

## МОРФОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ДЛИТЕЛЬНО ПАССИРУЕМЫХ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР *NICOTIANA TABACUM*

В.Н. РЕШЕТНИКОВ, доктор биологических наук;  
Т.И. ФОМЕНКО, кандидат биологических наук;  
А.А. КУЗОВКОВА, кандидат биологических наук,  
Л.Г. БЕРДИЧЕВЕЦ; М.К. МАЛЮШ

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Беларусь

### Введение

Клетки длительно пассируемых каллусных культур *in vitro* характеризуются снижением или даже полной утратой способности к вторичной дифференцировке и регенерации растений [3, 7]. В пассируемом каллусе реализуется только генетическая программа функционирования дедифференцированных клеток и не осуществляется переход к программе дифференцировки при создании соответствующих условий [3, 4]. Поэтому при проведении исследований необходимо оценить морфогенный потенциал многократно пассируемого каллуса и установить временную точку, в которой каллусные клетки теряют способность к морфогенезу. Важным является и выяснение зависимости величины морфогенного потенциала длительно пассируемых каллусных клеток табака от типа первичного экспланта.

С этой целью нами были проанализированы каллусы табака стеблевого и листового происхождения (продолжительность культивирования – 3 года). Известно, что реализация программ развития растительных тканей сопровождается изменением экспрессии генов растений, однако до сих пор не выяснено, какие гены могут являться маркерами отдельных процессов развития. В связи с этим особое внимание было уделено семейству генов пероксидаз (ПО), экспрессия которых, как установлено рядом авторов, контролируется факторами развития [9, 12].

#### Объекты и методы исследования

Для опытов и анализа использовали листья и стебли 40-дневных растений табака, выращенных в колбах, в стерильных условиях на 1/2 среде Мурасиге и Скуга (МС), при температуре 22-25°C, освещенности 3-5 клк, фотопериоде 16 ч. Образование первичного каллуса индуцировали переносом эксплантов листового и стеблевого происхождения на среду МС, содержащую 1 мг/л ИУК и 0,1 мг/г БАП, с последующим пассированием каллусов через 3 недели на этой же среде. Морфогенез в каллусе инициировали и поддерживали на среде МС с 2 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИУК. Морфогенный потенциал оценивали по количеству эксплантов с адвентивными побегами (АП) (в % к общему числу эксплантов). Оценку экспрессии генов ПО проводили по активности их белкового продукта, а также анализируя изоферментные спектры. Активность пероксидазы (ПО) определяли по методу Бояркина [1]. Экстракцию изоформ основной ПО проводили по методу Сафоновых [6] с модификацией, используя 50 мМ трис-НСI буфер (рН 7,6), содержащий 5 мМ аскорбата. Содержание белка в образцах определяли по Bredford [11]. Электрофоретическое разделение ПО проводили в 7,5% ПААГ в нативной щелочной системе. Активность ПО в геле обнаруживали бензидиновым методом в модификации Чайновой и Хавкина [8], используя на всех этапах 0,1М ацетатный буфер рН 4,5. Уровень активности отдельных изоформ ПО оценивали с помощью программы SigmaGel по данным денситометрирования.

#### Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ индукции морфогенеза эксплантов листа и стебля табака показал, что на 15 сут культивирования на морфогенной среде все листовые экспланты проявляли морфогенную реакцию, в то время как для ткани стебля этот показатель на 15 сут составил 43,8 и 93,8% – на 40 сут культивирования (табл. 1). Что касается первичных каллусов табака, то на 15 сут культивирования только у 28,6% каллусов листового и у 14,3% стеблевого происхождения отмечено адвентивное побегообразование, хотя к 40-м сут все экспланты независимо от их типа демонстрировали 100% морфогенную реакцию.

Таблица 1

#### Динамика морфогенной активности эксплантов и пассируемого каллуса из листа и стебля табака в процессе культивирования на среде для индукции морфогенеза

Число пассажей на среде для каллусообразования	Тип экспланта	Эксплантов с АП, %			
		Продолжительность культивирования на среде для индукции морфогенеза (1-й пассаж), сут			
		15	20	30	40
0	лист	100,0	100,0	100,0	100,0
	стебель	43,8	81,3	81,3	93,8
1	лист	28,6	61,9	85,7	100,0
	стебель	14,3	33,3	95,2	100,0
7	лист	0	14,3	66,7	81,0
	стебель	0	0	23,8	57,1
19	лист	0	0	28,6	47,6
	стебель	0	4,8	57,1	95,2
27	лист	0	0	9,5	38,1
	стебель	0	0	0	0

В длительно пассируемом каллусе морфогенный потенциал значительно снижается, и, например, к 30-м сут культивирования только у 9,5% каллусов листового происхождения, при 27

пассаже отмечена регенерация побегов, а к 40-м сут – у 38,1% эксплантов. При этом каллусы стеблевого происхождения после 27 пассажа вовсе не проявляли морфогенной реакции, хотя у тех же каллусов после 19 пассажей к 30-м и 40-м сут культивирования был зафиксирован высокий процент образования побегов.

Дальнейшее длительное пассирование каллусов из листа и стебля табака на среду, содержащую 1 мг/л ИУК и 0,1 мг/г БАП (40, 50 и 58 пассажи), существенно ослабляло их морфогенный потенциал, хотя следует указать, частота пролиферации у данных каллусов была выше, чем у каллусов 7, 19 и 27 пассажей. Только двукратная пересадка каллусов 40-го и 52-го пассажей на среды для инициации морфогенеза привела к побегообразованию (табл. 2).

Таблица 2

**Динамика морфогенной активности длительно пассируемых каллусов из листа и стебля табака при культивировании на среде для индукции морфогенеза**

Число пассажей на среде для каллусообразования	Тип экспланта	Число пассажей на среде для индукции морфогенеза			
		2		3	
		Эксплантов с АП, %	Число побегов на эксплант	Эксплантов с АП, %	Число побегов на эксплант
40	лист	52,4	3,5±2,0	100	5,2±4,1
	стебель	14,3	1,4±0,8	100	6,8±3,7
52	лист	47,6	4,2±1,9	100	16,0±3,1
	стебель	19,0	3,8±1,4	100	9,5±4,9
58	лист	0	0	54,5	6,0±1,5
	стебель	0	0	10,0	2,0±1,2

Интересно, что длительно пассируемый каллус 58 пассажа проявлял морфогенную реакцию лишь после трехкратной пересадки на среду с 0,1 мг/л ИУК и 2 мг/л БАП. По нашему мнению, такая ситуация обусловлена тем, что длительное пассирование на среду для индукции каллусообразования приводит к насыщению тканей ауксинами, способствующих активной пролиферации дедифференцированных клеток, поэтому однократного пассажа на среду для индукции морфогенеза недостаточно для его проявления в каллусах уже к 19 пассажию. Эксперимент показал, что только дальнейшее пассирование каллуса на данной среде реализует программу самого морфогенеза.

Следует отметить, что увеличение срока культивирования каллуса в условиях, индуцирующих адвентивное побегообразование, способствует увеличению количества побегов на эксплант. В связи с этим становится очевидным значение фактора времени в процессе детерминации развития индивидуального побега. Период, за который каллусные клетки приобретают это свойство, варьирует в довольно широких пределах, что особенно проявляется у длительно пассируемых каллусов.

Также нами установлена обратная зависимость между уровнем активности ПО каллуса и последующей выраженностью морфогенных процессов: чем ниже уровень активности пероксидазы, тем выше морфогенная активность длительно пассируемых каллусов (сравнение данных из табл. 2 и 3).

ПО в растениях кодируется семейством генов, экспрессия которых регулируется факторами окружающей среды и развития, вследствие чего в клетках выявляются несколько ее изоформ. Некоторые из этих изоформ рассматривают как маркерные ферменты ряда процессов развития растений [5].

Нами установлено, что для табака существуют изоформы, общие для процессов дифференциации и дедифференциации клеток, и изоформы – маркеры этих процессов: а) ПО с  $R_f$  0,14 и 0,21 – маркерные ферменты дедифференциации клеток табака; б) в длительно пассируемом каллусе стеблевого происхождения время начала экспрессии изоформы ПО с  $R_f$  0,50 не определяется возрастом дедифференцированных клеток; в) ПО с  $R_f$  0,11 является маркером инициации и развития морфогенных процессов только в листовой ткани табака; г) экспрессия ПО с

$R_f$  0,26; 0,51 и 0,65 – это особенность полностью дифференцированных тканей как листа, так и стебля табака; д) изоформы основных ПО с  $R_f$  0,02; 0,17; 0,45; 0,47; 0,52 и 0,61 не имеют четко выраженной функции в реализации какой-то одной программы развития клеток табака; 3) существует обратная зависимость по количеству изоформ основных ПО между первичными и длительно пассируемыми каллусами.

Таблица 3

**Пероксидазная активность эксплантов листового и стеблевого происхождения и пассируемых каллусов табака, культивируемых на среде, содержащей 1 мг/л ИУК и 0,1 мг/г БАП**

Число пассажей на среде для каллусообразования	Тип экспланта		Активность пероксидазы, у.е.	
			на г сырой	на мкг белка
	лист		42,4 ± 0,6	3,0 ± 0,1
	стебель		66,9 ± 0,3	10,4 ± 0,3
1	каллус из	листа	29,6 ± 0,4	8,7 ± 0,1
		стебля	24,4 ± 0,4	8,0 ± 0,2
7		листа	41,2 ± 0,5	22,2 ± 0,2
		стебля	43,1 ± 0,2	29,8 ± 0,1
19		листа	31,0 ± 0,4	20,2 ± 0,5
		стебля	21,8 ± 0,4	11,8 ± 0,2
27		листа	45,7 ± 0,3	27,0 ± 0,2
		стебля	77,6 ± 0,1	54,2 ± 0,1

В работах Бутенко, Румянцевой и др. [2, 5] показано, что для большинства видов не удается получить регенеранты в длительно пассируемой культуре. В этой связи необходимо отметить отзывчивость табака как культурального объекта.

### Выводы

Индукция активного морфогенеза в каллусных культурах, пассируемых в течение длительного периода, возможна, хотя морфогенный потенциал значительно ослабевает в процессе пассирования. Это обусловлено тем, что переключение с программы длительной дедифференциации клеток на редифференциацию адвентивных побегов происходит труднее, чем перевод дифференцированных тканей к пролиферации каллуса, что сопряжено с: остановкой реализации ранее действовавшей программы дедифференциации тканей; перестройкой на новую программу развития – дифференциацию клеток – при создании соответствующих условий для прохождения морфогенеза и осуществлением программы дифференцировки. Представленные нами результаты показали различную морфогенную реакцию для каллусов листового и стеблевого происхождения, что подтверждает тезис о доминирующем значении генетической информации клеток экспланта. Установлена корреляция между морфогенной и ферментативной активностью каллусных культур. Так процессы морфогенеза в каллусах табака сопровождаются инициацией экспрессии специфических пероксидаз.

### Список литературы

1. Большой практикум по физиологии растений. – М.: Высшая школа, 1978. – 392 с.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
3. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 3. Каллусообразование *in vitro* // Биополимеры и клетка. – 1997. – Т. 13, № 5. – С. 362-371.
4. Моисеева Н.А. Биология культивируемых клеток и биотехнология. – М.: Наука, 1991. – С. 166-185.

5. Особенности лигнификации клеточных стенок каллусов гречихи, различающихся по способности к морфогенезу / Румянцева Н.И., Валиева А.И., Самохвалова Н.А., Мухитов А.Р., Агеева М.В., Лозовая В.В. // Цитология. – 1998. – Т. 40, № 10. – С. 835-843.
6. Сафонов В.И., Сафонова М.П. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле // Биохим. методы в физиол. растений. – М.: Наука, 1971. – С. 113-119.
7. Фролова Л.В. Особенности популяций культивированных клеток // Культура клеток растений. – М.: Наука, 1981. – С. 5-16.
8. Хавкин Э.Е., Забродина М.В. Наследуемые изменения в спектрах пероксидаз и эстераз у соматклонов кукурузы // Физиология растений. – 1994. – Т. 41, № 6. – С. 859-867.
9. Хавкин Э.Е., Забродина М.В. Органоспецифичные спектры пероксидаз у кукурузы // Физиология растений. – 1995. – Т. 42, № 2. – С. 281-289.
10. Чайнова С.С., Хавкин Э.Е. Использование нейтрального полиакриламидного геля для изоферментного анализа пероксидаз и эстераз // Физиология растений. – 1990. – Т. 37. – С. 1037-1039.
11. Bredford M.M. A rapid sensitive method for the action of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248-254.
12. Van den Berg B.M., Wijsman H.J.W. Genetics of the peroxidase isoenzymes in *Petunia*. Part 1: Organ specificity and general genetic aspects of peroxidase isoenzymes // Theor. Appl. Genet. – 1981. – V. 60, N 2. – P. 71-76.

*Рекомендовано к печати д.б.н. Митрофановой И.В.*