

## ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ И СУСПЕНДИРОВАННЫХ КЛЕТОК ТАБАКА

Conditions for the storage and cultivation of the cells of *Nicotiana tabacum* culture were investigated. The cells immobilized in the Ca-alginate gel were examined. The viability of tobacco cells for the immobilization culture was compared with that for the suspension culture in different conditions. It was shown, that immobilized cells were more steady than the suspended cells under mechanical influence. Optimum conditions for preserving the cell viability were determined by following factors: the immobilization of tobacco cells, storage at low temperature in the medium without any nutrients.

В настоящее время возможность использования культур растительных клеток для получения биологически активных соединений общепризнана [1]. Однако применение культур растительных клеток для промышленного синтеза веществ сопряжено с рядом проблем (медленный рост культуры, способность клеток к агрегации, выращивание в строго асептических условиях, чувствительность к механическим повреждениям и т. д.), ограничивающих их внедрение в производство [2].

Иммобилизация растительных клеток помогает преодолеть указанные трудности и предопределяет возможность их эффективного использования для получения ценных соединений [3, 4]. Включение растительных клеток в различные носители приводит также к изменению процессов вторичного метаболизма и увеличению выхода метаболитов, например продукции фенолов, иммобилизованных в альгинате кальция клетками суспензионной культуры *Nicotiana tabacum* по сравнению с ее свободными клетками [5].

Длительное использование клеток суспензионной культуры и оптимизация технологических процессов требуют изучения жизнеспособности таких клеток при различных режимах культивирования, хранения и выбора прочих условий, что и послужило целью данной работы.

### Материал и методика

Объектом исследования являлась суспензионная культура клеток табака (*Nicotiana tabacum* сорта Samsun), полученная из листовой каллусной ткани. Субкультивирование этой культуры осуществлялось каждые 14 дней. На основании данных литературы и результатов ранее проведенных исследований [6] была отобрана питательная среда RMNO [7], обеспечивающая рост рыхлой каллусной ткани на листовых эксплантах. За основу ее минеральных добавок была взята среда Мурасиге и Скуга (MS) [8] с 3 мг/л ИУК, 0,1–2,4-Д, 0,04 мг/л кинетина. Среду того же состава использовали и при выращивании суспензионной культуры, но без добавления агара; pH среды перед автоклавированием доводилась до 5,7. Культивирование проводилось в 0,5 л колбах Эрленмейера, содержащих 0,2 л среды, в темноте на роторном шейкере (100 об/мин) при 24,5 °С. Доля инокулюма составляла 10 % (объем к объему).

Для хранения суспензированных и иммобилизованных клеток табака использовали два варианта среды: в качестве полноценной питательной – MS и раствор маннита (0,44 М) в качестве среды, лишенной питательных элементов, но не вызывающей плазмолиза клеток.

Температурные условия хранения – комнатная и пониженная температура (4–6 °С) – выбирали как оптимальные в первом случае для роста клеток и во втором – для снижения в них интенсивности метаболических процессов.

Иммобилизацию клеток проводили включением их в Са-альгинатный гель, поскольку данный метод отличается простотой, мягкими условиями включения, механической прочностью и возможностью длительного удерживания клеток в полисахаридном матриксе [9].

Жизнеспособность клеток табака в свободном и иммобилизованном состояниях определялась по окрашиванию нейтральным красным. Методика

окрашивания сводится к отбору проб суспензии клеток или препарата иммобилизованных клеток и добавлению красителя – 1–2 капля 2 % спиртового раствора нейтрального красного. Сразу же после внесения красителя в пробу добавляли несколько капель щелочи (0,01 M NaOH) для того, чтобы раствор приобрел слабощелочную реакцию и обесцветился. Проба окрашивалась в течение 5–10 мин. У жизнеспособных клеток, помещенных в слабощелочной раствор нейтрального красного, вакуоли интенсивно приобретали малиново-красный цвет. Количество жизнеспособных клеток определялось с помощью микроскопа в камере Горяева. Указанный метод прост и позволяет достаточно надежно обнаружить и произвести подсчет числа метаболизующих клеток как в культуре, так и в иммобилизованных препаратах.

### Результаты и их обсуждение

Анализ полученных результатов показал, что более 70 % клеток табака в суспендированном состоянии были жизнеспособными при хранении в течение 3 сут при комнатной температуре как в среде MS, так и в растворе маннита. Однако уже к концу 6 сут количество живых клеток в суспензиях было незначительно и составляло 11 % от исходного количества (рис. 1).

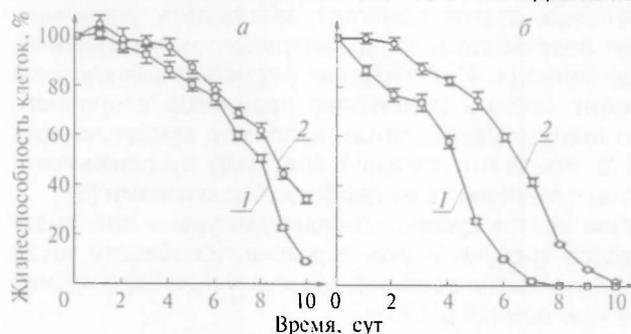


Рис. 1. Динамика изменения количества жизнеспособных клеток табака в суспензии (1) и иммобилизованных препаратах (2) при хранении в среде MS при пониженной (а) и комнатной (б) температуре

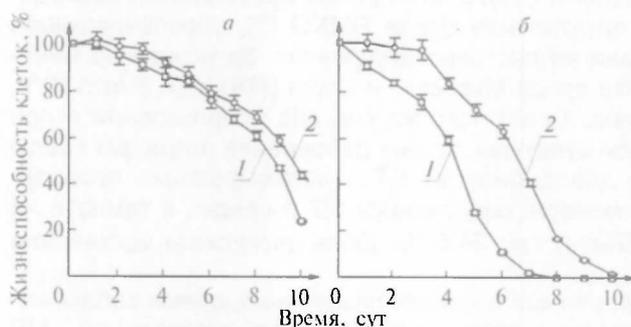


Рис. 2. Динамика изменения количества жизнеспособных клеток табака в суспензии (1) и иммобилизованных препаратах (2) при хранении в растворе маннита при пониженной (а) и комнатной (б) температуре

при понижении температуры.

В случае включения клеток табака в гель альгината кальция резко возрастала продолжительность их жизни как при комнатной температуре, так и при охлаждении до 4–6 °С. Причем, если в суспензиях с течением времени наблюдалось монотонное уменьшение числа живых клеток, то для препаратов иммобилизованных клеток были характерны периоды стабилизации. Так, в условиях хранения при комнатной температуре в первые 2 сут число

Динамика изменения содержания жизнеспособных клеток, суспендированных в среде MS, была практически идентичной в растворе маннита (рис. 1, 2). Снижение температуры среды до 4–6 °С резко повышало длительность жизни суспендированных клеток: более 70 % от их исходного количества сохраняли жизнеспособность в течение 6 сут, но к 10 сут число таких клеток падало резко (до 24 % в – растворе маннита и до 12 % – в среде MS). Более высокая степень жизнеспособности клеток в растворах, содержащих маннит, вероятно, связана с замедлением процессов метаболизма в клеточной культуре. В этом случае влияние повреждающих факторов среды сказывается слабее, особенно

живых иммобилизованных клеток в гранулах оставалось практически неизменным как в среде MS, так и в растворе маннита (см. рис. 1, 2). Дальнейшее хранение приводило к незначительному снижению количества жизнеспособных клеток – к 5 сут жизнеспособными оставались более 80 % клеток. В последующем гибель клеток происходила гораздо интенсивнее, и к 10-суточному периоду жизнеспособными оказались менее 5 % клеток. Тем не менее на 6 сут, т. е. к сроку, когда в суспензиях оставалось около 11 % живых клеток, в гранулах геля их было около 80 %, а через 7 сут – более 40 % (в суспензиях к этому периоду гибель клеток составила практически 100 %).

Охлаждение иммобилизованных препаратов увеличивало продолжительность жизни клеток, включенных в гель: после 8 сут в растворе маннита сохраняли жизнеспособность около 70 % клеток, а в среде MS – 63 %, через 9 сут – 59 и 46 % соответственно (см. рис. 1, 2).

При использовании растительных клеток в биотехнологическом производстве большое значение имеет повышение их устойчивости к механическим воздействиям (повреждениям), обусловленное необходимостью перемешивания. В этой связи нами исследовалось воздействие двух видов механического перемешивания среды – с помощью магнитной мешалки и барботированием воздуха – на сохранение жизнеспособности суспендированных и иммобилизованных клеток культуры табака. Суспендированные клетки повреждались в меньшей степени при барботировании воздухом (рис. 3): через 30 мин практически не отмечалась их гибель, в то время как перемешивание магнитной мешалкой приводило к потере почти 40 % клеток. После 1 ч барботирования погибали до 30 %, при работе магнитной мешалки – 80 % клеток. Дальнейшее перемешивание вызывало более интенсивное разрушение суспендированных клеток, и через 2 ч при барботировании сохраняли жизнеспособность лишь 10 % клеток, а перемешивание магнитной мешалкой практически приводило к полной гибели культуры.

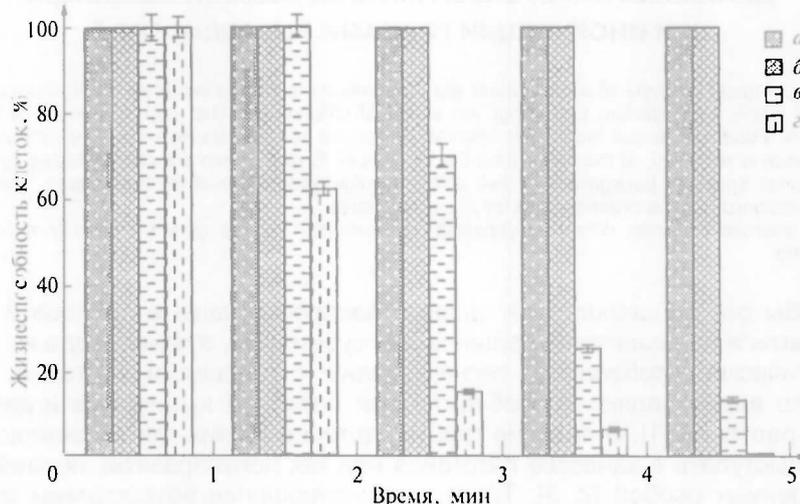


Рис. 3. Динамика изменения количества жизнеспособных клеток табака в суспензии и иммобилизованных препаратах при культивировании с использованием различных способов перемешивания культуры:

а, б – в иммобилизованных препаратах при барботировании воздухом и перемешивании магнитной мешалкой соответственно; в, г – в суспензии при барботировании воздухом и перемешивании магнитной мешалкой соответственно

Иммобилизация клеток табака резко повышала их устойчивость к механическому повреждению. При применяемых способах перемешивания клетки сохраняли жизнеспособность в течение 2 ч и более.

В заключение отметим, что наиболее оптимальными условиями для хранения культуры клеток табака явились прежде всего иммобилизация клеток, хранение при пониженной температуре и среда, лишенная питательных

веществ (с маннитом). Кроме того, как и следовало ожидать, при иммобилизации многократно повышалась устойчивость клеток культуры табака к механическим воздействиям.

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М., 1999. С. 43.
2. Бутенко Р.Г., Гусев М.В., Киркин А.Ф. и др. Клеточная инженерия. М., 1987. С. 27.
3. Tong-Jen Fu // *Chemtech*. 1998. 28(1). P. 40.
4. Misawa M. Plant tissue culture: An alternative for production of useful metabolite. *FAO Agricultural services bulletin*. 1994. № 108.
5. Shibasaki-Kitakawa N., Iizuka Y., Yonemoto T. // *J. Chem. Eng. Japan*. 2001. Vol. 34. № 11. P. 1431.
6. Юрин В.М., Кудряшов А.П., Шапчиц М.П., Бердичевец Л.Г. // Сохранение и устойчивое использование растительных ресурсов: Материалы междунар. симпоз. Бишкек, 2003. С. 71.
7. Сидоров А.В., Пивень Н.М., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Соматическая гибридизация пасленовых. Киев, 1985. С. 132.
8. Murashige T., Skoog F. // *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15. P. 473.
9. Броделиус П. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы. М., 1988. С. 154.

Поступила в редакцию 03.02.2004.

**Владимир Михайлович Юрин** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений.

**Мария Павловна Шапчиц** – младший научный сотрудник НИЛ физиологии растительной клетки.

**Анатолий Петрович Кудряшов** – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и биохимии растений.

УДК 633.11 «324»:632.484

С.Ф. БУГА, О.В. АРТЕМОВА, А.Г. ИЛЬЮК

### ДИНАМИКА ПАТОГЕНЕЗА КОЛОСА ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИНОКУЛЯЦИИ ГРИБАМИ *FUSARIUM SPP.*\*

A mycological analysis of winter wheat ear components is carried out after the artificial contamination of plants by *Fusarium* spp. fungi. An essential difference in the aggressiveness of different species of *Fusarium* genus isolates is marked. From the studied species the most competitive – *F. culmorum* is revealed, at the same time the isolates of *F. oxysporum* are characterized by low aggressiveness against a background of their ability to quick colonization of the host-plants. The highest speed of colonization is characteristic for *F. poae* isolates.

The sources of winter wheat caryopses contamination by the fungus *Fusarium* species are determined.

Грибы рода *Fusarium* Link. широко распространены в природе и могут развиваться на различных органических субстратах, в почве, воде и т. д. Их биологические особенности тесно связаны с условиями обитания. Большинство видов являются возбудителями болезней культурных и дикорастущих растений [1]. В системе гриб – растение-хозяин грибы данного рода могут выступать в качестве патогенов или как полупаразиты, поражающие ослабленных особей [2, 3]. Такие взаимоотношения обусловлены способностью этих грибов продуцировать микотоксины (более 150 соединений) и экзоферменты, попадание которых в организм человека или животных может привести к поражению кроветворных и иммунокомпетентных органов [4–6]. Именно поэтому главная опасность поражения посевов зерновых культур грибами рода *Fusarium* заключается в накоплении микотоксинов в продукции (зерно, солома).

Ежегодные потери сельскохозяйственных культур, связанные с фузариозами, исчисляются миллиардами долларов [7], прямые потери урожая ози-

\* Авторы статьи – сотрудники Научно-исследовательского республиканского унитарного предприятия «Белорусский институт защиты растений» (НИРУП «БелИЗР»).