

## ИЗМЕНЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ МЕРИСТЕМНЫХ ТКАНЕЙ ВИНОГРАДА И КАРТОФЕЛЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РЯДА КРИОПРОТЕКТОРОВ

Лысак Ю.С., Стрибуль Т.Ф., Петрик М.А.

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАНУ, Харьков,  
Украина, infinity-masha@mail.ru*

Метаболизм в растительных тканях сопровождается флюоресценцией. Флюоресценция обусловлена внутриклеточным окислением липидов и возбуждением молекул хлорофилла. Действие какого-либо стрессового фактора вызывает интенсификацию процессов перекисного окисления в тканях растений, увеличивает количество возбужденных состояний электронов в хлоропластах и увеличение интенсивности флюоресценции. При этом спектральный состав излучения не изменяется. Излучение в области 400-650 нм обусловлено окислением липидов и фенольных соединений, 650-750 нм – электронным транспортом в хлоропластах. После прекращения действия стрессового фактора на растительные клетки кривая интенсивности свечения возвращается к исходному уровню, при условии умеренного воздействия фактора.

Действие химических веществ, в том числе криопротекторов, на клетки растений, можно определить как стресс, а, следовательно, по величине изменения флюоресцентного свечения растительных тканей можно судить о степени влияния на них криопротекторов.

Исследовали меристемы винограда и картофеля, выделенные из растений, выращенных *in vitro*. Изучали действие на меристемы следующих растворов криопротекторов: раствор 1 М 1,2 пропандиола (1,2-ПД) на среде MS; 7%-й раствор поливинилпирролидона с молекулярной массой 24000 (ПВП) на среде MS; смесь этих растворов в соотношении 3:2 [3].

Флюоресценцию клеток меристем изучали с помощью конфокального микроскопа LSM-510 META («Carl Zeiss», Германия). Использовали диодный лазер с длиной волны 405 нм и рабочей мощностью лазера 180 мВт, размер лазерной апертуры (*pin hole*) – 228 мкм. Спектры флюоресценции получали из лямбда-серий (*lambda stacks*) в диапазоне 411–754 нм с шагом 11 нм с помощью приложения Zeiss LSM Image Examiner («Carl Zeiss», Германия) [4].

Исследуемые группы меристем помещали под микроскоп, обрабатывали растворами криопротекторов, возбуждали флюоресценцию и фиксировали эмиссию [2].

Параллельно меристемы, после инкубации в исследуемых растворах криопротекторов, культивировали. На 4-е сутки культивирования подсчитывали количество живых меристем и рассчитывали сохранность.

После 20-ти минутного действия 1 М раствора 1,2-ПД во всем диапазоне исследуемых длин волн у меристем картофеля и винограда отмечено увеличение интенсивности флюоресценции, причем у меристем картофеля в значительно большей степени (рис. 1). По прошествии 120 мин интенсивность флюоресценции практически совпадала с контрольной (сохранность меристем винограда и картофеля после экспозиции 120 мин составила 78% и 70% соответственно).

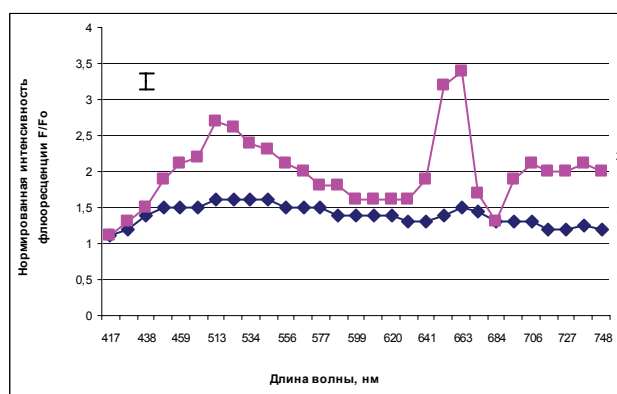


Рисунок 1 – Нормированный спектр флюоресценции меристем: 1- винограда, 2 - картофеля через 20 мин после действия 1М 1,2-ПД

Т.е. реакции меристем винограда и картофеля на действие проникающего 1,2-ПД – аналогичны [2, 3].

Реакция на действие 7% раствора ПВП у меристем картофеля и винограда различалась. 20-ти минутная экспозиция меристем винограда в растворе ПВП вызывала увеличение интенсивности флюоресценции в области 530 нм, а через 120 мин она снижалась до исходного уровня, хотя в области 680 нм интенсивность свечения значительно превышала контроль и через 20, и через 120 мин (рис. 2).

По видимому ПВП вызывал значительные структурные изменения более длительного характера в хлоропластах клеток винограда по сравнению с 1,2-ПД. Однако они не были необратимы, т.к. сохранность таких меристем составила около 50%.

Действие 7% раствора ПВП на меристемы картофеля оказалось губительным, сохранность меристем в этом опыте была равна нулю. Об этом свидетельствовали и кривые интенсивности флюоресценции: через 20 мин экспозиции интенсивность в опыте была ниже контроля, через 120 мин – снизилась еще больше.

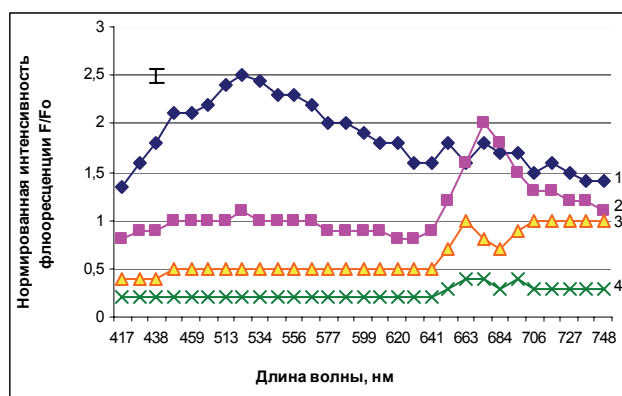


Рисунок 2 – Нормированный спектр флуоресценции меристем винограда: 1 - через 20 мин, 2 - через 120 мин и картофеля: 3 - через 20 мин, 4 - через 120 мин после действия 7%-го раствора ПВП

При совместном действии растворов 1М 1,2-ПД и 7% ПВП интенсивность свечения в области 530 нм по прошествии 20 мин была меньше по сравнению с интенсивностью при воздействии каждого вещества отдельно (сохранность меристем винограда после 120-ти минутной инкубации составила около 87%).

Можно предположить, что композиция 1,2-ПД и ПВП в меньшей степени влияла на флуоресценцию в низковолновой области спектра по сравнению с каждым из этих веществ в отдельности, т.к. практически не вызвала усиления окислительных процессов, а, значит, оказывало более слабый повреждающий эффект в растительных клетках [1].

### Литература

1. Diaz E., Sad M.E., Iglesia E. Homogeneous Oxidation Reactions of Propanediols at Low Temperatures // Chem. Sus. Chem. – 2010 – Vol.3, № 9. – P. 1063–1070.
2. Лысак Ю.С., Стрибуль Т.Ф., Компаниец А.М. Влияние криопротекторов на флуоресценцию меристем картофеля // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т.21. – №2. – С. 173-178.
3. Стрибуль Т.Ф., Лысак Ю.С., Компаниец А.М. Изменение интенсивности флуоресценции клеток меристемной ткани винограда под действием ряда криопротекторов // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т.20. – №3. – С. 297-302.
4. Феофанов А.В. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях // Успехи биологической химии. – 2007. – Т.47. – С. 371-410.