

УДК 576.316.353.7; 575.224.23

М.В. Скапцов, М.Г. Куцев

Изменения кариотипа *Rumex acetosa* L. в культуре *in vitro* на фоне явления соматклональной изменчивости

M.V. Skaptsov, M.G. Kutsev

Changing *Rumex Acetosa* L. Caryotype in the Culture *in Vitro* against the Background of the Somaclonal Variation Phenomenon

Установлено, что геном каллусных тканей *Rumex acetosa* L. претерпевает значительные изменения при культивировании *in vitro* уже после первого пассажа. После второго и последующих пассажей в кариотипе появляются анеуплоидии. Введение в питательные среды комплекса антиоксидантов несколько замедляет соматклональную изменчивость в виде изменения хромосомного состава после второго пассажа. Наиболее существенным методом снижения соматклональной изменчивости остается соблюдение методологических рекомендаций, а также использование прямой регенерации.

Ключевые слова: соматклональная изменчивость, каллусная ткань, биотехнология, кариотип, анеуплоидия.

Введение. Щавель кислый – *Rumex acetosa* L. сорт Широколистый – считается удачным объектом биотехнологии и генной инженерии растений, сочетая высокую скорость восстановления биомассы, он применим для фундаментального изучения процессов, протекающих в культурах *in vitro*, и испытания рекомбинантных ДНК, а также является лекарственным растением [1].

Известно, что явление соматклональной изменчивости – это в некоторой степени следствие применения фитогормонов цитокининового и ауксинового ряда, значительного накопления в тканях *in vitro* полифенолов и неупорядоченного роста, также существует предположение о значительной изменчивости в культурах, к которым применяется частое субкультивирование, вследствие подверженности каллусных тканей реакциям стресса [2–5].

Вместе с тем, учитывая обширные литературные данные, демонстрирующие на цитологическом уровне значительную изменчивость генома клеток растений в культуре *in vitro*, остался открытым вопрос о возможности преодоления или снижения частоты соматклональной изменчивости. Для решения этого вопроса нами были проведены исследования по снижению влияния некоторых факторов на частоту возникновения соматклонов, в частности таких факторов, как окислительное воздействие полифенолов.

It was established that the genome of *Rumex acetosa* L. callus tissues undergoes significant changes during cultivation *in vitro*, even after the first passage. After the second and the following passages aneuploidies in the caryotype appear. Introduction of antioxidants into the culture media complex slows down the somaclonal variation as a change in chromosome structure after the second passage. The most important way to reduce somaclonal variation remains compliance with the methodological recommendations, as well as the use of direct regeneration.

Key words: somaclonal variation, callus tissue, biotechnology, karyotype, aneuploidy.

Материалы и методы. В работе использовали каллусы изолированных тканей и органов растений, полученные согласно общепринятым рекомендациям с вариациями [6]. На различных этапах экспериментальной работы вводили минеральную основу питательных сред MS [7] с добавлением 30 г/л сахарозы, 100 мг/л мезоинозитола, 6 г/л агары [8]. Поверхностную стерилизацию листьев проводили в течение 15 мин в 2%-ном растворе лизоформина [9]. Экспериментальные образцы культивировали на средах с 2 мкМ 6-бензиладенином (6-БА) и 20 мкМ α -нафтилуксусной кислотой (НУК), а также с добавлением 6-БА и НУК в тех же концентрациях, но с дополнительным введением в питательные среды поливинилпирролидона в концентрации 5 г/л, 300 мкг/мл тиосульфата натрия и 50 мкг/мл дитиотреитола.

Экспериментальные образцы для хромосомного анализа забирали из кончиков корней в промежутки времени с 9.00 до 12.00, характеризующиеся наиболее активным ростом. Появления корней как на классических средах, так и на средах с антиоксидантами добывались путем введения в состав сред 4 мкМ 24-эпибрассинолида и 3 мкМ НУК, что приводило к активному ризогенезу. Контрольными образцами послужили корешки пророщенных семян щавеля кислого сорта Широколистый.

Предфиксационную обработку корешков проводили, помещая последние в 0,002 М оксихинолин на

3 часа, затем промывали 3 раза по 5 мин в дистиллированной воде. Подготовленные образцы фиксировали в растворе уксусного алкоголя (этанол 3:1 ледяная уксусная кислота) в течение суток при температуре 4 °С. После фиксации материал промывали в трех сменах 96%-ного этанола, затем материал переносили в 70%-ный спирт для хранения.

В результате исследований оптимальным красителем в нашем случае был ацетокармин. Корешки после предобработки, хранившиеся в 70%-ном спирте, согрели и переносили в фиксатор 3:1, приготовленный на 45%-ной уксусной кислоте на 30 мин. Затем переносили в ацетокармин и выдерживали на кипящей водяной бане 6 мин, после чего оставляли для окрашивания на 30 мин при комнатной температуре [10].

Для получения монослоя клеток проводили раздавливание наиболее интенсивно окрашенных участков материала в 45%-ной уксусной кислоте под покровным стеклом. Полученные препараты исследовали методом прямой световой микроскопии и подсчитывали хромосомные числа клеток контрольных (кончики корешков пророщенных семян) и экспериментальных (кончики корешков каллусных тканей, выращенных на классических средах и средах с антиоксидантами) образцов.

Результаты исследований. По данным литературы, хромосомное число *R. acetosa* L. $2n$ равно 14, 16 [11].

Нами было выяснено, что хромосомное число щавеля кислого сорта Широколистный $2n$ равно 16 (рис. 1).

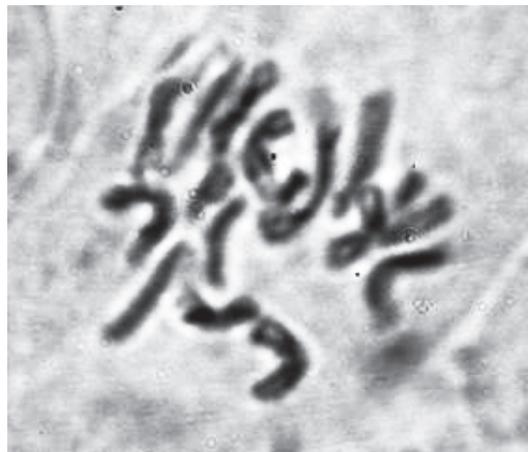


Рис. 1. Хромосомный набор щавеля кислого сорта Широколистный в норме

В результате наших исследований установлено, что после введения щавеля кислого сорта Широколистный в культуру клеток и тканей *in vitro* после первого пассажа (20 дней культивирования) обнаруживаются изменения кариотипа клеток в виде анеуплоидии ($2n - 1, 2n + 1, 2n - 2, 2n + 3$) (рис. 2).

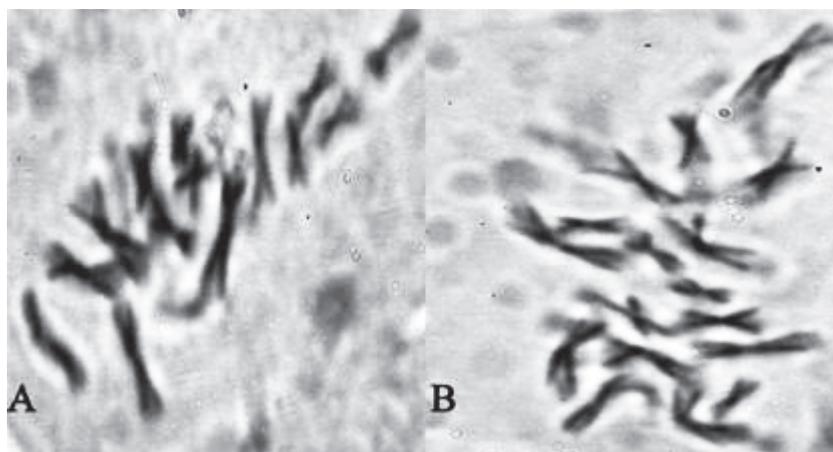


Рис. 2. Хромосомный набор щавеля кислого сорта Широколистный из каллусных тканей. А – $2n - 2$; В – $2n + 1$

Изучая реакцию кариотипа на внесение антиоксидантов, установлено, что хромосомные перестройки происходят в большинстве случаев после 2 и 3 пассажей, что свидетельствует о замедлении процесса соматоклональной изменчивости.

Анализируя процентное соотношение изменений кариотипа клеток, выращенных без добавления антиоксидантов, можно сделать вывод, что 43% исследованных клеток имеют хромосомные перестройки уже после первого пассажа, а в тканях, выращенных на средах с антиоксидантами, после первого пассажа

9% клеток имеют хромосомные перестройки, а после второго и третьего – 34 и 47% соответственно (табл.)

Зависимость частоты хромосомных изменений от количества пассажей

№ пассажа	Кол-во клеток с измененным кариотипом, %	
	без антиоксидантов	с антиоксидантами
1	43	9
2	59	34
3	70	47

Библиографический список

1. Ai-fang Y., Su-yun J., Xiao-guang D., Ju-ren Z. High efficient *in vitro* propagation and salt tolerant plantlet regeneration in *Rumex* // *Acta Pratacultural Sinica*. – 2005. – V. 14, №2.
2. Benzion G., Phillips R.L. Cytogenetic stability of maize tissue culture: a cell line pedigree analysis // *Genome*. – 1988. – V. 30.
3. Todd J., Cooke R., Racusen H., Cohen J.D. The role of auxin in plant embryogenesis // *The Plant Cell*. – 1993. – V. 5.
4. Hossain Z., Kalam A., Mandal A., Shukla R., Datta S.K. NaCl stress – its chromotoxic effects and antioxidant behavior in roots of *Chrysanthemum morifolium* Ramat // *Plant Sci*. – 2004. – V. 166.
5. Kaeppler S.M., Kaeppler H.F., Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants // *Plant Mol. Biol*. – 2000. – V. 43.
6. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе: учеб. пособие. – М., 1999.
7. Вечернина Н.А. Биотехнология растений: учеб. пособие. – Барнаул, 2009.
8. Муратова С.А., Шорников Д.Г., Янковская М.Б., Папихин Р.В. Совершенствование метода клонального микроразмножения актинидии и лимонника китайского // *Современное садоводство*. – 2010. – №1.
9. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. – 1962. – V. 15, №13.
10. Барыкина Р.П. Справочник по ботанической микро-технике. Основы и методы. – М., 2004.
11. Крогулевич Р.Е. Роль полиплоидии в генезисе флоры Путорана // *Флора Путорана: сб. науч. тр.* – Новосибирск, 1976.