

## ОСОБЕННОСТИ ПРОЛИФЕРАЦИИ И МОРФОГЕНЕЗА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В СА-АЛЬГИНАТНОМ ГЕЛЕ КЛЕТОК ТАБАКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТИПА ИСПОЛЬЗУЕМОЙ КУЛЬТУРЫ

М. П. Шапчиц, В. М. Юрин, А. П. Кудряшов

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь, [shapchitsm@inbox.ru](mailto:shapchitsm@inbox.ru)

Иммобилизация растительных клеток заняла важное место в биотехнологии как средство увеличения продуктивности. Биокаталитическая активность иммобилизованных клеток растений в настоящее время используется в самых различных областях науки и производства: при получении разнообразных органических соединений, при очистке сточных вод, конструировании биосенсоров, проведении различного рода анализов и т. п. В настоящее время мало известно о влиянии иммобилизации на физиологические свойства клеточных культур. По нашему мнению и заключению других исследователей [1] иммобилизация растительных клеток сможет оказаться альтернативой в разработке способов культивирования растительных клеток.

Целью нашей работы было исследование особенностей пролиферации иммобилизованных клеток табака из гранул Са-альгинатного геля и ее влияния на способность клеток к морфогенезу.

Для экспериментов использовали два типа клеточных культур табака *Nicotiana tabacum* – каллусную и суспензионную, выращиваемые в темноте в термостате при температуре 24,5 °С на среде RMNO [2], обеспечивающей быстрый рост рыхлой каллусной ткани и содержащей неорганические элементы среды Мурасига–Скуга (MS) [3], 3 % сахарозы, 1 мг/л тиамина, 100 мг/л мезо-инозита, 3 мг/л 3-индолил-уксусной кислоты, 0,04 мг/л кинетина, 0,1 мг/л 2,4-Д, рН 5,6–5,8. Каллусную культуру *Nicotiana tabacum* выращивали на твердой агаризованной среде в чашках Петри. Для этого в питательную среду RMNO добавляли 7 г/л агара. Суспензионную культуру клеток табака культивировали в 0,5 л колбах Эрленмейера на качалке (100 об/мин) при тех же условиях, что и каллусную культуру. Субкультивирование суспензионной культуры проводили через каждые 2 недели; каллусную культуру пересаживали через 21 сутки. Жизнеспособность клеток табака до и после включения в гель анализировалась с помощью окрашивания нейтральным красным.

Для иммобилизации клеток суспензионной культуры табака, 10 мл клеток, отмытых средой для индукции морфогенеза (МГ) (основа MS 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л 3-индолил уксусной кислоты, рН 5,6–5,8) смешивали с 10 мл стерильного 3 % На-альгината, полученную суспензию с помощью шприца каплями вносили в охлажденный (4 °С) 0,25 М раствор хлорида кальция. Для включения в гель альгината кальция клеток из каллусной культуры табака продавливали каллусную ткань через стерильное металлическое сито с диаметром пор 1 мм в среду МГ. Полученную суспензию клеток также иммобилизовали в гель Са-альгината вышеописанным способом.

Гранулы с включенными в них клетками табака помещали в чашки Петри на агаризованную МГ среду и инкубировали в термостате в тех же условиях, что и при выращивании каллусной культуры.

Пролиферация клеток табака на поверхность гранул у используемых типов культур *Nicotiana tabacum* была не одинаковой. Она начиналась через 4–5 недель инкубации в варианте с иммобилизованными клетками каллусной культуры и через 1–2 недели (10–15 сут) в варианте с иммобилизованными клетками суспензионной культуры табака. Процесс пролиферации клеток на поверхность был более

интенсивным при использовании суспензионной культуры табака. В этом случае происходило прорастание клеточной массы по всей поверхности гранул за исключением поверхности контакта гранула-агаризованная среда. На отдельных гранулах, содержащих клетки каллусной культуры формировались единичные очаги пролиферации. Препараты иммобилизованных клеток суспензионной культуры табака на начальном этапе пролиферации на поверхность гранул (спустя 13–17 сут с начала инкубации) были похожи на «ёжиков»; препараты иммобилизованных клеток каллусной культуры имели не более 2 точек прорастания.

Относительное содержание жизнеспособных клеток уже в суспензионной культуре было значительно большее (около 90 % от общего числа клеток), чем в суспензии, полученной из каллусной ткани табака (около 50 %). Такую разницу между двумя вариантами используемых для иммобилизации культур можно объяснить механическими повреждениями клеток каллусной ткани. Однако, маловероятно, что указанная разница в жизнеспособности иммобилизуемых клеток объясняет существенные различия в динамике процесса пролиферации у различных типов культур.

В дальнейшем в варианте с иммобилизованными клетками суспензионной культуры *Nicotiana tabacum* клетки разрастались по поверхности гранул в виде выростов и полностью покрывали Са-альгинатную гранулу, достигая в диаметре 1–2 см. В варианте с иммобилизованными клетками каллусной культуры *Nicotiana tabacum*, рост поверхностной популяции клеток ускорялся по мере увеличения ее массы, а после достижения клетками агаризованной поверхности МГ среды резко интенсифицировался и клетки полностью покрывали гранулу. Образовавшиеся из одной гранулы такого препарата иммобилизованных клеток каллусы *Nicotiana tabacum* были в 2–3 раза крупнее, чем в варианте с препаратами из суспензионной культуры клеток и достигали в диаметре 2,5–3 см.

Морфогенез в виде зачатков адвентивных вегетативных побегов в иммобилизованных препаратах клеток каллусной культуры табака был замечен через 7–8 недель культивирования, а в иммобилизованных препаратах суспензионной культуры через 4–6 недель. Следует отметить, что в варианте с иммобилизованными клетками суспензионной культуры табака зачатки вегетативных побегов образовывались на некоторых гранулах в количестве не более 2-х побегов на гранулу, тогда как в варианте с иммобилизованными клетками каллусной культуры было до 7 побегов на гранулу.

Полученные данные свидетельствуют о различиях 2-х типов исследуемых культур *Nicotiana tabacum* (суспензионной и каллусной) в способности пролиферировать из гранул Са-альгината и образовывать вегетативные побеги. Клетки суспензионной культуры быстрее (в 2–4 раза) и в большем количестве прорастают на поверхность гранул альгината кальция по сравнению с клетками каллусной культуры. Однако в последствии в первом варианте рост замедлялся и количество образованных вегетативных побегов было меньше (в 2–3 раза) по сравнению со вторым вариантом. Время, необходимое для начала морфогенеза, в сформированных из проросших сквозь гранулы клеток каллусов, в обоих типах культур различалось незначительно (1,2–1,5 раза). Вероятно, начало морфогенеза и его качественные показатели зависят не столь сильно от скорости пролиферации на поверхность гранулы и ее интенсивности, а определяются другими свойствами присущими клеткам различных типов культур, которые тесно связаны с условиями их выращивания.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. S. Ramachandra Rao and G. A. Ravishancar // *Biotech. Advances*, 2002, V. 20, P. 101-153
2. Сидоров А. В., Пивень Н. М., Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Соматическая гибридизация пасленовых // Киев. Наукова думка, 1985, 132 с.
3. Murashige T., Scoog F. A // *Physiol. plant.*, 1962, V. 15, P. 473-497.