

Состав клеточных стенок каллусных культур земляники с различной способностью к морфогенезу

Е. В. Яблокова, Р. Г. Киямова^{1*}, Н. М. Тюленева,
Е. В. Колесниченко¹, Т. А. Горшкова, Л. В. Желтоножская¹

Институт биологии Казанского научного центра Российской академии наук
420503 Казань, ул. Лобачевского, 2/31

¹Национальный аграрный университет
252041 Киев, ул. Героев Оборона, 15

Проанализирован состав полисахаридов и фенольных соединений клеточных стенок каллусных культур земляники с различной способностью к регенерации растений. Не обнаружено существенных различий ни по содержанию клеточных стенок, ни по составу и содержанию фракций полисахаридов. В то же время спектр фенольных соединений имел четко выраженные отличия: среди фенольных продуктов окисления клеточных стенок регенерирующих каллусных культур значительную долю составлял ванилин, который полностью отсутствовал у нерегенирующих каллусов. Спектрофотометрический анализ позволил предположить, что это связано с наличием феруловой кислоты в клеточных стенках регенерирующих культур.

Введение. Проблема регенерации растений из каллусных культур является одной из центральных в биотехнологии. К сожалению, до сих пор отсутствует теория, позволяющая направленно регулировать процессы морфогенеза, и подбор условий осуществляется, как правило, эмпирически. Поэтому поиск отличий между каллусными культурами с различной способностью к регенерации является актуальным для выявления как маркеров этой способности, так и ключевых звеньев в метаболизме клетки, запускающих и реализующих сложный комплекс процессов формообразования.

Клеточная стенка растительной клетки — многокомпонентная система, выполняющая разнообразные функции. По современным представлениям, одной из фундаментальных ее функций является регуляция роста и морфогенеза [1]. Задача нашей работы состояла в сравнении состава клеточных стенок различных каллусных культур земляники. При этом в нашем распоряжении имелись механически отобраные каллусные культуры, полученные из одного экспланта, выращиваемые на одной питательной среде, но с различной способностью к регенерации растений.

Материалы и методы. *Каллусные культуры.* В работе использованы каллусные культуры земляники садовой (*Fragaria grandiflora*) двух сортов: Русановка и Мускатная. Эксплантами служила верхушечная меристема (0,2 — 1 мм). Для получения каллуса экспланты помещали на модифици-

*Correspondence address.

рованные питательные среды [2], содержащие гормоны в следующих концентрациях (мг/л): ИМК — 1; БАП — 0,1; ГК — 0,1. Каллусообразование начиналось на 6—7-й день культивирования. Через 30 дней первичный каллус отделяли и переносили на свежую питательную среду того же состава. Каллусы культивировали в термостатах при температуре 25 ± 1 °С без освещения. Полученные каллусы различались по цвету, консистенции и интенсивности нарастания каллусной массы, что позволило разделить их на две группы: плотные (узловатые, медленно растущие) и рыхлые (светлые, быстрорастущие). Для получения растений-регенерантов каллусы переносили на морфогенные питательные среды, содержащие БАП (0,5 мг/л) и культивировали их на свету (25 ± 1 °С). На плотных узловатых каллусах на 14—18-й день культивирования начинали формироваться растения-регенеранты. На рыхлых каллусах растения-регенеранты не образовывались. Плотный узловатый каллус был назван регенерирующим, а рыхлый — нерегенерирующим.

Для анализа состава клеточной стенки каллусы снимали с питательной среды на 24-й день культивирования, фиксировали в термостате при температуре 105 °С и досушивали при 60 °С до постоянной массы.

Выделение и фракционирование клеточных стенок. Для выделения клеточных стенок 200 мг сухого растительного материала гомогенизировали в ступке в 10 мл 70 %-го этанола. Гомогенат центрифугировали при 1200 g в течение 5 мин, осадок последовательно промывали четыре раза в 0,5 М К-фосфатном буфере (рН 7,0), дважды — водой и дважды — 80 %-м ацетоном. Для удаления крахмала промытый водой осадок обрабатывали в течение ночи альфа-амилазой (10 ед/мл, «Serva», ФРГ). После двукратной промывки водой и ацетоном выделенные стенки высушивали, взвешивали и фракционировали.

Осадок дважды экстрагировали на кипящей водяной бане в 2 мл 0,5 %-го раствора оксалата аммония (рН 7). Полученные супернатанты объединяли. К оставшемуся после экстракции растительному материалу добавляли 2 мл 4 М КОН с 3 мг/мл NaBH_4 и интенсивно перемешивали в течение 1 ч. Осадок повторно экстрагировали щелочью в течение ночи. Супернатанты объединяли и нейтрализовали ледяной уксусной кислотой. Кислоторастворимые гемицеллюлозы удаляли кипячением в уксусно-азотном реактиве (смесь концентрированной азотной и ледяной уксусной кислот в соотношении 1:10) в течение 1 ч. Оставшийся при этом осадок представлял собой целлюлозу [3], количество которой определяли взвешиванием.

Качественный и количественный состав фракций полисахаридов определяли толуидиновым методом. Фракции клеточных стенок, растворимые в оксалате аммония (ОХА) и в щелочи (КОН), анализировали на содержание гексоз, пентоз и уроновых кислот. К 0,5 мл исследуемого образца добавляли 0,5 мл 4 N серной кислоты и выдерживали в течение 3 ч на кипящей водяной бане. После охлаждения смесь нейтрализовали 1 мл 2 М Na_2CO_3 . Из полученного раствора отбирали 50 мкл в другую пробирку, добавляли 2 мл толуидинового реактива и выдерживали в течение 30 мин на водяной бане. Далее измеряли оптическую плотность при 365, 385 и 630 нм соответственно для гексоз, пентоз и уроновых кислот. Их содержание определяли по калибровочным кривым для стандартов.

Анализ фенольных соединений клеточной стенки. Окисление фенольных соединений клеточных стенок с использованием оксида меди в щелочной среде проводили по методу [4]. После завершения реакции смесь подкисляли до рН 2,5 с помощью HCl и экстрагировали фенольные соединения этиловым эфиром. Пробы высушивали, растворяли в ацетоне и анализировали на стеклянной колонке (250 × 3 мм), заполненной 4 % CE52 на Хромосорбе W (100—200 mesh) («Sigma», США), на хроматографе

Хром-5 («Laboratorni pristroje», Прага). Температуру колонки изменяли по следующей программе: 170 °С — 10 мин, от 170 до 185 °С со скоростью 4 °С/мин с двухминутной задержкой при 185 °С, затем от 185 до 200 °С со скоростью 10 °С/мин и задержкой при 200 °С до завершения анализа. Температура пламенно-ионизационного детектора 210 °С, давление газа носителя (гелий) — 0,85 Па.

Спектрофотометрическое определение содержания феруловой кислоты. Клеточные стенки экстрагировали 1 N NaOH в течение 16 ч при комнатной температуре [5], центрифугировали при 2500 g (10 мин), супернатант фильтровали и разбавляли в 10 раз водой. 1 мл этого раствора смешивали с 0,5 мл 0,05 M трис-HCl (pH 9,0) и 0,5 мл 0,06 %-го 2,6-дихлорхинон-4-хлоримида (реактив Гиббса) в этаноле. Оптическую плотность сканировали от 500 до 670 нм на спектрометре Hitachi-557. Стандартный спектр поглощения для феруловой кислоты определяли при ее

Таблица 1

Содержание клеточных стенок (КС) и их фракций в различных каллусных культурах земляники (мг/100 мг сухой массы)

Сорт	КС	Фракция, растворимая в		Целлюлоза
		оксалате аммония	КОН	
Мускатная (24 дня)				
регенерирующая	44,5 ± 1,9	8,4 ± 0,7	8,6 ± 0,1	5,2 ± 0,1
нерегенерирующая	41,0 ± 1,0	8,4 ± 0,6	9,3 ± 1,4	5,1 ± 0,1
Русановка (24 дня)				
регенерирующая	46,7 ± 0,6	5,4 ± 0,4	8,8 ± 0,3	4,2 ± 0,1
нерегенерирующая	50,4 ± 0,3	3,0 ± 0,3	7,0 ± 0,8	3,5 ± 0,2

Таблица 2

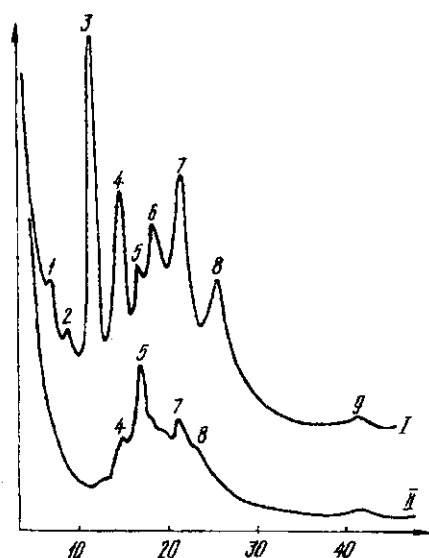
Состав фракций клеточных стенок в различных каллусных культурах земляники (% от массы фракции)

Сорт	Гексозы	Пентозы	Урсеновые кислоты
Фракция, растворимая в оксалате аммония			
Мускатная (24 дня)			
регенерирующая	37,0 ± 7,0	30,8 ± 1,2	31,9 ± 0,1
нерегенерирующая	38,5 ± 3,5	32,1 ± 1,2	29,4 ± 2,4
Русановка (24 дня)			
регенерирующая	37,2 ± 0,1	35,9 ± 0,2	23,2 ± 1,4
нерегенерирующая	40,4 ± 1,1	41,1 ± 3,7	18,2 ± 1,5
Щелоче-растворимая фракция			
Мускатная (24 дня)			
регенерирующая	28,5 ± 0,1	52,4 ± 0,9	19,1 ± 1,6
нерегенерирующая	33,8 ± 3,2	57,8 ± 1,4	8,4 ± 0,5
Русановка (24 дня)			
регенерирующая	33,8 ± 3,0	63,5 ± 4,0	2,7 ± 0,1
нерегенерирующая	40,0 ± 3,0	58,0 ± 3,0	1,3 ± 0,1

Таблица 3
Состав фенольных продуктов окисления клеточных стенок каллусных культур земляники
(% от суммы всех пиков на хроматограмме)

Сорт	Фенольные альдегиды, № пика на хроматограмме								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Мускатная (24 дня)									
регенерирующая	1,9	1,7	33,8	15,1	2,7	11,3	17,7	12,6	3,2
нерегенерирующая	—	—	—	14,4	43,0	3,6	26,2	9,0	3,6

Примечание. 1, 2, 5, 6, 8, 9 — неидентифицированные пики; 3 — ванилин; 4 — ацетованилон; 7 — сиреневый альдегид.



Спектр фенольных продуктов окисления клеточных стенок каллусных культур земляники (сорт Мускатная, 24 дня; I — регенерирующая и II — нерегенерирующая каллусная культура). По оси абсцисс — время удерживания (мин); по оси ординат — интенсивность сигнала

концентрации $4,65 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Результаты и обсуждение. Клеточная стенка составляла более 40 % сухой массы у всех проанализированных каллусных культур (табл. 1). Доля различных фракций в клеточной стенке имела некоторые различия между сортами, но не отличалась существенно у регенерирующих и нерегенерирующих каллусных культур одного сорта (см. табл. 1).

Аналогичный вывод можно сделать о результатах анализа состава фракции клеточных стенок толуидиновым методом (табл. 2).

В то же время спектр фенольных соединений имел четко выраженные отличия: среди фенольных продуктов окисления клеточных стенок регенерирующих каллусных культур значительную долю (34 %) составлял ванилин, который полностью отсутствовал у нерегенерирующих каллусов (табл. 3, рисунок). Существенное превышение количества ванилина среди продуктов окисления клеточной стенки может быть результатом высокого содержания 1) кониферилового спирта в лигнине; 2) феруловой кислоты в клеточной стенке; 3) гликозида кониферилового спирта в клеточной стенке [1]. Известно, что в каллусной массе лишь часть клеток (иногда очень немногочисленная) вовлекается в процесс регенерации. Столь замечная

Таблица 4
Содержание лигнина и феруловой кислоты в клеточных стенках различных каллусных культур земляники (% от массы клеточных стенок)

Сорт	Лигнин	Феруловая кислота
Мускатная (24 дня)		
регенерирующая	18,9 ± 0,8	0,170 ± 0,009
нерегенерирующая	21,4 ± 1,8	—

разница в содержании ванилина среди продуктов окисления клеточной стенки может означать либо крайне высокую концентрацию его предшественников в клетках, способных к регенерации, либо то, что последнее свойство присуще всей совокупности каллусных клеток, а не конкретно тем, которые начинают дифференцироваться.

Все проанализированные каллусные культуры независимо от способности к регенерации содержат среди продуктов окисления клеточной стенки сиреневый альдегид. Синаповая кислота, имеющая две метоксильные группы и являющаяся предшественником синапового спирта, дающего при окислении сиреневый альдегид, образуется в клетках только через феруловую кислоту, включающую одну метоксильную группу [1]. Это означает, что в исследуемых растительных тканях функционирует механизм образования феруловой кислоты. Чтобы объяснить отсутствие ванилина (типичного для продуктов окисления лигнина всех покрытосеменных растений), необходимо знать, входят ли анализируемые фенольные соединения в лигнин или это низкомолекулярные вещества.

Для этого мы провели экстракцию фенольных кислот, связанных с полисахаридами клеточной стенки. Известно, что эфирные связи фенольных кислот с полисахаридами клеточной стенки можно разорвать раствором щелочи [6]. В полученных экстрактах обнаружены резкие отличия в содержании феруловой кислоты (табл. 4). Его корреляция со способностью к регенерации может быть связана с иммобилизацией феруловой кислоты (если она выступает как ингибитор регенерации) посредством включения ее в лигнин или в гликозид. Другим возможным объяснением этого является модификация состава и свойств клеточной стенки вследствие присоединения феруловой кислоты к полисахаридным остаткам. В литературе в последнее время появились данные об участии фенольных кислот клеточной стенки в регуляции способности клетки к растяжению и формированию агрегатов [7, 8]. Наши результаты свидетельствуют о ключевой роли этих соединений в процессах регенерации в каллусных культурах.

О. В. Яблокова, Р. Г. Киямова, Н. М. Тюленева, О. В. Колесніченко, Т. А. Горшкова,
Л. В. Желтоножська

Склад клітинних стінок калусних культур суниці з різною здатністю до морфогенезу

Резюме

Проаналізовано склад полісахаридів фенольних сполук клітинних стінок калусних культур суниці з різною здатністю до морфогенезу. Не виявлено суттєвих відмінностей ні за кількісним вмістом клітинних стінок, ні за складом та вмістом фракцій полісахаридів. У той же час спектр фенольних сполук регенеруючого калусу різко відрізнявся від такого нерегенеруючого калусу. Серед фенольних продуктів окислення клітинних стінок регенеруючих калусних культур

значна частина припадала на ванілін, який повністю був відсутній у нерегенеруючому калусі. На підставі результатів спектрофотометричного аналізу зроблено припущення, що це пов'язано з наявністю ферулової кислоти в клітинних стінках регенеруючого калусу.

E. V. Yablokova, R. G. Kiyamova, N. M. Tuleneva, E. V. Kolesnichenko, T. A. Gorshkova,
L. V. Zheltonozhskaya

Composition of cellular walls in callus cultures of strawberries with different capacity to morphogenesis

Summary

The composition of polysaccharides and phenol combinations of cell walls in callus cultures of strawberries with different ability to regeneration of the plant has been investigated. No essential differences have been found either in the content of cell walls or in the content and composition of polysaccharide fractions. At the same time the spectrum of phenol compounds had some clear-cut distinction: among the phenol products of oxidation of cell walls in regenerating callus cultures the vanillin accounted for a considerable fraction which was totally missing in nonregenerating calluses. Spectrophotometric analysis has made it possible to suppose that this phenomenon involves the presence of ferulic acid in the cell walls of regenerating cultures.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fry S. C. The growing plant cell wall: Chemical and metabolic analysis / Ed. M. Wilkins.—New York: John Wiley and Sons, 1988.—333 p.
2. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.*—1962.—15.—P. 473—497.
3. Updegraff D. M. Semimicrodetermination of cellulose in biological materials // *Analyt. Biochem.*—1969.—32, N 3.—P. 420—424.
4. Hartley R. D. Improved methods for the estimation by gas-liquid chromatography of lignin degradation products for plants // *J. Chromatogr.*—1971.—54, N 3.—P. 335—344.
5. Willemsse M. T. M., Emons A. M. C. Autofluorescence and HPLC analysis of phenolics in *Zea mays* L. stem cell wall // *Acta bot. neer.*—1991.—40, N 2.—P. 115—124.
6. Harris P. J., Hartley R. D. Detection of bound ferulic acid in cell walls of *Gramineae* by ultraviolet fluorescence microscopy // *Nature.*—1976.—259.—P. 508—510.
7. Kato Y., Yamanouchi H., Hinata K. et al. Involvement of phenolic esters in cell aggregation of suspension cultured rice cells // *Plant Physiol.*—1994.—104.—P. 144—152.
8. Locher R., Martin H. V., Grison R., Filet P. E. Cell wall-bound *trans*- and *cis*-ferulic acids in growing maize roots // *Ibid.*—90.—P. 734—738.