

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
ОТДЕЛ БИОХИМИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

**КЛЕТОЧНЫЕ ЯДРА И ПЛАСТИДЫ
РАСТЕНИЙ:
БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Сборник материалов Международной конференции,
г. Минск,
26-28 мая 2004 г.

Минск
УП «ТЕХНОПРИНТ»
2004

**Клеточные
ядра
и пластиды
растений:**

биохимия и биотехнология

26-28
Май 2004 МИНСК



СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СТЕБЛЕВЫХ И ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ МНОГОКОЛОСНИКА МОРЩИНИСТОГО В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Мазур Т.В., Бердичевец Л.Г., Фоменко Т.И.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси,
220012, г. Минск, ул. Сурганова 2В, e-mail: tmazur@inbox.ru

Переход клетки *in vitro* из дифференцированного состояния к дедифференцированному и активным клеточным делениям обусловлен изменением активности генов (эпигеномной изменчивостью). Активирование одних генов и репрессия других приводит к проявлению новых свойств и признаков.

Способность отдельной соматической клетки полностью реализовывать свою программу развития и давать начало целому растительному организму называют тотипотентностью растительной клетки. Любая растительная клетка обладает одинаковыми потенциальными возможностями, так как содержит весь набор генов и, следовательно, клетки сохраняют свойственную зиготе программу развития. Анализ литературных источников показывает, что у двудольных растений процесс репрессии и дерепрессии генов, лежащей в основе дедифференцировки, происходит легче, чем у однодольных [1]. Многочисленные исследования показали, что свойство тотипотентности не всегда реализуется, так как потенциальные возможности клеток разных типов проявляются неодинаково. В некоторых из них гены в сильной степени репрессированы в связи с чем проявление тотипотентности становится ограниченным.

В настоящее время считается, что морфогенез можно рассматривать как вторичную дифференцировку клеток, при этом дедифференцированные клетки вновь приобретают структуру и функции специализированных. В морфогенезе проявляется активность так называемых «компетентных клеток» [2].

В основе дифференцировки и морфогенеза лежит последовательное включение различных генов, т.е. дифференцировка

клеток определяется дифференциальной активностью генов. Основную роль в этом процессе играют фитогормоны [3].

Целью наших исследований являлось изучение влияния различных гормонов на морфогенетическую активность листовых и стеблевых эксплантов многоколосника морщинистого в культуре *in vitro*.

Многоколосник морщинистый (*Agastache rugosa* (Fisch. Et. Mey)) – многолетнее травянистое растение, которое относится к роду *Agastache* Clayt. Ex Gronow из сем. Lamiaceae Lindl. (яснотковых) и является пряно-ароматическим и лекарственным растением. Произрастает в естественных условиях в Восточной Азии, Центральном и Восточном Китае, Японии и на Дальнем Востоке. Многоколосник морщинистый широко используется в медицине, парфюмерии и пищевой промышленности, однако полный спектр его биологической активности еще не изучен. Основное свойство *Agastache rugosa* заключается в активизации иммунной системы и оптимизации обмена веществ. Многоколосник морщинистый способен снижать давление и обладает бактерицидным свойством за счет содержания эфирных масел. Кроме того, наличие биофлавоноидов предполагает использование его в качестве антиоксидантного средства. Изучение содержания биологически активных веществ показало, что многоколосник морщинистый накапливает значительное количество аскорбиновой кислоты и других восстановителей, что в сочетании с наличием железа ставит это растение в один ряд с известными гемостабилизирующими средствами [4].

Материалы и методы исследования. Для изучения морфогенетической активности многоколосника морщинистого использовали листовые и стеблевые экспланты растения, выращенного *in vitro*. Сегменты одинакового размера высаживали на питательные среды, содержащие минеральные соли по Мурашиге и Скугу, тиамин HCl (2 мг/л), пиридоксин HCl (0,8 мг/л), мезоинозит (100мг/л), гидролизат казеина (500 мг/л), 2% сахарозы и 0,8% агара с прибавлением различных концентраций фитогормонов, pH среды – 5,7. Использовали среды, содержащие: кинетин с концентрацией 1, 2, 3 и 4 мг/л и 0,2 мг/л ИУК; БАП (6-бензиламинопурин) – 1, 2, 3 и 4 мг/л с 0,2 мг/л ИУК. Культивирование проводили в темноте при температуре $24,5 \pm 0,5$ °C.

Результаты и их обсуждение. На способность изолированных растительных клеток к морфогенезу оказывают влияние как внутренние, так и внешние факторы. К внутренним факторам относятся: видовая принадлежность исходного растения, тип и функциональное состояние экспланта, возраст экспланта. К внешним факторам прежде всего относятся: состав питательной среды, температурный и световой режимы культивирования.

Экспериментальный органогенез может быть индуцирован варьированием содержания в среде веществ гормональной и трофической природы. Наиболее мощным индуктором морфогенеза является изменение соотношения между цитокининами и ауксинами, входящих в состав питательных сред [5,6].

В наших исследованиях проведено сравнение действия различных цитокининов (кинетин и БАП) на морфогенетическую активность листовых и стеблевых эксплантов многоколосника морщинистого.

В зависимости от гормонального статуса исследуемой ткани возможно различное проявление экзогенных гормонов, приводящее либо к каллусогенезу, либо морфогенезу.



Рис. 1. Образование адвентивных побегов на стеблевых эксплантах, культивируемых на средах, содержащих 3 мг/л кинетина и 0,2 мг/л ИУК.

В результате экспериментов выявлено, что при увеличении концентрации кинетина (от 1 мг/л до 4 мг/л) с 0,2 мг/л ИУК наблюдается увеличение образования адвентивных побегов. Показано, что при 1 мг/л кинетина и 0,2 мг/л ИУК инициируется каллусогенез и единичный ризогенез, при концентрации 2 мг/л кинетина – 33% регенерантов от общей суммы и наибольший процент регенерирующих эксплантов был выявлен при концентрации кинетина 3 мг/л (рис. 1).

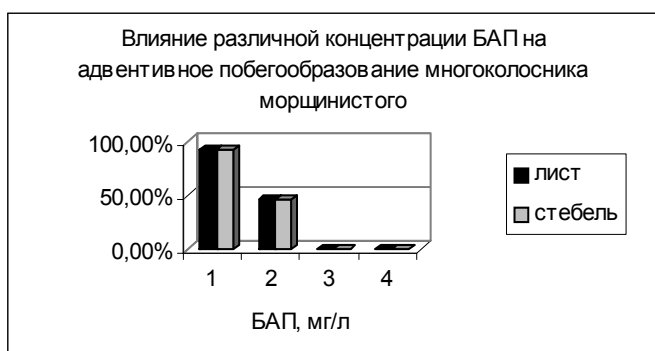
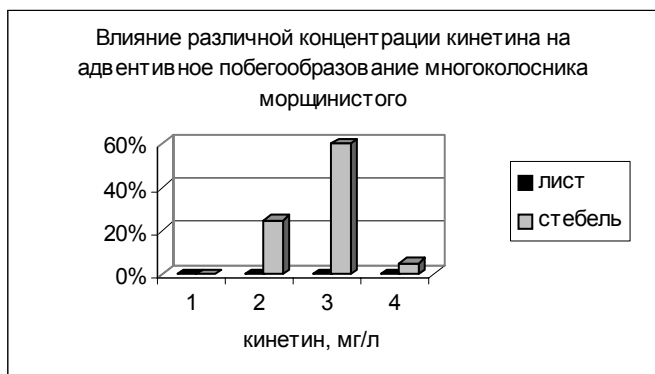


Рис. 2. Сравнительная характеристика морфогенетической активности многоколосника морщинистого на средах с добавлением различных концентраций кинетина и БАП.

При дальнейшем увеличении концентрации кинетина не отмечено положительного действия на развитие морфогенных процессов (рис. 2). Повышение концентрации приводило к потемнению и деградации ткани. В экспериментах показано, что при использовании кинетина адвентивное побегообразование характерно только для стеблевых эксплантов и количество регенерантов на эксплант колебалось от 1 до 4. На листовых эксплантах на данных культуральных средах наблюдали только краевой каллусогенез.



Рис. 3. Морфогенетическая активность многоколосника морщинистого на среде, содержащей 1 мг/л БАП и 0,2 мг/л ИУК.

При добавлении в среду 1 мг/л БАП и 0,2 мг/л ИУК (рис. 3), наблюдали более активное адвентивное побегообразование, однако дальнейшее увеличение концентрации БАП приводило к уменьшению интенсивности органогенеза и в конечном счете к некрозу тканей. При действии 1 мг/л БАП и 0,2 мг/л ИУК регенерировало 93,3% листовых и стеблевых эксплантов, тогда

как при концентрации БАП 2 мг/л – 46,6% листовых и стеблевых эксплантов (рис. 2). В то же время на стеблевых эксплантах количество регенерантов на эксплант колебалось от 2 до 6, а на листовых от 1 до 4.

Таким образом, можно сделать вывод, что процесс органо-генеза у многоколосника морщинистого зависит от типа экспланта и соотношения гормонов группы цитокининов и ауксинов (кинетина, БАП; ИУК). Показано, что наилучшее адвентивное побегообразование характерно для стеблевых эксплантов, так как при добавлении в среду кинетина на листовых эксплантах инициация морфогенеза не происходит, а с добавлением в среду БАП количество регенерантов на эксплант меньше, чем на стеблевых. Следует также отметить, что при добавлении БАП в среду культивирования наблюдается наиболее интенсивное адвентивное побегообразование.

ЛИТЕРАТУРА

1. Моисеева Н.А. Молекулярные и клеточные механизмы морфогенеза в культуре клеток растений. Сб. «Биология культивируемых клеток и биотехнология растений». М. «Наука», 1991. С. 166-185.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учебное пособие. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
3. Сельскохозяйственная биотехнология. Под редакцией В.С. Шевелуха. М.: Высшая школа, 1998. С. 29-36.
4. Кухарева Л.В., Тычина И.В., Курчавая А.И., Эльшевич А.В. Многоколосник морщинистый при интродукции в Белоруссию. Материалы докладов международной конференции. 31 мая – 2 июня. Минск, 1999. С. 71-72.
5. Reinert J. // Aspects of organization-organogenesis and embryogenesis. – In: Plant tissue and cell culture: Botanical monograph / Ed. H. E. Street. Oxford: Blackwell. Sci. Publ. 1973. vol. 11. P. 338-355.
6. Skoog F., Miller C.O. // Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol., 1957. 11. P. 118-131.