

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS
CENTRAL BOTANICAL GARDENS
Laboratory of Plant Biochemistry and Biotechnology

CELL NUCLEI OF PLANTS — **E**XPRESSION AND RECONSTRUCTION

After Materials of I Regional Conference,
Minsk, 28th-29th of July, 2001)

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Лаборатория биохимии и биотехнологии растений

Клеточные ядра растений — Экспрессия и реконструкция

Материалы I Региональной научной конференции
г. Минск, 28–29 мая 2001 г.

Минск
2001

ВЛИЯНИЕ ЭНДОГЕННОГО И ЭКЗОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ГОРМОНОВ НА ПРОЦЕСС КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЯ И МОРФОГЕНЕЗ У ТАБАКА

Фоменко Т.И., Бердичевец Л.Г., Малюш М.К., Чумакова И.М.
Центральный ботанический сад НАН Беларуси
Минск, 220012, ул. Сурганова, 2В, e-mail: biolog@it.org.by

Способность растительных тканей к недифференцированному росту зависит от эндо- и экзогенного содержания гормонов. На растениях табака *Nicotiana tabacum* сорта Самсун, трансгенных по гену изопентил-трансферазы (*ipt*) и глюкозоизомеразы (*xyl*), исследованы особенности каллусо- и морфогенеза в культуре *in vitro*. Обнаружено, что сдвиг баланса в содержании эндогенных гормонов в сторону цитокининов приводит к понижению каллусогенной активности листовых эксплантов. В активности пероксидазы не наблюдали корреляции с интенсивностью нарастания каллусов контрольных и трансгенных растений. Показано, что длительное культивирование *in vitro* трансгенных растений снизило уровень экспрессии признаков трансгенности по содержанию фитогормонов.

Введение. Рост и развитие растений сложный процесс, осуществляемый с помощью регуляторных механизмов, важнейшим из которых является гормональная система. Для включения и выключения физиологических и морфологических программ используются одни и те же фитогормоны, но в разных соотношениях. Сдвиг баланса гормонов в растении может изменить экспрессию многих генов. Введение в растение табака гена глюкозоизомеразы (*xyl*) *E.coli* приводит к снижению концентрации ауксина по сравнению с растениями нормального типа при неизменном уровне цитокининов. Ген биосинтеза изопентилтрансферазы, ключевого фермента синтеза цитокининов (*ipt*) Ti-плазмиды *A.tumefaciens*, также изменяет баланс фитогормонов в тканях растений за счет значительного увеличения синтеза цитокининов, что влечет за собой изменение активности генов, участвующих в других процессах, протекающих в растениях [1,2]. Способность растительных тканей к недифференцированному росту зависит главным образом от эндо-и экзогенного содержания фитогормонов. Целью наших исследований явилось изучение влияния измененного эндогенного содержания гормонов трансгенных растений на способность их к недифференцированному росту.

Материалы и методы. В нашей работе были использованы трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* сорта Самсун с введенными генами изопентилтрансферазы (ipt-растения) и глюкоизомеразы (xyl-растения), полученные в лаборатории молекулярной генетики ИМГ РАН и любезно предоставленные профессором Э.С.Пирузян. Для проведения исследований растения поддерживаются в культуре *in vitro* на протяжении 6 лет при культивировании на среде MS, содержащей половинный состав по минеральным компонентам. В качестве эксплантов использовали листовые диски контрольного и трансгенных растений, которые культивировали в темноте при температуре 25°C на трех средах, содержащих фитогормоны мг/л: I — ИУК–3, 2,4Д – 0,1, кинетин – 0,04; II — α -НУК–1, кинетин – 1; III — ИУК–1, кинетин – 1. После 30 дней культивирования определяли прирост сырой и сухой массы каллусной ткани. Определение активности пероксидазы проводили по методу Бояркина [3].

Результаты и обсуждение. В культуре ткани *in vitro* убедительно доказывается, что в реализации генетической информации клетки обнаруживается высокая мобильность в направлении клеточного роста, дедифференциации и дифференциации, которые удается контролировать и изменять с помощью сочетания различных факторов. Изменение генетической информации клетки отражается на ее ответной реакции на условия культивирования. В таблице 1 представлены данные по интенсивности каллусообразования на двух культуральных средах. Показано, что среда, содержащая α -НУК–1, кинетин–1, оказалась наиболее эффективной для каллусообразования у всех рассмотренных растений. Процесс пролиферации на этой среде проходил различно у контрольных и трансгенных растений, что особенно четко проявилось на приросте сухой массы: контроль — в 151 раз, ipt- в 88 раз, xyl- в 81 раз.

На среде, содержащей (мг/л) ИУК–3, 2,4Д – 0,1, кинетин – 0,04, этот процесс был менее интенсивным, но сохранял ту же тенденцию развития. Отмечено, что прирост сырой массы у контрольного растения был выше, чем у xyl-растений и ниже, чем у ipt-растений. Однако, прирост сухой массы, как и в случае с предыдущей средой, был выше в контроле, чем у трансгенных растений (контроль — увеличение в 90 раз, ipt – в 67 раз, xyl – в 39 раз). Сопоставляя показатели развития каллуса на двух гормональных средах

Таблица 1
Влияние гормонального состава среды на интенсивность нарастания каллуса контрольного и трансгенных растений табака сорта Самсун

Тип растений	Среда культиви-рования	Средний прирост сырой массы, мг		Средний прирост сухой массы, мг	
		Wt-W ₀	(Wt-W ₀)/W ₀	Wt-W ₀	(Wt-W ₀)/W ₀
Контроль	Среда I	801,3±3,7	155,3	35,3±0,2	90,4
	Среда II	1421,5±11,9	275,5	62,4±0,5	151,1
Ipt	Среда I	941,2±4,5	165,4	39,8±0,2	67,4
	Среда II	1254,5±4,8	220,5	52,2±0,2	88,5
Ху1	Среда I	517,7±4,1	109,5	26,1±0,2	39,5
	Среда II	1101,0±11,2	232,8	53,9±0,4	81,7

Примечание: W₀ - масса экспланта, Wt — масса каллуса.

можно отметить различие в соотношении прироста массы каллуса на среде II к его приросту на среде I, который составил для контроля -1,8, $I_{рт}$ -1.4, $X_{ул}$ - 2.2.

Из литературных данных известно [4], что содержание свободной ИУК в листьях контрольных растений примерно в 3 раза меньше, чем в irt -растениях (в контроле 40,0 нг/г, а в irt -растениях - 112,7 нг/г сырой массы). Одновременно этими же авторами было показано, что отношение цитокининов к ИУК в листьях контрольных растений было меньше, чем в листьях irt -растений (3,9 и 5,5 соответственно).

Из представленных выше данных следует, что, несмотря на более высокое содержание ИУК у irt -растений, сдвиг баланса эндогенного содержания фитогормонов в сторону цитокининов приводит к понижению каллусогенной активности листовых эксплантов irt -растений. Подобные выводы могут быть отнесены и к $x_{ул}$ -растениям.

В эксперименте по сравнению морфогенной активности контрольного и трансгенных растений отмечено, что у всех растений на среде, где в качестве ауксина использовалась ИУК (1 мг/л), шло образование только адвентивных побегов. Интенсивность этого процесса, проанализированная через 4 недели культивирования, была одинаковой как у контрольного, так и у трансгенных растений. При исследовании динамики образования адвентивных побегов на этой среде можно отметить, что морфогенная реакция $x_{ул}$ -растений проявилась раньше - через 2 недели культивирования, а у контрольного и irt -растения - через 3 недели. И хотя численность регенерантов у всех растений после 4 недель культивирования была одинаковой, адвентивные побеги, полученные на листовых эксплантах $x_{ул}$ -растений, визуально оценивались как более развитые. Присутствие в среде в качестве ауксина 1 мг/л α -НУК привело в основном к ризогенной реакции на листовых эксплантах у всех рассмотренных нами растений. Только у irt -растений через 4 недели зарегистрировано наряду с ризогенезом образование адвентивных побегов, однако значительно хуже, чем на среде с ИУК. Отмечено, что ризогенная реакция у листовых эксплантов в контрольном варианте была выше, чем у трансгенных растений. Начало этого процесса у контрольного и irt -растений зафиксировано через 3 недели культивирования, а у $x_{ул}$ -растений запаздывало еще на одну неделю. Из сказанного выше следует, что измене-

ние эндогенного баланса фитогормонов оказывает влияние на процесс морфогенеза у трансгенных растений, что особенно проследживается на ризогенной реакции. Можно отметить, что характер морфо- и каллусогенеза у трансгенных растений в культуре ткани *in vitro* непосредственно после трансгенеза был иным. Как сообщалось нами ранее [5], процесс морфогенеза шел значительно интенсивнее и был зафиксирован даже на безгормональной среде.

Процесс каллусогенеза может быть представлен как сложный этап выхода растительной ткани из стрессового состояния с активизацией всех биохимических систем ткани. Пероксидазы, являясь важным звеном ферментных систем, включаются в процессы, направленные на выход ткани из стресса. Определяя активность пероксидазы как функционально активного белка, локализованного во всех структурах клетки, можно судить об уровне метаболических процессов в растительной ткани. Пероксидазы проявляют значительные изменения активности в процессе каллусогенеза и особенно морфогенеза, являясь наряду с эстеразами и глутаматдегидрогеназами маркерными ферментами процесса морфогенеза [6, 7].

В эксплантах контрольных и трансгенных растений отмечены достоверные отличия по пероксидазной активности. Определение ферментативной активности в каллусной ткани, выращенной на среде I, показало ее увеличение в каллусе по сравнению с исходным эксплантом у Ху1 - в 4,9, у Iрт - в 1,1 раза. В то же время в контроле пероксидазная активность каллуса была в 3,7 раза ниже, чем в исходном экспланте (табл.2).

Трансгенные растения с измененным гормональным балансом (Ху1 и Iрт) показали различный уровень пероксидазной активности по сравнению с контрольными растениями, как в исходном экспланте, так и в каллусах, полученных на среде I. Каллус Iрт растений на этой среде имел пероксидазную активность в 2,8 раза выше, чем в контроле, увеличение у Ху1 было в 19 раз. На среде II пероксидазная активность каллусной ткани Ху1 варианта была выше в 2,2 раза, у Iрт ниже в 1,2 раза, чем в контроле. Зоны морфогенеза по сравнению с неморфогенными зонами имели повышенную активность у контроля в 2,2 раза, у Iрт в 2,4 раза. У Ху1 наблюдали небольшое снижение активности (в 1,2 раза) в морфо-

Таблица 2

Активность пероксидазы (АП) в каллусе трансгенных и контрольных растений табака сорта Самсун при культивировании в темновых условиях.

Объект исследования	АП в опт.ед./1 г сырой массы в сек		
	Контроль	Iрт	Xy1
Эксплант	12,1±0,2	8,0±0,1	12,8±0,2
Каллус, среда I	3,3±0,1	9,3±0,2	62,1±0,2
Каллус морфогенный, среда II	11,8±0,3	9,5±0,3	26,4±0,5
Зона инициации морфогенеза, среда II	26,6±0,4	23,6±0,3	22,2±0,3

генных зонах. На пятой неделе культивирования активность в каллусе Iрт увеличивалась на 55% и составила 14,7±0,3. Активность пероксидазы каллусной ткани трансгенных и контрольных растений табака не показала корреляции с интенсивностью нарастания сырой и сухой массы каллусов. В то же время ферментативная активность значительно отличалась у каллусов, выращенных на двух рассмотренных средах.

Исследования по получению и росту каллусных культур на безгормональных средах и средах с разным содержанием экзогенных гормонов показали неодинаковую способность контрольных и трансгенных Iрт и Xy1 растений к каллусообразованию, адвентивному побегообразованию, корнеобразованию у различных тканей. Обнаружено, для контрольных растений, с одной стороны, ауксотрофное, чувствительное к гормональному составу среды образование первичного каллуса, с другой стороны – появление высокой каллусообразующей активности эксплантов трансгенных растений в широком диапазоне концентраций, а также отличия в направленности морфогенных процессов. Сравнение каллусогенной активности контрольного и трансгенных растений табака показало, что сдвиг баланса в содержании эндогенных фитогормонов в

сторону цитокининов приводит к понижению каллусогенной активности листовых эксплантов трансгенных растений. Показано, что длительное культивирование *in vitro* трансгенных растений снизило уровень экспрессии признаков трансгенности по содержанию фитогормонов.

Литература

- 1 Андрианов В.М. Алияние чужеродных генов на рост и фитогормональный статус трансгенных растений.// Автореф. док. дис. М. 1992. 57с.
- 2 Piruzian E.S., Andrianov V.M. Plasmids of agrobacteria and genetic engineering of plant.// Nauka Publ. Moskow. 1985. 279p.
- 3 Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. М. Высшая школа. 1975. 392с.
- 4 Макарова Р.В., Борисова Т.А., Власова П.В. и др. Продукция фитогормонов у ipt-регенерантов табака *in vitro*.// Физиология растений. 1997. Т.44. №5. С.762-768.
- 5 Решетников В.Н., Быкова Л.Н., Фоменко Т.И., Пирузян Э.С., Андрианов В.М. Анализ трансгенных растений табака на активность каллусообразования и регенерацию побегов.// Генетическая инженерия и биотехнология. Минск. 1994.С.59.
- 6 Everett N.P., Wach M.J., Ashorth D.G. Biochechal markers of embryogenesis in tissue culture of the maize inbred B73 // Plant Sci. 1985. V.41. №2. P.133-140.
- 7 Coppens L., Dewitte D. Esterase and peroxidase zymograms from barley callus as a biochemical markers system of embryogenesis and organogenesis. // Plant Sci. 1990. V.67. №1. P.97-105.

Summary

Peculiarities of callus- and morphogenesis *in vitro* of cytokinin transgenic *Nicotiana tabacum* plants cv Samsun (Ipt, Xyl) were investigated. It was find that shift of balance in endogenous hormones content of citokinins led to decrease of callusogenic activity of leaf explants. There was not any correlation between peroxidase activity and callus growth intensity of control and transgenic plants. It was shown that long time cultivation *in vitro* of transgenic plants decreased the expression level of transgenic characteristic concerned with phytohormones content.