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

CELL NUCLEI OF PLANTS — EXPRESSION 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

УДК 582.31/.9:581.17

Научные рецензенты:
В.М.Юрин, доктор биологических наук, профессор (БГУ)
З.Я.Серова, доктор биологических наук (ИЭБ им. В.Ф.Купревича)

Изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер высших растений, путей регуляторного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгенеза. Представлены отдельные проблемы взаимодействия генома и пластома, чужеродных геномов, а также вопросы регуляторного воздействия на органеллы и клетки фитогормонов.

Редакционная коллегия:
В.Н.Решетников, Н.В.Гетко, О.П.Булко,
Т.И.Фоменко, Е.В.Спиридович

Материалы конференции изданы благодаря финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований

©Центральный ботанический сад НАН Беларуси 2001

ВЛИЯНИЕ ЭПИБРАССИНОЛИДА НА ПОКАЗАТЕЛИ КАЛЛУСОГЕНЕЗА ЛИСТОВЫХ ДИСКОВ *NICOTIANA TABACUM L.*

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

Исследовано влияние обработки листовых дисков табака растворами эпибрассинолида (ЭБ) на изменения сырой массы, размеров клеток, ядер и содержания нуклеиновых кислот в клетках в ходе каллусогенеза. Обнаружена зависимость характера каллусогенеза от концентрации ЭБ. Обработка ЭБ в концентрациях $1x10^{-6}$М и $1x10^{-5}$М стимулировала деление и рост клеток, а также повлияла на динамику изменения уровня ДНК в клетке.

Введение. Клетки растительного экспланта в культуре in vitro подвергаются ряду воздействий и пребывают в условиях существования отличных от таковых в интактном растении. В соответствии с изменившимися условиями корректируется программа развития, клетки дедифференцируются и пролиферируют образуя каллус. При этом происходит повышение уровня геномной изменчивости, а условия каллусогенеза носят мутагенный характер, обуславливая повышенную изменчивость клеток in vitro [1,2].

Ростстимулирующие соединения в настоящее время представляют большой научный и практический интерес. К ним относится группа биологически активных стероидных соединений растительного происхождения — брассиностероиды (БС), которая насчитывает более трёх десятков как природных, так и синтетических представителей. Подобно классическим фитогоромонам, БС проявляют множественные эффекты на рост и развитие. Особый интерес вызывает высокая биологическая активность БС в количествах на несколько порядков меньших, чем у ауксинов, цитокининов, гиббереллинов. Спектр изменений на морфологическом, физиологическом и биохимическом уровнях в присутствии БС достаточно широк [3,4,5], и характер изменений в большинстве случаев зависит от концентрации этого агента и биологического состояния организма (стадии онтогенеза). Но если влияние БС на растительный организм in vivo более изучено, то в отношении эф-

фектов, вызываемых ими in vitro, существуют лишь отдельные разрозненные данные [6,7,8,9].

Целью наших исследований являлось системное изучение влияния различных концентраций эпибрассинолида (ЭБ) на ряд цитометрических, физиологических и биохимических параметров листовых дисков табака в ходе каллусогенеза. В частности, была рассмотрена динамика изменений массы эксплантов в ходе культивирования, средней массы клеток и количества клеток в экспланте, изменения содержания ДНК и РНК.

Материалы и методы исследования. В качестве первичных эксплантов использовали листовые диски растений табака 50-дневного возраста диаметром 5 мм. Экспланты культивировали на питательной среде для каллусогенеза RMKU [10] в чашках Петри в темноте при 25^0C в течение 30 дней. Перед пассажем листовые диски помещали на 3 часа в растворы ЭБ с концентрациями различных порядков от $1x10^{-8}$ до $1x10^{-5}$М. Количество и размеры клеток определяли в камере Фукса-Розенталя после мацерации ткани в смеси глицерин-12н. соляная кислота [11]. Содержание нуклеиновых кислот исследовали по методу Шмидта-Тангаузера в модификации [12]. Материал анализировали в три этапа: на 10-ый, 20-ый и 30-ый дни культивирования.

Результаты и обсуждение. При оценке динамики развития листовых дисков табака отмечено, что после первых десяти дней культивирования не наблюдалось заметных отличий в изменении сырого веса эксплантов (табл. 1). При этом материал в вариантах отличался более высоким содержанием сухих веществ (у эксплантов обработанных $1x10^{-6}$М ЭБ оно заметно выше, чем в исходном материале). Сопоставление этих данных с результатами цитометрических исследований (рис. 1, табл. 2) обнаруживает, что первая декада культивирования характеризуется активным делением клеток во всех вариантах. На это указывает уменьшение средней массы клетки (более чем в 3 раза) и увеличения числа клеток в экспланте (в несколько десятков раз). При анализе содержания нуклеиновых кислот был отмечен высокий уровень РНК во всех опытных вариантах, особенно в варианте с $1x10^{-7}$М ЭБ (рис. 2). Высокое содержание ДНК было отмечено в вариантах с $1x10^{-6}$М и $1x10^{-5}$М ЭБ (на 60% больше чем в контроле), в варианте с $1x10^{-8}$М ЭБ — ДНК было на 40% меньше, чем в контроле (рис. 3).

Таблица 1

Изменение средней массы каллусов табака в ходе культивирования на питательной среде для каллусогенеза после обработки ЭБ, г.

Срок культивирования	контроль	ЭБ($1x10^{-8}$М)	ЭБ($1x10^{-7}$М)	ЭБ($1x10^{-6}$М)	ЭБ($1x10^{-5}$М)
10 дней	0,047±0,019	0,052±0,028	0,0443±0,014	0,058±0,021	0,038±0,013
20 дней	0,380±0,127	0,328±0,084	0,2974±0,062	0,322±0,091	0,165±0,076
30 дней	0,586±0,151	0,709±0,155	0,550±0,158	0,697±0,214	0,806±0,229

*Средняя масса листового диска: 0,0034±0,00027г.

Таблица 2

Кратность изменения количества клеток в ходе каллусогенеза после обработки листовых дисков табака ЭБ.

Период культивирования	Контроль	ЭБ($1x10^{-8}$М)	ЭБ($1x10^{-7}$М)	ЭБ($1x10^{-6}$М)	ЭБ($1x10^{-5}$М)
1-ая декада	79,64	64,05	50,23	50,42	36,62
2-ая декада	1,23	1,03	1,55	2,58	2,97
3-ая декада	1,21	2,25	1,80	1,65	1,53
За весь срок культивирования	119,26	148,50	140,06	215,29	166,05

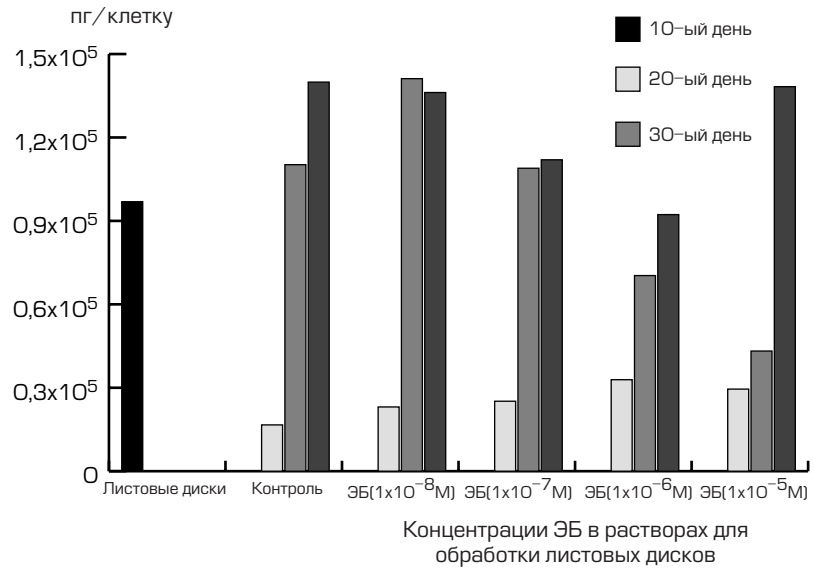

Рис.1 Изменение средней массы клетки в ходе каллусогенеза у листовых дисков табака обработанных ЭБ, пг

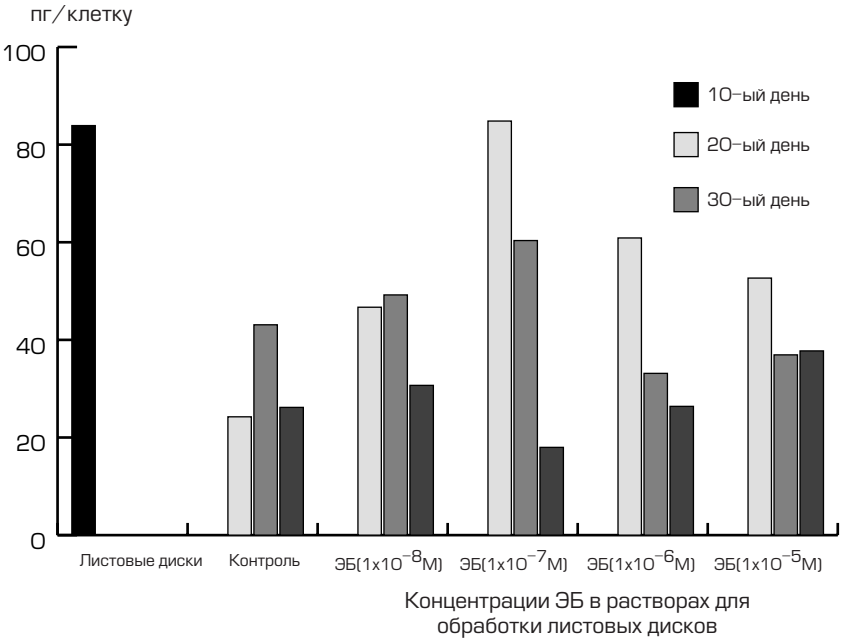

Рис.2 Изменение содержания в клетках РНК в ходе каллусогенеза у листовых дисков табака после обработки ЭБ, пг/клетку

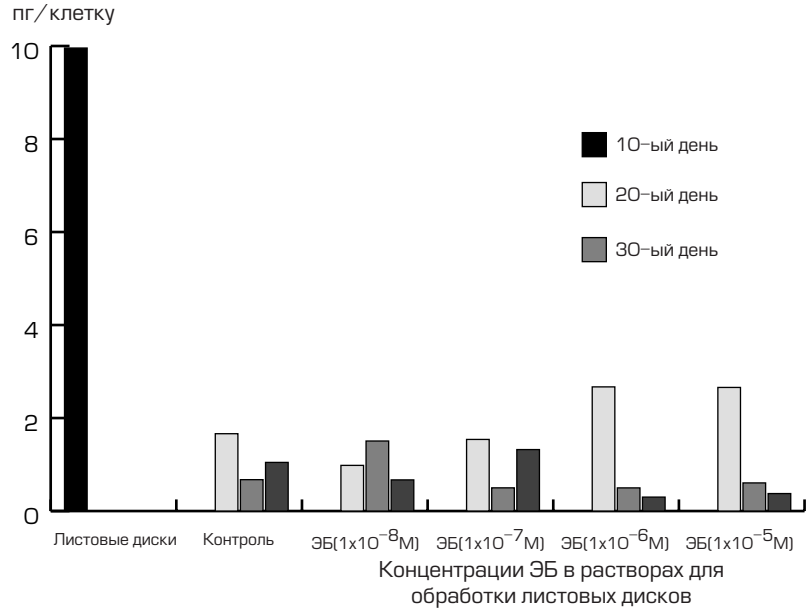

Рис.3 Изменение содержания в клетках ДНК в ходе каллусогенеза у листовых дисков табака после обработки ЭБ, пг/клетку

После 20-го дня культивирования сравнение средней массы экспланта выявило более интенсивное образование каллусов в контроле. Так средняя масса материала из варианта с использованием $1x10^{-5}$М ЭБ была меньше контроля более чем в два раза (табл. 1). Кроме того, вторая декада развития характеризовалась в контроле и в вариантах с $1x10^{-8}$М и $1x10^{-7}$М ЭБ преобладанием доли клеток вступивших в фазу роста. В вариантах с $1x10^{-6}$М и $1x10^{-5}$М ЭБ количество клеток в каллусе продолжало заметно увеличиваться, а средняя масса клетки возросла менее значительно (рис. 1, табл. 2). Количество РНК в клетках эксплантов контрольного варианта за вторую декаду возросло почти в два раза, в то время как в опытных вариантах (за исключением варианта с $1x10^{-8}$М ЭБ, где оно почти не изменилось) этот показатель заметно снизился (рис. 2). При этом наблюдалось значительное снижение содержания ДНК во всех вариантах кроме опыта с использованием $1x10^{-8}$М ЭБ. В этом случае количество ДНК возросло на 53% (рис. 3), показывая высокую избирательность к концентрации ЭБ.

На 30-ый день культивирования в опытных вариантах наблюдалась более активная пролиферация каллусной ткани. Особенно отличались варианты с $1x10^{-8}$М и $1x10^{-5}$М ЭБ. Здесь средняя масса экспланта превышала контрольный показатель на 22% и 38% соответственно (табл. 1). В этот же период для опытных вариантов оставалось характерным более значительное увеличение количества клеток в экспланте (табл. 2). При этом в варианте с $1x10^{-5}$М ЭБ был отмечен заметный рост средней массы клетки, однако, в вариантах с $1x10^{-8}$М и $1x10^{-7}$М ЭБ она практически не изменилась (рис. 1). Это свидетельствует о том, что в первом случае более значительная доля клеток ткани вступила в фазу роста и значительное увеличение массы каллусов произошло в основном за счет роста клеток, а в остальных случаях — за счет пролиферации клеток. К концу третьей декады содержание РНК в клетках уменьшилось как в контроле, так и в опытных вариантах за исключением варианта с $1x10^{-5}$М ЭБ, где значение рассматриваемого показателя практически не изменилось (рис. 2). Устойчивое снижение содержания ДНК в клетке сохранилось лишь в вариантах с $1x10^{-6}$М и $1x10^{-5}$М ЭБ (рис. 3).

Приведенные выше данные свидетельствуют о биологической активности различных концентраций ЭБ, о его влиянии на метаболизм нуклеиновых кислот и, возможно, как следствие, на процесс дедифференциации клеток ткани мезофилла листа и на характер следующего за ней каллусогенеза. В частности, в ходе нашего эксперимента было обнаружено, что в контрольном варианте дедифференциация клеток происходила, прежде всего, в местах повреждения ткани листа, то есть по краю листового диска, и именно эти клетки образовывали основную массу каллуса. При этом клетки центральной части экспланта содержали хлоропласты даже после 20 дней культивирования. По мере возрастания концентрации ЭБ роль раневой меристемы в образовании каллусной массы снижалась, а дедифференциацию претерпевала все большая доля клеток первичного экспланта. В частности, в варианте с $1x10^{-5}$М ЭБ хлоропласты в клетках практически не встречались уже после 10 дней культивирования. В результате пролиферации эти клетки формировали каллусную ткань более плотную по консистенции. Каллус из клеток раневой меристемы в варианте с $1x10^{-8}$М ЭБ оказался более рыхлым, чем в контроле.

При сопоставлении средних размеров клеток и ядер была выявлена тенденция к прямой зависимости их от концентрации ЭБ. Особенно наглядна эта зависимость в случае размера клеток (табл. 3). Кроме того, в опытных вариантах отмечено присутствие двуядерных клеток и заметное увеличение доли гигантских клеток (на 10-ый день культивирования в варианте с $1x10^{-5}$М ЭБ). Размеры последних почти на порядок превосходили средние размеры нормальных клеток экспланта. Ядра гигантских клеток также были более крупные по размеру, и их окружала сильно развитая сеть эндоплазматического ретикулума.

Таблица 3.

Зависимость среднего размера клеток и ядер каллусов табака от обработки листовых дисков растворами ЭБ различных концентраций

Вариант	Размер клетки	Размер ядра
контроль	1,37±0,48	0,57±0,12
ЭБ($1x10^{-8}$М)	1,44±0,27	0,55±0,05
ЭБ($1x10^{-7}$М)	1,66±0,20	0,59±0,10
ЭБ($1x10^{-6}$М)	1,71±0,69	0,60±0,10
ЭБ($1x10^{-5}$М)	2,01±0,42	0,64±0,13

Нестабильность генома — характерная черта клеток in vitro. В этом явлении имеет значение генетическая гетерогенность ткани пролиферирующей в первичный каллус. Играет важную роль и необычность условий питания ткани in vitro, что в свою очередь ведет к аномалиям в названных процессах.

В целом, полученные данные позволяют заключить, что обработка эпибрассинолидом в оптимальных концентрациях стимулирует процессы деления и роста клеток в ходе каллусогенеза у листовых дисков табака. Происходит это, вероятно, по причине влияния ЭБ на реорганизацию генома при каллусогенезе.

Благодарности

Выражаем искреннюю благодарность к.б.н. Булко О.П. за оказанную методическую помощь при подготовке и проведении экспериментов, а также д.х.н. Хрипачу В.А. и Жабинскому В.Н. за любезно предоставленный препарат ЭБ синтезированный в Институте биоорганической химии НАН Беларуси.

Литература

1 Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования in vitro. Физиология растений, 1999, 46, №6, с. 919-929.
2 Сидоров В.А. биотехнология растений. Клеточная селекция. – Киев: Наукова думка, 1990. 280с.
3 Clouse S.D. and Sasse J.M. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998 (49), p. 427-451.
4 Mandava NB. Plant growth promoting brassinosteroids. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1988 (39), p. 23-52.
5 Хрипач В.А., Лахвич Ф.А., Жабинский В.Н. Брассиностероиды. – Мн.: Навука і тэхніка, 1993.
6 Bach T., Roth P. and Thompson M. Brassinosteroids specifically inhibit growthof tobacco tumor cells. American Chemical Society. 1991 (474), p. 176-188.
7 Gaudinova A. at all. Different effects of two brassinosteroids on growth, auxin and cytokinin content in tobacco callus tissue. Plant Growth Regulation 1995 (12), p. 121-126.
8 Wilen R.W., Sacco M., Gusta L.V. and Krishna P. Effects of 24-epibrassinolide on freezing and thermotolerance of bromegrass (Bromus inermis) cell cultures. Physiologia Plantarum, 1995 (95), p. 195-202.
9 Roddick J.G., Rijnenberg A.L. and Ikekawa N. Developmental effects of 24-epibrassinolide in excised roots of tomato grown in vitro. Physiologia Plantarum, 1993 (87), p. 453-458.
10 Сидоров В.А. Пивень Н.Н., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Соматическая гибридизация паслёновых.- Киев. Наукова думка 1985.
11 Булко О.П., Самаль Т.Е. Разделение и подсчет клеток в растительных тканях// Весці АН БССР 1981 №4 с.101-103
12 Булко О.П., Горбацевич В.И., Королева Н.Ю. Методические подходы к определению содержания нуклеиновых кислот в каллусных тканях, полученных от эксплантов зародышей тритикале// Весці АН Беларуси 1985, №3 с.100-101

Summary

We investigate influence of treating of leaf disks of tobacco with solutions of epibrassinolid (EB) on changes of wet weight, the sizes of cells and nucleus and the content of nuclein acids in the cells during callusogenesis. Correlation of character of callusogenesis from concentration of EB is revealed. Treating with EB in $1x10^{-6}$M и $1x10^{-5}$M concentration stimulates division and growth of cells. It could be connected with differences in dynamics of change of DNA level in the cell.