

Зміна компонентного складу легкокорозчинних білків калусних культур суниці з різним морфогенним потенціалом

О. В. Колесніченко, С. С. Малюта¹

Національний аграрний університет
252041, Київ, вул. Героїв Оборони, 15

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

Здійснено пошук характерних біохімічних ознак морфогенезу за складом легкокорозчинних білків у морфогенних та неморфогенних калусів суниці, а також білків — маркерів морфогенезу. Встановлено, що білковий склад морфогенних та неморфогенних калусів значно відрізняється. Кількість білків у морфогенному калусі в 1,4—1,6 рази вища, ніж у неморфогенному. Виявлено велику кількість зон, специфічних для кожного типу калусу.

Вступ. Проблема регенерації рослин із калусних культур є однією з центральних у біотехнології. Підбір умов культивування здійснюється емпірично, оскільки до цього часу відсутня теорія, яка б дозволяла цілеспрямовано регулювати процеси морфогенезу. Тому актуальним є визначення маркерів процесу морфогенезу. Метою нашої роботи було виявлення характерних біохімічних ознак морфогенезу за складом легкокорозчинних білків калусних культур суниці з різним морфогенним потенціалом.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на калусних культурах суниці сорту Мускатна (*Fragaria Moschuta Duch.*), які отримані з різних типів первинних експлантів (апикальної меристеми, листків та черешків). Первинні експланти висаджували на поживні середовища Мурасіге і Скуга [1], модифіковані нами [2]. Калусні культури культивували в термостатах при температурі 25 ± 1 °C без освітлення. Отримано два типи калусів, які відрізнялися за здатністю до морфогенезу.

Вміст білка у калусів з різним морфогенним потенціалом визначали за методом Лоурі [3].

Білки екстрагували із 100 мг калусної тканини

в 1 мл 0,1 М трис-НСІ-буфері з додаванням 2-меркаптоетанолу (рН 6,8), центрифугували при 7000 об/хв. Для досліджень відбирали надосадкову рідину. Склад білків визначали за допомогою електрофорезу в градієнтному поліакриламідному гелі (5—17 %). Фарбували розчином Кумасі R-250 [4]. Електрофоретичну рухливість білків (R_f) визначали за відносною рухливістю барвника бром-фенолового синього (БФС).

Для визначення молекулярних мас компонентів використовували суміш білків-стандартів фірми «Serva» (ФРН). Будували калібрувальну шкалу залежності логарифму молекулярної маси маркерних білків від їхньої електрофоретичної рухливості і за нею характеризували молекулярну масу білків калусних культур. Процентний вміст кожного білка визначали за допомогою денситометра LKB Ultrascan.

Результати та обговорення. Калусоутворення у суниці сорту Мускатна починалося на 5—7-й день культивування. Отримані калуси відрізнялися за кольором, консистенцією та швидкістю наростання калусної маси. За цими показниками було виділено два типи калусів: а) вузлуваті, повільно-наростаючі та б) пухкі і швидконаростаючі. Перший тип калусу був морфогенним (при перенесенні

на регенераційні поживні середовища відбувалося формування рослин). Другий тип калусу був неморфогенним. Проведені дослідження дозволили встановити, що калуси з різним морфогенним потенціалом значно відрізнялися за вмістом легкокорозчинних білків (табл. 1).

Найбільшу кількість білка зафіксовано у калусів, які утворилися з апікальної меристеми незалежно від їх морфогенного потенціалу. Однак при порівнянні вмісту білка у калусів, які відрізнялися за морфогенним потенціалом, виявлено, що у морфогенного калусу його вміст був у 1,5 раза вищий, ніж у неморфогенного. Враховуючи, що найвищі морфогенні потенції характерні для калусів, які отримані з апікальної меристеми, можна констатувати, що морфогенні потенції калусів залежать від їхньої метаболічної активності.

У подальших дослідженнях було встановлено, що різні типи калусних культур відрізняються також за кількісним та якісним складом легкокорозчинних білків (табл. 2).

Як видно з даних табл. 2, у морфогенного калусу було ідентифіковано 18 спектрів, у неморфогенного — 17. Наступні дослідження виявили, що калуси з різним морфогенним потенціалом мають ряд як загальних, так і особливих рис. У калусів з різним морфогенним потенціалом спостерігали деякі однакові спектри з молекулярними масами (м. м.) 83,2; 74,1; 44,7; 36,3; 30,2 та 28,2 кДа. Слід зауважити, що відносна кількість цих білків суттєво відрізнялася. У морфогенного калусу загальна їх кількість становила 36,6 %, у неморфогенного — вона збільшилася і складала майже половину всієї кількості білків — 49,2 %. У морфогенного калусу кількість низькомолекулярних фракцій білків з м. м. нижчою, ніж 34,7 кДа, була більшою у порівнянні з неморфогенним (відповідно 45,2 та 33,7 %).

Аналіз білкових спектрів калусних культур

Таблиця 1
Вміст легкокорозчинних білків суниці сорту Мускатна у калусах з різним морфогенним потенціалом, мг/г сирої маси калусу

Тип калусу	Тип первинного експланту		
	Апікальна меристема	Листок	Черешок
Морфогенний	31,8±0,5*	24,6±0,6*	262±07*
Неморфогенний	20,5±0,4*	16,7±0,7*	17,6±0,8*

*Різниця між двома типами калусів достовірна при $p > 0,95$.

Таблиця 2
Розподіл за фракціями легкокорозчинних білків калусних культур суниці сорту Мускатна з різним морфогенним потенціалом

Кількість білкових спектрів	Молекулярна маса, кДа		Відносна кількість, %	
	1*	2**	1	2
1	83,2	83,2	3,3	7,3
2	77,6	75,9	1,3	7,0
3	74,1	74,1	3,2	12,0
4	67,6	72,4	7,2	9,8
5	65,6	54,7	10,3	7,1
6	63,1	50,1	7,3	4,3
7	53,7	47,9	5,0	4,7
8	45,7	47,2	7,3	3,5
9	44,7	44,7	3,6	3,1
10	41,7	36,3	1,6	7,6
11	36,3	34,7	4,7	2,9
12	33,9	34,2	2,0	5,5
13	30,2	33,6	6,5	4,8
14	28,2	31,6	10,3	3,8
15	26,9	30,2	8,5	3,0
16	26,3	28,2	5,6	6,1
17	22,4	25,1	7,7	7,6
18	20,4	—	4,6	—

*1 — морфогенний; **2 — неморфогенний.

дозволив встановити, що для морфогенних калусів характерними були білки з м. м. 77,6; 67,6; 65,6; 63,1; 53,7; 45,7; 41,7; 33,9; 26,9; 26,3; 22,4; 20,4 кДа. Спектр білків у неморфогенних калусів змінився і для них характерними були білки з м. м. 75,9; 72,4; 54,7; 50,1; 47,9; 47,2; 34,7; 34,2; 33,6; 31,6; 25,1 кДа.

Проведені дослідження дозволяють зробити висновок, що кількісний та якісний склад легкокорозчинних білків у морфогенних та неморфогенних калусів значно відрізняється. Кількість білків у морфогенних калусів в 1,4—1,6 раза більша. Виявлено велику кількість білкових спектрів, які є специфічними для кожного типу калусу. Морфогенні потенції калусних культур суниці залежать від вмісту в них легкокорозчинних білків та їх співвідношення за фракціями. Для морфогенних калусів характерною була відносно більша кількість білків з низькою молекулярною масою.

O. V. Kolesnichenko, S. S. Maluta

Изменения компонентного содержания легкорастворимых белков каллусных культур земляники с различным морфогенным потенциалом

Резюме

Осуществлен поиск характерных биохимических признаков морфогенеза по содержанию легкорастворимых белков в морфогенных и неморфогенных каллусах земляники, а также белков — маркеров морфогенеза. Установлено, что белковый состав морфогенных и неморфогенных каллусов значительно различается. Количество белков в морфогенном каллусе в 1,4—1,6 раза выше, чем в неморфогенном. Обнаружено большое количество зон, специфичных для каждого типа каллусов.

O. V. Kolesnichenko, S. S. Maluta

The differentiation of the composition of light-soluble proteins of strawberry calluses with difference morphogenic potential

Summary

A search for typical biochemical features of morphogenesis and its protein-marker has been performed by the composition of light-

soluble proteins in morphogenic and non-morphogenic types of strawberry calluses. The protein composition differs significantly in morphogenic and non-morphogenic callus. The amount of proteins in the morphogenic callus is 1,4—1,6 times higher than non-morphogenic one. A great number of proteins zones specific for each callus type has been revealed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*—1962.—15, N 3.—P. 473—497.
2. Яблокова Е. В., Киямова Р. Г., Тюленева Н. М. и др. Состав клеточных стенок каллусных культур земляники с различной способностью к морфогенезу // *Биополимеры и клетка.*—1996.—12, № 2.—С. 56—71.
3. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.*—1951.—193, N 1.—P. 265—275.
4. Leamanli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T 4 // *Nature.*—1970.—227.—P. 680—685.

Надійшла до редакції 18.12.97