

**Биология**

/ДК 582.892.833.11

**Р.Р. ВАРДАПЕТЯՆ, А.Б. КИРАКОСՅԱՆ, Գ.Ա. ԲԱՆՕՅԱՆ,  
Ր.Մ. ԱՐՄՈՆՅԱՆ, Կ.ՅՈ. ՄԱՐՏԻՐՕՏՅԱՆ**

**ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ МОРФОЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК  
СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК НЕКОТОРЫХ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ**

Исследована динамика размеров клеток, ядер и ядерно-плазменных отношений суспензионных культур клеток некоторых сортов пшеницы в первые две недели роста. С помощью анализатора изображений IBAS-2 показаны различие и сходство между исследованными параметрами клеточных культур сортов Безостая 1, Наири 40, Армянка 60 и Ахтамар. Обнаружено сходство в динамике изменений исследуемых параметров между сортами Безостая 1 и Наири 40, а также — Армянка 60 и Ахтамар. Выявлено, что ядерно-плазменные отношения отражают особенности роста, а падение величин исследованных параметров характеризует степень старения исследованных клеточных культур.

Для клеточных культур морфологическими характеристиками считаются размеры клеток и ядер, ядерно-плазменные отношения, митотическая активность, которые связаны с физиологическими и генетическими особенностями клетки [1].

Стабильность морфоцитологических характеристик можно считать косвенным показателем для сохранения других признаков, характерных для роста и метаболизма. Кроме этого, для суспензионных культур морфоцитологические особенности имеют также непосредственно прикладное значение.

Оптимизация условий для стандартного получения регенерантов в культуре тканей, клеток и изолированных протопластов большого числа двудольных и ряда однодольных растений в настоящее время не представляет значительных трудностей [2,3]. В то же время для таких важных зерновых злаков, как пшеница, кукуруза, рожь, овес и др., сообщения об удачных попытках получения растений-регенерантов из каллусных культур пока еще редки [4,5].

До сих пор не совсем ясно, чем определяется возможность получения культивируемой ткани пшеницы, сохраняющей морфогенетический потенциал, — генетическими особенностями исходного сорта, характером дифференцировки клеток эксплантатов или условиями выращивания каллусной ткани? Возможно, что существуют специфические сочетания всех трех факторов [6].

Целью настоящей работы являлось исследование ядерно-плазменных отношений во время роста у клеточных культур разных сортов пшеницы.

**Материал и методика.** Соматические эмбрионы получали из скутеллярного каллуса 4-дневных проростков семян пшеницы сортов Безостая 1, Наири 40, Армянка 60 и Ахтамар; все репродукции 1990 г.

Семена стерилизовали в течение 30 мин. в 96% этаноле, 2 раза промывали в стерильной воде. Добавляли 1% кальций-гипохлорид, инкубировали 30 мин. и повторно 3 раза промывали в стерильной воде. Полученные стерильные семена проращивали в стерильном термостате при 27°C 4 дня.

Обрезки из каждого эксплантата 0,4-1 г индивидуально инкубировали в 1 мл среды Ms [7], потом разрезали на 3-10 частей по 0,1 г и продолжали инкубировать в 100 мл колбах Эрленмейера в 5 мл среды Ms на качалке при 24°C под освещением 200 лк.

Для инициации клеточной суспензии использовали среду Ms, содержащую 1 г/л гидролизата казеина (MERCK, кислотно-гидролизированный, свободной от витаминов) 2 мг/л 2,4 Д (2,4-дихлорфеноксисукусная кислота, SIGMA), 250 мг/л мезо-инозитола (SIGMA), 1 мг/л тиамин (SIGMA) и 30 г/л сахарозы. Все растворы были отфильтрованы, стерилизованы и доведены до значения РН - 5,8 при добавлении 0,1 М КОН.

Образование клеточной суспензии протекает в три этапа.

I этап: 1-4 часа — начинаются разрушение каллуса, пролиферация наружной клеточной стенки и разделение нитей каллуса:

II этап: 4-24 часа — отделение отдельных клеток и клеточных кластеров, формирование гетерогенной клеточной суспензии.

III этап: 12-48 часов — постепенный переход сначала в гомогенную фазу, а в последующем в гомогенную культуру.

Через 48 часов на клеточную суспензию добавляли 30 мл свежей среды Ms. Через 7 дней проводили пересев клеточной культуры по 10 мл в новую питательную среду. При этом клеточная культура сохраняет способность к регенерации до 8 месяцев. Клеточную культуру отделяли от каллуса через 48 часов фильтрованием.

Морфогенетический контроль проводили проверкой способности культуры к повторной трансформации в проростки. Для этого на клеточную культуру в основной среде добавляли 2,5 мг/л 2,4 Д, 0,5 мг/л зеатина, 0,5 мг/л ГК<sub>3</sub> и 0,25 мг/л абсцизовой кислоты, далее переводили на среду, содержащую агар морских водорослей (0,8 г/л). Все среды стерилизовали. Культуру клеток инкубировали при 24°C 16 часов светового дня в течение 2-х недель до прорастания.

Для определения параметров клеточных культур на автоматизированной системе анализа изображений IBAS-2 (Opton, ФРГ) с использованием стандартного пакета программ клетки и ядра окрашивали ква-

своим кармином по методу Майера [8]. Для приготовления препаратов клетки фиксировали равным объемом смеси этанол-уксусная кислота (3:1) на предметном стекле, сушили и погружали на 15 мин. в раствор красителя. После инкубации препараты промывали в течение 2-3 мин. в стаканчике с дистиллированной водой. В результате получают частичная подкраска протоплазмы и практически чистая окраска ядер.

**Результаты и обсуждения.** На рис. 1 приведены изменения площадей и объемов ядер и клеток исследованных сортов пшеницы в первые 7 дней пассирования. Выбор первых 7-и дней пассирования обусловлен быстрым старением клеточных культур злаковых, что затрудняет выявление минорных различий в динамике роста разных сортов.

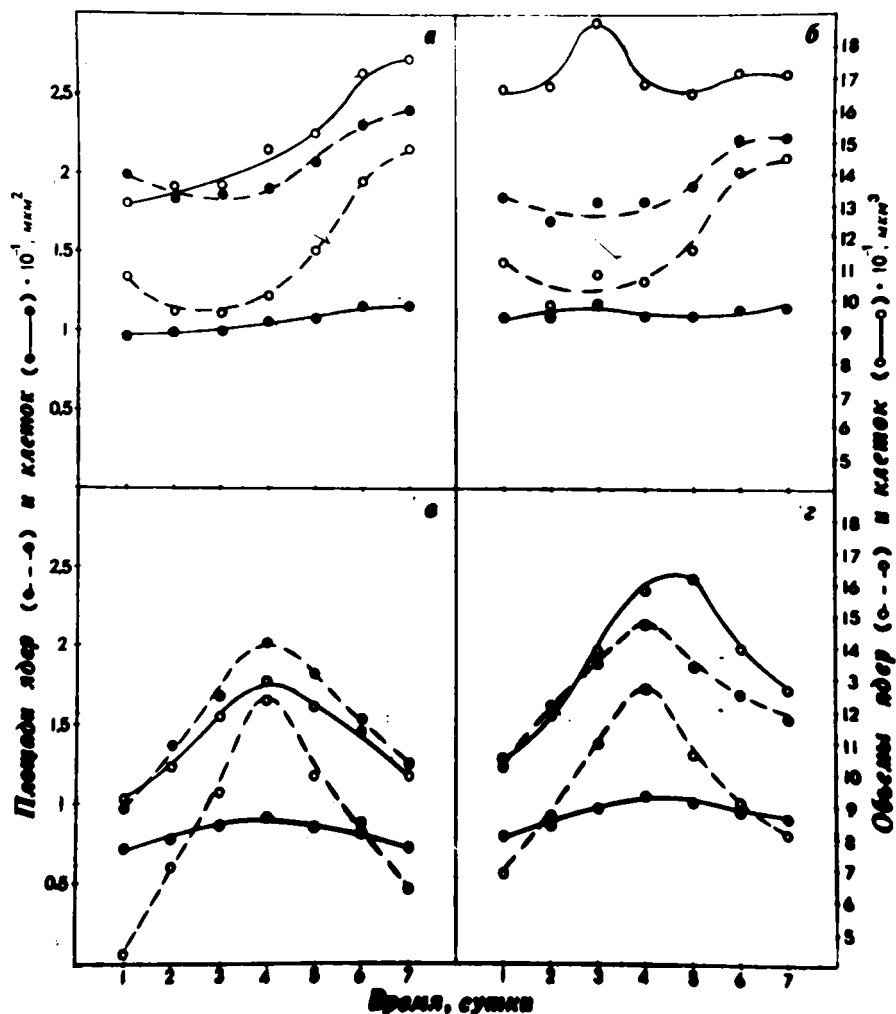


Рис. 1. Динамика изменений площадей и объемов ядер и клеток суспензионных культур клеток пшеницы сортов Безостая 1 (а), Наири 40(б), Армянка 60 (в) и Ахтамар (г).

Здесь же указаны изменения значений объема и площадей клеток и ядер суспензионных культур Безостая 1, Наири 40, Армянка 60 и Ахтамар. Как видно из рисунка, полученные результаты можно разделить на две группы. Пшеницы первой группы (Безостая 1 и Наири 40, рис. 1 а,б) характеризуются достаточно большим инкубационным периодом

с последующим ростом величин объемов и площадей, превышающих исходное значение. Это можно объяснить медленной адаптацией данных сортов при переходе от каллусной культуры к суспензионной. Несколько иная картина наблюдается для сортов Армянка 60 и Ахтамар (рис. 1 в,г). Для этих культур характерны наличие краткого адаптационного периода, достижение максимальных значений площадей и объемов на третий-пятый день пассирования с последующим падением вышеуказанных параметров до уровня контроля на 7-ой день.

Однако определение абсолютных величин площадей, объемов ядер и клеток нельзя считать достаточно четким показателем состояния суспензионных культур. В этом отношении общепринятым критерием являются ядерно-плазменные отношения. В связи с этим представлялось интересным исследование изменений ядерно-плазменных отношений различных сортов в те же периоды пассирования (рис. 2). Как видно из рисунка, динамику изменений ядерно-плазменных отношений также можно подразделить на две группы, существенно отличающиеся друг от друга.

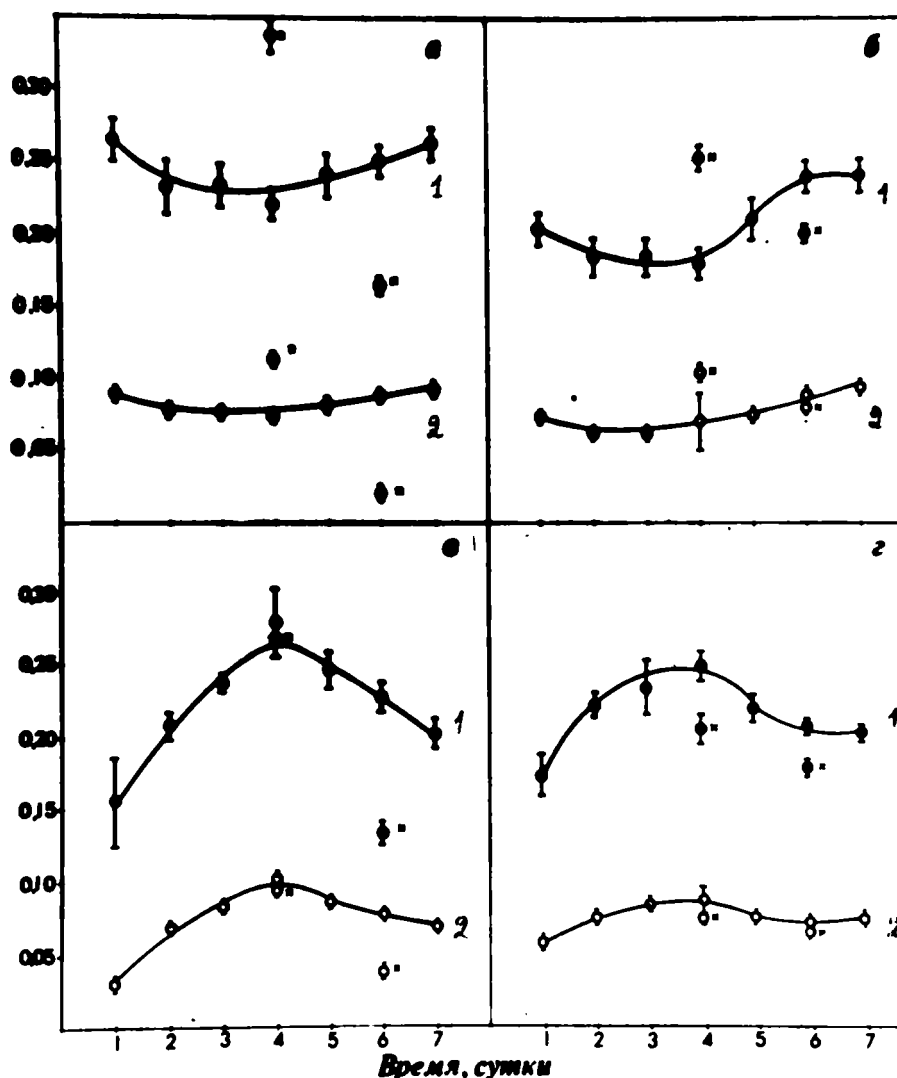


Рис.2. Динамика изменений ядерно-плазменных отношений площадей (1) и объемов (2) суспензионных культур клеток пшеницы сортов Безостая 1 (а), Наири 40 (б), Армянка 60 (в), Ахтамар (г).

\* — Отмечены данные после посева на 4-ый и 6-ой дни.

У первой группы (сорта Безостая 1 и Наири 40) на первом этапе роста (1-4 день) наблюдается значительное падение величин ядерно-плазменных отношений площадей и объемов (рис. 2 а,б). На втором этапе наблюдается значительное возрастание этих параметров и ядерно-плазменные отношения практически достигают своих исходных значений. Это можно объяснить тем, что у данных сортов на первом этапе происходит накопление биомассы отдельных клеток и только на втором этапе возрастает скорость деления клеток.

Иная картина наблюдается у сортов Армянка 60 и Ахтамар (рис. 2 в,г). Здесь на первом этапе (1-4 дня) наблюдается значительное возрастание ядерно-плазменных отношений. В дальнейшем эти отношения уменьшаются и опять практически достигают своих исходных величин. Из полученных результатов следует, что у данных сортов наблюдается относительное опережение роста ядерной массы, что косвенно указывает на увеличение процентного числа клеток, способных к митозу.

Дополнительный интерес представляет собой изменение ядерно-плазменных отношений клеточных культур после пересева. Из полученных результатов (рис. 2 а-г) следует, что после пересева у всех сортов наблюдается сходное изменение ядерно-плазменных отношений. Это объясняется адаптацией клеточных культур к пролиферативному росту.

Обобщая вышесказанное, можно отметить, что клеточная культура каждого сорта развивается с особой спецификой, которую необходимо учесть во время работы с клеточными культурами.

Изменение площадей и объемов ядер и клеток, ядерно-плазменных отношений свидетельствует, что основные морфологические особенности проявляются в первом пассаже и нивелируются при дальнейшей адаптации клеточных культур пшеницы.

Из вышеизложенного следует, что клеточная культура каждого сорта пшеницы развивается с особой спецификой особенно на первом этапе, которую необходимо учитывать при длительном пассировании или использовании в биореакторах.

*Кафедра биофизики, кафедра генетики*

*Поступила 4.05.1992*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Константинова Н.А. Морфоцитологическое исследование первичной и пассируемой суспензионной культуры клеток женьшеня. — Биотехнология, 1989, т. 5, № 4, с. 427.
2. Wareing P.F., Phillips C.D. The control of growth differentiation in plants. Oxford — N.Y.: Pergamon Press, 1978, p. 347.
3. Прохоров М.Н., Чернова А.К., Филин-Колдаков Б.В. Выращивание ткани пшеницы на культуре и восстановление целого растения. — Докл. АН СССР, 1974, т. 214, № 1-3, с. 472.
4. Lamora A.B., Scott K.J. Callus formation and plant regeneration from wheat leaves. — Plant. Sci. Letters, 1983, v. 29, N 2-3, p. 183.

5. Nabors M.W., Heysor J.W., Dykes T.A. et al. Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. — *Planta*, 1983, v. 157, N 5, p. 385.
6. Бутенко Р.Г., Джардемалиев Ж.К., Гаврилова Н.Ф. Каллусообразующая способность эксплантатов из разных органов различных сортов озимой пшеницы. — *Физиология растений*, 1986, т. 33, № 2, с. 350.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. — *Physiol. plantarum*. 1962, v. 15, f. 3, p. 473.
8. Кухтина Ж.М. Руководство к практическим занятиям по цитологии. М.: Просвещение: 1971.

Հ.Ռ. ՎԱՐՊԵՏՅԱՆ, Ա.Բ. ԿԻՐԱԿՈՍՅԱՆ, Գ.Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ,  
Ր.Մ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Կ.ՅՈՒ. ՄԱՐՏԻՐՈՍՅԱՆ

### ՅՈՐԵՆԻ ՈՐՈՇ ՍՈՐՏԵՐԻ ԲԶՋԱՅԻՆ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ՍՈՐՅՈՑԻՏՈՆՈԳԻԱԿԱՆ ԲՆՈՒԹՎԱԳԻՐԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԴԻՆԱՄԻԿԱՆ

#### Ամփոփում

Ուսումնասիրվել է ցորենի որոշ սորտերի սուսպենզիոն բջջային կուլտուրաների բջիջների և կորիզների չափերի, կորիզա-պլազմային հարաբերությունների դինամիկան աճի առաջին երկու շաբաթվա ընթացքում: IBAS-2 պատկերային անալիզատորի օգնությամբ ցույց են տրվել տարբերություններ և նմանություններ Բեզոստայա 1, Նաիրի 40, Արմյանկա 60 և Ախթամար սորտերի բջջային կուլտուրաների ուսումնասիրված պարամետրերի միջև: Հայտնաբերվել է նմանություն Բեզոստայա 1 և Նաիրի 40, ինչպես նաև Արմյանկա 60 և Ախթամար սորտերի ուսումնասիրված պարամետրերի փոփոխության դինամիկայում: Պարզվել է, որ կորիզա-պլազմային հարաբերությունները արտահայտում են աճի առանձնահատկությունները, իսկ ուսումնասիրված պարամետրերի մեծությունների անկումը բնութագրում է ուսումնասիրված բջջային կուլտուրաների ծերացման աստիճանը:

R.R. VARDAPETIAN, A.B. KIRAKOSIAN, G.H. PANOSIAN,  
R.M. HAROUTYUNIAN, K.YU. MARTIROSIAN

### CHANGE DYNAMICS OF MORPHOCYTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SUSPENSION CELL CULTURES OF SOME WHEAT SORTS

#### S: nmary

The dynamics of the size of cells, nuclei and nuclei-plasmatic relations of suspension cell cultures from some wheat sorts during the first two weeks of growth has been studiend. Analyzing the imprints of IBAS-2 the differences and similarities between investigated parameters of cell cultures from sorts Besostaya 1, Nairi 40, Armyanka 60 and Akhtamar have been investigated. Certain similarities in dynamics of changes of the investigated parameters between the sorts Besostaya 1 and Nairi.40 as well as Armyanka 60 and Akhtamar have been discovered. It has been revealed that nuclei-plasmatic relations show the peculiarities of growth and the decrease of values of the investigated parameters defines the ageing degree of the investigated cell cultures.