

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



СРАВНЕНИЕ АКТИВНОСТИ МОРФОГЕНЕЗА ДЛИТЕЛЬНО ПАССИРУЕМЫХ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР *NICOTIANA TABACUM*

Решетников В.Н., Фоменко Т.И., Бердичевец Л.Г., Малюш М.К.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси,
220012, Беларусь, г. Минск, ул. Сурганова, 2В,
e-mail: biolog@it.org.by

Введение и состояние вопроса. Переход клетки *in vitro* из дифференцированного состояния к дедифференцировке и активным клеточным делениям обусловлен эпигеномной изменчивостью. Существует несколько путей, по которым может идти развитие клетки после ее дедифференциации. Одним из них является вторичная дифференцировка клетки и регенерация целого растения.

Система культивирования клеток и тканей *in vitro* предоставляет возможность моделирования различных морфогенетических процессов, которые в нормальном онтогенезе протекают сопряженно. Наиболее мощным индуктором морфогенеза является соотношение между цитокининами и ауксинами, входящими в состав питательной среды. Различная реакция на условия культивирования *in vitro* проявляется в отношении частоты индукции каллусов и регенерантов. Эти показатели могут варьировать в зависимости от многих факторов. Объективной причиной, сдерживающей изучение клеточных и молекулярных основ морфогенеза в культуре *in vitro*, является низкая эффективность и несинхронность морфогенетических процессов для большинства видов [1,2]. Литературные данные показывают, что величина морфогенного потенциала культивируемых клеток составляет менее 1%, что означает сложность стабилизации данного процесса даже для хорошо разработанных модельных объектов [3]. Информация о временной реализации стеблевого морфогенеза в культуре *in vitro* в основном получена в системах, в которых клеточным источником адвентивных побегов являются не каллусные клетки, а дифференцированные клетки экспланта и первичного каллуса. Одним из наименее

изученных вопросов является ослабление морфогенного потенциала каллусных культур при длительном культивировании.

Объекты и методы. В работе использовали экспланты и каллусные культуры табака различных пассажей, полученные из листа и стебля на среде MS [4], содержащей 1мг/л ИУК и 0,1 мг/л БАП. Культуры поддерживали в термостате в темноте при температуре 25-26 °С. Пассирование каллусов проводили через три недели. Для индукции морфогенеза использовали среду MS, содержащую 0,1 мг/л ИУК и 1 мг/л (I) или 2 мг/л БАП (II).

Активность пероксидазы определяли по методу Бояркина (5).

Результаты и обсуждение. В рамках морфогенетических процессов, реализующихся в культуре *in vitro*, происходит дифференциация клеток, что, в конечном счете, приводит к возникновению клеток разных типов. Очевидно, что морфогенетической единицей индивидуального побега можно считать «компетентную» клетку. Временная сопряженность этих процессов говорит о существовании генетических систем, контролирующих дифференциацию клеток и морфогенез.

В данной работе дан сравнительный анализ уровня морфогенеза исходных эксплантов листа и стебля табака и каллусных тканей различных пассажей. Были использованы активно растущие каллусные культуры 1, 7, 19 и 27-го пассажей идентичные по фенотипическим показателям.

Для индукции морфогенеза каллусы переносили на среды, отличающихся по содержанию цитокинина – 1 мг/л и 2 мг/л БАП. Учет появления побегов проводили на 15, 20, 30 и 40-й день культивирования. Исследование динамики появления побегов (табл. 1, 2) показало существенную разницу во времени инициации побегообразования и скорости их развития. Эффект различных концентраций БАП был наиболее заметен в первые недели культивирования. Так, на 15-й день культивирования у всех эксплантов листа на среде, содержащей 2 мг/л БАП, отмечена морфогенная реакция, в то время как для ткани стебля этот показатель составил 43,8%, а на среде, содержащей 1 мг/л БАП, 71,4% листовых и 10% стеблевых эксплантов проявили морфогенную реакцию.

Таблица 1

Динамика морфогенной активности исходных эксплантов и пассируемой каллусной ткани листа в процессе культивирования на средах с 1 мг/л (I) и 2 мг/л БАП (II)

Пассаж	Среда	Морфогенная активность, %			
		15 дней	20 дней	30 дней	40 дней
0	I	71,4	100,0	100,0	100,0
	II	100,0	100,0	100,0	100,0
1	I	9,5	33,3	95,2	95,2
	II	28,6	61,9	85,7	100,0
7	I	4,8	4,8	4,8	33,3
	II	0	14,3	66,7	81,0
19	I	0	0	19,0	38,1
	II	0	0	28,6	47,6
27	I	0	0	14,3	28,6
	II	0	0	9,5	38,1

Таблица 2

Динамика морфогенной активности исходных эксплантов и пассируемой каллусной ткани стебля в процессе культивирования на средах с 1 мг/л (I) и 2 мг/л БАП (II)

Пассаж	Среда	Морфогенная активность, %			
		15 дней	20 дней	30 дней	40 дней
0	I	10,0	55,0	80,0	90,0
	II	43,8	81,3	81,3	93,8
1	I	28,6	33,3	61,9	81,0
	II	14,3	33,3	95,2	100
7	I	0	0	19,0	28,6
	II	0	0	23,8	57,1
19	I	0	0	38,1	95,2
	II	0	4,8	57,1	100
27	I	0	0	0	0
	II	0	0	0	0

В длительно пассируемом каллусе регенерация побегов отмечена только для листового каллуса 7-го пассажа (4,8%). Через три недели культивирования экспланты листа дали 100% регенерации на обеих средах, в то время как экспланты стебля не показали такого уровня ни на одной среде. К 20-му дню отмечено усиление тенденции развития регенерации побегов в каллусе 7-го пассажа на среде, содержащей 1 и 2 мг/л БАП, только для каллуса листового происхождения. В листовых каллусах 19-го и 27-го пассажа морфогенная реакция проявилась только к 30-му дню культивирования для обеих концентраций БАП. Следует отметить, что к 40-му дню культивирования морфогенная активность длительно пассируемых каллусов стебля 19-го пассажа достигла уровня 95-100%. При увеличении срока культивирования ткани в условиях, индуцирующих стеблевой морфогенез, количество побегов, возникающих в ткани, возрастает, причем пропорционально увеличению срока действия экзогенных гормонов. В связи с этим становится очевидным значение фактора времени в процессе детерминации развития индивидуального побега. Время, за которое каллусные клетки приобретают это свойство, варьирует в довольно широких пределах, что особенно проявляется на длительно пассируемых каллусах.

По окончании эксперимента измеряли также длину побегов, которые подразделяли на группы в зависимости от их величины: R1 – 3-10 мм, R2 – 11-30 мм, R3 – более 30 мм.

На рисунках 1 и 2 продемонстрирована активность побегообразования по числу регенерантов каждой группы на эксплант в культуре ткани листа и стебля табака в зависимости от длительности пассирования исходных культур. Анализ данных показал, что на среде содержащей 2 мг/л БАП каллусная ткань стеблевого происхождения показывала результат по числу регенерантов на эксплант в 2-2,5 раза выше по сравнению со средой содержащей 1 мг/л БАП. Данная закономерность сохранялась во всех пассажах, кроме 27, где не было отмечено ни какой морфогенной активности. Для листа по средам отмечена аналогичная зависимость, однако амплитуда колебаний по пассажам значительно шире – 1,3-7 раза. В 19-ом пассаже каллуса стеблевого

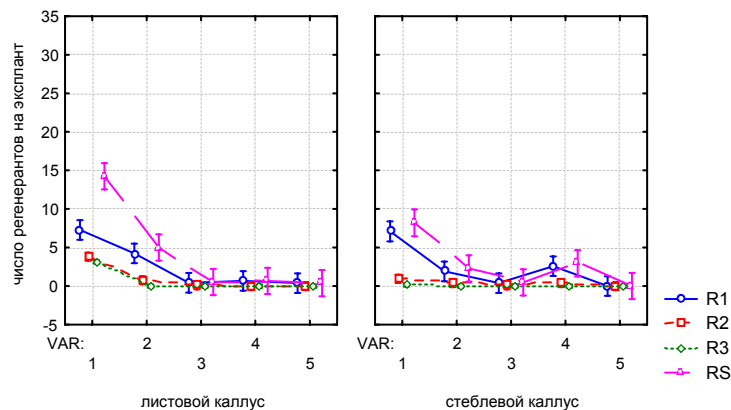


Рис. 1. Активность морфогенеза листовых и стеблевых каллусов различных пассажей на среде МС, содержащей 1 мг/л БАП. Обозначение 0, 1, 7, 19, 27 пассажей соответствует VAR 1, 2, 3, 4, 5. Распределение побегов на группы по размерам в мм: **R1** – 3-10, **R2** – 11-30, **R3** – более 30; **RS** – общее число побегов.

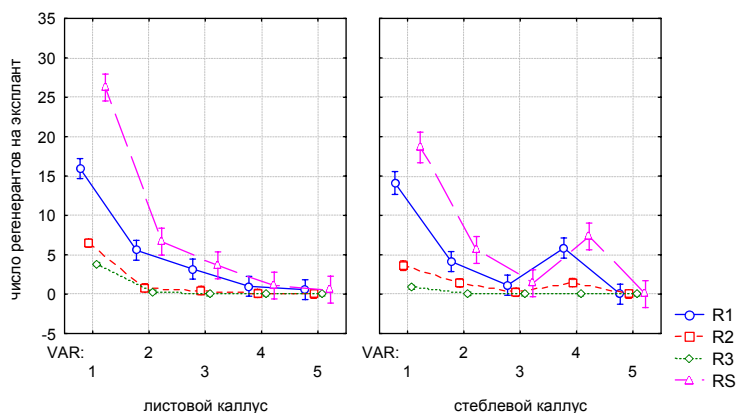


Рис. 2. Активность морфогенеза листовых и стеблевых каллусов различных пассажей на среде МС, содержащей 2 мг/л БАП. Обозначение 0, 1, 7, 19, 27 пассажей соответствует VAR 1, 2, 3, 4, 5. Распределение побегов на группы по размерам в мм: **R1** – 3-10; **R2** – 11-30; **R3** – более 30; **RS** – общее число побегов.

происхождения произошел резкий скачок в увеличении числа регенерантов в 5-7 раз по сравнению с листовым каллусом. Необходимо отметить, что в 27-ом пассаже морфогенез отмечен только у каллусов листового происхождения, причем все регенеранты имели размер 3-10 мм.

Анализ данных распределения адвентивных побегов по группам в зависимости от их размеров показал, что длительность культивирования отражается и на этих показателях (рис. 3, 4). В культуре 0-го и 1-го пассажей представлены побеги принадлежащие ко всем группам, однако для стеблевой культуры более 75% побегов представлено группой R1. В 7-ом пассаже исчезают регенеранты, принадлежащие группе R3 и основная масса побегов представлена группой R1. В 19-ом пассаже адвентивные побеги для листовых каллусов представлены группой R1, в то время как у стеблевых каллусах до 20% сохраняется тенденция развития побегов группы R2. В 27-ом пассаже у листовых каллусов присутствуют регенеранты только группы R1. Установлено, что размер побегов во всех пассажах существенно не зависел от концентрации БАП.

Каллусы различных пассажей были идентичны по фенотипическим показателям. Однако анализ ферментативной активности показал их различие. Согласно литературным данным для неморфогенных культур характерно уменьшение общей пероксидазной активности и обеднение спектра пероксидаз [6]. Приводятся данные, в которых увеличение лигнификации культивируемых тканей и предшествующее ей увеличение пероксидазной активности рассматривается как один из атрибутов и маркеров морфогенеза [7,8]. Исследование уровня активности пероксидазы позволило установить прямую корреляцию между уровнем активности фермента каллусных тканей и последующей выраженностью морфогенных процессов (табл. 3). Так в наших исследованиях показано, что число побегов на эксплант у стебля на среде, содержащей 2 мг/л БАП, в 2-2,5 раза выше, чем на среде, содержащей 1 мг/л БАП. Для ткани листа и каллусов сохраняется аналогичная зависимость, однако, амплитуда колебаний этого показателя в пассажах каллусов шире. В каллусе стеблевого происхождения 19-го пассажа число побегов на эксплант в 5-7 раз выше, чем в листовом каллусе. Этот

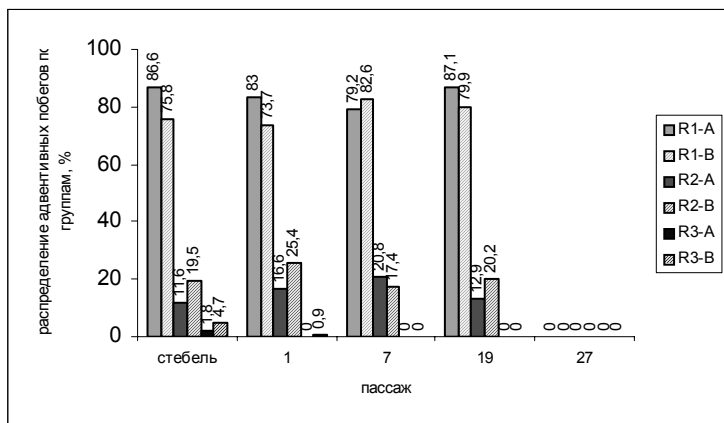


Рис. 3. Влияние концентрации БАП на размер адвентивных побегов стеблевых каллусов различных пассажей. Распределение побегов на группы по размерам в мм: **R1** – 3-10; **R2** – 11-30; **R3** – 30 и более. Концентрация БАП в мг/л: **A** – 1; **B** – 2.

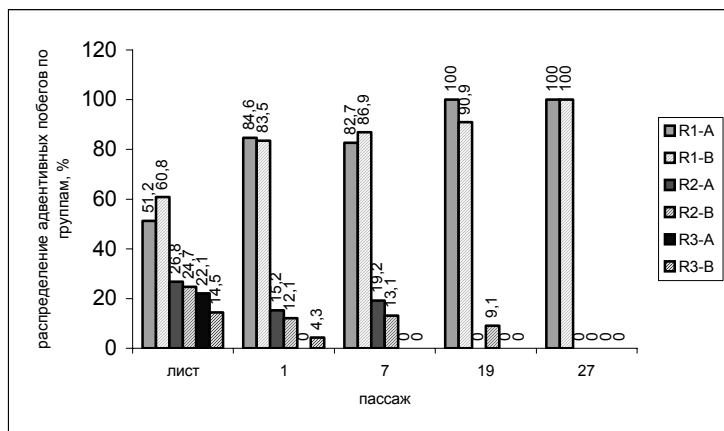


Рис. 4. Влияние концентрации БАП на размер адвентивных побегов листовых каллусов различных пассажей. Распределение побегов на группы по размерам в мм: **R1** – 3-10; **R2** – 11-30; **R3** – 30 и более. Концентрация БАП в мг/л: **A** – 1; **B** – 2.

скачок морфогенной активности сопровождается значительным снижением уровня активности пероксидазы, который становится почти идентичен активности пероксидазы в каллусе нулевого пассажа, отличающегося высоким уровнем побегообразования. В то же время самый высокий уровень пероксидазной активности, отмеченный для каллуса стебля в 27-ом пассаже, совпадает с полным отсутствием морфогенной реакции. Данные, приведенные в таблице, отражают уровень ферментативной активности исследуемых тканей. Показано, что уровень пероксидазы пассируемых каллусов листа коррелирует со способностью ткани к индукции побегов для каллусов всех пассажей.

Таблица 3

Пероксидазная активность эксплантов и каллусов табака

Экспланты		Содержание белка в мкг/мг сырой массы	Активность пероксидазы ед. опт. плотности	
Тип экспланта	№ пассажа		на г сырой массы в сек	на мкг белка в сек
Лист		14,3±0,2	42,4±0,6	3,0±0,1
Листовой каллус	1	3,4±0,1	29,6±0,4	8,7±0,1
	7	1,8±0,1	41,2±0,5	22,2±0,2
	19	1,5±0,1	31,0±0,4	20,2±0,5
	27	1,7±0,1	45,7±0,3	27,0±0,2
Стебель		6,4±0,2	66,9±0,3	10,4±0,3
Стеблевой каллус	1	3,0±0,1	24,4±0,4	8,0±0,2
	7	1,4±0,1	43,1±0,2	29,8±0,1
	19	1,7±0,1	21,8±0,4	11,8±0,2
	27	1,4±0,1	77,6±0,1	54,2±0,1

Многочисленные публикации отмечают, что у всех каллусных тканей в процессе культивирования начиная уже с четвертого пассажа заметно снижается, а затем полностью утрачивается способность к регенерации. Показано, что для большинства видов не удастся получить растения регенеранты в длительно пассируемой культуре [9]. В этой связи необходимо отметить некоторую исключительную отзывчивость табака как культурального объекта. Приведенные результаты показывают, что возможна индукция активного морфогенеза и в каллусных культурах, пассируемых в течение длительного периода, однако, переключение с программы недифференцированного роста на редифференциацию происходит значительно сложнее, чем перевод дифференцированных тканей к пролиферации каллуса. В настоящее время существует представление, что подбор составляющих запуска морфогенеза является сложным процессом. Морфогенез в каллусных культурах протекает асинхронно и продолжительно.

Выводы. Представленные нами результаты показали различную морфогенную реакцию для каллусов листового и стеблевого происхождения даже в длительно пассируемой культуре, что подтверждает тезис о доминирующем значении генетической информации клеток экспланта. Экспериментальные данные показали, что длительно культивируемые каллусные культуры табака сохраняют морфогенный потенциал со значительным ослаблением в процессе пассирования. Исследования показали корреляцию между морфогенной и ферментативной активностью каллусных культур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Моисеева Н.А. Молекулярные и клеточные механизмы морфогенеза в культуре ткани растений // В сб. Дифференцировка и морфогенез в культуре тканей и клеток. 1991. М. Наука. С.166-185.
2. Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дифференцировки и каллусообразования *in vitro*// Физиология растений, 1999, 46, № 6. С.919-929.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М. ФБК-Пресс. 1999. 160 с.

4. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures// *Physiol. plantarum*. 1962. V.15. P. 473-497.
5. Большой практикум по физиологии растений. М. Высшая школа. 1978.С.284-285.
6. Chaudry Z., Rashid H., Qurashi A. Analylisis of protein and peroxidase from embryogenic and non-embryogenic cultures of *Citrus reticulata* // *Pakistan J. Sci. and Ind. Res.* 1993. V. 36. P. 20-22.
7. Coppen S.L., Dewitte D. Esterase and peroxidase zymograms from barley (*Hordeum vulgare* L.) callus as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis // *Plant Sci.* 1990. V. 67. P. 97-105.
8. Румянцева Н.И., Валиева А.И., Самохвалова Н.А. и др. Особенности лигнификации клеточных стенок каллусов гречихи, различающихся по способности к морфогенезу// *Цитология*. 1998. Т.40, № 10. С.835-843.
9. Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биология. 1998. М. Высшая школа. 412 с.