

УДК 576.57.085.23

ЛИГНИФИКАЦИЯ КАЛЛУСА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ КАК РЕАКЦИЯ НА УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И СОСТАВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

© 2014 г. Г. Ф. Антонова¹, Т. В. Железниченко², В. В. Стасова¹

¹ Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН

660036, Красноярск, Академгородок, 50/28

² Центральный сибирский ботанический сад СО РАН

630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101

E-mail: antonova_cell@mail.ru, zhelez05@mail.ru, roman@akadem.ru

Поступила в редакцию 01.08.2014 г.

Изучали влияние состава питательной среды и условий культивирования каллуса сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на морфологию его клеток, степень их дифференциации и лигнификацию. Анатомо-морфологические характеристики клеток каллуса, содержание и макромолекулярная структура лигнина значительно варьируют в зависимости от продолжительности культивирования каллуса, уровня освещенности и содержания в питательной среде сахарозы, поливинилпирролидона (ПВП), феруловой и аскорбиновой кислот. Увеличение длительности культивирования каллуса с 21 до 60 сут способствует дифференциации клеток, однородности морфологической структуры их стенок и усиливает лигнификацию. Культивирование каллуса в темноте угнетает его рост и лигнификацию, тогда как в условиях свет–темнота приводит к его росту и накоплению лигнина. Каллус, выращенный в темноте, содержит больше низкомолекулярного лигнина и меньше высокомолекулярного, чем культивированный на свету. Повышение концентрации сахарозы в среде до 5 % усиливает рост каллусной массы и ее лигнификацию, увеличивает содержание в лигнине высокомолекулярных фракций и влияет на состав структурных единиц лигнина, особенно при культивировании в условиях свет–темнота. Действие на лигнификацию ПВП зависит от стадии развития клеток каллуса, условий освещенности и продолжительности культивирования. При культивировании в темноте в течение 21 сут ПВП подавляет лигнификацию каллуса, но способствует появлению в составе лигнина сиригильных единиц. Увеличение длительности культивирования с ПВП до 60 сут способствует конденсации предшественников лигнина, что приводит к повышению в составе лигнина высокомолекулярной фракции. Феруловая кислота, добавленная в среду, способствует развитию вторичного утолщения стенок клеток каллуса, повышает содержание низкомолекулярной фракции и снижает – высокомолекулярной. Добавление в питательную среду аскорбиновой кислоты положительно влияет на пролиферацию клеток и рост каллусной массы, но тормозит ее лигнификацию.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, каллус, длительность культивирования, свет, темнота, сахароза, поливинилпирролидон, феруловая и аскорбиновая кислоты, морфология клеток, лигнин, структура.

ВВЕДЕНИЕ

Лигнификация является одним из главных процессов, сопровождающих развитие клеток ксилемы древесных растений. Накопление лигнина в клетках растений, с одной стороны, приводит к укреплению тканей и появлению их механической прочности, с

другой – является одним из наиболее значимых факторов, влияющих на производство целлюлозы и биотоплива. Поэтому процесс лигнификации активно изучается не только с целью понимания механизма биосинтеза полимера, но и получения растений с низким содержанием лигнина или с измененной структурой, чтобы обеспечить последующую

легкую доступность химической деградации. Для изучения путей биосинтеза предшественников лигнина – оксикоричных кислот и ферментов, участвующих в процессе биосинтеза, с успехом используют культуру тканей (Eberhardt et al., 1993; Campbell, Sederoff, 1996; Anterola, Lewis, 2002; Möller et al., 2003, 2005, 2006; Stasolla et al., 2003; Kubo et al., 2005; Zhong et al., 2006, 2007, 2008; Kärkönen, Kontaniemi, 2010). Система культуры тканей используется также для изучения и получения биологически активных веществ (Загоскина, 1997; Носов, 1999).

Большинство работ с использованием культуры тканей проводилось на травянистых и в меньшей степени на древесных растениях (Kärkönen, Kontaniemi, 2010). Из хвойных объектами изучения были *Pinus radiata* (Möller et al., 2003, 2005, 2006), *Pinus taeda* (Carceller et al., 1971; Campbell, Ellis, 1992; Eberhardt et al., 1993; Nose et al., 1995; Anterola et al., 2002; Anterola, Lewis, 2002; Stasolla et al., 2003), *Picea abies* (Brunow et al., 1990, 1993; Messner, Boll, 1993; Kärkönen et al., 2002; Kontaniemi et al., 2005). В качестве модельных систем при изучении лигнификации применяют суспензионные или каллусные культуры. Последняя имеет определенные преимущества, так как дает возможность оценить состояние развития вторичных клеточных стенок и лигнификацию ткани (Möller et al., 2003, 2005, 2006). Предложенная авторами система клеточной культуры *Pinus radiata* D. Don позволяет индуцировать дифференцированные трахеальные элементы с лигнифицированными клеточными стенками. При изменении условий культивирования каллуса эта система, по мнению авторов, позволяет также воздействовать на ключевые точки, влияющие на развитие клеточных стенок (Möller et al., 2003).

Оптимизировать рост культуры и биосинтез лигнина можно за счет изменения в питательной среде концентрации сахарозы (Carceller et al., 1971; Ramsden, Northcôte, 1987; Nose et al., 1995; Rogers et al., 2005), содержания фитогормонов (Carceller et al., 1971; Simola et al., 1992; Eberhard et al., 1993) или варьирования таких физических факторов, как свет, его экспозиция, температура.

Сахарозу рассматривали как индуктор образования лигнина в суспензионных культурах *Pinus taeda* (Nose et al., 1995) и культивируемых клетках *Acer pseudoplatanus* (Carceller et al., 1971). Однако при некоторых концентрациях она отрицательно влияет на рост каллуса (Ramsden, Northcôte, 1987; Rogers et al., 2005). Например, содержание в питательной среде сахарозы выше 6 %, кинетина выше 2 мг/л и нафтилуксусной кислоты (NAA) выше 10 мг/л снижает активность фенилаланинаммиак-лиазы (ФАЛ) и количество образованных трахеид в клеточной культуре *Pinus sylvestris* L. (Ramsden, Northcôte, 1987). Негативное влияние определенных концентраций сахарозы в сочетании с условиями культивирования, возможно, обусловлено появлением продуктов ее разложения при автоклавировании (Pan, Staden, 1998) и/или накоплением в среде фенольных ингибиторов (Sugano et al., 1975). Отмечали также, что содержание сахарозы в среде и соотношение регуляторов роста в разной степени влияют на развитие клеток и лигнификацию (Rogers et al., 2005; Kärkönen, Kontaniemi, 2010). Чтобы устранить отрицательное действие нежелательных ингибиторных соединений, присутствующих в питательной среде при культивировании, и повлиять на морфогенез клеток и биосинтез лигнина, предложили в качестве сорбента использовать активированный уголь (Pan, Staden, 1998; Möller et al., 2003, 2006) и ПВП (Möller et al., 2003). Было показано, что среда без активированного угля содержит фенольные соединения и другие метаболиты, ингибирующие эмбрио- и морфогенез (Friborg et al., 1978).

Из физических факторов для развития каллуса имеют значение уровень освещения и продолжительность культивирования. Предполагается, что увеличение числа субкультур может иногда приводить к аккумуляции мутаций клеток, что вызовет потерю способности клеток к эмбриогенезу (Pan, Staden, 1998). Свет либо способствует дифференциации трахеальных элементов, либо не влияет на процесс, как это наблюдалось при изучении каллусной культуры *Pinus radiata* (Blee et al., 2001; Möller et al., 2003). В литературе отмечено, что в зависимости от родовой и даже

видовой принадлежности каждый из элементов культивирования может по-разному воздействовать на морфогенез клеток и степень их развития (Загоскина, 1997; Pan, Staden, 1998; Kärkönen, Kontaniemi, 2010).

Для окисления нежелательных метаболитов, которые накапливаются при увеличении числа субкультур, и пролонгирования жизнеспособности клеточных культур можно использовать антиоксиданты. Ранее было показано, например, что аскорбиновая кислота как антиоксидант положительно влияет на активность камбия, рост и развитие клеток сосны *in vivo* (Антонова и др., 2009). Следует ожидать, что использование ее в составе среды культивирования будет способствовать пролиферации клеток и росту биомассы каллуса.

Другим компонентом среды могла бы быть феруловая кислота, которая является предшественником гваяцилпропановых единиц лигнина, что должно влиять на лигнификацию каллуса.

Цель нашей работы – изучение влияния сахарозы, ПВП, феруловой и аскорбиновой кислот, а также уровня освещенности и длительности выращивания культуры каллуса *Pinus sylvestris* L. на морфологию клеток, степень их дифференциации и лигнификации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Каллусную культуру инициировали из слоев клеток развивающейся ксилемы и флоэмы побегов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.). Предварительно установили, что

для успешного культивирования экспланты должны содержать меристематические ткани, находящиеся в активном состоянии. Поэтому побеги собирали в период, когда камбиальные инициалы активно производят ксилемные и флоэмные клетки (июнь–июль).

Материал отбирали с верхушечного побега предыдущего года 6-летней сосны. Побеги диаметром 3–6 см разрезали на отрезки длиной 10–12 см, которые стерилизовали в течение 10 мин раствором с концентрацией гипохлорида натрия не менее 5 % и затем раствором 10%-й перекиси водорода в течение 20 мин. Стерилизованные отрезки трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой.

С отрезков удаляли кору и снимали полоски размером 0.7×2.5 см дифференцирующихся клеток либо флоэмы, либо ксилемы, содержащие камбиальную зону, а также смесь клеток ксилемы и флоэмы с камбием (меристематическую ткань) между ними. Экспланты помещали на питательную среду ½ МС (среда МС с уменьшенным вдвое содержанием макроэлементов) (Murashige, Skoog, 1962), не содержащую гормоны и дополненную 0.3 % активированного угля, и инкубировали в темноте в течение 3 дней при 2 °С (Ravinda et al., 2005). Далее их переносили на среду ½ МС, дополненную гормонами 2.4-Д (2.4 – дихлорфеноксиуксусная кислота: 4.42 мг/л), НАА (2 мг/л) и БАП (бензиламинопурин, 4.7 мг/л), и выдерживали в темноте в течение месяца при температуре (25±1) °С до появления каллуса. Эксплант, содержащий смесь клеток ксилемы и

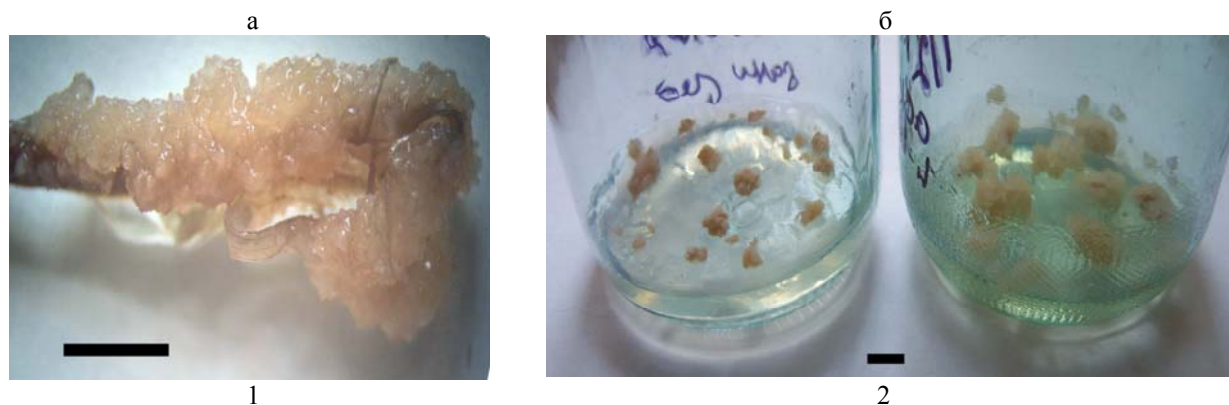


Рис. 1. Каллусные культуры сосны обыкновенной: а) каллус на экспланте; б) культура каллуса на среде без аскорбиновой кислоты – 1, с добавлением аскорбиновой кислоты – 2.

флоэмы с камбием между ними, позволил получить хорошо развитый каллус (рис. 1, а), который использовали для дальнейших исследований.

Инициированный каллус переносили на свежую среду того же состава, которую использовали для инициации каллуса, и субкультивировали его каждые 12–16 дней (линия «а»). Для стабилизации роста каллусной массы с 6-го по 12-й пассаж к питательной среде добавляли аскорбиновую кислоту (200 мг/л). Питательную среду доводили до рН 5.8 с помощью NaOH или HCl, добавляли агар (7 г/л) и стерилизовали при 121 °С в течение 20 мин. Культивирование проводили в течение 14 дней при температуре (22±1) °С. Каллусы, выращенные на среде с аскорбиновой кислотой, были рыхлые, светлые, равномерно окрашенные (линия «б») (рис. 1, б).

Каллус 12-го пассажа линии «б» использовали далее для изучения влияния состава питательной среды, условий освещенности и длительности культивирования на дифференциацию клеток каллуса и его лигнификацию. Влияние света на инициацию образования лигнина при культивировании каллуса изучали, изменяя условия освещенности.

Каллус 12-го пассажа разделили на части и культивировали далее на средах, особенности состава которых указаны в таблице. Концентрация сахарозы в питательной среде ½ МС составляла 3 (14) и 5 % (11; 15–25), содержание ПВП 3.5 г/л (16; 19; 20). На 18-м пассаже в одну из сред была добавлена феруловая кислота (0.5 ммоль/л) (24), в другую помимо феруловой вносили аскорбиновую кислоту (200 мг/л) (25). Все среды доводили до рН 5.8 и стерилизовали. Одну часть каллусной культуры держали в темноте (11, 19), другую – на свету при 16-часовом фотопериоде (14–16 и 20–25). Каллусы 11–16 культивировали в течение 21 сут, каллусы 19т–25т – в течение 60–70 сут.

После культивирования в течение 21 сут каллус был окрашен неравномерно и содержал светло-розовые и коричневатые клетки, т. е. был гетерогенен по структуре (см. рис. 1, б). Поэтому его биомассу разделяли на внешнюю «светлую» (активно делящиеся клетки) (11с, 14с, 15с, 16с) и внутреннюю

«темную» (дифференцированные клетки) (11т, 14т, 15т, 16т) части, которые анализировали отдельно. В каллусах с продолжительностью культивирования 60–70 сут светлая часть отсутствовала.

Для сравнения влияния условий культивирования на степень дифференциации клеток и лигнификацию использовали каллус одинакового пассажа и времени выращивания на питательной среде.

Морфология клеток. Состояние развития каллуса и его анатомо-морфологические характеристики оценивали световой микроскопией, используя давленные препараты и суспензию клеток, полученную после мацерации каллуса. Давленные препараты, полученные гомогенизацией каллуса в воде, использовали для определения степени дифференциации клеток, лигнификации и наличия внутриклеточных включений. Давленные препараты готовили для каждого варианта культивирования, используя по 2–3 кусочка каллуса. Один препарат оставляли неокрашенным, другой окрашивали флороглюциносовой кислотой (реактив Визнера) (Дженсен, 1965). Уровень лигнификации каллусной ткани оценивали визуально по степени окраски по 5-балльной системе. Присутствие в клетках крахмала определяли по реакции с йодом (Дженсен, 1965).

Мацерацию каллуса проводили смесью ледяной уксусной кислоты с 10%-й H₂O₂ в соотношении 1:1 (Wheeler et al., 1966). Для мацерации брали две средние пробы каллусных образований каждого варианта и в камере Фукса-Розенталя определяли число клеток разной формы. Данные рассчитывали как среднее из двух повторностей. Статистическую обработку результатов измерений проводили с применением программы Excel.

Химический анализ. Отдельные части каллусной биомассы («светлую» и «темную») с 11-го по 16-й или весь объем каллуса из образцов 19–25 брали в двух повторностях. Материал обрабатывали 80%-м этанолом и экстракты использовали для определения состава спирторастворимых веществ (Железниченко и др., 2011). Остатки после экстракции спиртом использовали для определения лигнина тиогликолевым методом

(Venverloo, 1969). Метод одинаково пригоден для определения лигнина *in vivo* и *in vitro*. Экстрагированный материал разделяли на две пробы и из каждой выделяли низкомолекулярную (спирторастворимую) и высокомолекулярную (щелочерастворимую) фракции лигнина (Antonova et al., 2014). Содержание каждой фракции в каждом варианте определяли в двух–трех аналитических повторностях. Статистическую обработку результатов измерений проводили с применением программы Excel.

По две навески каллуса (0.12–0.2 г сырой массы) отбирали для определения влажности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гистохимический анализ. Анатомо-морфологическая характеристика состояния развития клеток каллуса и степени его лигнификации в зависимости от условий культивирования приведена в таблице.

Каллусы 13-го пассажа, культивировавшиеся в течение 21 сут (11, 13, 14, 15, 16), имели гетерогенную структуру: клетки внешних («светлая» часть) и внутренних («темная» часть) фрагментов отличались онтогенетическим развитием и морфологией. В «светлых» (т. е. активно растущих частях каллуса) клетки имели разнообразную форму с преобладанием округлой, тонкие стенки и крупное ядро.

Развитие вторичного утолщения стенок, которое является неременным компонентом инициации отложения лигнина, зависело от культивирования каллуса в темноте или в условиях свет–темнота. Так, в препарате 11с (5%-я сахароза, 21 сут, темнота) вторичное утолщение в клетках отсутствовало, тогда как в препарате 15с из каллуса, выросшего на свету на той же среде, оно было хорошо развито и клетки имели слабую окраску на лигнин. В составе более зрелых клеток тех же каллусов (11т и 15т) наблюдали помимо овальных клетки с сетчатым утолщением и окаймленными порами, а также грушевидной (или гантелевидной) формы со сплошным утолщением (трахеидоподобные клетки) (рис. 2). Окраска на лигнин у каллуса 15т, выросшего на свету, была на балл выше,

чем у клеток 11т. Особенно сильное окрашивание наблюдалось в углах клеток, как обычно это наблюдается *in vivo*.

Изменение концентрации сахарозы ведет к отличиям в форме клеток, степени их развития и лигнификации (см. таблицу). Так, «светлые» части каллусов, выращенных на свету на среде с концентрацией сахарозы 3 % (14с), состояли из клеток со светлым содержанием, округлой или овальной формы, и только некоторые клетки имели утолщение стенок в виде прожилок. В каллусах, выращенных на среде с повышенной концентрацией сахарозы 5 % (15с), клетки были в основном округлые или овальные с утолщенными стенками. В некоторых клетках присутствовали зерна крахмала (до 50 % объема клетки), что может указывать на использование части углеводов в виде запаса питательных веществ. Окраска на лигнин была очень слабой (диффузной). «Темные» части каллусов, выращенных на средах с концентрацией сахарозы 3 % (14т) и 5 % (15т), отличались друг от друга по морфологии клеток. В препарате 14т отмечены клетки разнообразной формы, тогда как в 15т преобладали овальные и грушевидные (70–80 %). Утолщение клеточных стенок в 14т было в виде сеток или окаймленных пор (2/3 клеток), а в 15т клетки преимущественно имели сплошные утолщения (2/3 клеток). Повышение содержания сахарозы в среде (15т) способствовало лигнификации клеточных стенок.

Увеличение длительности культивирования с 21 до 60 сут (15т и 21т) приводило к изменениям в морфогенезе клеток. В каллусе 21 «светлая» часть отсутствовала и клетки имели сплошное вторичное утолщение (80–90 %), проявляя равномерное окрашивание на лигнин.

Добавление ПВП при выращивании каллуса на свету в течение 21 сут при 5%-й сахарозе (16) усиливало дифференциацию клеток и их рост в длину. Не только в «темной», но и в «светлой» частях каллуса появлялись клетки грушевидной формы. В 16с клетки со сплошным утолщением и окаймленными порами составляли примерно 50 %, а в 16т их содержание достигало 80–90 %. При увеличении длительности культивирования в тех

Лигнификация каллуса сосны обыкновенной
как реакция на условия культивирования и состав питательной среды

Условия культивирования каллуса *Pinus silvestris* L.

Об-ра-зец	№ пассажа	Среда культивирования	Условия освещения	Длительность, сут	Форма клеток	Наличие вторичного утолщения	Окраска на лигнин (по 5-балльной системе)
11с	13	½ МС + 5%-я сахара	Темнота	21	Округлые, овальные, продолговатые	Нет	0.5
11т	13	То же	>>	21	Округлые, овальные, грушевидные	Сетчатое, сплошное (окаймленные поры)	Сплошная розовая, диффузная 2.5
13с	13	½ МС + 5%-я сахара + ПВП	>>	21	Округлые, овальные, неправильной формы	Сетчатое, окаймленные поры (1/3 клеток)	Неравномерная среда 1.5–2.0
13т	13	То же	>>	21	Округлые, овальные, неправильной формы	Сетчатое, в большей части клеток сплошное	Равномерная, яркая на стыках клеток, среда, 2.5–3.0
14с	13	½ МС + 3%-я сахара	Свет (16 ч) – темнота	21	Неправильной формы, овальные	В виде прожилок	Слабая 0.5–1.0
14т	13	То же	То же	21	Разная	Равномерное, сетчатое, 2/3 с окаймленными порами	Равномерная, яркая на стыках клеток, среда 1.5
15с	13	½ МС + 5%-я сахара	>>	21	Округлые, овальные	Сплошное (слабое)	Диффузная, 1.0–1.5
15т	13	То же	>>	21	Округлые, овальные, грушевидные	У 2/3 клеток сплошное, сетчатое	Сильная, особенно в углах клеток, 3.0–3.5
16с	13	½ МС + 5%-я сахара + ПВП	Свет (16 ч) – темнота	21	Округлые, грушевидные	Сплошное, у 1/2 клеток окаймленные поры	Слабая, 1.0–1.5
16т	13	То же	То же	21	Разные (дисперсные по форме)	У 2/3 клеток сетчатое сплошное, окаймленные поры	Сильная, 2.5–3.0
19т	14	>>	Темнота	60	Округлые, овальные	Сплошное, сетчатое (редко)	Диффузная, углы клеток – ярко красные, среда 3.5
20т	14	½ МС + 5%-я сахара + ПВП	Свет (16 ч) – темнота	60	Крупные округлые и овальные	Сплошное (2/3 клеток), сетчатое	Сильная, особенно в углах клеток, 3.5–4.0
21т	14	½ МС + 5%-я сахара	То же	60	Округлые, овальные	То же	Равномерная, 3.5
24т	18	½ МС + 5%-я сахара + феруловая кислота	>>	70	То же	Сплошное	То же
25т	18	½ МС + 5%-я сахара + феруловая кислота + аскорбат	>>	70	Овальные	Сплошное (1/2 клеток), окаймленные поры	Равномерная, среда 2.5–3.0

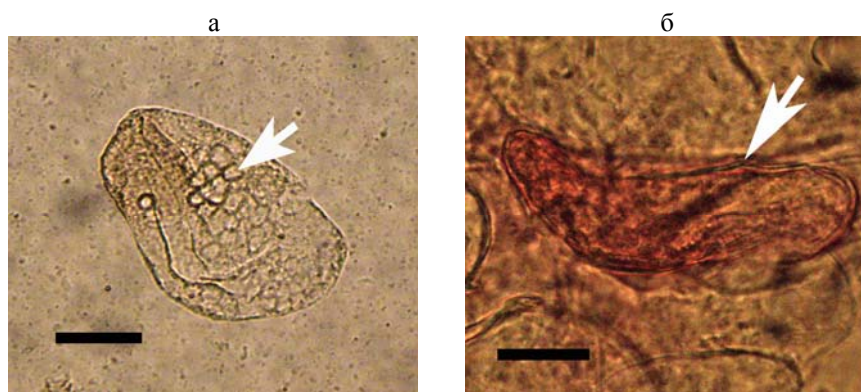


Рис. 2. Примеры морфогенеза клеток каллуса: а – с окаймленными порами, б – утолщение стенок клетки (окраска на лигнин).

же условиях до 60 сут (20т) клетки в основном имели сплошное вторичное утолщение и равномерное окрашивание на лигнин. При этом «светлая» часть в каллусе отсутствовала. Если при тех же условиях (5 % сахарозы, ПВП, 60 сут) каллус выращивали в темноте (19т), то клеток с сетчатым утолщением было больше, а со сплошным меньше, чем в 20т. Клетки каллуса 19т содержали крахмальные зерна. Окраска на лигнин была диффузной, ярче в углах клеток. Диффузная окраска препарата указывает на вероятность выхода низкомолекулярных фракций лигнина при окраске препарата.

Внесение в среду феруловой кислоты (24т) способствовало развитию вторичного утолщения. В каллусе 24т все клетки имели сплошное утолщение, тогда как в 21т таких клеток было около 75 %. По балльной системе лигнификация каллусов была одинаковой, но существует вероятность различия в структуре полимера. Добавление в среду аскорбиновой кислоты в смеси с феруловой (25т) приводило к снижению лигнификации (2.5–3.0 против 3.0–3.5 баллов в каллусе 24т). Клетки имели в основном овальную форму с окаймленными порами. Сплошное утолщение наблюдалось только у 1/2 клеток, тогда как в препарате 24т все клетки имели сплошное утолщение. Данные указывают на дедифференциацию клеток в культуре каллуса при добавлении в среду аскорбиновой кислоты на этом этапе культивирования. Окрашивание препарата на лигнин было равномерным, но меньшим, чем в 24т. Кроме того, наблюдалась розовая окраска среды,

что может свидетельствовать о переходе в раствор низкомолекулярных фракций лигнина при обработке реактивом с содержанием кислоты.

Лигнификация. Данные химического анализа показали различие в содержании лигнина как в «светлых» (рис. 3), так и в «темных» (рис. 4) частях каллусной биомассы в зависимости от условий культивирования (см. таблицу).

«Светлые» (растущие) части каллусов по данным химического анализа содержали низкомолекулярные (спирторастворимые) и высокомолекулярные (щелочерастворимые) фракции лигнина (рис. 3).

Как общее содержание (сумма) фракций (7.1, 15.2 и 10.9 %), так и их соотношение (1/5, 1/6.2, 1/6.4) меняются в зависимости от

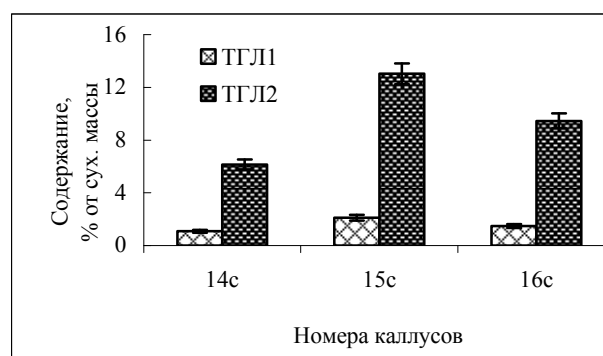


Рис. 3. Содержание низко- (ТГЛ1) и высокомолекулярных (ТГЛ2) фракций лигнина в растущих («светлых») частях каллусов, выращенных в течение 21 сут на свету с 16-часовым периодом (14с, 15с, 16с) с содержанием сахарозы в среде 3 % (14с) и 5 % (15с, 16с) и при добавлении ПВП (16с). Бары показывают ошибки средних.

состава среды. Увеличение концентрации сахарозы в среде с 3 (14с) до 5 % (15с) усиливало процесс лигнификации. При добавлении ПВП общее количество лигнина снижалось (16с). Соотношение фракций при этом не менялось, но в составе структурных единиц полимера увеличивалось содержание феруловой и п-кумаровой кислот (Железниченко и др., 2011), что может способствовать усилению связи формирующегося полимера с полисахаридами клеточных стенок.

Наиболее отчетливо влияние состава среды и условий культивирования каллуса проявляется в содержании низко- и высокомолекулярных фракций лигнина в «темных» (дифференцированных) частях каллусной массы (см. рис. 4).

При всех условиях культивирования доминирует фракция ТГЛ2. Фракция ТГЛ1 в среднем составляет 0.33 % от ТГЛ2, варьируя от 0.22 % в 15т до 0.55 % в 19т. Содержание как низко-, так и высокомолекулярных фракций лигнина было наименьшим в каллусе 14т (см. рис. 4), который культивировался на среде с 3%-м содержанием сахарозы, хотя культивирование проводили в условиях свет-темнота. Увеличение содержания 5%-й сахарозы даже при выращивании в темноте (11т) интенсифицирует рост каллуса

и лигнификацию. Содержание низко- и высокомолекулярных фракций лигнина в каллусе 11т почти в 2 раза выше, чем в 14т. Данные доказывают существенную зависимость развития клеток и лигнификации ткани от сахарозы как источника метаболитов для формирования клеточных стенок и исходного субстрата в биосинтезе фенольных структурных единиц лигнина.

Гетеротрофные условия (темнота) культивирования по сравнению с культивированием на свету (с 16-часовым фотопериодом) при равном содержании в среде сахарозы (5 %) угнетают рост каллуса и его лигнификацию (11 и 15). Количество фракции ТГЛ1 в 11т и 15т было практически равным, тогда как фракция ТГЛ2 в 15т было в 1.4 больше, чем в 11т (см. рис. 4). Усиление лигнификации наблюдали при культивировании каллуса чая в фотомиксотрофных (или частично фототрофных) условиях (Загоскина и др., 1990; Загоскина, 1997). Реакция на изменение световых условий объяснялась как результат развития на свету хлоропластов, дающих дополнительный субстрат (фенилпропановые структуры) для образования лигнина. Возможно, что при культивировании каллуса сосны на свету тоже могут появляться дополнительные фенольные соединения, способствующие лигнификации ткани. Интересно, что некоторые каллусы, выращенные на свету, имели на поверхности легкий зеленоватый оттенок, что может говорить о присутствии хлоропластов.

При добавлении в среду ПВП содержание ТГЛ2 лигнина в 16т снизилось по сравнению с 15т в 1.2 раза, тогда как содержание ТГЛ1 не изменилось. Увеличение продолжительности культивирования на среде с ПВП на свету до 60 сут (20т) способствовало значительному накоплению как ТГЛ1, так и ТГЛ2 фракций по сравнению с 15т (см. рис. 4). Из всех изученных условий культивирования каллус 20 был наиболее лигнифицирован и содержал самое высокое количество обеих фракций. Когда при тех же условиях культивирование проводили в темноте (19т), количество фракции ТГЛ2 снизилось в 2 раза, а ТГЛ1 оставалось на том же уровне, что указывало на торможение процесса конденса-



Рис. 4. Содержание низко- (ТГЛ1) и высокомолекулярных (ТГЛ2) фракций лигнина в дифференцированных («темных») частях каллусов, выращенных при разных условиях культивирования: в темноте – 11т; на свету с 16-часовым фотопериодом (14т, 15т, 16т, 20т, 21т, 24т, 25т); в течение 21 сут (11т, 14т, 15т, 16т) и 60–70 сут (19т, 20т, 21т и 24т, 25т); при концентрации в среде 3 % сахарозы (14т) и 5 % (11т, 15т, 16т, 21т, 24т, 25т) с добавлением ПВП (16т, 19т, 20т) или феруловой (24т) и аскорбиновой кислот (24т, 25т). Бары показывают ошибки средних.

ции монолигнолов при культивировании в темноте.

Культивирование на свету при 5%-м содержании сахарозы в среде без ПВП в течение 60 сут (21т) приводило к увеличению количества ТГЛ2 в 1.2 раза, а ТГЛ1 – в 1.4 по сравнению с каллусом 15т. Повышение содержания низкомолекулярной фракции на фоне относительного снижения высокомолекулярной может указывать на некоторое торможение процесса конденсации олигомерных фрагментов. Можно было предположить, что это связано с недостатком в среде сахарозы как субстрата для построения клеточных стенок. Однако в каллусе 21т большинство клеток имеет сплошное утолщение, что говорит о нормальном развитии вторичных стенок клеток каллуса. В то же время в большинстве клеток каллуса 15т утолщение развито только фрагментарно (сетчатое), что свидетельствует о начальных стадиях развития вторичных стенок клеток. Вероятно, неким тормозом лигнификации в данном случае является накопление нежелательных/ингибиторных метаболитов в среде из-за отсутствия в ней ПВП или такого адсорбента, как активированный уголь. Если сравнить 15т и 16т с 20т и 21т, то можно отметить следующее. При культивировании в течение 21 сут ПВП отрицательно влияет на процесс лигнификации каллуса, очевидно, вмешиваясь в метаболизм дифференцирующихся клеток. При культивировании в течение 60 сут, когда в среде идет последовательное накопление фенольных метаболитов, ПВП, наоборот, оказывает положительное влияние на образование высокомолекулярной фракции лигнина. В среде без ПВП (21т) фракция ТГЛ2 составляет 79 %, тогда как с ПВП (20т) – 76 % от общего количества лигнина, что явно указывает на усиление конденсации его фенилпропановых предшественников. Однако потенциал для последующей полимеризации в 20т более высокий за счет повышенного содержания фракции ТГЛ1.

Действие ПВП связано с наличием в его структуре амидной группы, благодаря чему ПВП может сорбировать ароматические соединения, такие как фенолы (подобно активированному углю или полиамиду), а также

некоторые спирты, кислоты и белки. Активированный уголь, например, может адсорбировать индолилуксусную кислоту и другие гормоны, снижая тем самым их положительное влияние на рост (Pan, Staden, 1998). Действие ПВП, очевидно, зависит также от стадии дифференциации клеток каллуса и накопления ингибиторов ростовых процессов.

Хотя феруловая кислота является предшественницей гваяцильных структур лигнина, добавление ее в среду культивирования не способствовало усилению лигнификации каллуса. В 24т содержание ТГЛ2 было меньше, чем в 21т, несмотря на то, что все клетки имели хорошо развитое вторичное утолщение (см. таблицу). Это, скорее, говорит об участии феруловой кислоты в образовании диферуловых мостиков между полисахаридами и укреплении матрикса клеточных стенок. Количество ТГЛ1 в 24т увеличилось с 6.7 до 7.96 % от сухой массы ткани по сравнению с каллусом 21т (см. рис. 4), что свидетельствует об определенном потенциале для последующей конденсации структурных единиц лигнина.

Подобная картина наблюдалась и при добавлении в питательную среду смеси феруловой и аскорбиновой кислот (25т). Клетки каллуса имели овальную форму, частично сплошное вторичное утолщение и частично окаймленные поры, т. е. каллус содержал много клеток на стадии начала вторичного утолщения, несмотря на длительность культивирования. Количество ТГЛ2 снизилось по сравнению с 24т, а содержание ТГЛ1 практически не изменилось (см. рис. 4). Ранее нами было показано, что аскорбиновая кислота положительно влияет на рост клеток при формировании древесины в деревьях сосны обыкновенной (*in vivo*), но тормозит лигнификацию (Антонова и др., 2009; Antonova, 2012).

Состав структурных единиц фракций ТГЛ1 и ТГЛ2 лигнина при изменении условий культивирования изучен нами для каллусов 14, 15 и 16 (Железниченко и др., 2011). Установлено, что отношение п-оксибензальдегид : синрингилальдегид : ванилин + ванилиновая кислота варьирует и составляет в ТГЛ2 из 14т – 0.17 : 1, из 15т – 0.6 : 0.26 : 1 и

из 16т – 0.4 : 0.38 : 1 соответственно. Данные показывают, что при развитии каллуса в темноте (14) идет задержка образования синрингильных структур. В условиях свет-темнота не только относительно увеличивается содержание п-оксibenзальдегида, как продукта окисления п-оксифенилпропановых единиц. В составе лигнина появляются синрингильные структуры. Присутствие в среде ПВП, хотя и задерживает лигнификацию каллуса, способствует биогенезу фенилпропаноидов и синтезу синрингильных единиц. Это указывает на усиление активности ферментов и коферментов, преобразующих феруловую кислоту вначале в 5-дегидроксиферуловую кислоту и через ряд преобразований – в синаповый альдегид и затем синаповый спирт с последующим введением монолигнола в синрингильные структуры лигнина (Whetten, Sederoff, 1995). Световые условия культивирования влияют на активность ферментов, например ФАЛ, ключевого фермента шикиматного пути образования оксикоричных кислот, фенилпропановых предшественников лигнина (Митус, Дитченко 2013).

Авторы подчеркивали, что активность ФАЛ в каллусе эхинацеи пурпурной в значительной степени зависит от физиологического состояния клеток при культивировании в гетеро- или фотомиксотрофных условиях. При разных световых условиях (гетеро- и фотомиксотрофных) культивирования каллусных культур чайного растения наблюдалось изменение в составе и соотношении структурных единиц лигнина (Zaprometov et al., 1993).

Можно ожидать, что фракция ТГЛ2 из 20т будет содержать больше синрингильных единиц, чем ТГЛ2 из 16т, в результате увеличения длительности культивирования, как следствие пролонгирования путей биосинтеза монолигнолов. С другой стороны, присутствие ПВП тоже должно благоприятствовать появлению синрингильных единиц в 20т.

Ранее было показано, что существуют значительные отличия в динамике аккумуляции лигнина, в его макромолекулярной структуре, содержании и составе его предшественников (фенолкарбоновых кислот)

при образовании (*in vivo*) в годичном приросте сосны обыкновенной слоев ранней и поздней древесины, которые формируются при разном водном статусе клеток (Antonova et al., 2012; Antonova et al., 2014). Это указывает на кардинальные различия в механизме биосинтеза лигнина, синтезе его предшественников и в условиях их дегидрогенной полимеризации в процессе лигнификации двух типов ксилемы.

Варьирование условий культивирования также по-разному влияет на состояние развития каллуса сосны обыкновенной, уровень его лигнификации, соотношение низко- и высокомолекулярных фракций в лигнине и биогенез предшественников, в результате чего меняется состав структурных единиц лигнина и степень их конденсации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Условия культивирования каллуса сосны обыкновенной оказывают влияние на морфологию клеток, степень их дифференциации и лигнификации. Увеличение концентрации сахарозы в среде до 5 % усиливает рост каллусной массы и ее лигнификацию, особенно при культивировании в условиях свет-темнота, а также влияет на состав структурных единиц лигнина. Увеличение длительности культивирования каллуса способствует дифференциации клеток, более однородной морфологической структуре их стенок и усиливает лигнификацию каллуса. Культивирование каллуса в темноте угнетает рост и лигнификацию, в условиях свет-темнота приводит к росту каллусной культуры и накоплению в ней лигнина. Каллус, выращенный в темноте, содержит больше низкомолекулярного лигнина и меньше высокомолекулярного, чем культивированный на свету. Действие ПВП, внесенного в среду, зависит от стадии развития клеток каллуса, световых условий и продолжительности культивирования. При культивировании в темноте в течение 21 сут ПВП подавляет лигнификацию каллуса, но способствует появлению в составе лигнина синрингильных единиц. При увеличении длительности культивирования ПВП усиливает конденсацию предшествен-

ников лигнина, благодаря чему увеличивается количество высокомолекулярной фракции. Феруловая кислота, добавленная в среду, способствует развитию вторичного утолщения клеток каллуса, создавая матрицу для отложения лигнина, повышению содержания его низкомолекулярной фракции и снижению высокомолекулярной. Аскорбиновая кислота в среде положительно влияет на пролиферацию клеток и рост каллусной массы, но тормозит лигнификацию каллуса.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 09-04-00155. Авторы выражают благодарность И. Н. Третьяковой и Т. Н. Вараксиной за помощь в проведении экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антонова Г. Ф., Стасова В. В., Вараксина Т. Н. Аскорбиновая кислота и развитие клеток ксилемы и флоэмы в стволе сосны обыкновенной // Физиол. раст. 2009. Т. 56. № 2. С. 210–219.
- Дженсен У. Ботаническая гистохимия. М.: Мир, 1965. 377 с.
- Железниченко Т. В., Стасова В. В., Антонова Г. Ф. Изучение лигнификации в культуре клеток сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) // Вестн. КрасГАУ. 2011. Вып. 10. С. 57–61.
- Загоскина Н. В. Особенности метаболизма фенольных соединений гетеротрофных и фотомиксотрофных каллусных культур чайного растения (*Camellia sinensis* L.): Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.12. М.: Ин-т физиол. раст. РАН, 1997. 40 с.
- Загоскина Н. В., Усик Т. У., Запорожцев М. Н. Влияние длительности освещения на фенольный метаболизм фотомиксотрофных каллусных культур чайного растения // Физиол. раст. 1990. Т. 36. № 6. С. 1089–1095.
- Носов А. М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиол. раст. 1999. Т. 46. № 6. С. 837–844.
- Митус А. А., Дитченко Т. И. Анализ активности фенилаланинаммиакилазы в гетеротрофной и фотомиксотрофной каллусных культурах эхинацеи пурпурной // Клеточная биология и биотехнология растений. 2013. <http://elib.bsu.by/handle/123456789/34873>
- Anterola A. M., Lewis N. G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations / Mutations on lignification and vascular integrity // Phytochemistry. 2002. V. 61. P. 221–294.
- Anterola A. M., Jeon J.-H., Davin L. B., Lewis N. G. Transcriptional control of monolignols biosynthesis in *Pinus taeda* // J. Biol. Chem. 2002. V. 77. P. 18272–18280.
- Antonova G. F., Varaksina T. N., Zheleznicenko T. V., Stasova V. V. Changes in phenolic acids during maturation and lignification of scots pine xylem // Rus. J. Developm. Biol. 2012. V. 43. N. 4. P. 199–208. V. 48. N. 5. P. 919–036. DOI: 10.1134/S1062360412040029
- Antonova G. F. The role of ascorbate in growth and development of cells during the formation of annual rings in coniferous trees // Oxidative stress in plants: causes, consequences and tolerance / Eds. Naser A. Anjum, Shahid Umar, Altaf Ahmad, New Delhi – Bangalore: I. K. Int. Publ. House Pvt. Ltd., 2012. Chap. 15. P. 443–466.
- Antonova G. F., Varaksina T. N., Zheleznicenko T. V., Stasova V. V. Lignin deposition during earlywood and latewood formation in Scots pine stems // Wood Sci. & Technol. 2014. DOI: 10.1007/s00226-014-0650-3
- Blee K. A., Wheatley E. R., Bonham V. A., Mitchell G. P., Robertson D., Slabas A. R., Burrell M. M., Wojtaszek P., Bolwell G. P. Proteomic analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that synthesises secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters // Planta. 2001. V. 212. P. 404–415.
- Brunow G., Ede R. M., Simola L. K., Lemmetyinen J. Lignins released from *Picea abies* suspension cultures: true native spruce lignins? // Phytochemistry. 1990. V. 29. P. 2535–2538.
- Brunow G., Kilpeläinen I., Lapierre C., Lundquist K., Simola L. K., Lemmetyinen J. The chemical structure of extracellular lignin re-

- leased by cultures of *Picea abies* // Phytochemistry. 1993. V. 32. P. 845–850.
- Campbell M. M., Ellis B. E. Fungal elicitor-mediated response in pine cell cultures I. Induction of phenylpropanoid metabolism // Planta. 1992. V. 168. P. 409–417.
- Campbell M. M., Sederoff R. R. Variation in lignin content and composition (mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants) // Plant Physiol. 1996. V. 110. P. 3–13.
- Carceller M., Davey M. R., Fowler M. W., Street H. The influence of sucrose, 2,4-D, and kinetin on the growth, fine structure, and lignin content of cultured sycamore cells // Protoplasma. 1971. V. 73. P. 367–385.
- Eberhardt T. L., Bernards M. A., He L., Davin L. B., Wooten J. B., Lewis N. G. Lignification in cell suspension cultures of *Pinus taeda*. In situ characterization of a gymnosperm lignin // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 21088–21096.
- Friberg G., Pedersen M., Landstrom N., Eriksson T. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis // Physiol. Plant. 1978. V. 43. P. 104–106.
- Kärkönen A., Kontaniemi S., Mustonen M., Syrjänen K., Brunow G., Kilpeläinen I., Teeri T. H., Simola L. K. Lignification related enzymes in *Picea abies* suspension cultures // Physiol. Plant. 2002. V. 114. P. 343–353.
- Kärkönen A., Kontaniemi S. Lignin Biosynthesis Studies in Plant Tissue Cultures // J. Integr. Plant Biol. 2010. V. 52. N. 2. P. 176–185.
- Kontaniemi S., Toikka M. M., Kärkönen A., Mustonen M., Lundell T., Simola L. K., Kilpeläinen I. A., Teeri T. H. Characterization of basic *p*-coumaryl and coniferyl alcohol oxidizing peroxidases from a lignin-forming *Picea abies* suspension culture // Plant Mol. Biol. 2005. V. 58. P. 141–157.
- Kubo M., Udagawa M., Nishikubo N., Horiguchi G., Yamaguchi M., Ito J., Mimura T., Fukuda H., Demura T. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation // Genes Dev. 2005. V. 19. P. 1855–1860.
- Messner B., Boll M. Elicitor-mediated induction of enzymes of lignin biosynthesis and formation of lignin-like material in a suspension culture of spruce (*Picea abies*) // Plant Cell Tissue and Organ Cult. 1993. V. 34. P. 261–269.
- Möller R., Ball R. D., Henderson A. R., Modzel G., Find J. Effect of light and activated charcoal on tracheary element differentiation in callus cultures *Pinus radiata* D. Don. // Plant Cell Tissue and Organ Cult. 2006. V. 85. P. 161–171.
- Möller R., McDonald A. G., Walter C., Harris P. J. Cell differentiation, secondary cell-wall formation and transformation of callus tissue of *Pinus radiata* D. Don // Planta. 2003. V. 217. P. 736–747.
- Möller R., Koch G., Nanayakkara B., Schmitt U. Lignification in cell cultures of *Pinus radiata*: activities of enzymes and lignin topochemistry // Tree Physiol. 2005. V. 26. P. 201–210.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473–497.
- Pan M. J., van Staden J. The use of charcoal in vitro culture – a review // Plant Growth Regul. 1998. V. 26. P. 155–163.
- Ramsden L., Northcôte D. H. Tracheid formation in cultures of pine (*Pinus sylvestris*) // J. Cell Sci. 1987. V. 88. P. 467–474.
- Ravinda B., Malabadi J., Van Staden. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula* // Tree Physiol. 2005. V. 25. P. 11–16.
- Rogers L. A., Dubos S., Surman C., Willment G., Mansfield S. D., Campbell M. M. Light, the circadian clock, and sugar perception in the control of lignin biosynthesis // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 1651–1663.
- Simola L. K., Lemmetyinen J., Santanen A. Lignin release and photomixotrophism in suspension cultures of *Picea abies*. // Physiol. Plant. 1992. V. 84. P. 374–379.
- Stasolla C. J., Scott U., Egertsdotter J. F., Kadla D. M., O'Malley, Sederoff R. R., van Zyl L. Analysis of lignin produced by cinnamyl alcohol dehydrogenase-deficient *Pinus taeda* cultured cells // Plant Physiol. Biochem. 2003. V. 41. P. 439–445.
- Sugano N., Iwata R., Nishi A. Formation of phenolic acid in carrot cells in suspension culture // Phytochemistry. 1975. V. 14. P. 1205–1207.

- Venverloo C. J.* The lignin of *Populus nigra* L. A comparative study of the lignified structures in tissue cultures and the tissue of the trees // *Acta Bot. Nederl.* 1969. V. 18. P. 241–314.
- Wheeler E. J., Zobel B. J., Weeks D. L.* Tracheid length and diameter variation in the bole of loblolly pine // *TAPPI.* 1966. V. 49. N. 11. P. 484–490.
- Whetten R., Sederoff R.* Lignin biosynthesis // *The Plant Cell.* 1995. V. 7. P. 1001–1013.
- Zaprometov M. N., Zagoskina N. V., Elkin V. V.* Comparative study of lignins produced by the tea-plant and by tea-plant derived callus tissues // *Phytochemistry.* 1993. V. 32(3). P. 709–711.
- Zhong R., Demura T., Ye Z. H.* SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2006. V. 18. P. 3158–3170.
- Zhong R., Lee C., Zhou J., McCarthy R. L., Ye Z. H.* A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2008. V. 20. P. 2763–2782.
- Zhong R., Ye Z. H.* Regulation of cell wall biosynthesis // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2007. V. 10. P. 564–572.

Lignification in Scots Pine Callus as Reaction to Cultivation Conditions and Nutrient Medium

G. F. Antonova¹, T. V. Zheleznihenko², V. V. Stasova¹

¹ V. N. Sukachev Institute of Forest, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch
Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

² Central Siberian Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch
Zolotodolinskaya str., 101, Novosibirsk, 630090 Russian Federation

E-mail: antonova_cell@mail.ru, zhelez05@mail.ru, roman@akadem.ru

The effect of nutrient medium composition and of the conditions of cultivation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) callus on the morphology of its cells, the degree of their differentiation and lignification was studied. The morphological characteristics of callus cells, the content and macromolecular structure of lignin considerably vary in the dependence on the duration of callus cultivation, the degree of illumination and on the content of sucrose, polyvinylpyrrolidone (PVP), ferulic and ascorbic acids in nutrient medium. The increase in the duration of callus cultivation from 21 to 60 days promotes the differentiation of cells, the homogeneity of morphological cell wall structure and intensification of lignification. The cultivation of callus in the darkness suppresses its growth and lignification, whereas under the conditions «light- darkness» leads to the growth of the callus and the accumulation of lignin. The callus grown in the darkness contains more low-molecular lignin and less high-molecular lignin than that cultivated in the light. The increase in sucrose concentration in nutrient medium to 5 % leads to the growth of callus mass and its lignification, to heightened content of high-molecular fraction in lignin and influences the composition of lignin structural units, especially under such conditions as «light- darkness». The effect of PVP on lignification depends on the development stage of callus cells, the conditions of illumination and the time of cultivation. With the cultivation in the darkness during 21 days PVP suppresses the lignification of callus, but it contributes to appearance of siringyl units in the composition of lignin. The increase in the duration of cultivation with PVP to 60 days promotes the condensation of lignin precursors that increases the quantity of high-molecular fraction. The ferulic acid, added in the medium, contributes to the development of the secondary wall thickening of callus cells as matrix for deposition of lignin, increases the content of low-molecular fraction and decreases the high-molecular fraction. The addition of ascorbic acid to nutrient medium favourably affects the proliferation of cells and the growth of the callus mass, but it impedes its lignification.

Keywords: Scots pine, callus, duration of cultivation, light, darkness, sucrose, polyvinylpyrrolidone, ferulic and ascorbic acids, cell morphology, lignin, structure.