

ЦИТО-ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ *ACONITUM BARBATUM* PATR. EX PERS

М.В. Филонова^{1,2}, С.В. Пулькина¹, Т.И. Фомина², А.А. Чурин^{1,2}

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

²Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия, Maria-Caurus7@yandex.ru

Аннотация. *Aconitum barbarum* ценное лекарственное растение, имеет невысокую численность и ограниченное распространение в Томской области. Изучены цитогистологические характеристики каллусной культуры аконита. Было выявлено несколько цитотипов: меристематического типа (меристемоподобных – М), паренхимного типа (паренхимоподобных: П1, П2, П3, П4, П5) и гигантских клеток (Г).

Ключевые слова: каллусная культура, *Aconitum barbarum* Patr. ex Pers., цито-гистология

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1407-1410

Введение. Культуры клеток растений представляют собой экспериментально созданную биологическую систему, физиологические, гистологические, цитологические и генетические особенности которой могут отличаться от интактного растения. Генетическое разнообразие каллусных клеток позволяет использовать их не только для разработки методов получения новых генотипов для селекционных исследований, но и для создания технологий получения веществ вторичного метаболизма. Для разработки большинства клеточных технологий необходимо иметь данные о характере ростовых процессов и цитогистологических изменениях, происходящих в каллусных тканях.

В работе использована каллусная культура, полученная из перспективного лекарственного растения *Aconitum barbarum* Patr. ex Pers. Акони́т борода́тый - многолетнее растение семейства Лютиковые (*Ranunculaceae* Juss) относится к редким видам, известен в народной медицине Китая, Тибета и Монголии [Kharina et al., 2017]. *A. barbarum* содержит дитерпеновые алкалоиды, флавоноиды и другие вещества, обладающие биологической активностью, и представляющие интерес для создания на их основе лекарств противоопухолевого [Wadaa et al., 2015] и антиноцицептивного [Li-Mei Sun et al., 2009] действия. Изучение морфологических параметров культуры, цитологических особенностей клеток с определением размера, морфологии и ядерно-цитоплазматического отношения, необходимо для того чтобы выявить особенности каллусной культуры аконита и подтвердить ее морфогенный статус. Что в дальнейшем позволит оценить возможность органогенеза и использования культуры в качестве источника для получения БАВ.

Культура аконита бородачатого получена на кафедре физиологии растений и биотехнологии НИ ТГУ, подобраны условия для индукции и длительного субкультивирования каллусной культуры [Филонова и др., 2017]. Цель настоящей работы - оценить цито-гистологические характеристики каллусной культуры *Aconitum barbatum* Patr. ex Pers.

Для более полной характеристики полученной каллусной культуры и определения направления ее пролиферации и цитодифференцировки провели анализ клеточного

состава на постоянных препаратах гистологических срезов каллусной культуры аконита бородатого.

Методы исследования. Для гистологического исследования использовали каллус аконита 15 пассажа на 20 сутки субкультивирования, его фиксировали в смеси 96% этилового спирта с ледяной уксусной кислотой (3:1), с последующим отмыванием 96% спиртом. Готовили гистологические препараты по стандартной методике. Гистологические срезы, изготовленные на микротоме толщиной 0,7 мкм, переносили на стекла, окрашивали гематоксилином и эозином и заключали в бальзам [Коржевский, Гиляров, 2010].

На гистологических препаратах с помощью системы анализа изображения на базе микроскопа Axio Lab A1 (Carl Zeiss, Германия) проводили фотографирование клеток при увеличении 100x10, на каждый цитотип по 100 измерений. При помощи программы ZEN 2.3 (blue edition) измеряли площадь клетки и ядра, далее рассчитывали ядерно-цитоплазматическое отношение, которое является важной морфологической характеристикой, позволяющей оценить уровень метаболизма в клетках.

Результаты и выводы. Каллус аконита бородатого представляет собой плотную гетерогенную массу светло-желтого цвета. В результате цито-гистологического исследования выявлено, что каллусная культура *A. barbarum* состоит из нескольких цитотипов: меристематического типа (меристемоподобных - М), паренхимного типа (паренхимоподобных: П1, П2, П3, П4, П5) и гигантских клеток (Г) (рисунок).

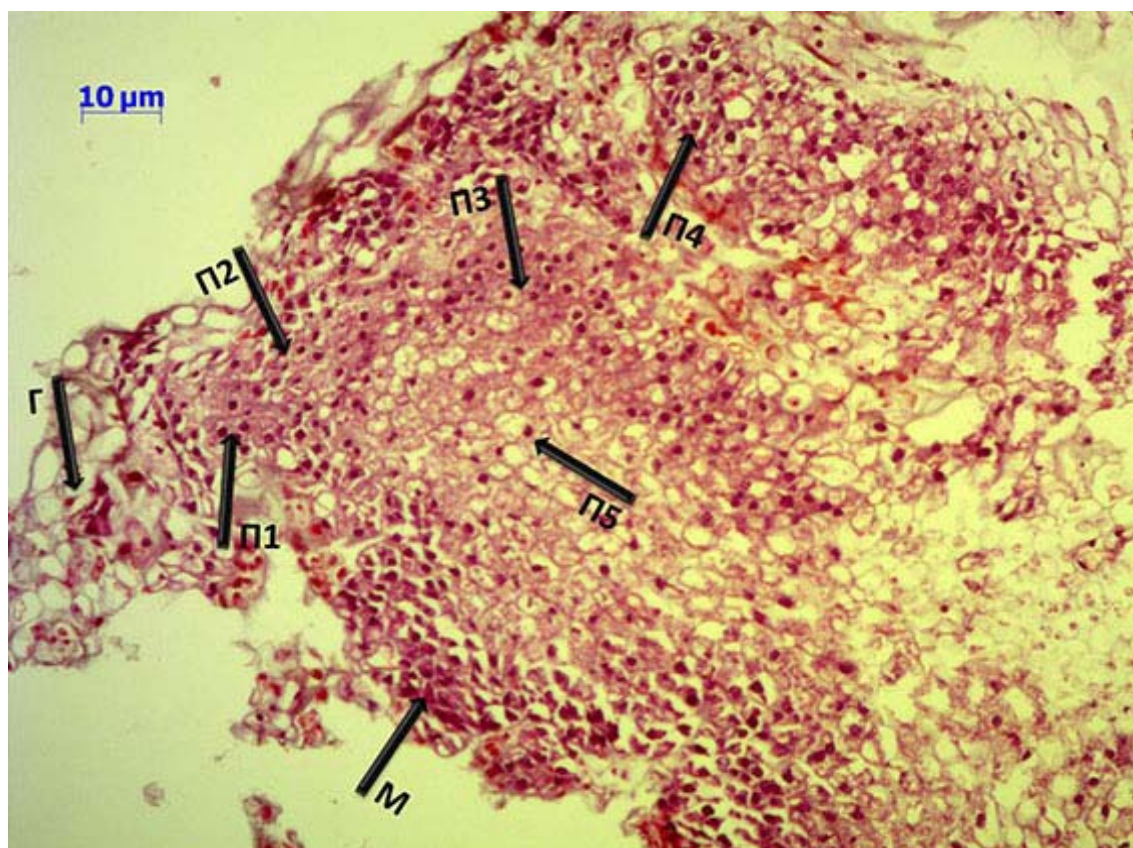


Рисунок. Гистологический срез каллуса *Aconitum barbarum* Patr. ex Pers. (увеличение 10x10). **Примечание:** стрелками указаны цитотипы: М (меристемоподобные), П1-П5 (паренхимоподобные), Г (гигантские).

Клетки меристематического типа – сравнительно мелкие: 130-150 мкм², с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением – более 0,3; полигональной

формы, плотно прилегающие друг к другу, с округлым ядром расположенным в центре клетки и несколькими ядрышками, неоднородно окрашенной кариоплазмой сетчатого типа и интенсивно окрашенной цитоплазмой. Некоторые из них находятся на разных стадиях митотического деления.

Клетки паренхимного типа – различные по форме и размерам от 180 и до 700 мкм², ядерно-цитоплазматическим соотношением от 0,08 до 0,3; что позволило условно разделить их на 5 типов:

П1 – клетки неправильной формы с крупным ядром, неоднородно окрашенной кариоплазмой с одним или несколькими ядрышками. Цитоплазма с мелкими вакуолями, интенсивно окрашена.

П2 – клетки крупные округлой формы с крупным ядром с одним или 2-3 ядрышками и интенсивно окрашенной кариоплазмой. Цитоплазма светлая неоднородно окрашенная, отмечается слияние мелких вакуолей в несколько более крупных.

П3 – клетки округлые с округлым ядром с 1-2 ядрышками и интенсивно окрашенной однородной кариоплазмой. Вакуоли в цитоплазме симметрично окружают ядро, оставляя небольшой поясok из цитоплазмы. Четко просматривается клеточная стенка.

П4 – Клетки крупные округлые или слегка вытянутые с интенсивно окрашенным небольшим ассиметрично расположенным ядром. Цитоплазма светлая, ограничивает 2-3 слабоокрашенные вакуоли.

П5 – Крупные клетки с ассиметрично расположенным ядром с крупным ядрышком, слабо окрашенной цитоплазмой, которая в ряде клеток смещена к клеточной стенке одной, двумя крупными вакуолями.

Кроме того, четко выделяется немногочисленная группа гигантских клеток площадью в среднем 2000 мкм² и ядерно-цитоплазматическим соотношением менее 0,05. Клетки с интенсивно окрашенным ядром, ассиметрично расположенным, крупной вакуолью, занимающей всю площадь клетки, слабо окрашенной цитоплазмой и хорошо выраженной клеточной стенкой. Иногда встречаются гигантские клетки с крупным ядром с интенсивно окрашенным ядрышком и зернистой цитоплазмой.

Так как предварительный цитогенетический анализ каллусной культуры 15 пассажа показал наличие клеток разной ploидности, возможно, данный тип связан с наличием полиплоидных ядер.

На гистологических срезах можно визуализировать группы клеток на разных стадиях деградации, что затрудняет их идентификацию и не позволяет отнести к какому-либо цитотипу, поэтому они не анализировались.

В результате цито-гистологического анализа показано, что каллусная культура аконита является морфогенной и имеет гетерогенный клеточный состав.

Литература

Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. – СПб.: Спец Лит, 2010. – 95 с.

Филонова М.В., Медведева Ю.В., Ефимова М.В., Чуринов А.А. Способ получения каллусной культуры борца борогатого (*Aconitum barbatum* Patr. ex Pers.). Патент РФ № 2631927, заявитель и патентообладатель НИ ТГУ – опубл.: 28.09.2017. – Бюл. Изобретения полезные модели. – № 28. – 8 с.

Kharina T.G., Prokopyev A.S., Pulkina S.V., Yamburov M.S., Kataeva T.N. Study of *Aconitum barbatum* in the southern Tomsk region in wild and horticultural conditions // International Journal of Green Pharmacy. – 2017. – V. 11, No. 4. – P. 726–729.

Li-Mei Sun, Ze-Dong Nan, Hong-Li Huang, Wen-Hai Li, Cheng-Shan Yuan. Chemical constituents of *Aconitum barbatum* var. *puberulum* // Chemistry of Natural Compounds. – 2009. – V. 45, No. 6. – P. 934.

Wadaa K., Ohkoshi E., Zhao Y., Goto M., Morris-Natschke S. L., Lee K.-H. Evaluation of *Aconitum* diterpenoid alkaloids as antiproliferative agents // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2015. – V. 25, No. 7. – P. 1525–1531.

CYTO-HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CALLUS CULTURE ACONITUM BARBATUM PATR. EX PERS.

M. V. Filonova^{1,2}, S. V. Pulkina¹, T. I. Fomina², A. A. Churin^{1,2}

¹National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

²Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia, *Maria-Caurus7@yandex.ru*

Abstract. *Aconitum barbarum* the valuable medicinal plant, has a low number and limited distribution in the Tomsk region. The cyto-histological characteristics of the callus culture of *Aconitum barbarum* were studied. Several cytotypes were identified: meristematic-type (meristem-like – M), parenchymal type (parenchymal-like: P1, P2, P3, P4, P5) and giant cells (G).

Keywords: *callus culture, Aconitum barbarum Patr. ex Pers., cyto-histology*