

УДК 582.951.4:581.143.6:577.1

СОПРЯЖЕННОСТЬ ПРОЦЕССОВ ДЕ- И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ КЛЕТОК *NICOTIANA TABACUM* С МОДИФИКАЦИЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПЕРОКСИДАЗ

А.А.КУЗОВКОВА (ЛЕНЕЦ), Т.И.ФОМЕНКО, Л.Г.БЕРДИЧЕВЕЦ

ГНУ “Центральный ботанический сад НАН Беларуси”

Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2В

e-mail: cbg@it.org.by

*Исследована модификация изоферментного спектра основных пероксидаз (ПО) при реализации генетических программ де- и дифференциации клеток разных тканей *Nicotiana tabacum*. Установлено, что большинство изоформ ПО листового и стеблевого эксплантов табака обладают тканеспецифичностью, и это свойство сохраняется в первичных дедифференцированных тканях, полученных из данных эксплантов. Процессы морфогенеза в листовом каллусе сопровождаются инициацией экспрессии специфических ПО, не обнаруживаемых в данных условиях в стеблевом каллусе. Выявлены изоформы, общие для процессов дифференциации и дедифференциации клеток, и изоформы – маркеры этих процессов. ПО с R_f 0, 14 и 0,21 являются маркерами дедифференциации, а ПО с R_f 0,26; 0,51 и 0,65 – полной дифференциации клеток табака.*

Ключевые слова: табак, дифференцированные/дедифференцированные ткани, пероксидазы.

Введение. Молекулярные механизмы уровня и направленности геномной изменчивости соматических клеток растений еще не выяснены. Существует несколько путей, по которым может идти развитие клетки после ее дедифференцировки. Первый путь – это вторичная регенерация целого растения, возможная дифференцировка на уровне клеток, тканей, органов. Второй путь – это утрата клеткой способности к вторичной дифференцировке и регенерации растения, стойкая дедифференцировка, приобретение способности расти на среде без гормонов, т.е. превращение в опухолевую. Такими свойствами часто характеризуются старые пересадочные культуры. Третий путь – это нормальный цикл развития каллусной клетки, заканчивающийся ее старением и отмиранием. Однако такая дифференцировка не ведет к морфогенезу, а закрепляет за ней свойства старой каллусной клетки [1,2].

Целью исследований явилось изучение молекулярных механизмов переключения генетических программ развития растения на примере тканей табака *in vitro*, проходящих цикл развития от дифференцировки через длительный этап дедифференцировки к новой дифференцировке, что сопряжено с: 1) остановкой реализации ранее действовавшей программы дифференциации тканей; 2) перестройкой на новую программу развития – дедифференциацию клеток (неорганизованный рост каллуса); 3) осуществлением программы

неорганизованного роста и 4) переходом к программе дифференцировки при создании соответствующих условий для прохождения морфогенеза. При этом прекращение одной и реализация другой программ развития растительных тканей, как известно, сопровождается изменением экспрессии ядерных генов и плазмогенов растений. Наше внимание уделялось семейству генов ПО, экспрессия которых, как установлено, контролируется факторами развития [3]. Оценку экспрессии генов ПО проводили по активности их белкового продукта, анализируя изоферментные спектры. Использование листовых и стеблевых эксплантов дало возможность выявить особенности экспрессии генов *in vitro* в зависимости от типа экспланта.

Материалы и методы

Нами исследовались изоферментные спектры основных ПО из общей фракции легкорастворимых белков листовой и стеблевой ткани *Nicotiana tabacum* разной степени дифференцированности: 1) листовой и стеблевой экспланты (полностью дифференцированные ткани), полученные из *in vitro* растений; 2) первичный каллус (дедифференцированная ткань с очагами дифференцированной ткани), полученный из листового и стеблевого эксплантов на среде для каллусогенеза; 3) длительнокультивируемый каллус (ДК – полностью дедифференцированная ткань), полученный в ходе многократных пассажей (40, 52 и 58 пассажей) первичного каллуса и 4) ДК, пассируемый на морфогенную среду (2 пассажа) (дедифференцированная ткань с очагами редифференцированной ткани разной степени выраженности).

Для анализа использовали листья и стебли 40-дневных растений табака, выращенных в колбах в стерильных условиях на 1/2 среде Мурасиге – Скуга (МС)

при температуре 22 – 25°C, освещенности 3–5 тыс. лк. Световой день – 16 ч. Образование первичного каллуса индуцировали переносом листовых и стеблевых эксплантов на среду МС, содержащую 1 мг/л ИУК и 0,1 мг/г БАП, с последующим пассированием каллусов на этой же среде. Морфогенез в каллусе инициировали и поддерживали на среде МС с 2 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИУК. Экстракцию изоформ основной ПО вели по методу Сафоновых [4] с нашими модификациями, используя 50 мМ трис-НСl (рН 7,6) буфер с 5 мМ аскорбата. Содержание белка в образцах определяли по Bredford [5]. В каждом отдельном эксперименте все образцы уравнивались по белку. Электрофоретическое разделение ПО проводили в 7,5 % ПААГе в нативной щелочной системе. Активность ПО в геле обнаруживали бензидиновым методом Сафоновых [4] в модификации Чайновой и Хавкина [6], используя на всех этапах 0,1 М ацетатный буфер рН 4,5. Уровень активности отдельных изоформ ПО оценивали с помощью программы SigmaGel по данным денситометрирования.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты показали, что клетки листового и стеблевого эксплантов, взятых с 40-дневных растений табака, характеризуются практически одинаковым набором (соответственно, 13 и 12) изоформ основных ПО с R_f от 0,02 до 0,65, различающихся по уровням активности (рис. 1, а). Стеблевой эксплант не экспрессирует изоформу с R_f 0,59 из листового спектра, которая, таким образом, может быть маркером листовых тканей табака. В клетках листа наивысшей активностью обладают ПО с R_f 0,47 и 0,52, а в клетках стебля – с R_f 0,45 и 0,50. На среднем уровне в листе экспрессируются изоформы с R_f 0,11; 0,17; 0,56 и 0,65, тогда как в стебле они малоактивны. И, нао-

ворот, в стеблевом экспланте ПО с R_f 0,02 и 0,61 имеют среднюю активность, а в листовом – они относятся к минорным фракциям. Все это позволяет считать экспрессию вышеописанных изоформ тканеспецифичной. Только изоформы с R_f 0,26 и 0,51 имеют одинаковый уровень активности как в листе, так и в стебле табака. Данные изоферментные спектры листового и стеблевого эксплантов, представленные полностью дифференцированными тканями табака, использовались нами далее в качестве эталонов, с которыми сравнивались спектры ПО из тканей табака других степеней дифференцированности.

Как показали результаты исследований активности основных ПО в первичных каллусах, полученных из листового и стеблевого эксплантов (рис. 1, б), тканеспецифичность экспрессии изоформ ПО сохраняется и при инициации дедифференциации

клеток табака. Данные каллусы проявляют главные отличительные черты своих “родительских” дифференцированных клеток. Однако при этом из спектра ПО листовой ткани табака нивелировались 4 изоформы, а из спектра стеблевой – 6. Показано, что экспрессия ПО с R_f 0,26 и 0,51 характерна только для полностью дифференцированных тканей листа и стебля, а уровень активности изоформы с R_f 0,65 снизился в первичных каллусах по сравнению с листовым и стеблевым эксплантами. Это позволяет считать ПО с R_f 0,26; 0,51 и 0,65 особенностью полностью дифференцированных тканей табака. В то же время в листовом экспланте инициация каллусогенеза индуцировала активность новой изоформы с R_f 0,21, чего не наблюдалось для первичного каллуса из стеблевого экспланта. Однако следует указать, что данная ПО стала

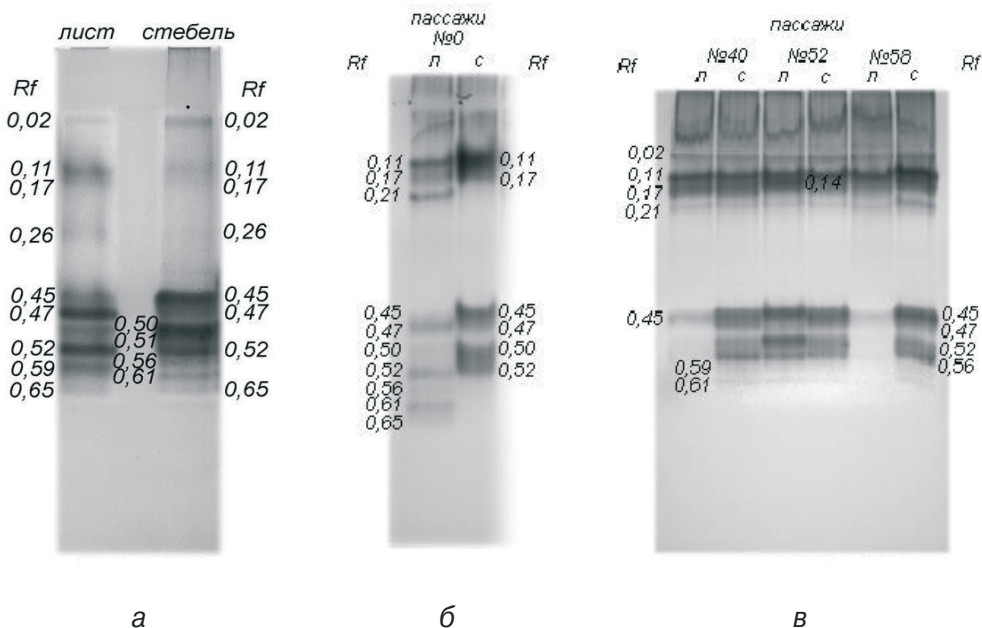
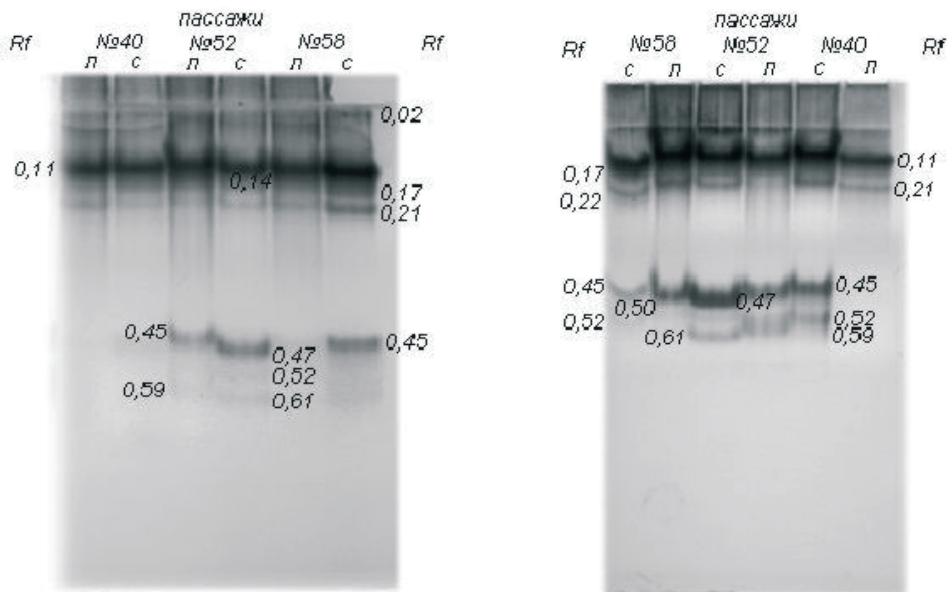


Рис. 1. Изоферментные спектры основных ПО эксплантов и каллусных (первичных и длительнокультивируемых) тканей *Nicotiana tabacum*: а – экспланты, б – первичная каллусная ткань, в – длительнопассируемая каллусная ткань. Л – листовой каллус, с – стеблевой каллус, R_f – относительная электрофоретическая подвижность белков



а

б

Рис. 2. Изоферментные спектры основных ПО длительнокультивируемых тканей *Nicotiana tabacum*, пассируемых на морфогенную среду (пассаж №1): а – 2 недели культивирования на морфогенной среде (пассаж №1), б – 4 недели культивирования на морфогенной среде (пассаж №1). Л – листовой каллус, с – стеблевой каллус, R_f – относительная электрофоретическая подвижность белков

экспрессироваться в стеблевом каллусе при его многократных пассажах на среду для поддержания каллусогенеза. Это позволяет ей претендовать на роль молекулярного маркера каллусогенеза в табаке.

После многократного пассирования каллусной ткани табака на среду для поддержания каллусогенеза (40, 52 и 58 пассажей) нами была получена уникальная модельная ткань (ДК), в которой реализуется только генетическая программа функционирования дедифференцированных клеток. Благодаря этой модельной ткани выявлено (рис. 1, в), что истинным маркером процессов дедифференциации клеток табака может служить только изоформа ПО с R_f 0,14, поскольку она присуща исключительно “чистым” длительнокультивируемым каллусным

тканям листа и стебля табака, хотя ее экспрессия с увеличением количества пассажей несколько уменьшается. Показана обратная зависимость между количеством изоформ основной ПО в первичных и длительнокультивируемых каллусах разной природы.

При переходе листовых и стеблевых тканей табака от программы продолжительного неорганизованного роста клеток к программе редифференцировки (через 2 недели культивирования каллуса в темноте на морфогенной среде) продолжался быстрый прирост массы каллуса без проявления морфогенеза. Однако для листовых и стеблевых каллусов всех пассажей (рис. 2, а) показана модификация экспрессии 5 изоформ ПО с R_f от 0,02 до 0,21, что отражает переключение на новую генетическую программу развития.

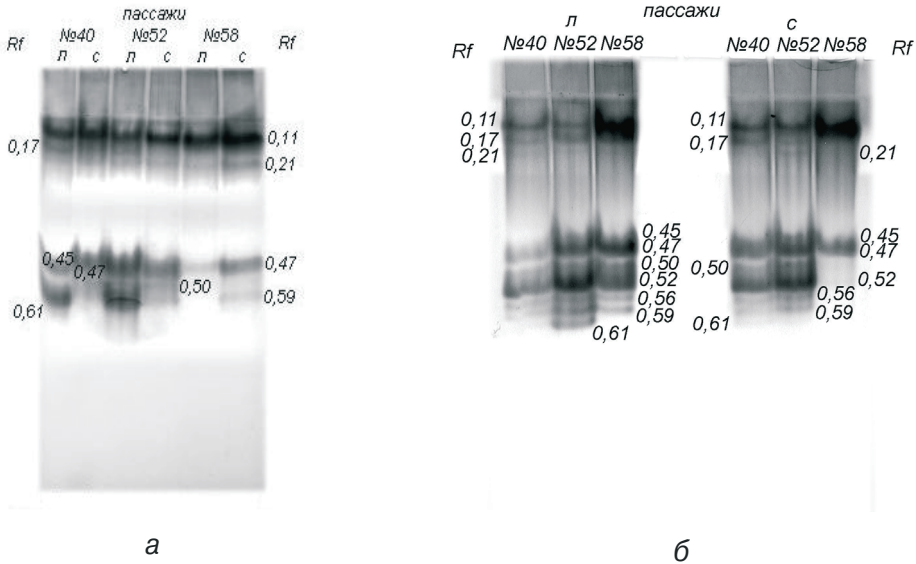


Рис. 3. Изоферментные спектры основных ПО длительнокультивируемых тканей *Nicotiana tabacum*, пассируемых на морфогенную среду (пассаж №2): а – 6 недель культивирования на морфогенной среде (пассаж № 2), б – 14 недель культивирования на морфогенной среде (пассаж № 3). Л – листовый каллус, с – стеблевой каллус, R_f – относительная электрофоретическая подвижность белков

В условиях инициации морфогенеза в листовом длительнопассируемом каллусе произошло существенное увеличение активности изоформы с R_f 0,11, высокий уровень которой сохраняется в течение всего срока культивирования на морфогенной среде, что позволяет считать ее маркером инициации и развития морфогенных процессов в табаке. Подобного свойства ПО с R_f 0,11 в стеблевых тканях табака обнаружено не было.

В течение следующих 2-х недель культивирования (в целом — 4 недели) на морфогенной среде появились первые визуальные признаки инициации морфогенеза в листовом каллусе в виде очагов уплотнения клеток лишь в 40-м и 52-м пассажах, а трансформация спектра ПО происходила в каллусах любого происхождения и возраста (рис. 2, б). Так, из изоферментных спектров листовых и стеблевых каллусов табака исчезает ПО с R_f 0,14 — фермент-маркер каллусогене-

за, т.е. через 4 недели культивирования длительнопассируемого каллуса табака на морфогенной среде в клетках превалирует реализация генетической программы дифференциации. Следует указать, что, в целом, в клетках листовых и стеблевых каллусов всех возрастов на данном этапе морфогенеза экспрессируется меньшее количество изоформ ПО, чем на предыдущей стадии. Интересна изоформа с R_f 0,50, обнаруженная в листовом каллусе 58-го пассажа — наиболее старом из исследуемых. Как показали дальнейшие исследования, в листовом каллусе 52-го пассажа она впервые начинает экспрессироваться только через 6 недель культивирования на морфогенной среде (рис. 3, а), а в каллусе табака 40-го пассажа — через 14 недель (рис. 3, б). Видимо, время начала экспрессии изоформы ПО с R_f 0,50 определяется возрастом дедифференцированных клеток, и данная ПО связана с преодолением клеткой про-

цессов старения и необходима для включения каких-то начальных механизмов ювенилизации клеток, хотя подобное не характерно для стебля.

После 4 недель культивирования на морфогенной среде (пассаж 1) каллусы табака переносили на свежую среду (пассаж 2) для дальнейшего развития морфогенеза. Через 6 недель культивирования на морфогенной среде (пассаж 2) в темноте листовые каллусы табака 40-го и 52-го пассажей и стеблевой каллус 40-го пассажа первыми инициировали адвентивное побегообразование. Листовой и стеблевой каллусы 58-го пассажа все еще не проявляли видимых признаков морфогенеза, для них по-прежнему была характерна рыхлая структура, свойственная каллусу, культивируемому на каллусогенной среде. При этом адвентивное побегообразование в листовых каллусах 40-го и 52-го пассажей коррелировало с индукцией экспрессии ПО с R_f 0,59 (рис. 3, а), которую, таким образом, можно считать маркером данного этапа морфогенеза в листовом каллусе, но не в стеблевом. Листовой каллус 58-го пассажа через 6 недель культивирования в темноте на морфогенной среде характеризовался изоферментным спектром ПО, похожим на таковой в листовом каллусе 40-го пассажа через 4 недели культивирования в темноте на морфогенной среде. Видимо, листовый каллус 58-го пассажа в силу своей старости отстает по срокам развития от листового каллуса 40-го пассажа. Стеблевой же каллус 58-го пассажа на этом сроке культивирования проявлял активность только 4 изоформ ПО.

Через 4 недели культивирования 2-го пассажа на морфогенной среде в темноте (в целом – 10 недель) для ускорения морфогенеза длительнопассируемые каллусы табака снова перенесли на свежую среду (пассаж 3) и далее экспонировали на свету еще 4 недели (в целом – 14 недель культивирования на морфогенной среде). В итоге, листовые каллусы всех пассажей образовали адвентивные побеги. При

этом (рис. 3, б), изоферментные спектры ПО данных каллусов, кроме стеблевого 58-го пассажа, обладали широким набором изоформ, свойственных листовому и стеблевому эксплантам, соответственно, что говорит о возрастании уровня дифференцированности клеток. В целом, характеризуя морфогенез в ДК разного происхождения, можно отметить общие тенденции изменения экспрессии отдельных изоформ ПО при развитии морфогенных процессов в листовой и стеблевой каллусной ткани табака.

Выводы

Таким образом, установлено, что 1) большинство изоформ основных ПО в дифференцированных клетках листового и стеблевого эксплантов табака обладают тканеспецифичностью, и это свойство сохраняется у отдельных изоформ в первичных дедифференцированных тканях, полученных из данных эксплантов; 2) 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 стеблевом длительнопассируемом каллусе время начала экспрессии изоформы ПО с R_f 0,50 не определяется возрастом дедифференцированных клеток, и данная ПО не связана с преодолением клеткой процессов старения, как это показано для листового каллуса; 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 четкой функции и ярко выраженного участия в реализации какой-то одной программы развития клеток табака; 3) существует обратная зависимость между количеством изоформ основных ПО в первичных и ДК разной природы; 4) мор-

фогенная активность ДК напрямую зависит от возраста каллуса: чем больше пассажей каллуса было проведено, тем позже дедифференцированные клетки дифференцировались.

Список литературы

1. Кунах В.А. Генотипическая изменчивость соматических клеток растений // Биополимеры и клетка. – 1997. – Т.13, №5. – С. 362–371.
2. Моисеева Н.А. Молекулярные и клеточные механизмы морфогенеза в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. – С. 166–186.
3. Хавкин Э.Е., Забродина М.В. Наследуемые изменения в спектрах пероксидаз и эстераз у соматических кукурузы // Физиология растений. – 1994. – Т.41, Вып. 6. – С. 859–867.
4. Сафонов В.И., Сафонова М.П. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – С.113–119.
5. 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. –Vol.72. – P. 248–254.
6. Чаянова С.С., Хавкин Э.Е. Использование нейтрального полиакриламидного геля для изоферментного анализа пероксидаз и эстераз // Физиология растений. – 1990. – Т. 37. – С. 1037–1039.

Представлена В.А. Кунахом
Поступила 6.05.2009

СПРЯЖЕНІСТЬ ПРОЦЕСІВ ДЕ- І ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ КЛІТИН *NICOTIANA TABACUM* З МОДИФІКАЦІЄЮ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ ПЕРОКСИДАЗ

А.А. Кузовкова (Ленец), Т.И. Фоменко,
Л.Г. Бердичевец

ГНУ “Центральний ботанічний сад НАН Білорусі”,
Білорусь, 220012, м. Мінськ, вул. Сурганова, 2В
e-mail: cbg@it.org.by

Досліджено модифікацію ізоферментного спектра основних пероксидаз (ПО) при реалізації генетичних програм де- і диференціації клітин різних тканин *Nicotiana tabacum*. Установлено, що більшість ізоформ ПО листового й стеблового експлантів тютюну є тканиноспецифічними, і ця властивість зберігається в первинних дедиференційованих тканинах, отриманих із даних експлантів. Процеси морфогенезу в листовому калюсі супроводжуються ініціацією експресії специфічних ПО, які не виявляють у даних умовах у стебловому калюсі. Виявлені ізоформи, загальні для процесів диференціації й дедиференціації клітин, і ізоформи – маркери цих процесів. ПО з R_f 0,14 і 0,21 є маркерами дедиференціації, а ПО з R_f 0,26; 0,51 і 0,65 – повної диференціації клітин тютюну.

Ключові слова: тютюн, диференційовані / дедиференційовані тканини, пероксидази.

CONTINGENCY OF DE- AND DIFFERENTIATION PROCESSES OF *NICOTIANA TABACUM* CELLS WITH MODIFICATION OF PEROXIDASE GENE EXPRESSION

A.A. Kuzovkova (Lenets), T.I. Fomenko,
L.G. Berdichevets

GSI “Central botanical gardens of NAS of Belarus”,
Belarus, 220012, Minsk, Surganov str., 2V
e-mail: cbg@it.org.by

Modification of isoenzyme spectrum for basic peroxidases (BP) upon realization of cell de- and differentiation genetic programs in various tissues of *Nicotiana tabacum* has been studied. Most BP isoforms of leaf and stem tobacco explants were found to exhibit tissue specificity and this property is maintained in the primary dedifferentiated tissues, derived from these explants. Morphogenesis events in leaf callus are accompanied by initiation of specific BP expression, not found in stem callus under the same conditions. There were revealed isoforms shared by the processes of cell differentiation and dedifferentiation and isoforms that present markers of these processes. BP with R_f 0,14 and 0,21 appear to be markers of dedifferentiation, while BP with R_f 0,26; 0,51 and 0,65 suggests the complete tobacco cell differentiation.

Key words: tobacco, differentiation / dedifferentiation tissues, peroxidases.