

65.

2. Мошков Н.Н. Неизвестное об известном. Янтарь – красота, здоровье и долголетие от природы. Калининград, 2008, 82 с.
3. Мошков Н.Н. Исцеляющее тепло янтаря (история, медицина, косметология). – Калининград, 2006. 151 с.
4. Акоюн В.Б. Янтарное ожерелье здоровья. М., Международный центр научной и технической информации, 1999, 38 с.
5. Кивалкина В.П. Бактерицидные свойства прополиса // Пчеловодство. 1948. №10. с. 50-51.
6. Ступин А.Ю. Суспензии природных смол и смолоподобных веществ // М. ФГНУ «Росинформагротех». 2010. 67 с.
7. Ona Montiejunaite, Dalia Peciulyte. Fungicidal properties of *Pinus sylvestris* L. for improvement of air quality. *Medicina (Kaunas)* 2004, 40(8) P. 787-793.
8. Ona Montiejunaite, Dalia Peciulyte. *Pinus sylvestris* L. fungicidai – patalpų oro kokybei gerinti. *Medicina (Kaunas)* 2004, 40(8) P. 793 – 794.
9. Бамбура М.В. Получение и применение дисперсных форм антимикробных препаратов на основе смолы сосны и прополиса. Автореферат диссертации, Щелково, 2011, 22 с.
10. Бамбура М.В. и др. Аэрозоль экстракционной смолы сосновой древесины. Вестник Новосибирского государственного аграрного университета 2010, № 3, 15, с. 54-60.
11. Акоюн В. Б., Ступин А. Ю., Бамбура М. В., Рухман А.А, Филатова В.А. Ультразвук в формировании водных суспензий тугоплавких биологически активных веществ. Сборник трудов XXII сессии Российского акустического общества и Сессии научного совета по акустике РАН, 2010, том 3, 125-127.
12. Fels, Jr.; Donald C. (Greenwich, CT), Патент US № 0013925, 1996.
13. Акоюн В.Б., Ершов Ю.А. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами (ультразвук в медицине, ветеринарии и экспериментальной биологии). М.: РГТУ им. Н.Э.Баумана, 2005. 223 с.
14. Хоулт Дж. Краткий определитель бактерий Берги. М.:Мир, 1980, 496 с.
15. ГОСТ 9.049-91 и ГОСТ 9.049-75.
16. ГОСТ 9.048-89.

Влияние факторов стресса на культуру тканей *Arabidopsis thaliana* в условиях *in vitro*

д.б.н. проф. Долгих Ю.И., Седов К.А.
 Университет машиностроения, ИФР РАН
 8 (499) 231-83-34, sedov_konstantin@bk.ru

Аннотация. Работа посвящена изучению влияния стрессовых факторов на культуру тканей *A. thaliana*, оценке устойчивости культуры под действием ионов меди и высокой температуры. В результате работы получена культура клеток *A. thaliana* и определены параметры стрессовых воздействий: продолжительность и его сила. На основании полученных результатов построены дозовые кривые.

Ключевые слова: стресс, культура тканей, медь, температура, *Arabidopsis thaliana*.

Многие растительные сообщества, популяции и отдельные растения постоянно или периодически подвергаются неблагоприятным воздействиям, среди которых - тяжелые металлы и повышенные температуры. Показано, что соли тяжелых металлов и повышенные температуры оказывают стрессовое воздействие на растения, приводящее к различным физико-химическим аномалиям в клетках, повреждению структур и нарушению метаболических функций (Титов, Таланова и др., 2007).

Как показывают исследования разных авторов, тяжелые металлы не только тормозят рост и развитие растений, но и оказывают множественное негативное действие на фотосинтез, дыхание, водный обмен и минеральное питание. Тем не менее, приходится констатировать, что до сих пор многие аспекты их действия на растительный организм изучены недостаточно полно (Гладков, 2000).

Температура оказывает на живые существа не только прямое влияние, но и косвенное. Отрицательное воздействие высоких температур связано с инактивацией, а иногда даже денатурацией ферментов у организмов. Высокие температуры нарушают обмен веществ. У растений, например, дыхание осуществляется интенсивнее, чем фотосинтез, так как продукты обмена расходуются быстрее, чем образуются (Пронина, 2000).

В условиях стресса также изменяется функционирование защитных систем, что в результате может привести к появлению генетических изменений (Pen, 1998).

Несмотря на большое количество работ в области соматической изменчивости, влияние стрессовых факторов на геном культивируемых *in vitro* клеток практически не изучено. Известно, что различные стрессовые факторы нарушают работу регуляторных и репарационных систем растений, индуцируют изменения экспрессии генов, вызывают структурную реорганизацию ДНК. Все это может служить косвенной причиной мутаций (Madlung, Comai, 2004).

Внимание большинства исследователей привлекает сохранение стабильности генома у растений-регенерантов, полученных в ходе микроклонального размножения. Есть работы, посвященные исследованию изменчивости ДНК при длительном культивировании клеток *in vitro* или при использовании разных регуляторов роста. Большинство работ выполнено на видах растений со сложными и мало изученными геномами.

A. thaliana наилучшим образом соответствует задаче исследования. Компактный геном полностью секвенирован и для значительной части генов определены их функции (Зеленин, 2003).

Удобной моделью для изучения влияния стрессовых факторов на стабильность генома растений является культура клеток *in vitro*. Задачей данной работы было получение культуры тканей *in vitro* и определение силы стрессовых воздействий, ингибирующих рост клеток.

Материалы и методы

Объектом нашего исследования был выбран арабидопсис (*A. thaliana* (L.) Heynh) экотипа *Columbia*, как широко используемый в качестве модельного организма для изучения генетики и биологии развития растений, так как он удобен для осуществления манипуляций со сменой условий культивирования, имеет небольшой размер генома (125 млн. п.н.) и малое число хромосом (5 пар) (Зеленин, 2003).

Каллус получали из прорастающих семян. Перед посадкой на питательные среды семена стерилизовали 70% спиртом в течение 1 минуты, затем 3 раза промывали стерильной дистиллированной водой. Для получения каллусных культур использовали модифицированную питательную среду Мурасиге-Скуга (MS) с различными сочетаниями ауксинов и цитокининов. В качестве стрессовых воздействий были выбраны кратковременная инкубация при повышенной температуре (40 °С) и культивирование на среде с сульфатом меди (CuSO₄·5H₂O). Устойчивость к стрессу определяли по увеличению сырой массы каллуса в конце цикла выращивания, который имел продолжительность один месяц. Токсическое действие меди оценивалось в течение двух пассажей.

Результаты и обсуждения

Первый этап заключался в получении хорошо растущей культуры тканей *A. thaliana*. Для выбора наилучшей среды для образования каллуса тестировали разные сочетания фитогормонов: 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д); 1 мг/л 2,4-Д и 0,15 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП); 1 мг/л 2,4-Д и 0,15 мг/л кинетина; 1 мг/л а-нафтилуксусной кислоты (НУК) и 0,15 мг/л БАП; 1 мг/л НУК и 0,15 мг/л кинетина.

По результатам работы можно сказать, что оптимальной средой для образования каллуса является среда MS с 1 мг/л 2,4-Д и 0,15 мг/л БАП. На среде, содержащей только 2,4-Д, и среде с 2,4-Д и 0,15 мг/л кинетина каллус формировался значительно хуже. На средах с 1 мг/л НУК в сочетании с 0,15 мг/л БАП или кинетином каллус не образовывался (рисунок 1).

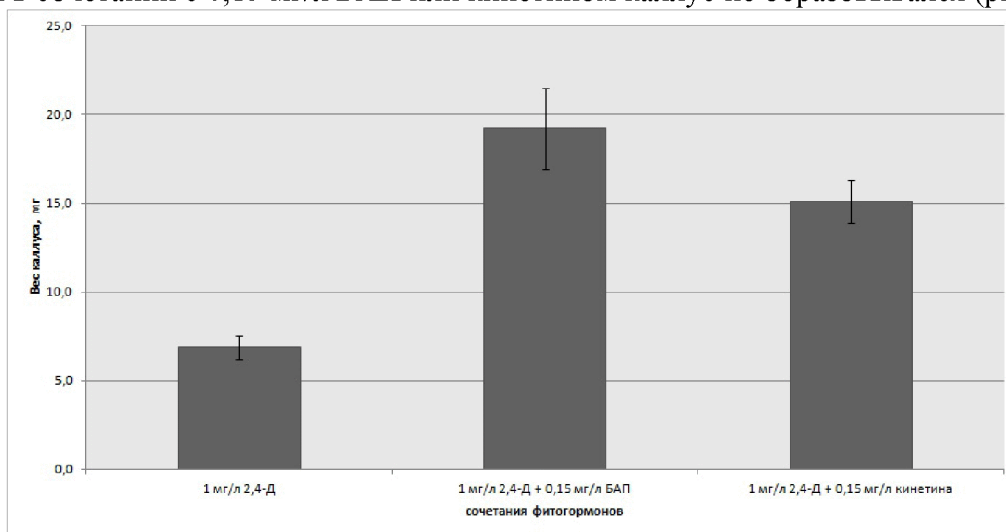


Рисунок 1 – Образование каллуса *A. thaliana* из семян на среде MS с различным сочетанием фитогормонов

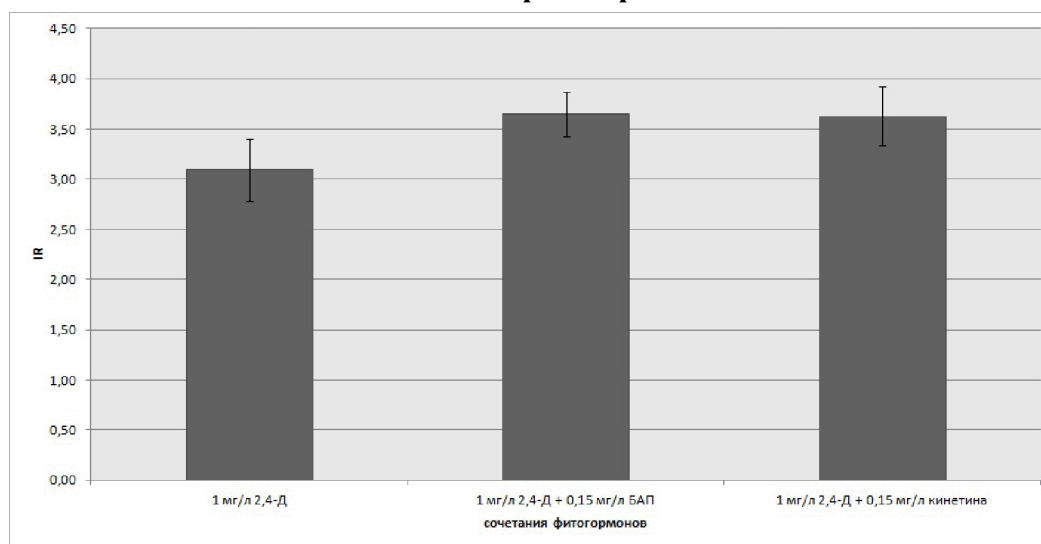


Рисунок 2 – Рост каллуса *A. thaliana* на среде MS с разным сочетанием фитогормонов

Для подбора условий длительного активного роста тканей первичный каллус пересаживали на среды, содержащие 1 мг/л 2,4-Д или НУК в сочетании с 0,15 мг/л БАП или кинетина. Результаты роста снимали после четырех месяцев культивирования. На средах, в составе которых был НУК, рост каллуса отсутствовал, наблюдали образование корней. На среде с 2,4-Д и средах с 2,4-Д и цитокининами каллус рос одинаково активно. Для дальнейшей работы была выбрана среда MS с 1 мг/л 2,4-Д и 0,15 мг/л БАП (рисунок 2).

Второй этап работы заключался в оценке устойчивости каллуса в условиях стресса. Незначительные концентрации сульфата меди от 20 до 50 мг/л стимулировали рост каллуса как в первом, так и во втором пассажах. После первого цикла культивирования на среде, содержащей соль меди в концентрации 30 и 40 мг/л, прирост каллуса превосходил контроль на 70%, после второго – на 50% и 80% соответственно. Начиная с концентрации меди 60 мг/л наблюдали ингибирование роста каллуса после обоих циклов выращивания. В первом пассаже на среде с медью в концентрации 150 мг/л рост каллуса составлял 40% от контроля, а во

втором - снизился в 2 раза и составил 20% по сравнению с контролем. Концентрация меди 175 мг/л являлась летальной для клеток как в первом, так и во втором пассажах (рис. 3).

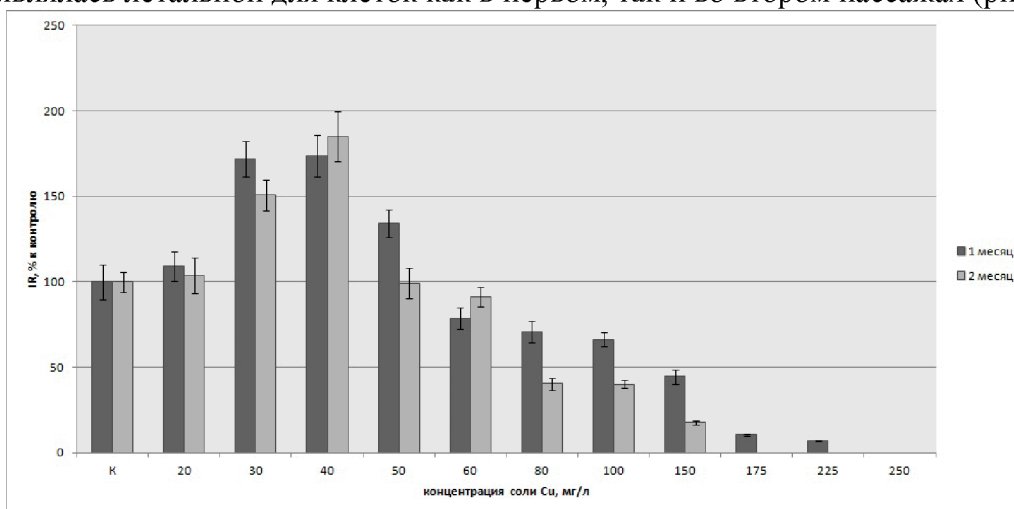


Рисунок 3 – Влияние ионов меди на рост культуры тканей *A. thaliana*

Воздействие повышенной температуры от 2 до 5 часов также стимулировало рост каллуса. При 3 и 5 часах воздействия клеточный рост был выше контроля на 20%. Начиная с 6 часов воздействия температуры наблюдали ингибирование роста клеток. При 10 часах воздействия температуры рост каллуса составлял 60% по сравнению с контролем, а при 14-ти часовом воздействии наблюдали полную гибель клеток (рисунок 4).

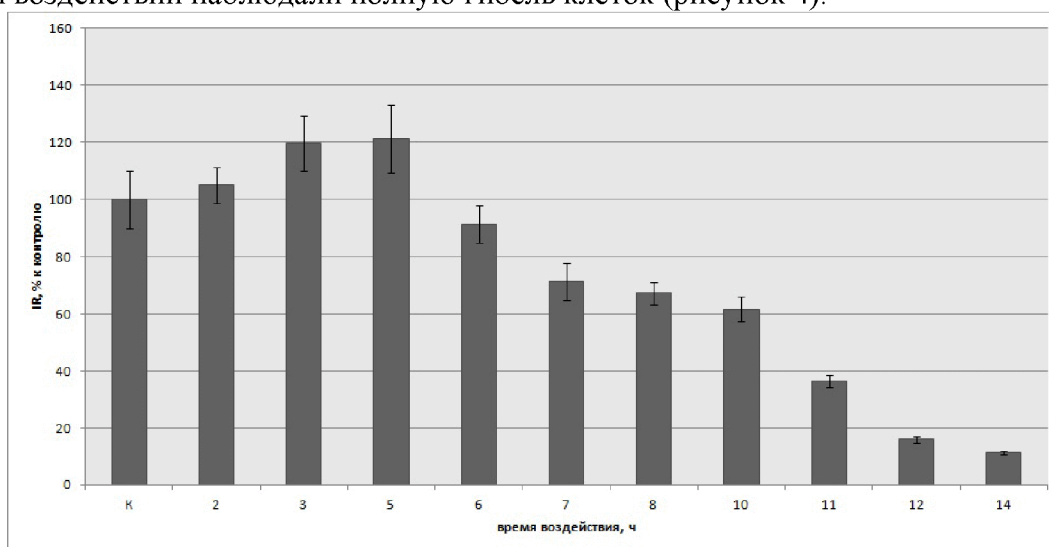


Рисунок 4 – Влияние температуры 40 °С на рост культуры тканей *A. thaliana*

В результате работы были подобраны условия для каллусообразования *A. thaliana* и оценена токсичность воздействия соли меди и влияние повышенной температуры на рост клеток в условиях *in vitro*. Сублетальными воздействиями для культуры тканей *A. thaliana* было культивирование на среде со 150 мг/л меди на протяжении 2 циклов выращивания или инкубация при температуре 40 °С в течение 12 часов.

Литература

1. Гладков Е.А. Оценка фитотоксичности комплексного воздействия тяжелых металлов и определение ориентировочно допустимых концентраций для цинка и меди. Сельскохозяйственная биология, 2000, № 6, 33-36 с.
18. Зеленин А.В. Геном растений. Вестник российской академии наук, 2003, т. 73, № 9, 797-806 с.
19. Пронина Н.Б. Экологические стрессы // Москва, Издательство МСХА, 2000, 310 с.