УДК 58.084.1:58.086: 581.41

МЕТОДИКА ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРОЕНИЯ СОЦВЕТИЙ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *BRASSICACEAE* НА ПРИМЕРЕ *MATTHIOLA LONGIPETALA* (VENT.) *DC.* В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

Е. С. Березенко

Луганский национальный аграрный университет

Поступила в редакцию 13.03.2014 г.

Аннотация. В статье приведена методика выращивания в лабораторных условиях и использования как модельного объекта для морфолого - анатомических исследований различных органов растений *Matthiola longipetala* (Vent.) DC (*Brassicaceae*), описан способ изготовления постоянных микропрепаратов соцветий данного растения.

Ключевые слова: *Matthiola longipetala*, культивирование, лаборатория светокультуры, проростки, постоянный микропрепарат, фиксация, соцветие, анатомическое строение.

Abstract. The article describes a method of in vitro cultivation and use as a model system for morphological - anatomical studies of various plant organs *Matthiola longipetala* (Vent.) DC (*Brassicaceae*), describes a method for the manufacture of permanent micropreparations inflorescences of this plant.

Keywords: Matthiola longipetala, cultivation, permanent micropreparations, fixation , inflorescence, anatomical structure.

Известным модельным объектом генетических исследований является *Arabidopsis thaliana* (L.) *Heynh* (резушка Таля) из семейства *Brassicaceae* (Капустные). Данное растение также может использоваться как живой растительный объект в учебном процессе. *A. thaliana* имеет много преимуществ, одним из которых является короткий жизненный цикл, составляющий около двух месяцев. Методики культивирования этого растения известны давно и достаточно разнообразны [1, 2]. Однако существует ряд негативных причин, препятствующих широкому использованию арабидопсиса в научных и учебных целях. Семена *A. thaliana* можно приобрести исключительно в специализированных научно-исследовательских лабораториях Европы и США. Растение является требовательным к температуре окружающей среды, влажности почвы и воздуха, pH почвы, ее плотности и т.д. Кроме того, семена арабидопсиса очень мелкие (масса 1000 семян составляет 20 мг), что усложняет манипуляции при выращивании [2].

Таким образом, для выращивания *A. thaliana* в лабораторных условиях необходимо иметь определенный опыт работы с этим растением, а также создать благоприятные условия, требующие большого количества средств и времени.

В качестве наглядного пособия для проведения занятий по дисциплинам ботанического цикла в высших учебных заведениях, общеобразовательных учреждениях, практических занятий по селекции растений и модельного объекта

© Березенко Е. С., 2014

для изучения морфогенеза растений мы предлагаем использовать растение, принадлежащее, как и арабидопсис, к семейству *Brassicaceae* - *Matthiola longipetala* (Vent.) *DC,* более известное под названием левкой или ночная фиалка, которое также можно круглогодично выращивать в условиях лаборатории. Данное растение имеет большие размеры всех органов, клеток, чем *A. thaliana* и является более удобным для использования его на лабораторных занятиях и в процессе культивирования. Например, масса 1000 семян составляет 2.5 – 3 г, а жизненный цикл растения продолжительнее, чем у арабидопсиса и составляет до четырех месяцев при том, что процесс перехода к цветению происходит уже на 4 – 6 неделе после прорастания семян. Это позволяет дольше использовать растения для учебных целей. Одним из главных преимуществ левкоя является возможность приобретения семян в розничной торговле, агрофирмах, а их стоимость в 400 – 500 раз меньше, чем стоимость семян арабидопсиса [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение морфолого-анатомических особенностей строения соцветий представителей семейства *Brassicaceae* проводилось на растениях *Matthiola longipetala* (Vent.) DC. в естественных условиях на территории Луганского национального аграрного университета и в условиях лаборатории светокультуры. Постоянные микропрепараты для анатомического изучения морфогенеза соцветия изготавливали по методике заливки парафиновых блоков с дальнейшим окрашиванием гематоксилином Эрлиха. Изучение препаратов проводилось с помощью микроскопов МБИ-1 (с объективами х8, х20 и окулярами х7, х10, х15х40) и МББ-1АУ42 (с объективами х10, х15 и окулярами х8, х10, х40). Иллюстративный материал получали с помощью цифровой камеры Samsung S830.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Взрослые растения *Matthiola longipetala* достигают высоты 20-40 см, стебель тонкий, опушенный звездчатыми волосками (с примесью железистых); листорасположение очередное; листья узкопродолговатые, выемчато-зубчатые (до перистораздельных) с прилистниками 2-2.5 мм; соцветие кистевидное, цветки имеют укороченные цветоножки, в основании которых располагаются парные прицветнички 1-2 мм; чашелистики длиной около 10 мм, опушены прижатыми звездчатыми волосками; лепестки линейные, расширенные кверху, длиной 20-25 мм бледно-сиреневые с желтоватыми прожилками; тычинки четыре длинные, две короткие, между тычинками располагаются четыре нектарника; стручки цилиндрические, слегка бугорчатые, длиной 50-60 мм, шириной 2.5 – 3 мм, опушенные звездчатыми волосками (обычно с примесью железистых); рыльце при основании с двумя острыми шиловидными рожками длиной 3 – 8 мм, в связи, с чем растение имеет еще одно название – маттиола двурогая (Рис. 1 А, Б).

Процесс культивирования *M. longipetala* начинается с проращивания семян. Для этого предварительно готовят чашку Петри, на дне которой выкладывают фильтровальную бумагу, таким образом, чтобы края бумаги были загнуты на 0.5 – 1 см. Фильтровальную бумагу смачивают дистиллированной водой комнатной температуры до полной ее пропитки, избегая покрытия семян водой.

Для яровизации семена растения *M. longipetala* выкладывают на бумагу не более четырех семян на 1 см^2 (более плотное расположение затрудняет процесс посадки) и выдерживают в холодильной камере при температуре +4 – 6 °С в течение трех суток. Фильтровальная бумага должна быть всегда влажной, но без избытка воды, так как это может привести к загниванию проростков.

После холодовой обработки чашку Петри с семенами ставят на проращивание при круглосуточном освещении, для которого желательно использовать лампы дневного освещения (4000-6000 лк) при температуре 20 – 24 °С.

Проращивание семян в чашках Петри продолжается до тех пор, пока не появятся хорошо выраженные семядольные листочки. Однако процесс высадки в грунт не должен задерживаться, так как возможно сильное вытягивание подсемядольного колена, нарушение сроков вегетации, загнивание ростков.

Почвенная смесь для посадки состоит из двух частей плодородной почвы, двух частей песка и одной части универсальной торфосмеси с pH 5.5 – 6.5. Все составляющие почвосмеси необходимо тщательно просеять, отделив крупные частицы, перемешать и после этого заполнить емкости для выращивания.

В качестве горшков для выращивания могут быть использованы одноразовые стаканы из полипропилена объемом 200 мл и более, на дне которых необходимо сделать 1-2 небольших отверстия. Стаканы заполняются почвосмесью на 1 см ниже верхнего края, при этом необходимо как можно меньше уплотнять почву.

Рис 1. Растение *Matthiola longipetala* в лабораторных условиях. Обозначения: А - взрослое растение *Matthiola longipetala*:1 - горшок для выращивания растений, 2 – побег, 3 – соцветия; Б - соцветия *Matthiola longipetala*: 1 – цветок, 2 – бутон

Перед высадкой растений в грунт горшки ставят в поддоны с водой комнатной температуры для увлажнения почвы, после этого готовят лунки для посадки глубиной 0.7 – 1 см на расстоянии 3.5 – 4 см.

Посадка проростков *M. longipetala* осуществляется в лунки с помощью изогнутой на конце препаровальной иглы или любым стальным крючком небольших размеров (можно использовать крючок для вязания № 0.5 – 3) . После посадки горшки на 3 – 5 дней накрывают прозрачной полиэтиленовой пленкой, поддерживая при этом необходимый уровень влажности почвы; освещение продолжают круглосуточно.

После снятия пленки необходимо следить за влажностью почвы в горшках. Поливают растения по мере необходимости. Для полива желательно использовать дистиллированную воду для предотвращения засоления почвы, особенно в местностях с большой жесткостью воды. Но при ее отсутствии можно воспользоваться обычной отстоянной водой. В любом случае, вода для полива должна быть комнатной температуры.

С помощью данного метода выращивания можно получить в лабораторных условиях растения *M. longipetala*, с использованием наименьшего количества затрат времени и средств. Полученные растения могут быть использованы в качестве наглядного материала на занятиях по ботанике и селекции растений в высших учебных заведениях для лабораторных работ [4].

Как объект исследования на полученных растениях нами были избраны соцветия *M. longipetala*. Морфологический анализ растений проводился с применением комплементарного подхода, предложенного Т.В. Кузнецовой (1991), согласно которому было выделено главный и боковой побеги, определены границы и структуры соцветия Границы соцветия определяли на основании ритмологичного подхода, по результатам наблюдений морфогенеза растений *M. longipetala* [5, 6].

Листья на побегах растений в составе соцветий и за его пределами анализировали на основании критериев выделеных Remane (1951) (по положению на побеге, по строению и наличию переходных форм), и сопоставления морфологии

близкородственных таксонов. Иллюстративный материал был получен с помощью цифровой камеры Samsung S830.

Дальнейшие изучения структуры соцветий проводилось с помощью микроскопических препаратов.

Среди известных методик фиксации тканей и органов живых организмов, изготовления постоянных микропрепаратов из животных тканей являются способы, описанные Лилли Р. (1969) [7]. Изготовление постоянных микропрепаратов из растительных тканей, которое было взято за основу, также описано в литературе [8, 9]. Описанные методики требуют затрат большого количества рабочего времени, реактивов и электроэнергии.

Нам удалось приспособить уже известные методики изготовления постоянных микропрепаратов к нашим потребностям, при этом максимально сохраняя качество микропрепаратов.

Изготовление постоянного препарата начинается с этапа фиксации объекта. Верхушку соцветия, с удаленными сформированными листьями и цветками, погружают в фиксирующую жидкость - уксусный алкоголь, который изготавливают непосредственно перед фиксацией материала.

В состав фиксирующей жидкости входит: раствор этанола 96% - 3 части, ледяная уксусная кислота - 1 часть. Для фиксации небольших объектов (до 2 см длиной) предлагается использовать медицинский флакон из-под антибиотиков (10 мл), для которого необходимо 3 мл этанола и 1 мл кислоты. При этом количество реагентов для раствора удобно измерять с помощью одноразового шприца для инъекций. Время выдержки объекта размерами до 2 см длиной и до 3 мм в диаметре (обязательным условием является то, что фиксации подвергаются молодые ткани растения) составляет 2 часа. Фиксирующую жидкость сливают и заменяют 96 % раствором этанола, в котором объект оставляют дважды на 30 минут. Если изготовление постоянного препарата откладывается на некоторое время, то объект необходимо залить 80 % этанолом, флакон закрыть крышкой, хранить в холодильной камере при температуре 3 – 6 °С. Срок хранения при таких условиях может составлять до двух лет.

Вторым этапом подготовки к изготовлению постоянного микропрепарата является обезвоживание объекта или проводка. Для этого используют методику проведения через спирты и другие апротонные растворители. Если объект хранился некоторое время, необходимо заменить раствор 80% этанола на 96% , выдерживая дважды по 15 минут. К этанолу добавляют равный объем бутанола (выдержка объекта в растворе составляет 15 минут).

Смесь сливают и заменяют чистым бутанолом дважды, выдерживая по 15 минут. К последней порции бутанола добавляют равную часть ксилола и снова выдерживают 15 минут. Смесь сливают, а объект дважды заливают чистым ксилолом на 20 минут для больших и более грубых частей растений, и до 5 минут для маленьких объектов, образованных молодыми тканями. После данной операции объект становится прозрачным и хрупким, поэтому работать с ним нужно осторожно. К последней порции ксилола добавляют предварительно подготовленную перед этим смесь парафина с пчелиным воском [7], разогретую до температуры 65 – 70°С, и поставить в термостат на 30 минут при температуре 55 – 60°С. Осторожно, стараясь не потерять объект, выдерживают в расплавленной смеси парафина с воском дважды, сначала 1 час, а затем 2 часа, оставляя в термостате при температуре 65 – 70°С .

Третьим этапом изготовления микропрепаратов является заливка в парафиновые блоки, которые изготавливают путем заливки парафина в уголки из нержавеющего металла (размеры уголков: длинная сторона – 10 см, короткая сторона – 3 см, высота – 2 см) [10]. Уголки выкладывают на крышку чашки Петри, таким образом, чтобы мог образоваться прямоугольник необходимого размера, плотно прижимают к поверхности стекла, и на 1/3 заливают разогретую до 70 °С смесь парафина с воском, выкладывают с помощью разогретого пинцета и препаровальной иглы подготовленный объект, таким образом, чтобы в дальнейшем изготовить срезы в необходимой плоскости, доливают расплавленный парафин до верхней части уголка. Чашку Петри с уголком выкладывают в емкость с холодной водой ($t \approx 15 – 18$ °С). Для процесса заливки в блоки необходимо чтобы температура воздуха в помещении составляла не менее 23 °С.

Парафиновые блоки, содержащие зафиксированные объекты, маркируют. Срок хранения при температуре не выше 30 °С неограничен.

Следующим этапом изготовления постоянных является фиксация парафиновых блоков. Для этого проводят наклейку блоков на деревянные кубики, предварительно пропитанные расплавленным парафином при температуре 100 – 120 °С путем нагревания их в течение 40 – 50 минут.

Рис. 2. Строение цветка *Matthiola longipetala*. Обозначения: А – общий вид: 1 – ось соцветия, 2 – цветоножка, 3 – чашечка, 4 – венчик; Б – цветок в разрезе: 1 – ось соцветия, 2 – цветоножка, 3 – цветоложе, 4 – чашелистики, 5 – лепестки, 6 – тычинки, 7 – пестик; В – генеративные органы *M. longipetala*: 1 – длинная тычинка, 2 – короткая тычинка, 3 – пестик, 4 – пыльник, 5 – пыльцевая зерно, 6 – связник, 7 – тычиночная нить, 8 – рыльце, 9 – завязь.

Из парафинового блока с исследуемой частью растения скальпелем вырезают четырехугольник таким образом, чтобы объект со всех сторон был окружен слоем парафина толщиной 1 – 3 мм. Затем, положив на деревянный кубик небольшой кусочек твердого парафина, расплавляют его горячим металлическим шпателем (или скальпелем), проводя этим же шпателем по нижней поверхности парафинового блока и быстро придавливая его к кубику.

После этого объект, приклеенный к деревянному кубику, необходимо оставить на 10 – 15 минут для полного застывания парафина.

Для получения срезов нами был использован микротом санного типа. Объект на деревянном блоке закрепляется на держателе микротома. Толщина срезов составляла 12 – 14 мкм. Температура окружающей среды для изготовления микротомных срезов не должна быть менее 23 °С. Если парафиновые срезы становятся хрупкими и неэластичными, то для восстановления их свойств необходимо повысить температуру воздуха в рабочей зоне с помощью осветительных приборов с лампами накаливания.

Рис. 3. Продольные срезы верхушки соцветия *Matthiola longipetala*

Полученные серии срезов расправляют в ванночке с дистиллированной водой t 30 – 37 °С. При более высокой температуре происходит деформация срезов, до полного их расплавления. На этом же этапе осуществляется контроль за качеством срезов и материалом с помощью микроскопа МБС–2.

Расправленные срезы выкладываются на обезжиренное предметное стекло и высушиваются при температуре 28 – 30 °С.

Срезы окрашиваются согласно стандартной методики гематоксилином Эрлиха и заключаются в канадский бальзам.

ВЫВОДЫ

Matthiola longipetala (Vent.) DC (*Brassicaceae*) возможно использовать в качестве модельного объекта для морфолого - анатомических исследований различных органов растений.

Выращивание *Matthiola longipetala* (Vent.) DC. возможно в лабораторных условиях с последую-

щим использованием в учебном процессе в общеобразовательных и высших учебных заведениях и научно-исследовательской работы.

Изготовление постоянных микропрепаратов верхушек соцветия включает стадии фиксации растительного материала, обезвоживание объекта, заключения в парафин, разрезания на микротоме, окраски и заключения в канадский бальзам. Полученные постоянные микропрепараты позволяют более точно описывать морфолого-анатомическую характеристику соцветия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Генетика: практикум: навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів / І.Д. Соколов [та ін.]. — К.: Арістей, 2003. — 176 с.

2. Лабораторный практикум по общей генетике / И.Д. Соколов [и др.]. — Луганск: Русь, 1999. — 205 с.

3. Петров А.П. Методика почвенной культуры Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. и минимизации паратипических варианс / А.П. Петров, В.А. Плотников, Л.И. Прокопенко // Генетика. — 1976. — Т.12. — №2. — С. 83 - 87.

4. Спосіб вирощування Matthiola longipetala (Vent.) DC (Brassicaceae BURNETT) у лабораторних умовах: патент на корисну модель №54338 Україна, МПК (2009) A01G7/00 / В. Є. Харченко, К.С. Березенко; Луганський національний аграрний ун-т. — № u 2010 03946; заявл. 06.04.2010; опубл. 10.11.2010 // Промислова власність. — 2010. — №21 — [4 с].

5. Кузнецова Т.В. Морфология соцветий: современное состояние / Т.В. Кузнецова // ВИНИТИ Итоги науки и техники. Ботаника. — 1991. — Т.12. — С. 51-124.

6. Алексеев Д.В. Определение типа и положения органов цветка: динамическая модель развития / Д.В.Алексеев // Известия РАН. — 2006. — №6. — С. 45-659.

7. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лили — М.: Мир, 1969. — 625 с.

8. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. — М.: Колос, 1980. — 304 с.

9. Прозина М.Н. Ботаническая микротехника / М.Н.Прозина. — М.: Высш. школа, 1960. — 205 с.

10. Буданцев А. Ю. Основы гистохимии: Учебное пособие / А.Ю. Буданцев — Пущино: Изд-во Пущинск. гос. ун - т, 2008. — 156 с.

Березенко Екатерина Сергеевна — Кафедра биологии растений, Луганский национальный аграрный университет; моб. тел. +380505270957; e-mail: ketrin_lg@mail.ru

Katerina Berezenko — Department of Plant Biology, Lugansk National Agrarian University; mob. tel.+380505270957; e-mail: ketrin_lg@mail.ru,