

УДК: 576.3

Рахимова Е.В., Нургазина А.С., Амирова А.К., Бишимбаева Н.К.

РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, Алматы

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК РЫХЛОГО ЭМБРИОГЕННОГО КАЛЛУСА ПШЕНИЦЫ

Аннотация

Проведено электронно-микроскопическое исследование рыхлых эмбрионных каллусов пшеницы, культивируемых на среде с 0,1 мг/л АБК. Выявлены особенности ультраструктуры клеток с различным типом цитодифференцировки: молодые клетки; более взрослые клетки, характеризующиеся разной степенью вакуолизации и пристеночной локализацией цитоплазмы: слабо вакуолизированные, плазмолизированные клетки.

Ключевые слова: электронная микроскопия, эмбрионный каллус, злаковые.

Введение

Одной из важных проблем, связанной с культивированием клеток и тканей злаков, является быстрая потеря ими способности к соматическому эмбриогенезу при длительном культивировании, что существенно ограничивает разработку таких важнейших биотехнологических методов улучшения растений как клеточная селекция, клеточная и генетическая инженерия [1,2,3,4].

В результате цитофизиологических исследований нами предложена схема цитоморфоза [5], согласно которой три типа клеток - морфогенетически пластичные клетки подобные ствольным, эмбрионно компетентные и клетки с признаками ПКС, составляют основные звенья в процессе индукции и длительного поддержания тотипотентности в культуре соматических клеток. Однако, несмотря на то, что методами световой микроскопии были описаны признаки морфогенетически пластичных клеток глобулярных каллусов и эмбрионных компетентных клеток рыхлые эмбрионных каллусов (РЭ) [6], неясными остаются их ультраструктурные характеристики.

Несмотря на то, что нами подробно изучена ультраструктура клеток с признаками ПКС, нами описаны только те из них, которые появляются в ЭК в присутствии высоких концентраций 2,4-Д и ПКС по типу псевдоплазмолиза [7], что сопровождается абортацией эмбриоидов. В то же время методами световой микроскопии обнаружено преобладание клеток с признаками ПКС и на среде с АБК [8].

Наиболее выраженная картина регуляции процессов цитодифференцировки ранее была представлена на полутонких срезах каллусов пшеницы, культивируемых на среде с 0,1 мг/л АБК [9]. В связи с этим для электронно-микроскопического исследования были отобраны РЭ ткани пшеницы, культивируемых на среде с 0,1 мг/л АБК.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были отобраны длительно культивируемые рыхлые эмбрионные (РЭ) каллусы пшеницы культивируемые в течение 20 суток на среде Гамборга В5 [10], дополненные абсцизовой кислотой (АБК) в концентрации 1 мг/л. Каллусы культивировали при температуре $26^{0}\pm 2^{0}\text{C}$, продолжительность светового периода составляла 16 ч.

Для фиксации использовали 2% глютаральдегид (2,5 ч) и 1% тетроксид осмия (2 ч) на какодилатном буфере (рН 7,4). Далее объекты отмывали от фиксаторов, окрашивали алциановым синим, затем каллусы обезвоживали в этаноле и заключали в смесь эпон-

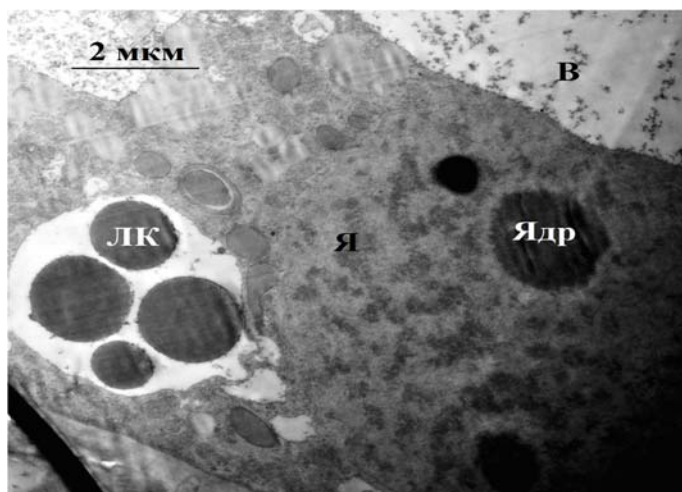
аралдит. Ультратонкие срезы толщиной 60-100 нм получали с помощью ультратома Ultracut (Reichert-Jung), контрастировали уранилацетатом, изучали и фотографировали с помощью электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss).

Результаты и их обсуждение

В результате ультраструктурного анализа РЭ каллусов пшеницы получили следующие результаты (блок 282, 0,1 мг/л АБК, окрашивание алциановым синим).

Меристематические клетки РЭ каллуса пшеницы характеризуются слабой и средней степенью вакуолизации. Для первых из них характерно образование мелких немногочисленных вакуолей, для второй – нескольких (часто двух) более крупных вакуолей. Как мелкие, так и крупные вакуоли редко выглядят пустыми или прозрачными. Обычно в них можно увидеть хлопьевидный осадок разной степени плотности и крупные глобулы, по плотности идентичные липидным каплям.

Ядра довольно крупные, размером 5 x 6 мкм, располагаются приблизительно в центре клетки или смещены к периферии, хромонемного типа, с 1-2 ядрышками (рисунок 1).

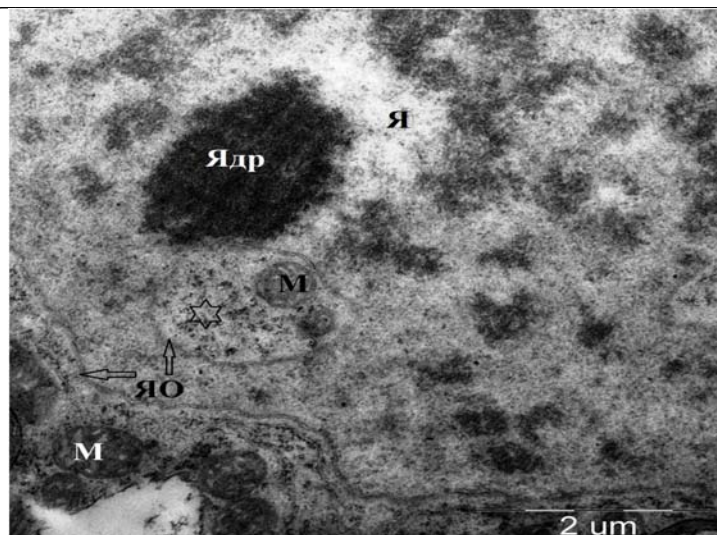


В – вакуоль, ЛК – липидная капля, Я – ядро, Ядр – ядрышко

Рисунок 1 – Слабо вакуолизированная клетка с ядром

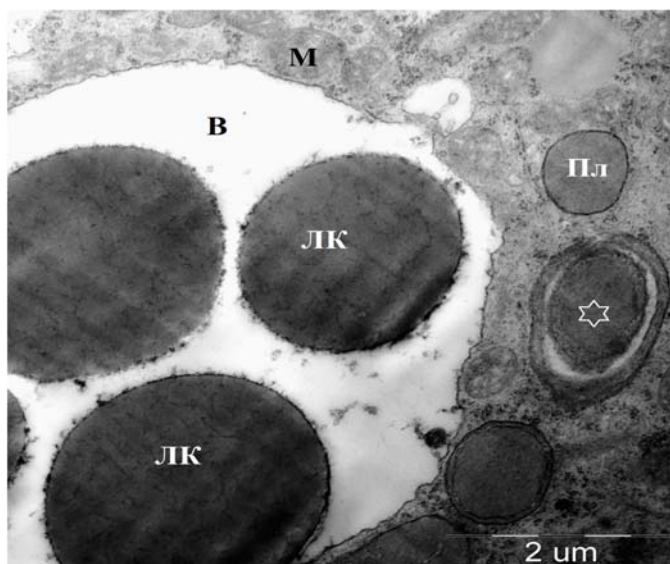
Ядерная оболочка типичная, часто извилистая, с редкими прикрепленными рибосомами на наружной поверхности, ядерные поры плохо заметны. Глыбки конденсированного хроматина обычно сгруппированы в тяжи – хромонемы. В некоторых ядрах хромонемы располагаются достаточно плотно, в этом случае ядрышки не выявляются. Ядрышки крупные, диаметром 1-1,5 мкм, эксцентрические. В некоторых ядрах наблюдаются инвагинации, заполненные цитоплазмой с рибосомами и митохондриями (рисунок 2).

Митохондрии обычно эллипсоидальной формы, размерами 0,5 x 0,7 мкм, с короткими кристами, часть крист выглядит вздутыми. Часть митохондрий приобретают необычную для них форму: гантелевидную, чашевидную. В чашевидных митохондриях наблюдаются другие органеллы, такие как рибосомы и мелкие трубочки ЭР.



М – митохондрия, Я – ядро, Ядр – ядрышко, ЯО – ядерная оболочка
Рисунок 2 – Ядро с инвагинацией (звездочка), наполненной цитоплазмой
с органеллами

В пластидах клеток каллуса отсутствуют гранулы крахмала. Обычно органеллы округлой или эллипсоидальной формы, размерами 0,5 x 0,7 мкм, 0,5 x 1 мкм, 1 x 2 мкм. Однако, имеются пластиды с чашевидными инвагинациями (рисунок 3), гантелевидной или неправильной формы. Мембранная система совсем не развита или развита крайне слабо. Оболочка органеллы типичная, лишена складок.

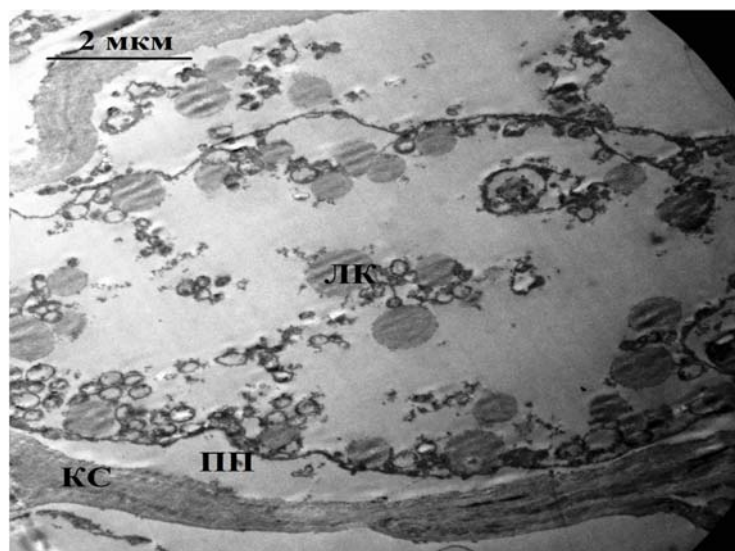


В – вакуоль, ЛК – липидная капля, М – митохондрия, Пл – пластида,
звездочкой указана пластида с чашевидной инвагинацией
Рисунок 3 – Пластиды и вакуоли клеток ЭР каллуса

Эндоплазматический ретикулум представлен преимущественно цистернальным элементом. Крупные цистерны располагаются по периферии клетки, параллельно клеточной оболочке, или обкладывают ядро. На наружной поверхности мембран цистерн наблю-

даются прикрепленные рибосомы (шероховатый ЭР). В качестве запасных веществ отмечаются в основном липидные капли.

Часть клеток каллуса характеризуется признаками программированной клеточной смерти. Клеточная оболочка таких клеток выглядит расслаивающейся на отдельные фибриллы. Протопласт сжимается и отходит от клеточной стенки, образуя периплазматическое пространство (рисунок 4).



КС – клеточная стенка, ЛК – липидная капля, ПП – периплазматическое пространство

Рисунок 4 – Плазмолизированная клетка каллуса пшеницы

Если целостность плазмалеммы не нарушена, то периплазматическое пространство выглядит пустым, при разрыве плазмалеммы в периплазматическое пространство попадают остатки деградированной цитоплазмы, некоторых органелл и неутилизированные липидные капли.

По данным китайских исследователей [11] в культуре незрелых эмбрионидов пшеницы наблюдается большое количество мелких вакуолей, крупных ядер, прозрачных и множественных ядрышек. Увеличено количество и тип органелл – пластид, рибосом и митохондрий, клеточная стенка уплотнена, исчезли плазмодесмы, увеличилось количество крахмальных зерен в эмбриогенных клетках.

Тогда как молодые меристематические клетки РЭ каллуса пшеницы на среде с 0,1 мг/л АБК содержат крупное ядро с 1-2 ядрышками, вздутыми митохондриями и пластидами гантелевидной и чашевидной формы. Эти клетки встречаются как слабовакуолизированные, так и средневакуолизированные, которые отличаются содержанием хлопьевидных осадков и крупных глобул идентичных липидным. На среде с АБК части клеток присущи признаки ПКС, характеризующихся образованием периплазматического пространства.

Литература

1 Lambe P., Mutambel H.S.N., Deltour R., Dinant M. Somatic embryogenesis in pearl millet (*Pennisetum glaucum*): Strategies to reduce genotype limitation and to maintain long-term totipotency // Plant Cell. 1999. V. 55. P. 23-29

- 2 *Vasil I.K.*, Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops // *J. Plant. Physiol.* 1987. V. 128. P. 193-218
- 3 *Armstrong C.L., Green C.E.* Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-proline // *Planta.* 1985. V. 164. P. 207-214
- 4 *Luppoto E., Lussardi M.C.*, Secondary somatic embryogenesis from regenerating plants of the inbred line B 79 of maize (*Zea mays L.*) Switch from type 1 to type 2 callus and effect on the regenerative potential // *Maudica/* 1988. V. 33. P. 163-177
- 5 *Бишимбаева Н.К.* Регуляция соматического эмбриогенеза и длительное поддержание тотипотентности в культуре тканей пшеницы и ячменя // Доклады НАН МОН РК. 2007. № 4. С. 71-76
- 6 *Амирова А.К., Бишимбаева Н.К.* Идентификация типов каллусных тканей пшеницы и изучение путей их метаморфоза // Вестник КазНУ. Серия биологическая. 2002. № 3 (18). С. 15-19
- 7 *Амирова А.К., Бишимбаева Н.К.* Влияние 2,4-Д на процесс соматического эмбриогенеза в длительно-культивируемых тканях пшеницы // Биотехнология. Теория и практика. 2004. № 3-4. С. 42-47
- 8 *Бишимбаева Н.К., Амирова А.К., Денебаева Г.* Влияние абсцизовой кислоты на состав клеточных популяций и морфогенез в культуре тканей пшеницы и ячменя // Поиск. Серия естеств. и тех. наук. 2007. № 1. С. 133-135
- 9 *Рахимова Е.В., Бишимбаева Н.К., Амирова А.К., Нургазина А.С.* Влияние фитогормонов на структуру рыхлых эмбриогенных каллусов // Исследования и результаты КазНАУ. 2015. № 4. С. 165-173
- 10 *Gamborg O.L., Eveleigh D.E.* Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures // *Can J Biochem.* 1968. V. 46 (5). P. 417-421
11. *Ya-fu W., Ka-rong C., Li-hong W., Lun-shan W.* // *Acta Botanica Sinica.* 1994. V. 36 (6). P. 418-422.

Rakhimova E.V., Nurgazina A.S., Amirova A.K., Bishimbayeva N.K.

ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS OF CELLS FRIABLE EMBRYOGENIC CALLUS WHEAT

Annotation

Electron microscopic examination of the cells friable embryogenic callus of wheat was carried out cultured on medium with 1.0 mg / l ABA. As a result, we clarified the ultrastructure of cells with different types of cytodifferentiation: young cells; more mature cells, characterized by varying degrees of vacuolation and cytoplasmic localization of the wall: slightly vacuolated; cells with plasmolysis.

Keywords: electron microscopy, embryogenic callus, cereals.

Рахимова Е.В., Бишимбаева Н.К., Амирова А.К., Нургазина А.С.

БИДАЙДЫҢ БОРПЫЛДАҚ ЭМБРИОГЕНДІ КАЛЛУС КЛЕТКАЛАРЫНЫҢ УЛЬТРАСТРУКТУРАЛЫҚ ЕРЕКШЕЛІКТЕРІ

Аңдатпа

Бидайдың борпылдақ эмбриогенді каллустарына 0,1 мг/л АБК культивирленген қоректік ортада электронды-микроскопиялық зерттеу жүргізілді. Зерттеу нәтижесінде цитодифференцирленген әр-түрлі типтегі клеткалардың ультрақұрылымдық ерекшеліктері анықталды; жас клеткалар, ересек клеткалар, әр-түрлі деңгейдегі вакуолизацияны және қабырға аралықлық цитоплазма локализациясын сипаттайды: төмен вакуолизирленген, плазмоллизирленген клеткалар.

Кілт сөздер: электронды микроскопия, эмбриогенді каллус, дақылдар.

УДК: 634.12(574)

Садад С., Укибасов О.А.

Казахский национальный аграрный университет

РОСТ И ЭКОНОМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДЕРЕВЬЕВ ЯБЛОНИ В ИНТЕНСИВНОМ САДУ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА РАЗМНОЖЕНИЯ САЖЕНЦЕВ

Аннотация

В статье рассмотрено влияние способов размножения саженцев на рост и экономические показатели деревьев яблони в интенсивном саду.

Установлено, что компактной кроной отличались деревья выращенные из зимних прививок непосредственно в саду. Однако деревья всех вариантов опыта со схемой посадки 1,5 * 1,0 м сильно загущается.

По экономическим расчетам все способы размножения были рентабельными. Тем не менее, самый высокий уровень рентабельности установлен в варианте с зимней прививкой посаженный непосредственно в сад ("Сад").

Ключевые слова: Окулировка, зимняя прививка, питомник, сад, Голден Делишес, М9.

Введение

Увеличение урожайности плодовых культур в значительной степени связано с освоением новой технологии выращивания плодов, основу которой составляют интенсивные насаждения [1]. При этом менялись схемы размещения деревьев в сторону более плотных посадок, а с помощью обрезки и наклона ветвей стали решать задачи по ограничению высоты и ширины кроны [2]. Общими чертами для всех типов современных садов (по крайней мере насаждений яблони) является низкорослость деревьев и их раннее вступление в пору плодоношения.

Как отмечал Ю.Л.Кудосов [3] на орошаемых землях юга и юго-востока Казахстана высота яблонь даже на карликовых подвоях достигает 4-5 м. Еще выше бывают деревья при плотных схемах посадки.