

ЕМЕЛЬЯНОВА И.С.

**ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР РАСТЕНИЙ
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРЕССОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ**

Аннотация: В данном обзоре рассмотрено использование каллусных культур как модельных объектов для изучения стрессовых воздействий на растения. Проанализированы некоторые методики, применяемые при исследовании процессов, происходящих в каллусных культурах растений при действии тяжелых металлов. Приведены данные по использованию каллусной культуры некоторых видов растений при изучении стрессовых воздействий.

Ключевые слова: каллусная культура, окислительный стресс, стрессовое воздействие, тяжелые металлы, устойчивость растений.

EMELYANOVA I.S.

**ABOUT THE USING OF CALLUS CULTURE OF THE PLANTS
FOR THE STRESSFUL IMPACT INVESTIGATION**

Abstract: This paper presents data on the using callus culture as the model object to investigation of stressful impact on plants. We discuss some methods that are used to investigation processes occurring in the callus culture of plants under effect of heavy metals. Data on the using of callus culture of some plant species to investigation of stressful impact are presented.

Keywords: callus culture, oxidative stress, stressful impact, heavy metals, plant resistance.

Клеточные механизмы устойчивости растений к окислительному стрессу до сих пор изучены недостаточно. В последние годы для исследования этих вопросов используют культуры растительных клеток, дающие возможность работать с более простым и однородным материалом в контролируемых условиях [1]. Трудности, возникающие при получении каллусной культуры и растений-регенерантов, особенно характерны для культуры *in vitro*. Высшие растения расцениваются как модульные организмы. При этом признаки модульной организации – модульное строение, открытый рост и (или) циклический морфогенез – у разных групп высших растений могут проявляться по-особенному. Модульное строение многоклеточных организмов на анатомическом уровне выражается в клеточной организации макроморфологических структур. Анализ экспериментальных данных и теоретических обобщений в области культуры *in vitro* растений дает возможность предложить модельный подход к исследованию формирования сложной модульной организации растений. Удобной моделью в этом отношении может служить каллус, полученный из различных растительных эксплантов и развивающийся в строго контролируемых условиях [2]. Использование клеточных культур в качестве

экспериментальных объектов при исследовании механизмов повреждения растений имеет ряд преимуществ, позволяющих оценить параметры физиологии клетки; при этом культуры клеток и протопласты представляют собой довольно однородную систему, в которой исключены многие проблемы, связанные с надклеточными системами регуляции. Использование клеточных культур в этих целях требует тщательного изучения особенностей полученных линий, так как ответная реакция клеток на внешнее воздействие изменяется под влиянием гетерогенности каллусной культуры, связанной с эпигенетическими особенностями исходных клеток экспланта, а также условий культивирования [3].

В связи с изменениями климатической ситуации возникает потребность в получении растений, устойчивых к комплексу неблагоприятных факторов. Изменения условий окружающей среды (водный дефицит, кислородная недостаточность (затопление), засоление, гербициды и т.д.) приводят к образованию и аккумуляции активных форм кислорода, которые вызывают деградацию биомолекул. Поэтому получение растений, устойчивых к стрессовым факторам, является актуальным.

Ионы тяжелых металлов (ИТМ) считаются наиболее опасными токсикантами, поскольку они могут вызывать обширные патологические изменения во многих тканях растительного организма. Как правило, ИТМ действуют совместно с неблагоприятными абиотическими факторами, усиливая стрессовое давление окружающей среды [6].

Имеются данные, описывающие воздействие различных тяжелых металлов на каллус культурных растений. Для получения каллусной культуры поверхностно стерилизованные семена огурца (*Cucumis sativus* L., сорт Единство) и редиса (*Raphanus sativus* L., сорт Красный великан) проращивали 7 дней на воде, после чего вычленили экспланты, делали насечки и помещали в чашки Петри на питательную среду Мурасиге и Скуга (МС), содержащую 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) и 6-бензиламинопурин (6-БАП), глицин, никотиновую кислоту и мезоинозит для образования каллусной ткани. Полученную каллусную ткань пересаживали на среду МС, содержащую ионы тяжелых металлов в концентрациях 10 мкМ, 0,1 мМ и 1мМ. Было показано, что и у редиса, и у огурца низкие концентрации тяжелых металлов стимулировали рост каллусов, тогда как в высоких концентрациях сильно угнетали каллусогенез. По токсическому действию тяжелых металлов на каллусогенез и рост каллусов их можно расположить в следующем порядке: $Zn^{2+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Pb^{2+}$. [4]

Кадмий является одним из наиболее распространенных в природе поллютантов, для которого характерно быстрое поступление в клетки растений. В большинстве случаев это сопровождается развитием в них окислительного стресса, что, в свою очередь, приводит к изменениям в содержании фенольных соединений (ФС), являющихся важными

компонентами антиоксидантной системы растений. Каллусные культуры, полученные из стебля чайного растения (*Camellia sinensis* L., грузинская разновидность), выращивали в темноте на модифицированной питательной среде Хеллера. В опытных вариантах к ней добавляли кадмий в виде соли. Длительность пассажа составляла 40 дней. Материал для анализа брали на 25-й и 40-й дни культивирования. ФС экстрагировали 96%-ным этанолом. Этанольные экстракты пропускали через мембранный фильтр и анализировали методом ВЭЖХ. В результате в каллусных культурах, растущих на среде с кадмием, было отмечено упрощение фенольного комплекса. Все это свидетельствует об изменениях в метаболизме фенольных соединений в культурах чайного растения при действии кадмия [5]. Рост содержания фенольных соединений может быть обусловлен защитной реакцией клеток. Различные стрессоры, в том числе и ТМ, индуцируют в растениях оксидативный стресс, запускающий мощную систему антиоксидантной защиты.

Методы клеточной селекции были использованы для получения клеточных линий и растений льна многолетнего, устойчивых к окислительному стрессу. Для введения в культуру *in vitro* семена стерилизовали раствором гипохлорита натрия в течение 20–25 мин., с последующей трехкратной промывкой дистиллированной водой в течение 10 мин. Каллус получали из семядолей 14-дневных стерильно выращенных проростков. Для каллусообразования семядоли и гипокотили высаживали на модифицированную среду МС. Для проведения селекции необходимо было определить чувствительность к параквату каллусных культур, поэтому каллусы были высажены на твердую питательную среду МС с добавлением параквата (от 0,1 до 5 мкмоль/л). Показано, что одним из механизмов устойчивости полученных линий к параквату и окислительному стрессу является повышение активности таких антиоксидантных ферментов, как супероксиддисмутаза (СОД) [7].

Влияние тяжелых металлов и других стрессорных факторов на растения и культуры клеток интенсивно изучается в настоящее время. Но для различных ТМ и видов растений необходимо детальное исследование физиологических и биохимических механизмов. Использование пищевых культур требует постоянного создания новых сортов растений, устойчивых к различным стрессовым факторам. Для этого часто применяют методы культуры тканей. С его помощью можно получить как новый материал для использования его в классической селекции, так и создать генетически измененные формы растений, устойчивые к стрессовым факторам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гарник Е.Ю., Константинов Ю.М., Шмаков В.Н. Различная реакция каллусных линий лиственницы на окислительный стресс, индуцируемый паракватом // *Biopolymers and cell*. – Киев, 2003. – Т. 19. – №3 – С. 247-251.
2. Круглова Н.Н. Каллус как модель для изучения формирования структуры высшего растения // *Известия Уфимского научного центра РАН*. – 2011. – №3-4. – С. 17-22.
3. Лукаткин А.С. Использование каллусных культур кукурузы для оценки устойчивости к холодовому стрессу // *Доклады Российской академии с/х наук*. – 2010. – №5. – С. 10-15.
4. Михайлова И.Д., Лукаткин А.С. Каллусная культура огурца как модель для изучения стрессового воздействия ионов Zn^{2+} и Ni^{2+} // *Сборник тезисов X Международной конференции «Биология клеток растений in vitro и биотехнология»*. – Казань, 2013. – С. 179.
5. Нечаева Т.Л., Храмова Е.П., Высочина Г.И., Загоскина Н.В. Изменения в фенольном комплексе каллусной культуры чайного растения, выращенной на среде с кадмием // *Сборник тезисов X Международной конференции « Биология клеток растений in vitro и биотехнология»*. – Казань, 2013. – С. 183.
6. Сергеева Л.Е., Бронникова Л.И. Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов: новые аспекты комплексной устойчивости // *Сборник тезисов X Международной конференции « Биология клеток растений in vitro и биотехнология»*. – Казань, 2013. – С. 82.
7. Староверов В.В., Степанова А.Ю., Терешонок Д.В., Литвинова И.И. Клеточная селекция в культуре *in vitro* льна многолетнего (*Linum perenne* L.) на устойчивость к окислительному стрессу // *Плодоводство и ягодоводство России*. – М: ГНУ ВСТИСП Россельхозакадемии, 2011. – С. 230-236.