

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 трансгеноза. 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

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ КАЛЛУСОГЕНЕЗЕ У РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ

Бердичевец Л.Г., Кондрацкая И.П., Малюш М.К., Фоменко Т.И., Володько И.Ф.

Центральный ботанический сад НАН Б

Минск, 220012, ул. Сурганова, 2В, e-mail: biolog@it.org.by

Исследована каллусогенная активность, полипептидный состав легкорастворимых белков и ферментативная активность пероксидазы каллусов клубня картофеля сортов Архидея, Яхант, Карлена, Аксамит, Скарб, Дельфин. Активная пролиферация каллуса отмечена для сортов Архидея, Дельфин, Карлена. На средах с различным содержанием гормонов получены каллусы, различающие по морфологическим и биосинтетическим потенциалам. Показаны изменения по активности пероксидазы и спектров легкорастворимых белков при дедифференциации ткани. Выявлены тканеспецифичные полипептиды для различного состояния каллусной культуры.

Введение. Широкое применение метода культуры ткани, быстрое его совершенствование, довольно большой объем публикаций в этой области не уменьшают интереса исследователей к его использованию при решении фундаментальных и прикладных проблем в области физиологии и биохимии растений. Двумя принципиальными особенностями культуры клеток растений как биологической системы является отсутствие организменного контроля развития и избыточный, не работающий в данных условиях, генетический материал. Мощным фактором, создающим гетерогенность клеток, являются условия культивирования и сам процесс перевода генотипа на новый уровень организации – тканевой и клеточный.

Каллусную ткань можно поддерживать в культуре неограниченно длительное время, периодически разделяя ее на фрагменты и пересаживая на новую среду. Аспекты использования каллусных культур тканей очень разнообразны [1-3]. В настоящее время каллусные культуры индуцируются практически из любого органа и ткани растения. Однако легкость этого процесса зависит от вида растения и ткани. Целью данной работы явилось исследование сортовых особенностей каллусогенеза картофеля.

Материалы и методы. Для сравнения каллусогенной активности клубневых эксплантов новых сортов картофеля (Архидея, Яхант, Аксамит, Карлена, Скарб, Дельфин), введенных в лабораторную коллекцию, была использована питательная среда, содержащая минеральные компоненты по MS, органические добавки (мг/л): мезоинозит - 100, глицин - 2, гидролизат казеина - 500, тиамин - 0,5, пиридоксин - 0,5, никотиновая кислота - 5, фолиевая кислота - 0,5, сахароза - 20 000. Исследованы среды с различным содержанием гормонов (ауксины - ИУК, α -НУК и 2,4 -Д; цитокинины - кинетин и БАП). Каллусы выращивали в темноте и на свету при 26°C с освещенностью 3-4 тыс.лк и 16-ти часовом фотопериоде. Активность пероксидазы определяли по А.Н.Бояркину [4]. Электрофорез белков проводили в ПААГе по Лэмли [5].

Результаты и обсуждение. Каллусные культуры различаются по интенсивности роста, по консистенции, окраске, способности зеленеть на свету и другим свойствам. Клеточные колонии на агаризованной среде могут быть плотными и рыхлыми, а также глобулярными, распадающимися на отдельные части. Консистенция каллусов зависит от многих факторов и в значительной степени от состава среды культивирования. Каллусные культуры различаются по морфологии и степени гетерогенности клеточных популяций, по морфологическим и биосинтетическим потенциалам.

Из рассмотренных нами вариантов была выбрана среда, содержащая 6мг/л α -НУК, на которой клубневые экспланты всех рассмотренных сортов образовывали каллус. Ежедневное наблюдение за активностью каллусообразования показало зависимость этого процесса от сортовой принадлежности экспланта. При культивировании клубневых эксплантов в темноте отмечена активная инициация каллуса уже на первой неделе. Некоторое отставание в развитии наблюдали для сортов Архидея и Яхант. В световом варианте, начиная со второй недели роста, прослеживается та же закономерность для этих сортов. В последующие недели шло нарастание каллусной массы с опережающим развитием для сортов Архидея, Дельфин и Карлена. На 3-4 неделе разница в визуальной оценке прироста каллуса в световом и темновом варианте у сортов нивелировалась. После 4 недель культивирования проводили оценку состояния каллусов по приросту сырой и сухой массы. Показано, что интенсивность роста клубневого каллуса зависела

от сорта картофеля. Наиболее интенсивный прирост как сырой, так и сухой массы наблюдали у сорта Архидея. Так сырая масса каллуса на свету увеличилась в 13,5 раза, а в темноте в 15,3 раза. Увеличение сухой массы было в 3,1 и 1,9 раза соответственно. У сортов Аксамит, Скарб и Яхант каллусогенная активность была приблизительно одинаковой и на порядок ниже, чем у сорта Архидея (табл. 1).

Сравнение влияния световых условий культивирования на процесс каллусообразования на клубневых эксплантах показало, что у большинства рассмотренных сортов наблюдается наибольший прирост сырой каллусной массы при культивировании в темноте. Исключение составил сорт Карлена, у которого на свету сырой вес в течение опыта увеличился в 7,5 раза, а в темноте только в 4,8 раза. По приросту сухой массы прослеживается обратная зависимость – у всех сортов прирост сухой массы больше на свету, чем в темноте. Полученные данные свидетельствуют о том, что нарастание каллусной массы в темноте идет не столько за счет увеличения числа клеток, сколько за счет увеличения их оводненности. Приведенные результаты демонстрируют различную активность изученных сортов по интенсивности прироста каллуса.

Для определения сортоспецифичности картофеля проведен биохимический анализ легкорастворимых белков клубней 6 сортов картофеля. Показано, что полипептидные спектры легкорастворимых белков сортов Архидея, Аксамит, Яхант, Карлена, Дельфин, Скарб насчитывают до 32 основных белковых компонентов разной интенсивности в широком диапазоне молекулярных масс от 108,6 – до 5,4 кД, и имеют сортовые отличия. Показано, что количество белковых компонентов у сортов Аксамит и Скарб снижено до 20 с уменьшением количества и интенсивности полипептидов в области молекулярных масс от 45,7 до 24,4 кД.

Обнаруженные сортовые различия в интенсивности нарастания каллуса отражаются в изменении отдельных белковых компонентов полипептидных спектров. Показано, что при каллусогенезе идет значительное уменьшение содержания полипептидов с М.м. 58 – 55 кД и 45 – 41 кД. Также обнаружены отличия в спектрах полипептидов каллусов, выращенных на свету и в темноте. Так, например, в световом каллусе остается полипептид с М.м. 29,2 кД, отсутствующий в темновом каллусе. Отмечено, что при культивировании на свету более активно экспрессируются белки с М.м.

Таблица 1.
Влияние световых условий культивирования на процесс каллусообразования на клубневых экплантах различных сортов картофеля.

Сорт	Световые условия	Средний прирост сырой массы, мг		Средний прирост сухой массы, мг	
		Wt-W ₀	(Wt-W ₀)/-W ₀	Wt-W ₀	(Wt-W ₀)/W ₀
Аксамит	Свет	125,1±1,8	1,56	6,5±0,1	0,37
	Темнота	177,2±0,5	2,20	5,7±0,2	0,33
Архидея	Свет	1016,5±4,8	13,54	37,4±0,2	3,10
	Темнота	1150,1±5,0	15,32	23,7±0,1	1,97
Дельфин	Свет	259,0±1,4	3,89	10,3±0,2	0,92
	Темнота	264,7±3,6	3,98	5,5±0,1	0,49
Карлена	Свет	633,0±10,3	7,52	22,4±0,4	1,41
	Темнота	414,9±4,2	4,75	12,6±0,3	0,79
Скарб	Свет	115,5±1,5	1,47	3,9±0,1	0,26
	Темнота	139,8±0,8	1,78	1,1±0,0	0,07
Яхант	Свет	106,2±1,2	1,46	9,5±0,1	0,51
	Темнота	131,3±0,8	1,80	3,7±0,1	0,20

Примечание: W₀ – масса экпланта, W_t – масса каллуса.

56,0, 29,2 и 11,9 кД. В целом для каллусной ткани характерна элиминация значительного числа низкомолекулярных полипептидов. Электрофоретическое исследование показало отличие в белковых спектрах активно растущего каллуса сорта Архидея и медленно растущих каллусов сортов Яхант и Скарб в области среднеподвижных полипептидов. Полученные данные позволяют говорить о том, что при каллусогенезе происходят активные изменения по уровню экспрессии целого ряда полипептидов, что связано с деградацией запасных белков экспланта клубня при дедифференциации клеток и активизацией ростовых процессов.

В процессе каллусогенеза гормональный состав среды является важным фактором, определяющим направленность процессов каллусогенеза. На средах с различными составами гормонов можно получить каллусы, отличающиеся по морфологическим и биохимическим характеристикам. Пероксидазная активность каллусной ткани, находясь в тесной связи с наличием и уровнем этих гормонов в культуральной среде, является важной биохимической характеристикой каллуса, так как отражает уровень метаболических процессов.

Сравнивая величину пероксидазной активности в каллусной ткани 6 сортов картофеля (табл.2), можно отметить высокий ее уровень у сорта Аксамит в темновом и световом вариантах.

Самую низкую пероксидазную активность каллуса наблюдали в световом варианте сорта Дельфин. Она была несколько ниже активности исходного экспланта. Другие сорта характеризовались более высокой ферментативной активностью каллусной ткани по сравнению с исходным эксплантом. При пересчете активности пероксидазы на единицу сухой массы активность каллусной ткани во всех случаях была выше, чем в экспланте. У сорта Аксамит это увеличение для светового каллуса составило 41 раз, для темновом варианте 71 раз, Архидея 110 и 81, Карлена 15 и 4, Дельфин 2 и 5, Яхант 8 и 23 раза соответственно. При выражении пероксидазной активности в единицах оптической плотности на единицу сухой массы мы устраняем влияние оводненности каллуса на расчетную величину активности пероксидазы и приходим к выводу, что пероксидазная активность каллусной ткани как темновом, так и световом вариантах всегда выше исходного экспланта. Это согласуется с тем фактом, что при стрессовом воздействии на растительную ткань наблюдается, как показано другими

Таблица 2.

Активность пероксидазы в ткани клубней и каллусов различных сортов картофеля на среде, содержащей 6 α -НУК 1 мг/л

Сорт	Активность пероксидазы в ед. опт. плотности на г сырой и сухой* массы в сек.		
	Эксплант	Каллус	
		световой	темновой
Аксамит	1,2 \pm 0,1	34,8 \pm 0,8	34,1 \pm 0,9
	22 \pm 1*	290 \pm 10*	426 \pm 12*
Архидея	0,5 \pm 0,02	13,2 \pm 0,2	7,3 \pm 0,1
	16 \pm 1*	330 \pm 15*	243 \pm 9*
Дельфин	0,5 \pm 0,03	4,8 \pm 0,1	8,0 \pm 0,2
	19 \pm 1*	60 \pm 2*	114 \pm 5*
Карлена	2,6 \pm 0,1	10,4 \pm 0,3	3,0 \pm 0,1
	19 \pm 1*	208 \pm 10*	60 \pm 3*
Скарб	3,8 \pm 0,1	3,3 \pm 0,1	5,5 \pm 0,1
	16 \pm 1*	55 \pm 2*	110 \pm 6*
Яхант	2,0 \pm 0,1	8,4 \pm 0,2	20,3 \pm 0,1
	26 \pm 2*	60 \pm 2*	184 \pm 8*

авторами [6], повышение пероксидазной активности. Рост каллуса в условиях света или его отсутствия не давал однозначного ответа по величине активности пероксидазы. У сорта Яхант темновой каллус характеризовался более высокой активностью пероксидазы, чем световой (в 2,4 раза). Такую же тенденцию наблюдали у сорта Скарб (в 2 раза) и Дельфин (в 1,7 раза). У сорта Архидея и Карлена наблюдали обратный эффект. Сорт Аксамит, имевший самую высокую ферментативную активность темнового и светового каллуса, отличался низким уровнем прироста сырой каллусной массы по сравнению с другими изученными сортами и в темновом, и в световом варианте. Однако сорта Архидея, Карлена, Яхант, Скарб, Дельфин проявляли некоторую корреляцию интенсивности прироста каллуса и активности пероксидазы.

Исследования показали сортовые особенности каллусогенеза, проявляющиеся в интенсивности нарастания массы каллуса, изменении уровня экспрессии полипептидов и активности пероксидазы.

Литература

- 1 Бутенко Р.Г. Культура растительных клеток и биотехнология.// М.Наука.1986.285с.
- 2 Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент. Обзор.//Физиология растений.1999.Т.46.№6.С.837-844.
- 3 Фоменко Т.И., Лаптева О.К, Сосновская Т.Ф.и др. Физиология и биохимия каллусогенеза и морфогенеза в культуре ткани *in vitro* злаковых и бобовых.// Проблемы экспериментальной ботаники.Мн.1997. С.375-388.
- 4 Гавриленко И.Ф., Ладыгина М.Б., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. М.Высшая школа.-1975.-392с.
- 5 Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.// Nature.1970. V.227.P.680-685.
- 6 Moran P.J., Cipollini D.F. Effect of wind – induced mechanical stress in soluble peroxidase activity and resistance to pests in cucumber.// J.Phytopatol.-1999.-V.147, N5.C.313-316.

Summary.

Callus formation ability of potatoes six sorts was investigated. It were shown changes in peroxidase activity and polypeptid's composition of dedifferential callus tissue and explants of tuber potato.