

Глава 4.

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 633.72:581.1.

**ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ
КЛЕТОК КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ЧАЙНОГО РАСТЕНИЯ
ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ СВЕТОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ**

Нечаева Т. Л., Воронков А. С., Загоскина Н. В.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук,
г. Москва, Россия, e-mail: Nechaevatyana.07@yandex.ru*

Проведено изучение изменений в морфометрических параметрах клеток гетеротрофных каллусных культур чайного растения (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) после их перенесения в условия светового воздействия (16-час. фото-период, освещённость 5 000 люкс). Как в контрольном, так и в опытном вариантах выявлена значительная гетерогенность каллусных клеток (по форме, размеру, степени вакуолизации). Уже на начальных этапах светового воздействия (1 или 7 дней) отмечалось уменьшение их размеров. Предполагается, что в этих условиях активируются процессы деления в *in vitro* культурах чая.

Ключевые слова: *Camellia sinensis*, каллусная культура, свет, морфология клеток.

Культуры клеток и тканей растений успешно используются в качестве модельных систем для теоретических и прикладных исследований [15]. В значительной степени это обусловлено их способностью к синтезу как первичных, так и вторичных метаболитов, характерных для исходных эксплантов и представляющих практический интерес [12]. Кроме того, в условиях *in vitro* можно строго контролировать влияние различных факторов внешней среды: температуру, влажность, состав питательных веществ, продолжительность и интенсивность освещения. Всё это позволяет изучать физиологические реакции клеток растений на внешние факторы в течение непродолжительного времени [1].

Одним из необходимых условий для роста и развития растений является свет, который служит для них регуляторным сигналом и источником энергии для фотосинтеза [8]. Большое внимание уделяется изучению влияния его спектрального состава на морфогенез, содержание и состав пигментов, скорость роста и деления клеток [10, 2, 7, 13]. Имеются данные и о таком важном периоде развития растений, как

процесс перехода от роста в темноте к росту на свету (деэтиоляция или фотоморфогенез) [14]. Для него характерны значительные изменения в морфологических и физиолого-биохимических характеристиках, а также формирование новых систем метаболизма [9]. Следует также отметить, что большинство этих исследований было выполнено на интактных растениях, тогда как для культивируемых *in vitro* клетках и тканей они редки.

Одним из объектов, которые успешно используются для изучения различных метаболических процессов, являются каллусные культуры чайного растения [3]. На их примере были изучены многие аспекты биосинтеза фенольных соединений и его регуляции, в том числе переход к фотомиксотрофному типу питания при формировании в клетках хлоропластов [6]. Однако это касалось длительного действия света, но не «затрагивало» начальных этапов данного процесса.

Целью исследования являлось сравнение морфометрических параметров клеток каллусных культур чайного растения, культивируемых в темноте и перенесённых в условия освещения (до 7 дней). Такой подход позволит изучить начальный эффект светового воздействия на морфофизиологические характеристики клеток высших растений.

Объект и методы исследования. Объектом исследования являлись гетеротрофные каллусные культуры, инициированные из стебля флешей чайного растения (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), грузинская разновидность) и выращиваемые в факторостатной камере ИФР РАН на питательной среде Хеллера, содержащей 2,4-Д (5 мг/л) и глюкозу (25 г/л), при 25 °С, 70%-ной влажности, в темноте [5]. Длительность пассажа – 45 дней.

Постановка опыта осуществлялась по следующей схеме: каллусы 20-дневного возраста (середина линейной фазы роста) либо оставляли в обычных темновых условиях выращивания (контроль), либо переносили в камеру с 16-часовым периодом освещения (до 7 дней, опыт). В качестве источника белого света использовали трубчатые люминесцентные лампы (Osram, Германия) диаметром 26 мм и мощностью 40 Вт. Освещённость составляла 5 000 люкс.

Для изучения морфометрических показателей клеток использовали срезы, полученные из средней части каллусов контрольного и опытных вариантов на микротоме с вибрирующим лезвием Termo Scientific Microm HM 650 V (Германия). Их просматривали на световом микроскопе AxioImager D1 Carl Zeiss (Германия) и фотографировали. Морфометрические параметры клеток рассчитывали в программе ZEN2012, а площадь клеток измеряли, используя инструмент "square". Полученные данные статистически обрабатывали с помощью программы Excel. В таблице представлены средние арифметические значения определений и их стандартные отклонения.

Результаты и обсуждение. Каллусные культуры чайного растения, растущие в темноте, представляли собой плотный каллус, светло-бежевого цвета с приростом молодых клеток более светлого оттенка. При их переносе на свет морфо-физиологические характеристики культур не изменялись, поскольку световое воздействие было достаточно кратковременным. Это согласуется и с полученными нами ранее данными о формировании в каллусах чая хлорофилл-содержащих клеток лишь после более длительного светового воздействия [4].

Важным аспектом наших исследований являлось сравнение морфометрических параметров каллусных культур контрольного (темновые условия) и опытных вариантов (световое воздействие до 7 дней). Согласно данным цитологических исследований, длительно выращиваемые в темновых условиях каллусы состояли в основном из клеток паренхимного типа, различающихся по форме и степени вакуолизации. Вторичная дифференциация в этой культуре была выражена слабо, о чём свидетельствовали лишь единично встречающиеся трахеидальные элементы (данные не представлены).

Определение размеров клеток показало, что их можно «разделить» на крупные и мелкие, которые почти в 15 раз отличались друг от друга (табл. 1). При этом в контрольном варианте по мере роста культуры их размеры увеличивались почти вдвое. Это свидетельствует об активации процессов растяжения и вакуолизации клеток, что характерно для процессов старения [11].

Таблица 1

Площадь (S) клеток каллусных культур чайного растения, выращиваемых в темноте (контроль) или в условиях 16-часового освещения (опыт)

Вариант	1 день		7 дней	
	S крупных клеток, мкм^2	S мелких клеток, мкм^2	S крупных клеток, мкм^2	S мелких клеток, мкм^2
Контроль	4 693 \pm 600	300 \pm 53	8 178 \pm 748	636 \pm 120
Опыт	2 338 \pm 450	457 \pm 88	2 778 \pm 530	173 \pm 40

Перенесение каллусов чая в условия освещения уже через 1 день приводило к морфологическим изменениям клеток. Это проявлялось в уменьшении площади «крупных» клеток на фоне увеличения площади мелких (на 50 и 25 % соответственно) по сравнению с контрольным вариантом. При более продолжительном световом воздействии (7 дней)

площадь крупных клеток незначительно увеличивалась, но была более чем в 2,5 раза меньше таковой в каллусе контрольного варианта этого же возраста. Что касается мелких клеток, то тенденция была противоположной: их размеры были в 2,5 раза меньше по сравнению с более ранним периодом и почти в 3 раза меньше, чем в контроле. Всё это свидетельствует об активации процессов деления клеток каллусных культур чая в условиях светового воздействия. Можно также отметить усиление их вторичной дифференциации, о чём свидетельствует увеличение числа трахеидальных элементов (данные не представлены).

Заключение. Всё вышеизложенное позволяет заключить, что уже на начальных этапах светового воздействия в каллусных культурах чайного растения происходят изменения в морфометрических показателях, формирующих их клетки. Это свидетельствует о начальных этапах преобразования клеточной системы растений в ответ на действие света.

Библиографический список

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с. – ISBN: 5-89240-059-X.
2. Гвоздева Е.С., Ефимова М.В., Карначук Р.А., Дорофеев В.Ю., Асташкина М.П. Роль света в морфогенезе клеточной культуры *in vitro* трансгенного табака с геном интерлейкина-18 человека // Вестник Томского государственного университета. – 2007. – № 300(2). – С. 116-118. – ISSN: 1561-7793.
3. Загоскина Н.В., Нечаева Т.Л., Николаева Т.Н., Лапшин П.В., Гончарук Е.А. Углеводы питательной среды и их влияние на рост и накопление фенольных соединений в каллусной культуре чайного растения (*Camellia sinensis* L.) // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. – 2016. – Т. 37. – № 25(246). – С. 45-55. – ISSN: 2075-4671.
4. Загоскина Н.В., Усик Т.У., Запрометов М.Н. Влияние длительности освещения на фенольный метаболизм фотомиксотрофных каллусных культур чайного растения // Физиология растений. – 1990. – Т. 37. – № 6. – С. 1089-1095. – ISSN: 0015-3303.
5. Загоскина Н.В., Федосеева В.Г., Фролова Л.В., Азаренкова Н.Д., Запрометов М.Н. Культура ткани чайного растения: дифференциация, уровень ploидности, образование фенольных соединений // Физиология растений. – 1994. – Т. 41. – № 5. – С. 762-767. – ISSN: 0015-3303.
6. Запрометов М.Н., Загоскина Н.В. Ещё об одном доказательстве участия хлоропластов в биосинтезе фенольных соединений // Физиология растений. – 1987. – Т. 34. – № 1. – С. 165-171. – ISSN: 0015-3303.
7. Карначук Р.А., Тищенко С.Ю., Головацкая И.Ф. Эндогенные фитогормоны и регуляция морфогенеза *Arabidopsis thaliana* синим светом // Физиология растений. – 2001. – Т. 48. – № 2. – С. 262-267. – ISSN: 0015-3303.
8. Лебедева Г.В., Беляева Н.Е., Дёмин О.В., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Кинетическая модель первичных процессов фотосинтеза в хлоропластах. Описание быстрой фазы индукции флуоресценции хлорофилла при различной интенсивности света // Биофизика. – 2002. – Т. 47. – № 6. – С. 1044-1058. – ISSN: 0006-3029.
9. Любарев А.Е., Курганов Б.И. Метаболизм протоклеток – переходная стадия от химической эволюции к клеточному метаболизму // Биохимия. – 1996. – Т. 61. – № 5. – С. 853-861. – ISSN: 0320-9725.

10. Маляровская В.И., Коломиец Т.М., Соколов Р.Н., Самарина Л.С. Влияние спектрального состава света на рост и развитие *Lilium caucasicum* в условиях культуры *in vitro* // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2013. – № 94. – С. 1016-1026. – eISSN: 1990-4665. [Электронный ресурс]. – URL: <http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/12.pdf>
11. Неуструева С.Н., Сиянова Н.С., Винтер В.Г., Кунин А.В., Жегалова И.В., Марданова Г.Н. Влияние биназы на динамику основных метаболических процессов в культуре ткани *Rauwolfia serpentina* Benth. // Учёные записки Казанского университета. Серия Естественные науки. – 2005. – Т. 147. – № 2. – С. 149-160. – ISSN: 2542-064X.
12. Юрин В.М., Дитченко Т.И., Молчан О.В., Шапчиц М.П., Ромашко С.Н., Булатова А.А., Логвина А.О. Культура растительных клеток и тканей: технология получения, разнообразие фармакологически активных метаболитов и приёмы регуляции их синтеза // Труды БГУ. Серия: физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2009. – Т. 4. – Ч. 2. – С. 168-182. [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.bio.bsu.by/proceedings/?act=11>
13. Correll M.J., Kiss J.Z. The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots // Plant and Cell Physiology. – 2005. – Т. 46. – № 2. – P. 317-323. – ISSN: 0032-0781.
14. Kravtsov A.K., Zubo Y.O., Kulaeva O.N., Kusnetsov V.V., Yamburenko M.V. Cytokinin and abscisic acid control plastid gene transcription during barley seedling de-etiolation // Plant Growth Regulation. – 2011. – Т. 64. – № 2. – P. 173-183. – ISSN: 0167-6903. – doi: 10.1007/s10725-010-9553-y
15. Shohael A.M., Ali M.B., Yu K.W., Hahn E.J., Islam R., Paek K.Y. Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor // Process Biochemistry. – 2006. – Т. 41. – № 5. – P. 1179-1185. – ISSN: 1359-5113. – doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.015

CHANGES OF MORPHOMETRIC PARAMETERS OF CALLUS CULTURE CELLS IN TEA PLANT WITH SHORT-TERM LIGHT EXPOSURE

Nechayeva T. L., Voronkov A. S., Zagoskina N. V.

*Federal State Budgetary Scientific Institution
Institute of Plants Physiology named after K. A. Timiryazev
of the Russian Science Academy,
c. Moscow, Russia, e-mail: Nechaevatyana.07@yandex.ru*

The changes in the morphometric parameters of the heterotrophic callus cultures cells (in the tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) after their transfer to the light exposure conditions (16-hour photoperiod, illumination of 5 000 lux) were studied. Both in the control and in the experimental variants, a significant heterogeneity of the callus cells was revealed (in shape, size, degree of vacuolization). Already at the initial stages of light exposure (1 or 7 days), there was a decrease in their size. It is assumed that under these conditions the fission processes in *in vitro* tea cultures are activated.

Key words: *Camellia sinensis*, callus culture, light, cell morphology.