

УДК 581.143

Т.И. ДИТЧЕНКО, В.М. ЮРИН

РЕГУЛЯЦИЯ РОСТОВЫХ ПРОЦЕССОВ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ *NICOTIANA TABACUM* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКЗОГЕННОЙ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ*

The effect of exogenic salycilic acid on the specific rate of growth and the biomass doubling time of *Nicotiana tabacum* callus culture in depends on the nutrient medium hormonal balance was studied.

В результате весьма интенсивного изучения физиологических эффектов салициловой кислоты (СК) установлено, что ее синтез играет ключевую роль в реакции сверхчувствительности, а также в пролонгированной системной устойчивости растений к широкому кругу инфекций [1]. Получено немало данных о возможности участия данного соединения в индукции механизмов устойчивости растительного организма также и к неблагоприятным абиотическим факторам [2]. Все это в совокупности свидетельствует об активации защитных реакций растений под влиянием СК.

Вместе с тем на сегодняшний день не до конца изученными остаются рострегуляторные свойства СК. Хотя выявлено значительное возрастание митотического индекса у СК-обработанных растений и, как следствие, – выраженная ростстимулирующая активность данного соединения [3], предполагается, что СК, подобно другим ингибиторам фенольной природы, способна вызывать сильное торможение ростовых процессов либо за счет подавления синтеза индолилуксусной кислоты (ИУК), либо ускорения ее распада под действием ИУК-оксидазы.

Хорошей моделью для изучения многих физиологических процессов растительного организма является культура клеток и тканей *in vitro*. С использованием данного метода можно изучать такие процессы, как деление и растяжение, дифференцировка растительных клеток под влиянием как внешних, так и внутренних факторов, прежде всего фитогормонов [4]. В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование закономерностей воздействия экзогенной СК на показатели роста каллусной культуры *Nicotiana tabacum* в зависимости от гормонального баланса питательной среды.

Материал и методика

В качестве объекта исследований использовали длительно пассируемую каллусную культуру *Nicotiana tabacum*. Каллусы культивировали на питательной среде Мурасиге и Скуга [5] в присутствии 3 мг/л ИУК, 0,2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и 0,04 мг/л кинетина (среда RMNO) [6] в темноте в условиях термостата при 24,5 °С.

* Авторы статьи – сотрудники кафедры физиологии и биохимии растений.

Изучение влияния СК на показатели роста каллусной культуры *Nicotiana tabacum* включало 4 серии опытов, которые различались по составу использованных сред: среда RMNO (I); модифицированная среда RMNO, содержащая 1,5 мг/л ИУК, 0,1 мг/л 2,4-Д, 0,02 мг/л кинетина (II); модифицированная среда RMNO, содержащая 1,5 мг/л ИУК, 0,1 мг/л 2,4-Д, 0,04 мг/л кинетина (III); модифицированная среда RMNO, содержащая 3,0 мг/л ИУК, 0,2 мг/л 2,4-Д, 0,02 мг/л кинетина (IV). Величина pH питательных сред до автоклавирования составляла 5,7÷5,8.

Рострегуляторные свойства СК исследовались в диапазоне концентраций от 10^{-7} до 10^{-3} моль/л. Определялись такие параметры каллусных культур, как удельная скорость роста и время удвоения биомассы [7]. На рис. 1, 2 и в таблице представлены среднearифметические значения и стандартные ошибки для 5–6 экспериментов для каждой концентрации СК.

Значения времени удвоения биомассы каллусной культуры *Nicotiana tabacum* в зависимости от концентрации экзогенной СК

Концентрация СК, моль/л	Вариант питательной среды			
	I	II	III	IV
0	2,8±0,3	3,9±0,7	3,8±0,5	6,7±0,8
10^{-7}	3,8±0,6	8,4±2,6	2,7±0,4	7,7±0,7
$5 \cdot 10^{-7}$	3,9±0,1	3,4±0,7	2,2±0,2	5,9±1,1
10^{-6}	3,9±0,6	3,3±0,7	2,3±0,2	4,3±0,5
$5 \cdot 10^{-6}$	2,8±0,3	3,0±0,5	2,5±0,2	4,7±0,2
10^{-5}	2,0±0,1	2,5±0,5	1,8±0,2	4,2±0,7
$5 \cdot 10^{-5}$	3,5±0,4	5,5±2,0	2,7±0,5	4,3±0,5
10^{-4}	3,9±0,7	12,9±2,2	3,0±0,5	4,5±0,4
$5 \cdot 10^{-4}$	6,0±0,5	20,2±5,1	4,6±0,5	4,9±0,3
10^{-3}	9,0±0,9	46,9±4,9	20,1±2,1	23,2±5,3

Примечание. Здесь и на рис. 1, 2 * – различия достоверны по сравнению с контролем при уровне значимости $P = 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Для каллусов *Nicotiana tabacum*, культивируемых на питательной среде RMNO, которая характеризуется сбалансированным сочетанием концентраций ауксинов и цитокинина для поддержания оптимального роста исследуемой культуры, концентрационная зависимость действия СК на удельную скорость роста имела колоколообразный вид: наблюдалось достоверное ингибирование ростовых процессов в присутствии $5 \cdot 10^{-7}$ и $5 \cdot 10^{-4} \div 10^{-3}$ моль/л СК и достоверная их стимуляция под действием концентрации 10^{-5} моль/л (см. рис. 1). Увеличение удельной скорости роста каллусной культуры *Nicotiana tabacum* в присутствии 10^{-5} моль/л СК достигало в среднем 40 %. Под действием $5 \cdot 10^{-5} \div 10^{-4}$ моль/л СК снижение данного показателя составляло около 30 %, а при более высоких концентрациях – от 54 до 70 %.

Анализ времени удвоения биомассы исследуемой культуры показал, что в диапазоне концентраций $10^{-7} \div 10^{-6}$ моль/л СК вызывала некоторое его возрастание (см. таблицу). В присутствии 10^{-5} моль/л СК наблюдалось достоверное снижение данного показателя по сравнению с контролем в 1,4 раза. Начиная с концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л СК вызывала существенный рост времени, за которое происходило удвоение биомассы каллусов. В присутствии самой высокой из протестированных концентраций – 10^{-3} моль/л анализируемый показатель увеличивался более чем в 3 раза.

При изучении действия СК на показатели роста каллусной культуры *Nicotiana tabacum*, инкубируемой на модифицированной питательной среде RMNO с вдвое уменьшенной концентрацией всех фитогормонов (II), было показано, что, в отличие от предыдущей серии

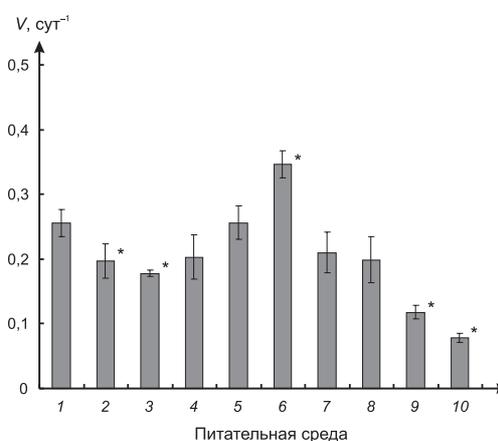


Рис. 1. Зависимость удельной скорости роста V каллусной культуры *Nicotiana tabacum* на питательной среде RMNO от концентрации СК (моль/л). Здесь и на рис. 2: 1 – контроль, 2 – 10^{-7} , 3 – $5 \cdot 10^{-7}$, 4 – 10^{-6} , 5 – $5 \cdot 10^{-6}$, 6 – 10^{-5} , 7 – $5 \cdot 10^{-5}$, 8 – 10^{-4} , 9 – $5 \cdot 10^{-4}$, 10 – 10^{-3}

опытов, воздействие $10^{-7} \div 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л СК не вызывало достоверного изменения удельной скорости роста. Однако, как и в случае полной питательной среды RMNO, присутствие СК в концентрации 10^{-5} моль/л приводило к достоверному возрастанию скорости ростовых процессов исследуемой каллусной культуры, которое достигало в среднем 60 %. Ингибирующий эффект СК в концентрациях 10^{-4} и 10^{-3} моль/л был гораздо более выраженным, чем для питательной среды RMNO, и составлял 69 и 92 % соответственно. Согласно полученным данным, СК в концентрациях 10^{-7} , а также $5 \cdot 10^{-5} \div 10^{-3}$ моль/л достоверно увеличивала время удвоения биомассы каллусов табака, а в концентрации 10^{-5} вызывала его снижение (см. таблицу). Для остальных концентраций СК не отмечено статистически достоверного изменения данного показателя по сравнению с контролем. Самое высокое значение времени удвоения биомассы ($46,9 \pm 4,9$ сут) было установлено в случае культивирования каллусов на средах, содержащих 10^{-3} моль/л СК.

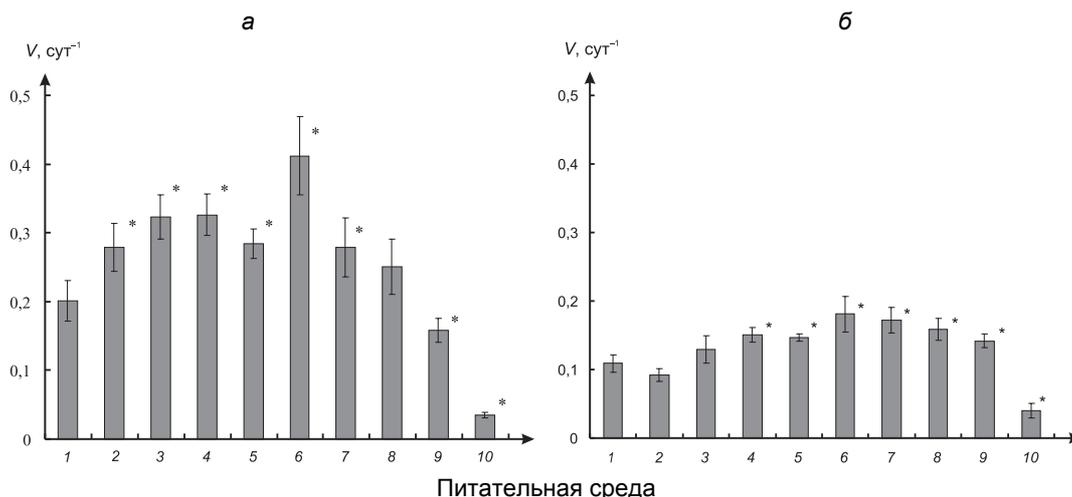


Рис. 2. Зависимость удельной скорости роста каллусной культуры *Nicotiana tabacum* на модифицированной питательной среде RMNO, содержащей 1,5 мг/л ИУК, 0,1 мг/л 2,4-Д, 0,04 мг/л кинетина (а) и 3,0 мг/л ИУК, 0,2 мг/л 2,4-Д, 0,02 мг/л кинетина (б), от концентрации СК

В целом при выращивании каллусной культуры *Nicotiana tabacum* на питательной среде с уменьшенным вдвое по сравнению с питательной средой RMNO содержанием фитогормонов выявлены закономерности, отмеченные в предыдущей серии опытов: достоверная стимуляция ростовых процессов в присутствии 10^{-5} моль/л СК и их ингибирование под действием более высоких ее концентраций. При этом ростингибирующий эффект 10^{-3} моль/л СК был более чем в 4 раза выше на питательной среде с вдвое сниженным содержанием фитогормонов, чем при оптимальных их концентрациях. Исследования рострегуляторных свойств СК для каллусной культуры *Nicotiana tabacum*, выращиваемой на питательной среде, характеризующейся вдвое уменьшенной концентрацией ауксинов при неизменном уровне цитокинина (III), позволили выявить, что, в отличие от предыдущих серий опытов, СК вызвала достоверное увеличение удельной скорости роста каллусов табака в концентрациях $10^{-7} \div 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л (см. рис. 2 а).

Наиболее выраженный стимулирующий эффект, как и для ранее протестированных питательных сред, был зарегистрирован в присутствии 10^{-5} моль/л СК. Возрастание удельной скорости роста каллусов *Nicotiana tabacum* в этом случае было самым высоким – от $0,201 \pm 0,029$ сут⁻¹ в контроле до $0,412$ сут⁻¹ в результате внесения в среду СК. В концентрациях $5 \cdot 10^{-4}$ и 10^{-3} моль/л СК, так же как и в предыдущих экспериментах, вызывала значительное подавление удельной скорости роста каллусной культуры табака, достигавшее 82 % в присутствии 10^{-3} моль/л СК.

СК в концентрациях $5 \cdot 10^{-7} \div 10^{-5}$ моль/л уменьшала время удвоения биомассы. Минимальное его значение ($1,8 \pm 0,2$ сут) было характерно для каллусов, культивируемых на среде, содержащей 10^{-5} моль/л СК. Зарегистрированный показатель являлся самым низким не только для данной серии опытов, но и для всех протестированных вариантов питательных

сред. В концентрации 10^{-3} СК вызывала возрастание времени удвоения биомассы каллусов *Nicotiana tabacum* по сравнению с контролем более чем в 5 раз.

Анализ полученных данных позволяет заключить, что характер влияния СК на показатели роста каллусов табака, культивируемых в условиях 50 % снижения концентраций ауксинов в питательной среде, значительно отличался от предыдущих серий опыта. Снижение уровня 2,4-Д и ИУК в питательных средах приводит к расширению диапазона концентраций СК, характеризующихся ростстимулирующим действием. Данный эффект исследуемое соединение начинает проявлять уже при более низких уровнях содержания в питательной среде – $5 \cdot 10^{-7} \div 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, т. е. в $10 \div 20$ раз ниже, чем для каллусов табака, культивируемых на питательных средах со сбалансированным содержанием ауксинов и цитокининов.

При изучении рострегуляторных свойств СК для каллусной культуры *Nicotiana tabacum*, выращиваемой на модифицированной питательной среде RMNO с вдвое уменьшенной концентрацией кинетина при неизменном уровне ауксинов, была зарегистрирована самая низкая ростовая активность (рис. 2 б). Так, в контроле удельная скорость роста была практически в 2,5 раза меньше по сравнению с таковой для питательной среды RMNO. Можно заключить, что снижение уровня кинетина в питательной среде крайне неблагоприятно отражается на ростовых характеристиках каллусной культуры *Nicotiana tabacum*, в отличие от уменьшения концентрации ауксинов. Как и в предыдущей серии опытов, СК вызывала стимуляцию ростовых процессов каллусов табака в достаточно широком диапазоне концентраций – от 10^{-6} до $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Максимальный стимулирующий эффект был зарегистрирован в присутствии 10^{-5} моль/л СК. Удельная скорость роста каллусов *Nicotiana tabacum* увеличивалась в 1,7 раза (с $0,109 \pm 0,013$ сут $^{-1}$ в контроле до $0,181 \pm 0,026$ под действием указанной концентрации СК). Таким образом, величина ростактивирующего эффекта 10^{-5} моль/л СК на средах с вдвое уменьшенным содержанием кинетина была ниже, чем на средах со сниженным вдвое уровнем ауксинов. В отличие от рассмотренных ранее вариантов питательных сред в данной серии опытов СК вызывала достоверное возрастание удельной скорости роста даже в достаточно высоких концентрациях ($5 \cdot 10^{-5} \div 5 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Достоверное уменьшение удельной скорости роста было установлено только для 10^{-3} моль/л СК – около 60 % от контрольного уровня.

Значения времени удвоения биомассы каллусов *Nicotiana tabacum*, культивируемых на средах, содержащих $10^{-6} \div 5 \cdot 10^{-4}$ моль/л СК, практически не различались между собой (см. таблицу). Достоверный рост данного показателя по сравнению с контролем был зарегистрирован только в присутствии самой высокой из использованных в опытах концентраций СК – 10^{-3} моль/л.

Анализ полученных данных позволяет заключить, что независимо от уровня экзогенных регуляторов роста (ауксинов и цитокининов) СК в концентрации 10^{-3} моль/л вызывает ингибирование ростовых процессов каллусной культуры *Nicotiana tabacum*, достигающее максимальной величины при снижении концентраций как ауксинов, так и цитокининов в питательной среде. Механизм данного эффекта, вероятнее всего, аналогичен механизму действия фенольных ингибиторов роста, которые оказывают сильное влияние на рост растений в концентрациях на 2–3 порядка больших по сравнению с таковыми для эндогенных фитогормонов. В то же время СК в концентрации 10^{-5} моль/л вызывает существенную стимуляцию роста каллусной культуры *Nicotiana tabacum*. Аналогичные результаты были получены при обработке проростков пшеницы СК в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л [8]. При этом в обработанных растениях наблюдалось возрастание уровней как эндогенных цитокининов, так и ИУК. Характер и степень модификации ростовых процессов каллусов *Nicotiana tabacum* под действием $10^{-7} \div 5 \cdot 10^{-6}$, а также $5 \cdot 10^{-5} \div 5 \cdot 10^{-4}$ моль/л СК зависит от гормонального баланса питательной среды. Уменьшение вдвое уровня ауксинов в среде культивирования приводит к проявлению ростстимулирующего эффекта СК в концентрациях от 10^{-7} до $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. При снижении содержания цитокинина в питательной среде СК вызывает стимуляцию ростовых процессов в самом широком диапазоне концентраций – от $5 \cdot 10^{-7}$ до $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Полученные данные указывают на способность СК существенно активизировать процессы клеточного деления и роста с целью их поддержания на оптимальном уровне при нарушении баланса ауксинов и цитокининов.

Поскольку многие из хорошо изученных физиологических эффектов СК проявляются только при концентрациях (10^{-5} – 10^{-3} моль/л), поэтому ее отнесение к фитогормонам по настоящее время является дискуссионным [9]. Обнаруженное в наших экспериментах изменение скорости ростовых процессов каллусной культуры табака под влиянием гораздо более низких концентраций СК (10^{-7} – 10^{-5} моль/л) свидетельствует о достаточно высокой физиологической активности данного соединения, а также позволяет рассматривать СК в качестве эффективного регулятора роста растений.

1. Raskin I. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1992. Vol. 43. P. 439.
2. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа, 2001.
3. Сахабутдинова А.Р., Безрукова М.В., Фатхутдинова Р.А., Шакирова Ф.М. // Иммуноанализ регуляторов роста в решении проблем физиологии растений, растениеводства и биотехнологии: Материалы III конф. Уфа, 2000. С. 184.
4. Носов А.М. // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 6. С. 837.
5. Murashige T., Skoog S. // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. P. 473.
6. Сидоров В.А., Пивень Н.М., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Соматическая гибридизация пасленовых. Киев, 1985.
7. Загребельный С.Н. Биотехнология: в 2 ч. Ч. 1. Культивирование продуцентов и очистка продуктов. Новосибирск, 2000.
8. Шакирова Ф.М., Безрукова М.В., Сахабутдинова А.Р. // Агрехим. 2000. № 5. С. 52.
9. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Г. и др. Физиология растений. М., 2005.

Поступила в редакцию 04.04.07.

Татьяна Ивановна Дитченко – кандидат биологических наук, доцент.

Владимир Михайлович Юрин – доктор биологических наук, профессор.