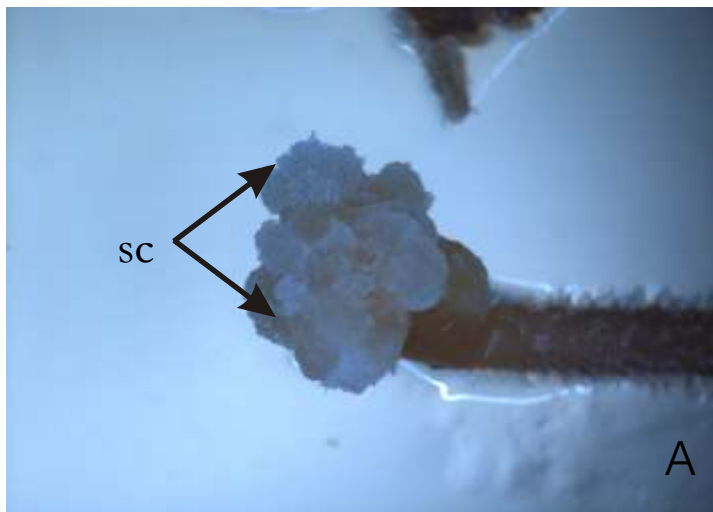


Рис. 2. **А-В** - Фрагмент основания столбика *Campanula bononiensis* на питательной среде с каллусом из соматических клеток (110 дней). **sc** - каллус из соматических клеток, **pt** - пыльцевые трубки.

При культивировании интактных цветков *Helianthus tuberosus* образование каллуса наблюдалось из микроспор, из тканей тычи-ночных нитей вблизи связника, из основания столбика в области нектарников, из чашелистиков и лепестков венчика (Рис. 4). Также как и у *C. bononiensis*, каллус первого типа из незрелых микроспор *H. tuberosus* образовывал конгломераты крупных паренхимных клеток с прозрачными стенками. В большинстве случаев они были окружены более мелкими быстро делящимися клетками каллуса второго типа, сформировавшегося из стенки пыльника (Рис. 5 D-E). Каллусы одного и того же типа у *H. tuberosus* и у *C. bononiensis* проявили идентичную способность к гистогенезу.

У изученных видов орхидных, несмотря на продолжительное культивирование, не удалось получить каллус из пыльников и лепестков околоцветника от распутившихся цветков и бутонов, находящихся непосредственно перед раскрытием. Наиболее вероятно, что это было обусловлено крайней протоадричностью цветков и глубокой специализацией элементов околоцветника орхидных. У *Cynorkis seychellarum*, например, пыльники раскрывались еще в бутонах и массы попадали на рыльце за неделю до распускания цветков. Известно, что для орхидных умеренной зоны стадия одноядерной микроспоры также является критичной для введения пыльников в культуру *in vitro*, но она наступает задолго до распускания цветка (Теплицкая и др., 2010). Еще одним фактором, препятствующим успешному культивированию пыльников, может выступать степень агрегированности пыльцы в поллиниях.

Интересно, что при культивировании интактных бутонов ложно клейстогамного вида - *C. seychellarum* (Рис. 6 А-D) и незрелых коробочек ксеногамного вида - *M. hariotiana* (Рис. 6 Е-F) наблюдалась вивипария - незрелые зародыши семян прорастали на створках

### Благодарности

Выражаем искреннюю благодарность сотрудникам отдела Ботанический сад БИН РАН: к.б.н. Ткаченко К.Г. и Цейтину Н.Г. за активную помощь и ценные советы при переводе растений из культуры *in vitro* *in situ*.

### Литература

- Батыгина Т. Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О. А. От микроспоры к сорту. М.: Наука, 2010. 174 С.
- Батыгина Т.Б., Титова Г.Е., Васильева В.Е. Репродукция растений: теоретические разработки и инновационные технологии // Инновации. 2007. № 20 (100). С. 39-46.
- Пименова А.А., Андропова Е.В. Коллекция живых растений рода *Cypripedium* и микрклональное размножение // Материалы II Всерос. науч.-практ. конф. "Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира" (1921 августа 2008). Волгоград, 2008. С. 123-127.
- Теплицкая Л.М., Назаров В.В., Астапенко Н.А., Соломыкина А.М. Изучение этапов формирования пыльников *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce. (Orchidaceae) в связи с введением в систему *in vitro* // Уч. Зап. Таврического нац. ун-та им. В. И. Вернадского, Серия «Биология, химия». Том 23 (62). 2010. № 2. С. 163-169.
- Теплицкая Л.М., Шейко Е.А., Лобко В.Н. Культура пыльников орхидных *in vitro* и ее морфогенетический потенциал // Уч. Зап. Таврического нац. ун-та им. В. И. Вернадского, Серия «Биология, химия». Том 20 (59). 2007. № 3. С. 79-86.



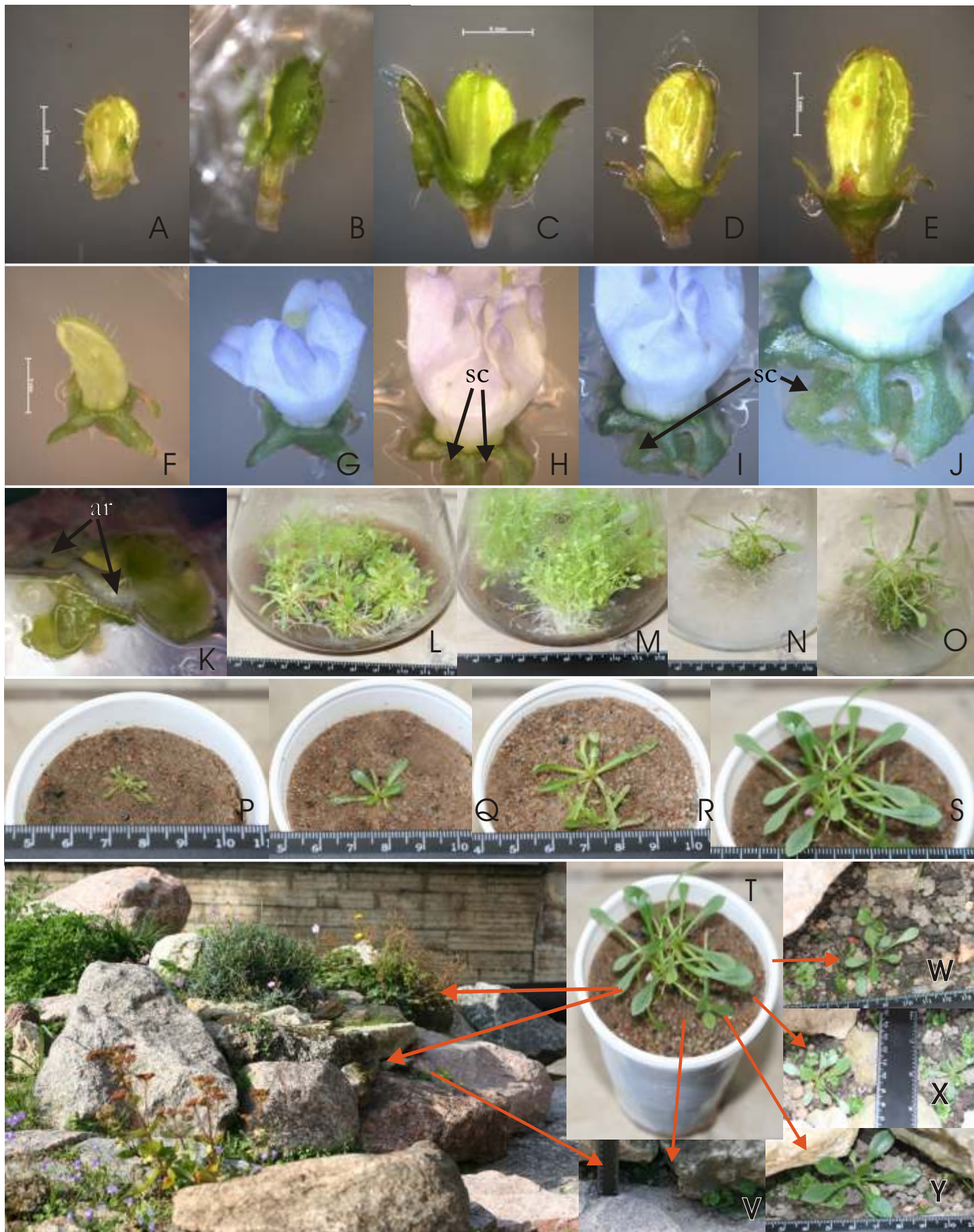


Рис. 3. Этапы инициации каллуса второго типа (соматического), гемморизогенеза и перевода растений из условий *in vitro* в условия *in situ* у *Campanula mirabilis*: **A-E** - Цветки в различной стадии бутонизации, высаженные на искусственную питательную среду (1-й день); **F-J** - Различные стадии культивирования отдельного цветка (**F** - бутонизация, 5 дней; **G-H** - цветение, 15-20 дней и **I-J** - отцветание, 25 дней после посадки); **K** - Начало ризогенеза (55 дней после посадки); **L-M** - Гемморизогенез после первой пересадки (65-80 дней после посадки); **N-O** - Гемморизогенез после второй пересадки (95-110 дней после посадки); **P-T** - Этапы культивирования саженцев в стерильном речном песке (**P** - 5 дней, **Q** - 15 дней, **R** - 25 дней и **S-T** - 45 дней после пересадки); **U** - Фрагмент "Альпийская горка" Ботанического сада БИН РАН, выбранный для перевода саженцев в условия *in vitro*; **V-Y** - Молодые растения после 30 дней культивирования на альпийской горке; **ar** - адвентивный корешок, **sc** - каллус из соматических клеток.



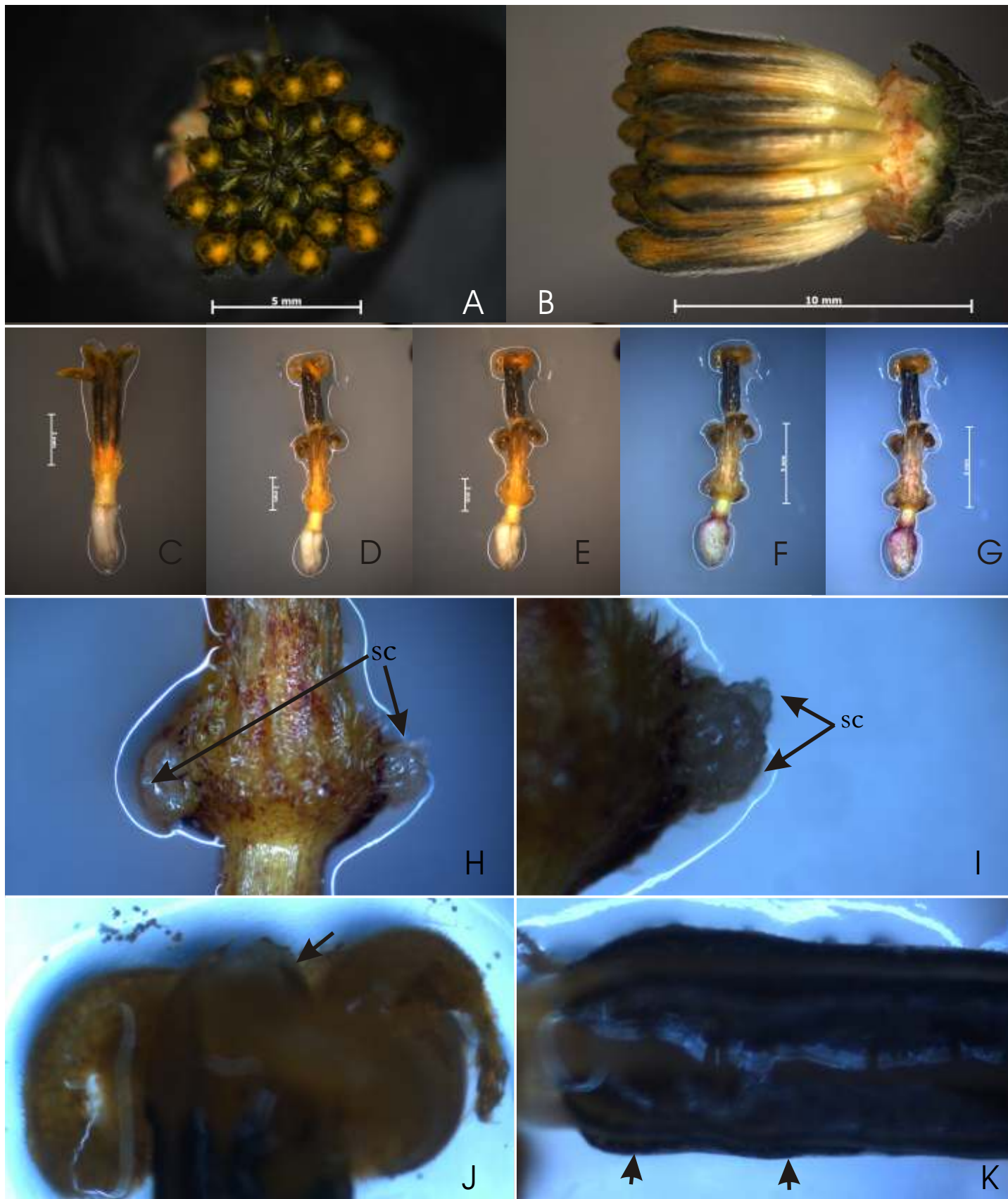


Рис. 4. Этапы инициации каллуса у *Helianthus tuberosus*: **A-B** - Вид корзинки спереди и сбоку, с которой были впоследствии взяты цветки в качестве эксплантов (часть цветков удалена); **C-G**- Стадии культивирования одного из цветков; **C** - 2-ой день, **D** - 5-ый день, **E** - 8-ой день, **F** - 14-ый день, **G** - 18-ый, **H-I** - Фрагмент основания чашечки цветка с каллусом из соматических клеток; **J** - Фрагмент рыльца культивируемого цветка с проросшими пыльцевыми зёрнами (18-ый день). **K** - Фрагмент пыльника с бугорчатыми утолщениями предположительно из-за каллуса внутри теки (18-ый день); **sc**-каллус из соматических клеток.

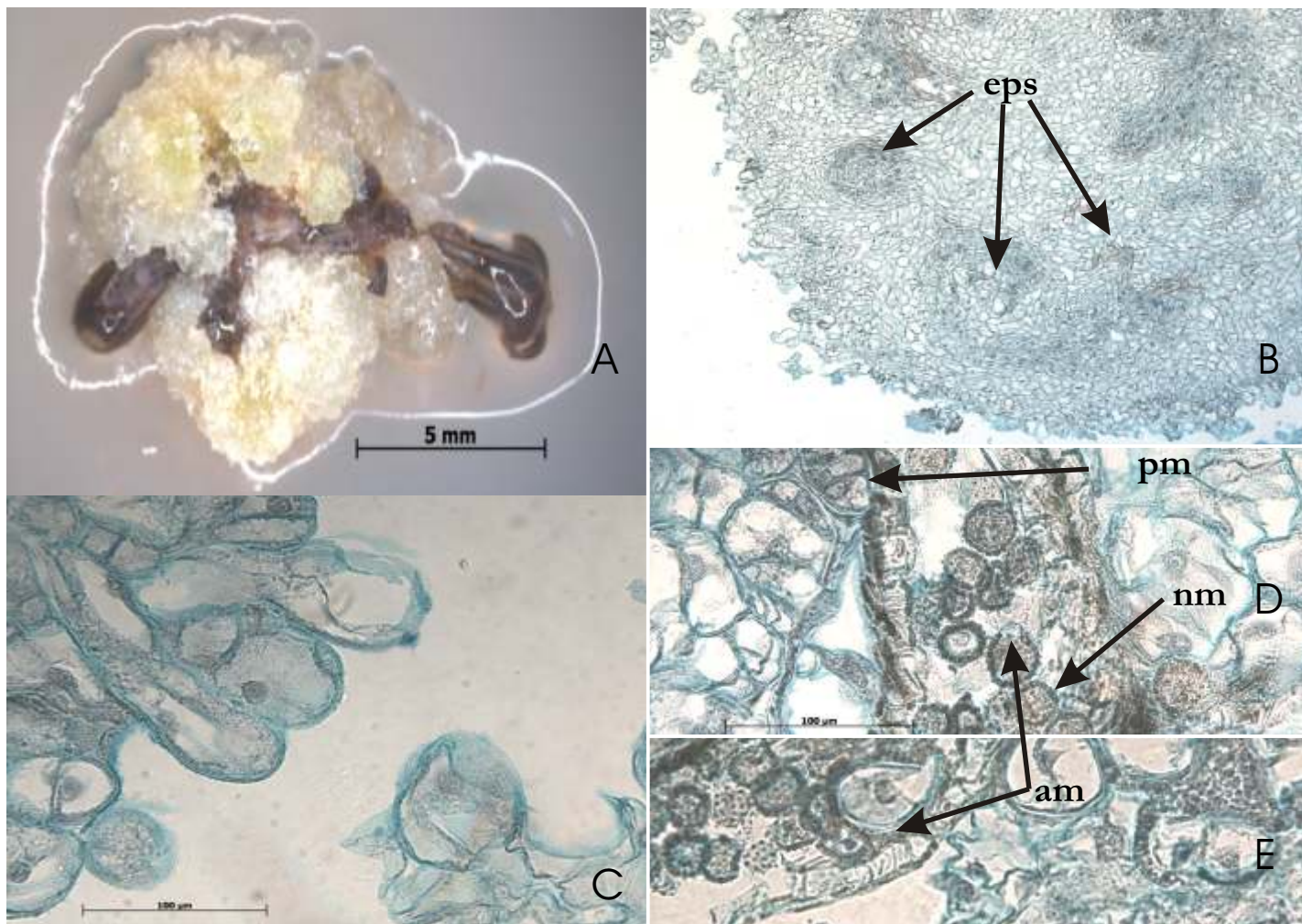


Рис. 5. Внешнее и внутреннее строение каллуса, полученного из цветка *Helianthus tuberosus* на 110-ый день культивирования: **A** - Вид сверху, **B-C** - Анатомический срез периферической части, **D-E** - Участки пыльника окруженные каллусом; **am** - микроспора сильно увеличенная в размерах и претерпевшая несколько клеточных делений внутри оболочки, **eps** - элементы проводящей системы, **nm** - микроспора не претерпевшая изменений.

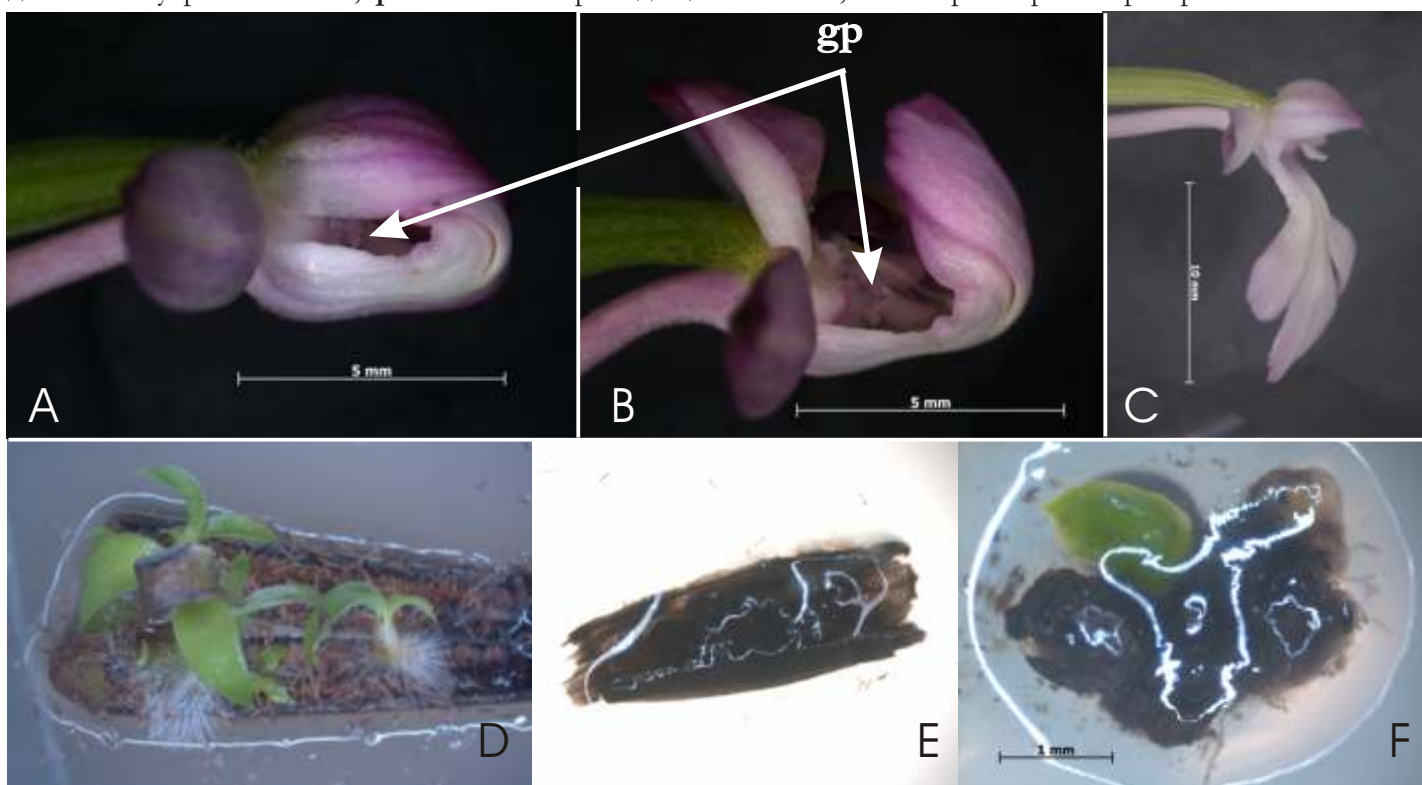


Рис. 6. Этапы инициации вивипарии у *Cynorkis seychellarum* и *Microterangis hariotiana*: **A-B** - Бутоны *C. seychellarum* с уже проросшей пылью на рыльце; **C** - Распустившийся цветок *C. seychellarum*; **D** - Отдельный плодолистик *C. seychellarum*, с вивипарными проростками, полученными в ходе культивирования завязи после ложно клейстогамного опыления (180 дней); **E** - Незрелая коробочка *M. hariotiana* после культивирования её в условиях *in vitro* (180 дней); **F** - Молодое растение *M. hariotiana*, выросшее из культивированной незрелой коробочки (230 дней); **gp** - проросшая пыльца (массулы) на рыльце.