

**БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ****АНАЛИЗ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ФРАКЦИЙ НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ ПОБЕГООБРАЗОВАНИЯ У *DENDROBIUM* SP. В КУЛЬТУРЕ IN VITRO**

О.Н. КОЗЛОВА

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г.Минск, Республика Беларусь

**Введение**

На современном этапе развития науки, а также промышленных технологий производства высококачественного посадочного материала ценных декоративных растений все большее распространение приобретает культура изолированных органов, клеток и тканей растений. Необходимым условием успешного использования этих методик является разработанная система индуцируемого морфогенеза [2]. Однако, несмотря на широкое использование регенерации *in vitro* в научных и практических целях, до сих пор не получено целостной картины механизмов этого процесса. Важным моментом изучения процессов морфогенеза является исследование самых ранних этапов, когда некоторые клетки суспензии или экспланта приобретают способность развития в орган или эмбрионид [4]. Полученные на сегодняшний момент научные данные характеризуют, в основном, отдельные стадии регенерации *in vitro*. Также следует отметить, что большинство исследований проводятся с использованием ограниченного круга растений: арабидопсис, табак, морковь [2, 6]. Литературные данные, характеризующие эти процессы у орхидных, отсутствуют.

Целью нашей работы явилось проведение анализа полипептидных фракций легкорастворимых, мембраносвязанных белков и белков клеточной стенки на ранних стадиях побегообразования в культуре *in vitro* у *Dendrobium* sp. (*Orchidaceae*) для определения возможных маркеров данного процесса.

**Объекты и методы исследования**

В качестве объекта исследования использовалась асептическая культура *Dendrobium* sp. (коллекция ЦБС НАН Беларуси). Для культивирования эксплантов использовали среду MS [5]. Основной режим культивирования: температура  $25 \pm 2^{\circ}$ , освещенность 3 000 лк, фотопериод 16 часов. Для изучения индукции побегообразования в качестве эксплантов использовали молодые туберидии *Dendrobium* sp с двумя сформировавшимися листьями и корешками. Наблюдение за культурой велось до появления видных невооруженным глазом новых побегов. В каждую колбу высаживалось по 10 побегов *Dendrobium* sp. Эксперименты проводились в трехкратной повторности.

Материал для последующего выделения белков отбирали по схеме: контроль (эксплант без высадки на среду) – 1 день культивирования – 2 день – 3 день – 5 день – 6 день – 7 день – 9 день – 13 день – 15 день для *Dendrobium* sp. Отобранные образцы взвешивали, фиксировали в жидком азоте и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

При выделении белков различных фракций использовали методику, предложенную в диссертационной работе Василенко для определения растительных глюконаз [1]. Электрофоретическое разделение белков проводили при комнатной температуре в полиакриламидном геле (ПААГ) при постоянном токе 30 мА в щелочной системе с ДСН. Для электрофореза использовали 5%-ный концентрирующий и 15%-ный разделяющий ПААГ. После разделения белковых фракций гели фиксировали 10%

ТХУ, а затем окрашивали 0,1% Coomassie Blue R-250. Гели фотографировали, интенсивность окрашивания зон и величины молекулярных масс полипептидов оценивали с помощью компьютерной программы Phoretix 1D (Nonlinear Dynamics LTD). В качестве маркера молекулярных масс полипептидов использовали LMW стандарт производства Amersham Pharmacia Biotech.

### Результаты и обсуждение

Анализ качественного состава различных фракций белков проводился с целью идентификации возможных маркеров процессов, обуславливающих образование новых побегов при развитии в культуре *in vitro* *Dendrobium* sp. Спустя сутки после пассажа на среду видимых качественных и количественных изменений в составе полипептидов легкорастворимой фракции из туберидиев *Dendrobium* sp. по сравнению с контролем не происходило. На второй день культивирования наблюдалось увеличение количества полипептидов с молекулярной массой 16,1-16,8 кДа и снижение количества полипептидов с молекулярной массой от 12,1 до 14,2 кДа по сравнению с контролем и первым днем культивирования (рис.1). На следующие сутки количество 16,1-16,8 кДа белков снижалось и возрастало количество 12,1-14,2 кДа группы полипептидов. На пятый день культивирования проявлялся полипептид с массой 91,8 кДа (рис. 1), а полипептиды 114,7; 101,6 и 85,9 кДа исчезали и появлялись снова 85,9 кДа на шестые и 114,7-101,6 кДа на седьмые сутки после высадки туберидиев на среду. Количество полипептидов 16,1-16,6 кДа и 12,1-14,2 кДа между пятым и седьмым днем менялось в противоположном направлении относительно друг друга: если интенсивность окрашивания 16,1-16,8 кДа зон уменьшалась (пятые и седьмые сутки), то 12,1-14,2 кДа увеличивалась и наоборот (шестые сутки). Количество 12,1-14,2 кДа полипептидов снова возрастало на тринадцатые–пятнадцатые сутки. Согласно данным денситограммы, количество полипептида 13,3кДа на седьмой день было максимальным. На девятые сутки наблюдалось резкое увеличение количества полипептида с молекулярной массой 30,7 кДа. Полипептидов с молекулярной массой выше 80 кДа не наблюдалось. На тринадцатые сутки снова появлялись 101,6 и 85,9 кДа полипептиды. На пятнадцатый день появлялся новый полипептид 96,1 кДа.

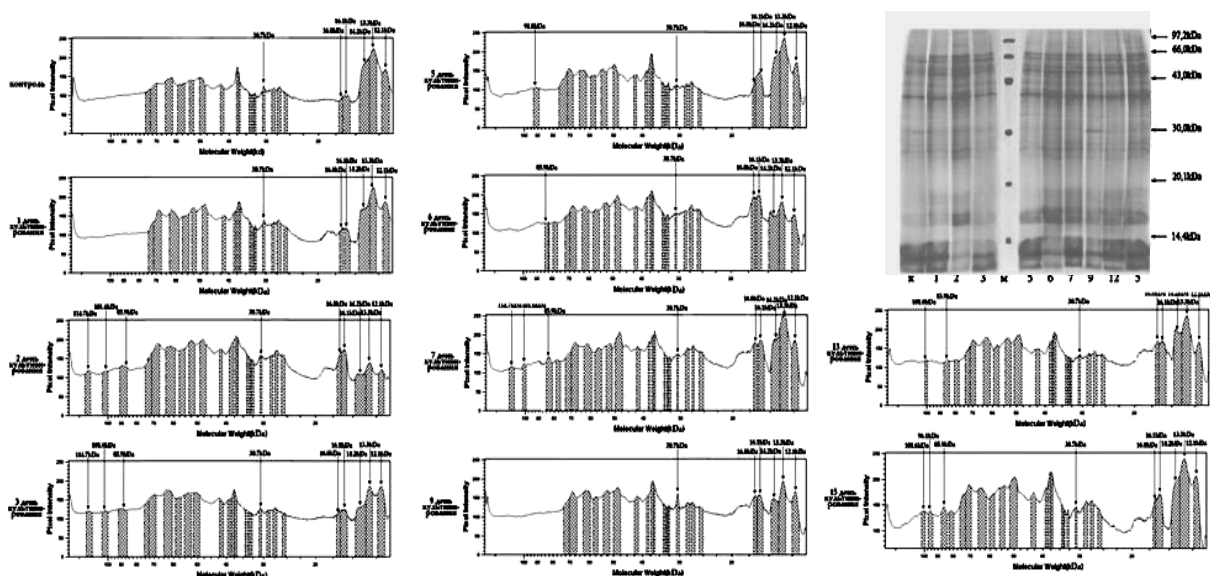


Рис. 1. Электрофорез и денситограммы фракции легкорастворимых полипептидов из туберидиев *Dendrobium* sp.

При изучении фракции мембраносвязанных белков из туберидиев *Dendrobium* sp. четких качественных и количественных различий по составу полипептидов в процессе индукции адвентивного побегообразования не выявлено. Количество белка остается практически неизменным с момента высадки на среду и до момента образования новых побегов. Наблюдается небольшое увеличение количества белка с молекулярной массой 11,9 кДа с пятого по девятый день культивирования.

Различия среди полипептидов клеточных стенок *Dendrobium* sp. определены для низкомолекулярных белков. Количество 21,2 кДа полипептида снижается на пятый–седьмой день и снова возрастает на девятый. Так же после пяти дней культивирования полностью исчезает 16,2 кДа полипептид и снова появляется на девятый день. Для всего периода культивирования характерна стабильная экспрессия полипептида с молекулярной массой 13,8 кДа. 11,2 кДа полипептид обнаружен на первый-третий, а так же девятый-тринадцатый дни культивирования эксплантов.

Как известно, процесс адвентивного морфогенеза состоит из трех стадий: приобретение компетенции, индукция и реализация [2]. В связи с этим можно предположить, что резкое увеличение количества 16,1-16,8 кДа полипептидов на второй день культивирования является показателем завершения приобретения компетенции и началом процесса индукции морфогенеза у *Dendrobium* sp. Так же об этом может свидетельствовать начало синтеза полипептидов с молекулярной массой 114,7-85,9 кДа. Предположительно, эти полипептиды могут являться субъединицами некоторых ферментов, в частности пероксидазы, которые рассматриваются рядом авторов как возможные маркеры различных стадий регенерации в культуре *in vitro* [3]. Новое увеличение количества 16,1-16,8 кДа полипептидов на шестой день культивирования и появление 114,7-85,9 кДа полипептидов на шестой-седьмой день может быть связано с началом процесса реализации. Так же на пятый день отмечено появление полипептида с молекулярной массой 91,6 кДа. В это же время показано снижение синтеза 21,2 кДа полипептида и прекращение синтеза 11,2 и 16,2 кДа полипептидов в клеточных стенках *Dendrobium* sp. Изменение количества 12,1 - 14,2 кДа легкорастворимых полипептидов, обратно коррелирующее с количеством полипептидов 16,1-16,8 кДа, так же может рассматриваться, как маркер процессов индукции и реализации при адвентивном побегообразовании у *Dendrobium* sp. Дальнейшие качественные и количественные изменения в составе полипептидов скорее всего связаны с началом синтеза соединений необходимых для роста новых побегов.

#### Выводы

В результате анализа электрофореграмм различных фракций белков выявлено двенадцать полипептидов фракции легкорастворимых белков и три полипептида из фракции белков клеточных стенок, которые могут быть использованы в качестве потенциальных маркеров процесса побегообразования у *Dendrobium* sp.

Однако, полученные данные не дают целостного представления о начальных стадиях процесса побегообразования у *Dendrobium* sp в культуре *in vitro*. Поэтому в последующих экспериментах предполагается проанализировать количественные изменения в составе нуклеиновых кислот, изменения изоферментного состава ряда энзимов (в частности, пероксидазы), а так же провести цитологические исследования для более точного определения стадий развития новых побегов *Dendrobium* sp в культуре *in vitro*.

#### Список литературы

1. Василевко В.Т. Модель переноса гена бактериальной полиглюкангидролазы ( $\beta$ -1,4-глюканазы) в растения табака как способ защиты растений фитопатогенов:

Автореф. дис. ... кандидата биол. наук / Центральный ботанический сад НАНБ. – Мн., 2002. – 23 с.

2. Моисеева Н. А. Молекулярные и клеточные механизмы морфогенеза в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. – С. 166-185.

3. Шан Х., Ли С.В., Ли Д., Шао С., Лиу Б. Дифференциальная экспрессия специфических белков при органогенезе томата *in vitro* // Физиология растений. – 2004. – Вып. 51. – № 3. – С. 422-328.

4. De Klerk G.-J., Arnhold-Schmitt B., Lieberei R., Neuman K.-H. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical, molecular aspects // *Biologia Plantarum*. – 1995. – Vol. 39. – № 1. – P. 53-66.

5. Murashige T., Skog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – V.15. – P.473-497.

6. Jimenez V.M., Bangerth F. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot // *Physiol. Plant.* – 2001. – Vol.111. – P. 389-395.

*Рекомендовано к печати д.б.н., проф. Митрофановой О.В.*