

ДК 576.315.42:577.1:581.143.6

В. Н. РЕШЕТНИКОВ, М. К. МАЛЮШ, Т. И. ФОМЕНКО,
И. П. КОНДРАЦКАЯ, И. М. ЧУМАКОВА

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛЛУСОГЕНЕЗА КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM* L.)

Культивируемые *in vitro* клетки и ткани являются биологической моделью, на которой представляется возможным изучение механизмов роста и развития в контролируемых условиях. Культуральная среда и другие факторы выращивания могут стать условием возникновения и селекции клеток с отличными от исходных свойствами. В ответ на ранение паренхимные клетки дедифференцируются, переходят к делению и образуют недифференцированную ткань — каллус. Образование и рост каллуса регулируется ауксинами и цитокининами. С помощью этих веществ образование каллуса можно индуцировать и у тех тканей растений, которые его не образуют в ответ на ранение. Индуцированный каллус отделяют и помещают на поверхность агаризованной питательной среды или в культиваторы для получения суспензированной культуры. Каллусную ткань можно поддерживать в культуре неограниченно длительное время, периодически разделяя ее на фрагменты и пересаживая на новую среду. Области использования каллусных культур тканей очень разнообразны. Исследования по культуре ткани картофеля идут по нескольким направлениям: выращивание растений из меристемы, в основном для получения оздоровленного материала свободного от вирусной инфекции [1]; получение соматклонов и протоклонов и отбор форм с полезными свойствами [2—3]; соматическая гибридизация [4]; генетическая инженерия [5—6].

Материалы и методы. Для получения каллуса чаще всего используют среду Уайта, Мура-сиге и Скуга, Гамборга, дополненные сахарозой или глюкозой, витаминами и регуляторами роста. Каллусообразование в большей мере зависит от удачного подбора регуляторов роста. При индукции образования каллуса веществами ауксиновой природы применяют в 10 раз более высокую концентрацию, чем та, которая в последующем используется для поддержания его роста (1—10 мг/л). Первичный каллус рекомендуется культивировать одновременно на нескольких средах с различным соотношением регуляторов роста.

Для изучения динамики образования каллуса была отобрана среда МС с α -НУК (8 мг/л) для клубневых эксплантов и среда с 2,4-Д (3 мг/л) и кинетином (1 мг/л) для листовых и стеблевых эксплантов. Культивирование проводили в темноте при 26 °С. Использование этих сред давало возможность получать интенсивно растущую каллусную ткань [7]. Исследование каллусогенеза проводили на тканях картофеля, отличающихся по уровню специализации: фотосинтезирующей ткани, проводящей ткани стебля, запасающей ткани клубня. Состояние ткани анализировали каждую неделю в течение полутора месяцев, т. е. от первых этапов инициации каллуса до нарастания каллусной массы. Определяли содержание нуклеиновых кислот (НК), белка, проводили электрофоретическое разделение белков, давали морфофизиологическую характеристику ткани, изучали состояние клеточных структур методом световой микроскопии.

Результаты и обсуждение. При микроскопическом исследовании показано, что инициация развития каллуса листа, выражающаяся в разбухании и изгибе листовой пластинки, представляет собой начальное деление клеток мезофилла без утраты структурной организации клетки, но приводящее к изменению межклеточных взаимодействий. Клеточные деления происходят в ткани асинхронно. Активный рост каллуса идет в зонах меристематического деления. Основная масса каллуса представлена вакуолизированными клетками. Наблюдается значительное сокращение количества хлоропластов. Размер клеток варьирует в зависимости от фазы роста. На начальных этапах культивирования сохраняются элементы сосудисто-проводящей системы листа.

Ткань стебля представлена системой проводящих элементов ксилемы и флоэмы. Удлиненные клетки стеблевой ткани на первых этапах каллусообразования сохраняют свои особенности. Начальной фазой каллусогенеза является дезинтеграция структуры ткани и возникновение на раневой поверхности первичных зон инициации каллусного роста. В каллусных клетках сохраняются хлоропласты, увеличивается вакуолизация клетки, появляется полиморфизм в размерах ядер.

Для ткани клубня характерной особенностью каллусогенеза является постепенная диссимиляция крахмала в клетках в связи с тем, что клетки запасающей ткани переходят к активному развитию, делению, росту. Клетки клубня отличаются сравнительно большими размерами, что сохраняется и в первичном каллусе. При дальнейшей пролиферации происходит образование клеток, типичных для каллусной ткани.

Таким образом, микроскопическое исследование динамики каллусообразования показало, что уже в нулевом пассаже из различных тканей картофеля формируется каллусная ткань, клетки которой, хотя и сохраняют еще некоторые особенности исходной ткани (размер, хлоропласты, остаточное количество крахмала), но тем не менее идет процесс нарушения межклеточных взаимодействий, нивелируются особенности специализации клеток, морфологическая гетерогенность клеток первичного каллуса возрастает.

Для более глубокого убедительного исследования процессов метаболизма при каллусогенезе контролировалась динамика содержания белка и НК. Данные представлены в табл. 1.

Таблица 1. Содержание белка и НК в исходной и каллусной ткани стебля и листа пробирочного растения гибрида картофеля 78563-76 на среде MS, содержащей 4 мг/л α -НУК

Вид растительной ткани, срок культивирования каллуса	Содержание белка, γ /мг сырого веса	Содержание НК, γ /мг $\cdot 10^{-3}$ сырого веса		% сухого вещества
		РНК	ДНК	
Стебель, пробирочное растение	16,6 \pm 0,6	28	9	7,5
Лист, пробирочное растение	15 \pm 0,8	104	122	75
Каллус стебля, 2 недели	20 \pm 0,6	50	30	7
Каллус листа, 2 недели	16,6 \pm 0,9	120	150	7
Каллус стебля, 3 недели	15 \pm 0,9	70	40	7
Каллус листа, 3 недели	10 \pm 1,0	133	152	7
Каллус стебля, 4 недели	15 \pm 1,2	72	30	7
Каллус листа, 4 недели	10 \pm 0,6	120	148	8
Каллус стебля, 5 недель	14 \pm 0,8	65	30	8
Каллус листа, 5 недель	6 \pm 0,5	115	140	8

Каллусная ткань культивировалась на среде MS, 2,4-Д 3 мг/л, кинетин 1 мг/л в течение 5 недель. Содержание белка в первые две недели культивирования увеличивалось и в каллусной ткани листа, и в каллусной ткани стебля. Более значительное увеличение (25% от содержания в исходной ткани) получено для каллуса ткани стебля и 6% в каллусной ткани листа. На 3, 4, 5-й неделях шло снижение содержания белка на мг сырого веса. В каллусной ткани листа снижение составило 60% от количества белка в исходной ткани, в каллусной ткани стебля — 12%. Содержание НК увеличивалось в расчете на мг сырого веса каллусной ткани в первые три недели культивирования, а затем снижалось. Такой профиль графиков наблюдали для каллуса листа и стебля как по содержанию ДНК, так и РНК. В каллусной ткани листа на 3-й неделе культивирования отмечено увеличение содержания ДНК на 25% и РНК на 30%. К 5-й неделе культивирования содержание ДНК и РНК снижалось по отношению к максимальному в возрасте 3 недель, но по-прежнему было выше, чем в исходной ткани листа и стебля пробирочного растения.

Ткань стебля характеризовалась увеличением содержания РНК к 3—4-й неделе культивирования, которое составило 40% от исходного в ткани стебля. Максимум содержания ДНК наблюдали на 3-й неделе культивирования (4-кратное увеличение). К 4—5-й неделе содержание ДНК уменьшалось, но оставалось по-прежнему выше исходного в ткани стебля.

Полученные результаты согласуются с данными авторов [8, 9], где в процессе культивирования каллусной ткани на средах с ИУК и кинетином наблюдался активный синтез НК, который связывают с синтезом новых ферментов, необходимых в период интенсивного роста. Дальнейшее культивирование характеризуется прогрессирующим падением содержания НК, а затем стабилизацией этого процесса. Возрастание содержания белка в культивируемой ткани связано с активными процессами синтеза в растущей каллусной ткани и может рассматриваться как показатель степени активности и направленности морфологических процессов *in vitro*.

С клубнем картофеля гибридной формы 78563-76 провели аналогичный описанному эксперимент по культивированию каллусной ткани на среде MS, содержащей α -НУК 8 мг/л. В процессе развития каллусной ткани из ткани клубня определяли содержание белка и НК. Данные представлены в табл. 2.

Таблица 2. Содержание белка и НК в исходной и каллусной ткани клубня картофеля гибридной формы 78563-76 на среде MS, содержащей НУК 8 мг/л

Вид растительной ткани, срок культивирования каллуса	Содержание белка, $\gamma/\text{мг}$ сырого веса	Содержание НК, $\gamma/\text{мг} \cdot 10^{-3}$ сырого веса		% сухого вещества
		РНК	ДНК	
Клубень	15	40	30	12
Каллус, 1 неделя	18	45	32	12
Каллус, 2 недели	20	51	45	10
Каллус, 3 недели	21	58	52	12
Каллус, 4 недели	16	56	48	11
Каллус, 5 недель	12	45	40	10
Каллус, 6 недель	12	30	21	11

Содержание белка на мг сырого веса в процессе культивирования каллуса из клубня на указанной среде возрастало, достигая максимума на 3-й неделе культивирования (40% от содержания белка в клубне). После трех недель культивирования количество белка уменьшалось, к 5—6-й неделе составив величину на 20% ниже, чем в исходной ткани клубня. Похожий профиль изменений получен по содержанию НК в развивающемся каллусе клубня как для РНК, так и для ДНК. Максимальной величины содержание НК достигало на 3-й неделе культивирования. Увеличение составило 50% для ДНК. На 4, 5, 6-й неделях культивирования произошло уменьшение содержания НК, как и белка, и составило 30% для ДНК и 25% для РНК. После посадки каллуса на среду культивирования и адаптации его к условиям внешней среды на 3-й неделе культивирования идут активные синтетические процессы, что отражается на уровне содержания белков и НК в ткани. После исчерпания ресурсов среды идет спад указанных процессов.

Проведено изучение изменений в полипептидных спектрах в связи с дедифференциацией ткани. Электрофоретическое разделение общих растворимых белков листовых и стеблевых эксплантов гибридной формы 78563-76 осуществляли методом электрофореза в градиентном (10—22%) ПААГе по Лемли [10]. Образцы растущей каллусной ткани брали еженедельно в течение 1,5 мес. В качестве контроля использовали исходный эксплант. При анализе электрограмм динамики развития каллуса у листовых эксплантов в полипептидных спектрах общих растворимых белков обнаружено: у контроля — 21 основной белковый компонент, 1-я неделя культивирования — 25, 2-я — 29, 3-я — 26, 4-я и 5-я — 25 (рис. 1). Отмечено, что на первом этапе роста при переходе с автотрофного на смешанный (авто- и гетеротрофный) тип развития ткани происходит перестройка в синтезе ряда белков с первоначальным уменьшением синтеза низко- и высокомолекулярных фракций. При последующем развитии каллуса отмечено увеличение синтеза высоко- и низкомолекулярных полипептидных спектров. Так, в контроле выявлены 4 полипептида с Мм 109—56 кД и 11 полипептидов с Мм 30—7,5 кД, а к 2-й неделе обнаружено 8 полипептидов с Мм 109—56 кД и 19 полипептидов с Мм 30—6,8 кД, к 5-й неделе культивирования каллусной ткани листовых эксплантов происходит уменьшение экспрессии белка как высоко-, так и низкомолекулярных полипептидных спектров. Следует отметить, что в процессе каллусогенеза происходят количественные изменения

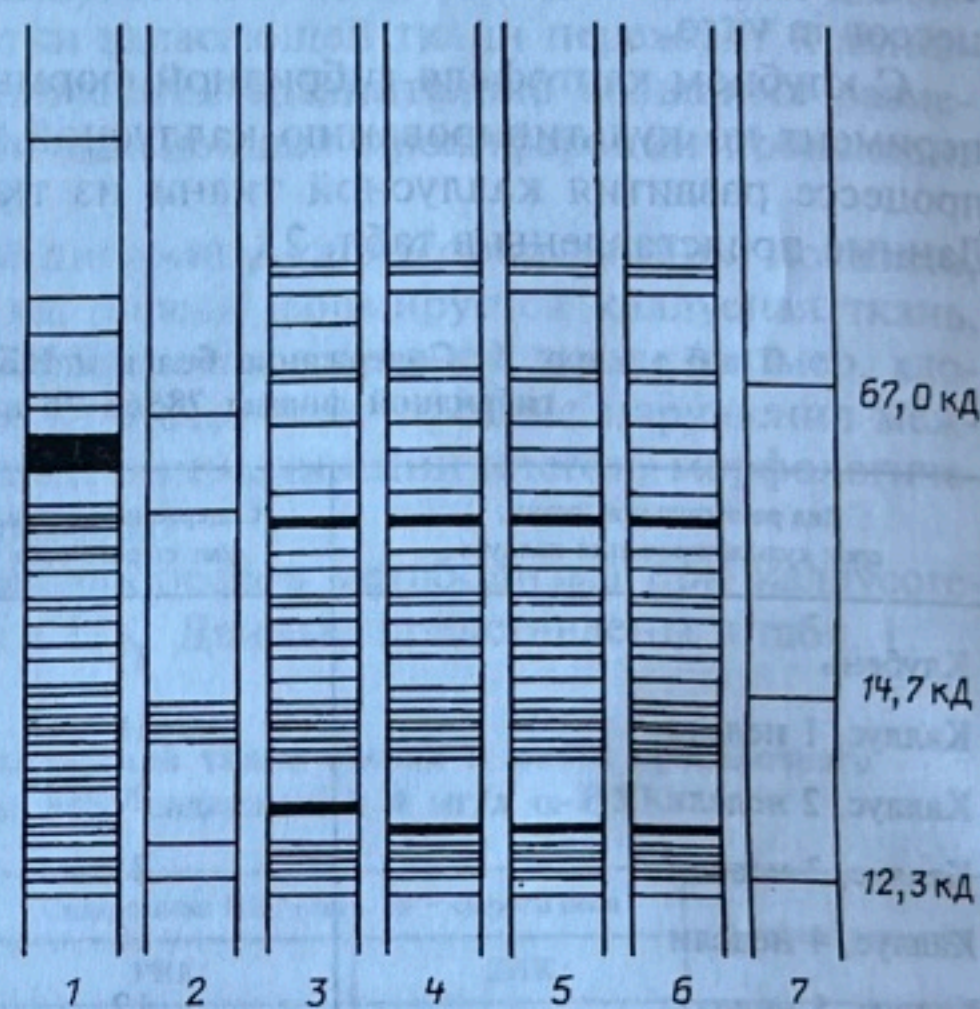
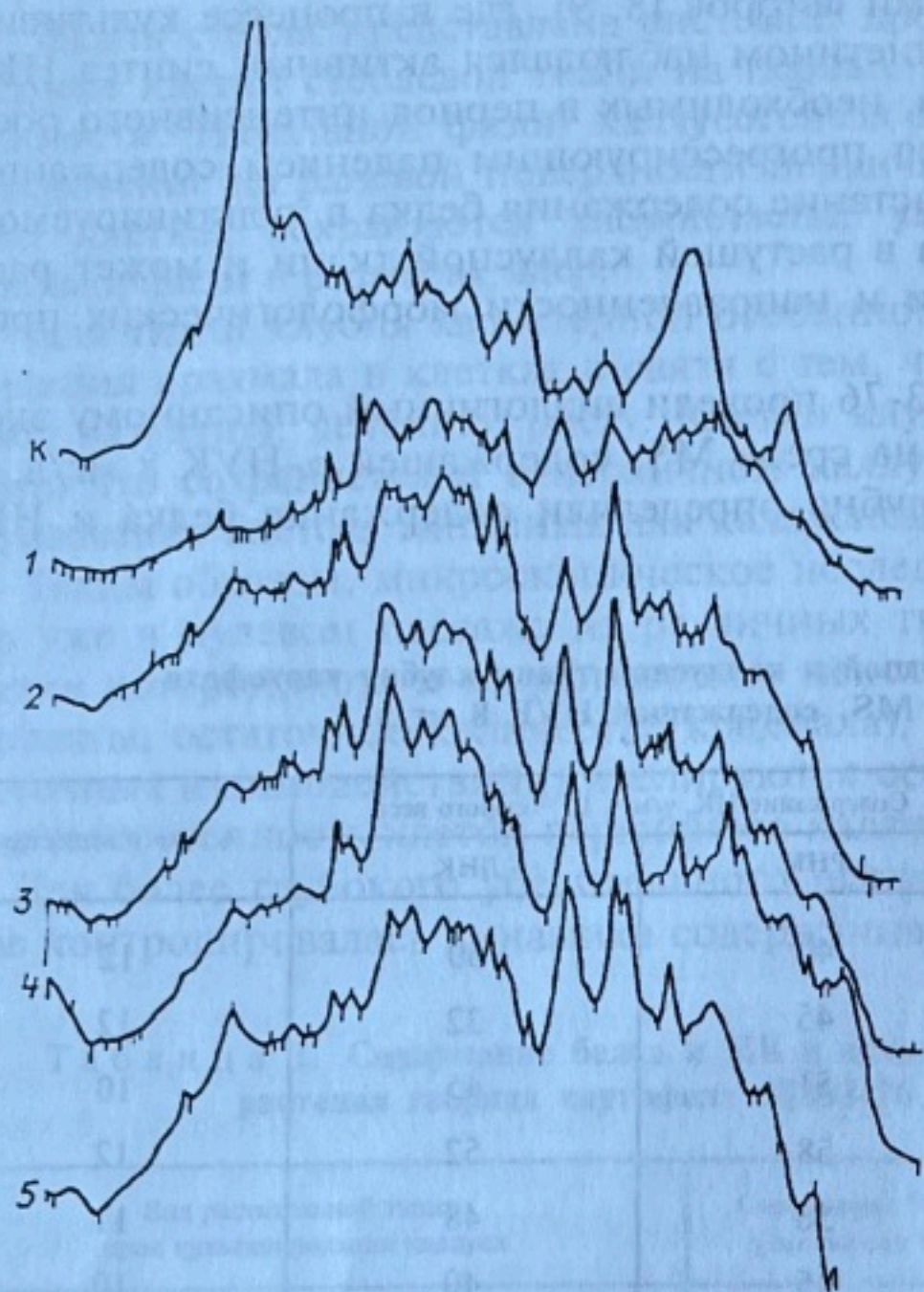


Рис. 1. Денситограммы растворимых белков. Динамика растущего каллуса: 1 — 1-я, 2 — 2-я, 3 — 3-я, 4 — 4-я и 5 — 5-я недели культивирования

Рис. 2. Электрофореграммы растворимых белков листовых эксплантов картофеля. Динамика растущего каллуса: 1 — контроль, 2 — 1-я, 3 — 2-я, 4 — 3-я, 5 — 4-я, 6 — 5-я недели культивирования, 7 — маркер

(в процентном отношении) полипептида с Мм 56 кД, так, у контроля составляя 18,7% от общего количества белкового компонента, на 1-й неделе — 0,9%, на 2-й — 3,1, на 3-й — 4,2, на 4-й — 5,7, на 5-й — 8,0%.

При исследовании электрофореграмм динамики каллусогенеза стеблевых эксплантов (рис. 2) также выявлены существенные отличия как в качественном, так и в количественном отношении. На 1-й неделе культивирования каллусной ткани обнаружено только 11 полипептидов, которые в количественном отношении существенно отличаются как от контроля, так и от полипептидных спектров растущего каллуса. В отличие от каллусогенеза листовых эксплантов в динамике каллусогенеза стеблевых эксплантов синтез полипептида с Мм 56 кД начинается только с 3-й недели культивирования. В каллусе стеблевых эксплантов не обнаружено трех высокомолекулярных полипептидов с Мм 144,0, 81,2 и 71,5 кД, но присутствуют 4 полипептида с Мм 91,6, 88,7, 83,3 и 73,4 кД, которые не выявлены в контроле. Также в каллусе стеблевых эксплантов отсутствуют средне- и низкомолекулярные полипептиды в диапазоне Мм 36,0—30,0 кД и от 14,3 до 12,9, 10,9, 9,4 кД. На 3, 4 и 5-й неделе культивирования выявлено появление белка с Мм 12,4 кД, который отсутствует в контроле и в каллусе 1-й и 2-й недели культивирования.

В ходе развития культур установлено появление ряда новых белков и изменение содержания некоторых предшествующих, что согласуется с исследованиями по биохимической гетерогенности каллусов [11,12]. Полученные данные позволяют выявить белки с различной электрофоретической подвижностью в процессе каллусообразования, что представляет возможным разделить эти белки на группы: а) белки с увеличивающейся экспрессией в процессе культивирования; б) белки, появляющиеся *de novo*; в) белки, исчезающие в процессе каллусообразования.

Уровень и интенсивность обмена белков в развивающейся системе можно рассматривать как показатель степени активности и направленности морфологических процессов *in vitro*. Каллусогенез тканей картофеля обнаруживает свои специфические характеристики на различных уровнях дедифференциации ткани.

Summary

Information on comparative study of callus formation from different explants of potato is presented in article.

Литература

1. Хромова Л. М., Седнина Т. В., Бутенко Р. Т. // С.-х. биология. 1963. № 6. С. 3—12.
2. Яковлева Г. А., Гулина И. В., Дубинич В. А. и др. Получение новых форм картофеля с помощью биотехнологии. Генетическая инженерия и биотехнология: Тез. докл. Мн., 1994. С. 74.
3. Долбик Г. М., Бердичевец Л. Г., Малюш М. К. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1987. № 2. С. 35—39.
4. Сидоров В. А., Пивень Н. М., Глеба Ю. Ю. и др. Соматическая гибридизация пасленовых. Киев, 1985.
5. Пирузян Э. С., Андрианов А. М. Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений. М., 1985.
6. Хромова Л. М., Крашенинникова Л. В., Кукушкина Л. Н. и др. Коррекция сортов картофеля методами клеточной и геномной инженерии. Молекулярная генетика и биотехнология: Материалы международного конф. Мн., 1998. С. 282.
7. Фоменко Т. И., Решетников В. Н., Малюш М. К. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 1998. № 4. С. 97—105.
8. Раклявичене Д., Урбонайте Б. // Физиол. и биохим. культ. растен. 1995. Т. 27, № 5—6. С. 367—373.
9. Арипджанов Ш. А., Хакимов Х. А., Ходжаев Ш. Х. // Биополимеры и клетка. 1989. Т. 5, № 6. С. 104—107.
10. Z a e m l i U. K. // Nature. 1970. Vol. 227, N 5259. P. 680—685.
11. Кударов Б. Р., Есмагулов К. У., Тумганова Б. Г., Анапьяев Б. Б. 2-й съезд Всесоюз. об-ва физиологов растений: Тез. докл. Ч. 2. Мн., 1990. С. 111.
12. Корнеева Т. В., Каньельес Л. М., Катаева Н. В. // II Междунар. конф. «Биология культивируемых клеток и растений и биотехнология». Алматы, 28 сентября — 2 октября 1993 г.: Тез. докл. Вып. 1. Алматы, 1993. С. 15.

Поступила в редакцию
05.11.98

Центральный ботанический сад
НАН Беларусі

№	Вид	Орган	1994 г.		1995 г.		Среднее	Станд. откл.
			Число	Объем	Число	Объем		
101	Бутононосный	Лист	111	1492.0	1171	1492.0	0.31	1.06
		Стебель	159	1751	151	1751	0.34	1.12
		Корень	136	1366.8	136	1366.8	0.33	0.91
24.07	Листовый	Лист	111	1492.0	1171	1492.0	0.31	1.06
		Стебель	159	1751	151	1751	0.34	1.12
		Корень	136	1366.8	136	1366.8	0.33	0.91
		Стебель	159	1751	151	1751	0.34	1.12
5.09	Плодоносный	Лист	111	1492.0	1171	1492.0	0.31	1.06
		Стебель	159	1751	151	1751	0.34	1.12
		Корень	136	1366.8	136	1366.8	0.33	0.91
		Стебель	159	1751	151	1751	0.34	1.12
17.10	Камей	Лист	111	1492.0	1171	1492.0	0.31	1.06
		Корень	136	1366.8	136	1366.8	0.33	0.91
17.10	Камей	Лист	111	1492.0	1171	1492.0	0.31	1.06
		Корень	136	1366.8	136	1366.8	0.33	0.91