

УДК 635.922, 621.039

UDC 635.922, 621.039

ИЗУЧЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO МЕТОДОМ ЯМР РЕЛАКСАЦИИ**STUDY OF PLANT FACILITIES IN CULTURE IN VITRO BY NMR RELAXATION**Сергеев Роман Владимирович
к.с.-х.н.Sergeyev Roman Vladimirovich
Cand.Agr.Sci.

Новиков Петр Сергеевич

Novikov Petr Sergeevich

Черных Елена Николаевна

Chernykh Elena Nikolaevna

Шургин Алексей Иванович
к.с.-х.н., доцентShurgin Alexey Ivanovich
Cand.Agr.Sci., associate professor

Лобанова Елена Александровна

Lobanova Elena Aleksandrovna

Худякова Татьяна Федоровна
ФГБОУ ВПО «Поволжский государственный
технологический университет», г.Йошкар-Ола,
РоссияKhudyakova Tatiana Federovna
Volga State University of Technology, Yoshkar-Ola,
Russian Federation

В статье дан обзор неинвазивного метода ЯМР релаксации и проведена оценка эффективности использования данного метода в изучении культивируемых в условиях *in vitro* растительных объектов на примере растений *Rosa hybrida*

The article gives the overview of the non-invasive method of NMR relaxation and assess the efficiency of using this method in the study of cultured under *in vitro* plant objects on the example of *Rosa hybrida* plants

Ключевые слова: IN VITRO, МЕРИСТЕМА, ЯМР РЕЛАКСАЦИЯ, ЭКСПРЕСС МЕТОД, 6-БАП

Keywords: IN VITRO, MERISTEM, NMR RELAXATION, EXPRESS METHOD 6-BAP

Введение. В садоводстве, важное значение имеет раздел, связанный с разработкой и внедрением новых экономически эффективных методов размножения ценных сортов декоративных растений. Одним из таких способов является получение корнесобственных саженцев путем микроклонального размножения [1]. Он позволяет повысить коэффициент размножения и освобождает растения от вирусных болезней. Многие сорта роз возможно успешно и активно размножать посредством микроразмножения [2]. Однако существуют сложности в изучении и размножении особо ценных генотипов растений, ввиду отсутствия эффективных методов оценки роста и развития растительных клеток в культуре *in vitro* [3]. Ядерный магнитный резонанс - неразрушающая и неинвазивная методика, у которой есть большое количество анатомических и физиологических приложений к растительным клеткам,

органам растения и живым растениям [4,5,6,7,8]. ^1H ЯМР долго использовался для исследования физического состояния воды в растительной ткани и для неразрушающего измерения молекулярного смещения, такого как поток и диффузия в растениях [9].

Содержание воды и гидравлическая удельная электропроводность, включающая транспорт внутри клеток, по мембранам, между клетками, и дальний транспорт ксилемы и флоэмы, сильно зависит от дефицита воды в растении. Благодаря возможности измерить эти процессы транспорта неинвазивно, в неповрежденном растении относительно его клеток и тканей, можно исследовать и многие физиологические аспекты вегетирующего растения.

Одним из основных факторов создания эффективной биотехнологической системы является подбор оптимальной питательной среды, максимально полно обеспечивающей потребности растущей клеточной культуры продуцента в растительных регуляторах роста, макро- и микроэлементах минерального питания, факторов регуляции процессов клеточного деления и дифференциации, необходимых для высокого биосинтеза целевого продукта.

Современные методы исследования интенсивности роста растений можно разделить на физические и химические. Из них большинство методов являются разрушающими [10], то есть, при анализе объекта его экспериментальный образец либо подвергается участию в химической реакции (химические методы), и по количественному составу продуктов последней судят об изучаемом объекте, либо образец должен пройти серию физико-химических превращений для пригодности исследования соответствующим методом (например, методы исследования коэффициентов преломления раствора, методы электронной микроскопии, рентгеновской дифракции и т. п.).

К неразрушающим образцам методов относятся, в основном, спектроскопические, такие как методы диэлектрической спектроскопии (ДС и ВДС), электронный парамагнитный резонанс (ЭПР), электронный спиновый резонанс (ЭСР), ядерный магнитный резонанс (ЯМР) и некоторые другие.

Ядерный магнитный резонанс является неразрушающим материал экспресс методом, дающим информацию о различных морфологических и физиологических параметрах растительного объекта, например, о размерах вакуолей в клетках растений, проницаемости клеточной мембраны, содержании воды в клетках [12], скорости и объеме потока веществ в ксилеме и флоэме [13].

Цель работы - изучить возможность применения метода ЯМР релаксации для оценки пролиферативной активности и определения оптимальных параметров развития эксплантов растений в культуре *in vitro* на основе водных потоков в меристематических очагах.

Материалы, методы и объекты исследований. Объектом для исследований являлись растительные ткани образцов *Rosa hybrida*, культивируемые *in vitro*.

ЯМР в настоящее время является одним из самых популярных методов исследования микроструктуры соединений природного происхождения. Ядерная магнитная релаксация – это процесс установления термодинамического равновесия внутри спиновой системы с характерным временем T_2 , и в системе спины-решетка с общим временем релаксации T_1 [14]. Спин-спиновая (поперечная) релаксация происходит в плоскости xy и сопровождается излучением фотонов, т. е. является наблюдаемой величиной. Продольная спин-решеточная релаксация не вызывает излучательных переходов в спин-системе и наблюдается косвенно [15,16]. Следует отметить, что время T_2 непосредственно зависит от подвижности протонов и если протоны подвижны, то T_2 длиннее. Этот

параметр мы использовали для оценки интенсивности роста растительных объектов в культуре *in vitro*.

Чтобы характеризовать подвижность сегментов макромолекул и функциональных групп, в работе использовалось время спин-спиновой релаксации T_2 , которое возрастает с уменьшением времени корреляции движений ^1H в изучаемом образце. На основе измерений амплитуды ССИ определялось количество протонов водорода в образце, так как эти величины связаны линейно. Для определения времени ядерной магнитной релаксации T_2 и амплитуды сигнала ЯМР исследуемых образцов использовались импульсные последовательности Карра – Перселла – Мейбума – Гилла (КПМГ) [17,18], спада свободной индукции (ССИ) и спинового эха Хана. Время спин-решеточной релаксации (T_1) определялось путем снятия кривой восстановления продольной намагниченности (импульсная последовательность $90^\circ - \tau - 90^\circ$).

Все измерения проводились на ЯМР-анализаторе «Spin Track», зарегистрированном в Государственном реестре средств измерений Российской Федерации под номером 32677 – 06 [19], поддерживающем все возможные приложения ЯМР низкого разрешения. Процедура подготовки образца в большинстве приложений сводится лишь к помещению анализируемого вещества в пробирку и установке ее в датчик прибора. Основные параметры ЯМР-анализатора «Spin Track» приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Основные характеристики ЯМР-анализатора «Spin Track»

Параметр	Значение
Постоянное магнитное поле B_0 (в зависимости от типа магнита)	0,1..1,5 Т
Диапазон рабочих частот спектрометра	2-60 МГц
Программируемый фазовый сдвиг РЧ импульсов	$0^0, 90^0, 180^0, 270^0$
Время восстановления чувствительности (для датчика с ампулой на 10мм, 0.47Т)	7 мкс
Разрешение по времени в последовательности	0.1 мкс
Импульсная последовательность	Полностью программируемая
Коэффициент усиления приемного тракта	70 .. 95 дБ
Шаг дискретизации АЦП	Программируемый
Минимальный шаг дискретизации АЦП	0,2 мкс
Число разрядов АЦП	10
Операционная система управляющих программ	Windows 9x, NT, Me, 2000, XP
Связь с компьютером	Full Speed USB 2.0
Программная совместимость данных	ASCII, Microsoft Excel®
Область чувствительности датчика с ампулой на 10 мм (высота заполнения пробирок образцом)	10 мм

Теоретические расчеты, моделирование и аппроксимация экспериментальных данных проводились с использованием современного программного обеспечения Origin 6.1 и MATHCAD 2001 Professional. Построение графиков и обработка данных осуществлялась при помощи пакета программ Microcal Origin 6.1.

Для экспериментов по исследованию интенсивности роста и динамики формирования меристематических очагов в культуре растительных тканей были взяты культуры *Rosa hybrida* сортов 'Парцелайн' и 'Ле руж э ле нуар'. Все образцы культивировались на среде по прописи MS [20] с различной концентрацией 6-бензиламинупирин в пробирках Видаля. Данные с образцов собирались в различные периоды культивирования (через 2, 3 и 4 недели).

Измерения магнитно-релаксационных параметров проводились на ЯМР релаксомере «Spin Track» с частотой резонанса 19 МГц [17].

Времена спин-спиновой релаксации T_2 измерялись при помощи импульсной последовательности Карра-Парселла-Мейбума-Гилла. Времена спин-решеточной релаксации T_1 были получены в эксперименте с импульсной последовательностью 90° - τ - 90° .

Результаты проведенных экспериментов по ЯМР-релаксации во временной области для *Rosa hybrida* сорта 'Парцелайн' представлен в таблице 2.

Таблица 2 - Экспериментальные данные ЯМР-релаксации образцов *Rosa hybrida* сорта 'Парцелайн' в зависимости от продолжительности культивирования

Концентрация 6-БАП, мг/л	Время T_2 в зависимости от продолжительности культивирования, мкс			Наличие меристематических очагов
	2 недели	3 недели	4 недели	
0	6100	6437	9083	нет
0,5	222	184	175	есть
2	222	201	194	есть
5	240	227	222	есть
7	222	214	208	есть

Анализируя данные, можно сделать вывод, что наличие в питательной среде фитогормонов влияет на формирование меристематических очагов у анализируемых образцов. Это объясняется тем, что уменьшение времени спин-спиновой релаксации T_2 говорит о снижении подвижности протонов в исследуемых образцах, что в свою очередь может свидетельствовать о формировании меристематических очагов в растительной ткани, которое сопровождается увеличением числа клеток и протонной плотности. Так, на питательной среде без содержания фитогормонов время спин-спиновой релаксации T_2 через 2 недели культивирования составило 6100 мкс, через 3 недели – 6437 мкс, через 4 недели 9083 мкс. Увеличение времени T_2 в процессе культивирования свидетельствует об отсутствии формирования меристематических очагов у анализируемых образцов.

На средах с добавлением 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л, 2 мг/л, 5 мг/л и 7 мг/л время спин-спиновой релаксации с течением времени

уменьшается, что свидетельствует о процессе формирования меристематических очагов.

На рисунке 1 показана зависимость формирования меристематических очагов культуры *Rosa hybrida* сорта 'Парцелайн' от концентрации 6-БАП в питательной среде.

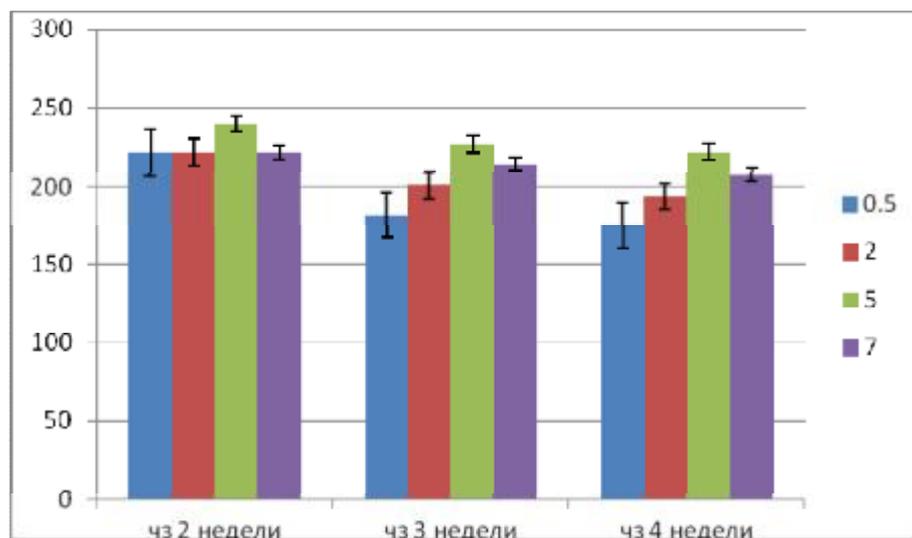


Рисунок 1 - Зависимость формирования меристематических очагов *Rosa hybrida* сорта 'Парцелайн' от концентрации 6-БАП в питательной среде

У образцов *Rosa hybrida* сорта 'Парцелайн' наиболее интенсивное формирование меристематических очагов наблюдали на среде с добавлением 6-БАП в концентрациях 0,5 мг/л и 2 мг/л. Дальнейшее увеличение концентрации 6-БАП снижает интенсивность формирования меристематических очагов.

Результаты проведенных экспериментов по ЯМР-релаксации во временной области для *Rosa hybrida* сорта 'Ле руж э ле нуар' представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Экспериментальные данные ЯМР-релаксации образцов *Rosa hybrida* сорта 'Ле руж э ле нуар' в зависимости от продолжительности культивирования

Концентрация фитогормона, мг/л	Время T_2 в зависимости от продолжительности культивирования, мкс			Наличие меристематических очагов
	2 недели	3 недели	4 недели	
0	111	109	123	нет
0,5	215	175	156	есть
2	163	142	139	есть
5	189	159	147	есть
7	176	151	143	есть

Данные показывают, что наличие в питательной среде фитогормонов влияет на формирование меристематических очагов у анализируемых образцов. Так, на питательной среде без содержания фитогормонов время спин-спиновой релаксации T_2 через 2 недели культивирования составило 111 мкс, а через 4 недели - 123 мкс. Увеличение времени T_2 свидетельствует об отсутствии формирования меристематических очагов у анализируемых образцов.

На средах с добавлением 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л, 2 мг/л, 5 мг/л и 7 мг/л время спин-спиновой релаксации с течением времени уменьшается, что свидетельствует о процессе формирования меристематических очагов.

На рисунке 2 показана зависимость формирования меристематических очагов культуры *Rosa hybrida* сорта 'Ле руж э ле нуар' от концентрации 6-БАП в питательной среде.

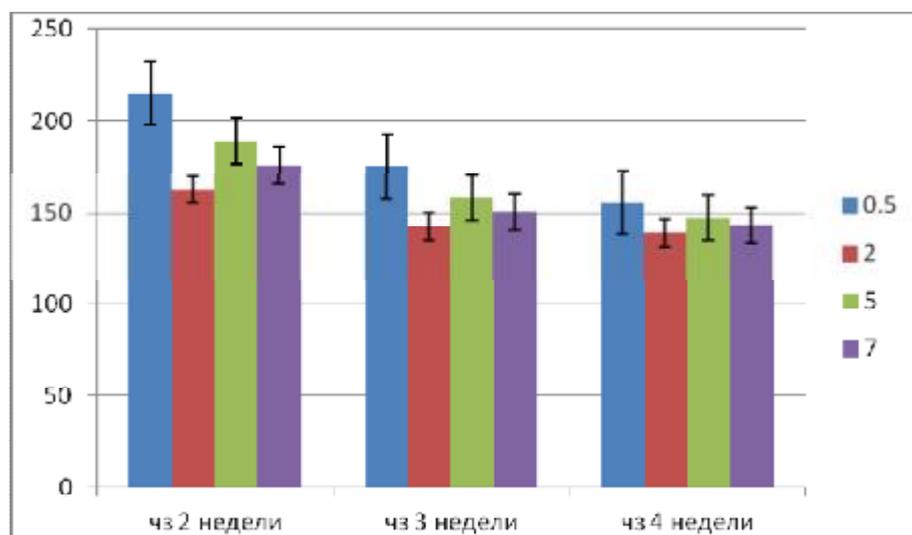


Рисунок 2 – Зависимость формирования меристематических очагов культуры *Rosa hybrida* сорта 'Ле руж э ле нуар' от концентрации 6-БАП в питательной среде

Таким образом, у образцов *Rosa hybrida* сорта 'Ле руж э ле нуар' уменьшение времени спин-спиновой релаксации T_2 , а, следовательно, и наиболее интенсивное формирование меристематических очагов наблюдается на питательной среде с добавлением фитогормона в концентрации 0,5 мг/л.

На следующих рисунках приведены графики спада поперечной намагниченности у образца *Rosa hybrida* сорта 'Ле руж э ле нуар', культивируемого на среде с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП через 2 (рис. 3) и 4 недели (рис. 4) культивирования.

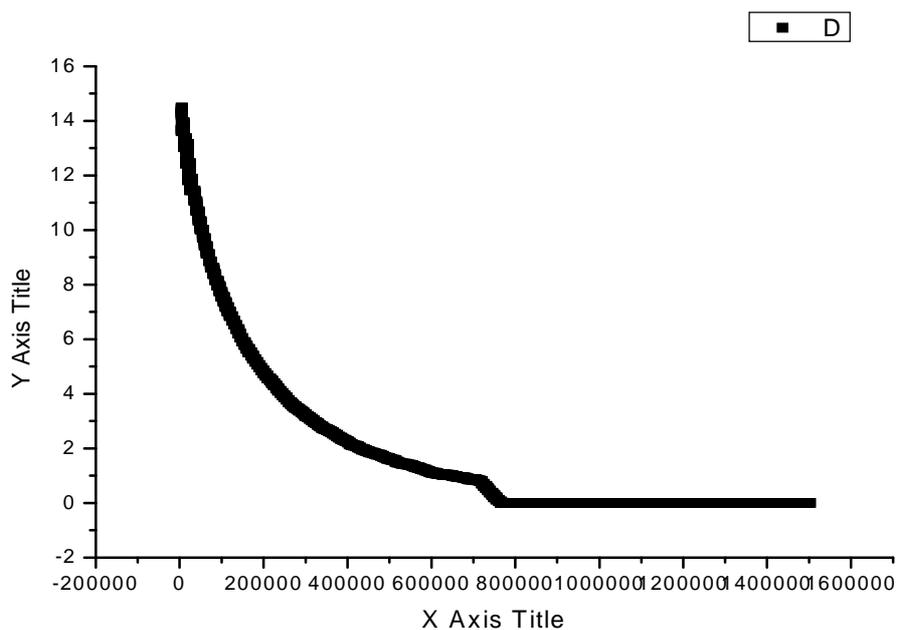


Рисунок 3 – Спад поперечной намагниченности у образца *Rosa hybrida* сорта ‘Ле руж э ле нуар’, культивируемого на среде с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП через 2 недели культивирования

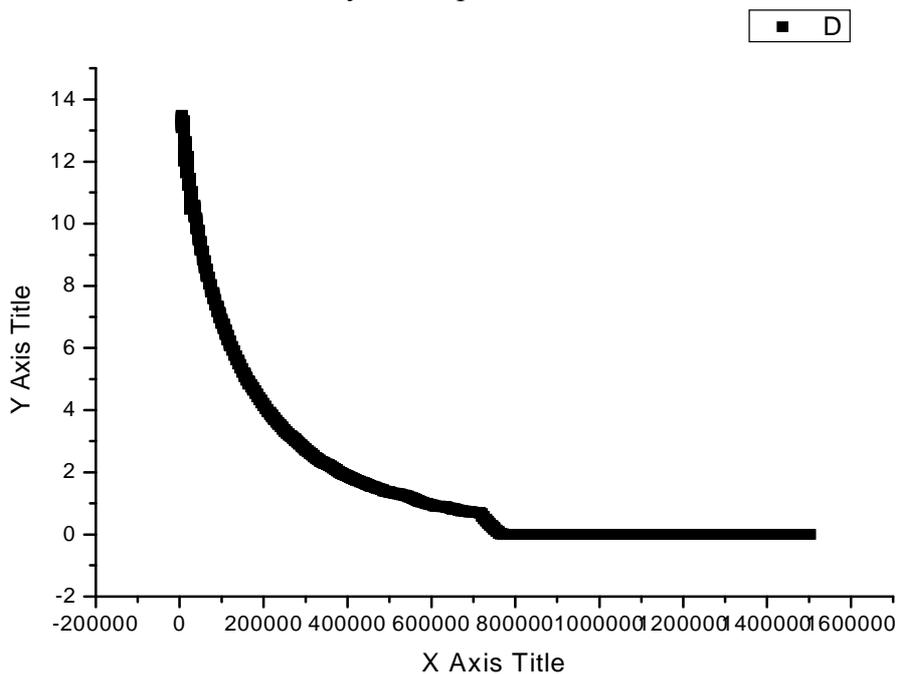


Рисунок 4 – Спад поперечной намагниченности у образца *Rosa hybrida* сорта ‘Ле руж э ле нуар’, культивируемого на среде с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП через 4 недели культивирования

На следующих рисунках приведены графики спада поперечной намагниченности у образца *Rosa hybrida* сорта ‘Парцелайн’,

культивируемого на среде с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП через 2 (рис. 5) и 4 недели (рис. 6) культивирования.

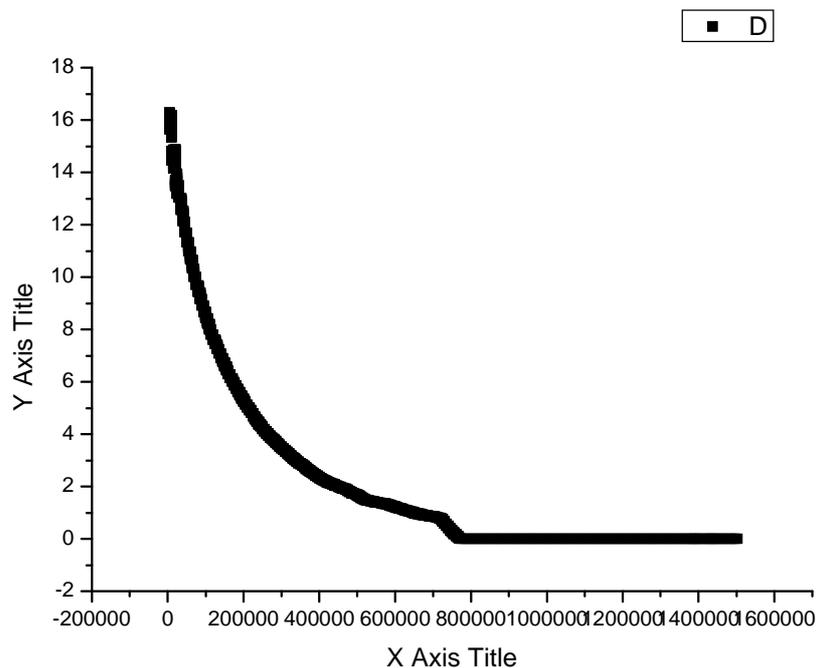


Рисунок 5 - Спад поперечной намагниченности у образца *Rosa hybrida* сорта 'Парцелайн', культивируемого на среде с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП через 2 недели культивирования

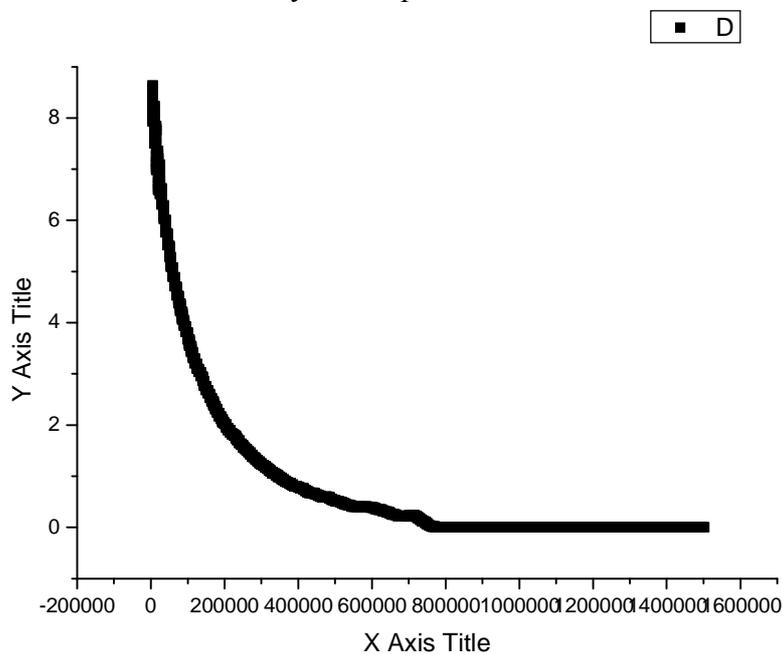


Рисунок 6 – Спад поперечной намагниченности у образца *Rosa hybrida* сорта 'Парцелайн', культивируемого на среде с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП через 4 недели культивирования

Применение магнитнорезонансной релаксации в изучении пролиферативной активности клеток растений позволит своевременно оценить и при необходимости изменить условия культивирования эксплантов на различных этапах онтогенеза, а также существенно увеличить эффективность подбора компонентов питательных сред и как следствие ускорить процесс размножения растений.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 - 2013 годы» при финансовой поддержке Минобрнауки России (Соглашение № 14.В37.21.1110 от 14 сентября 2012 г.) с использованием оборудования ЦКП «ЭБЭЭ» ФГБОУ ВПО «ПГТУ».

Список литературы

1. Поздняков, И.А. Особенности микрклонального размножения шиповника и декоративных сортов рода *Rosa L.*: автореф. дис. канд. с-х. наук / И.А. Поздняков. – М., 2007. - 25 с.
2. Arnold, N.P. A study of the effect of growth regulators and time of plantlet harvest on the in vitro multiplication rate of hardy and hybrid tea roses / N.P. Arnold, M.R. Binns, N.N. Barthakur, D.C. Cloutier // *Journal of Horticultural Science* 67. - 1992. - N. 6. - P. 727-735.
3. Сергеев, Р.В. Выращивание декоративных цветочных растений в культуре in vitro с использованием субстратов из органических отходов / Е.М. Романов, Д.И. Мухортов, А.Д. Средин, Р.В. Сергеев, А.И. Шургин // *Вестник МарГТУ*. № 3(13)., 2011. – С. 72-81.
4. Walter, L. Studies of plant systems by in vivo NMR spectroscopy / L. Walter, R. Callies, R. Altenburger // In: de Certaines JD, Bove'e WMMJ, Podo F, eds. *Magnetic resonance spectroscopy in biology and medicine*. Oxford: Pergamon Press. – 1992. – P. 573–610.
5. Ratcliffe, R.G. In vivo NMR studies of higher plants and algae / R.G. Ratcliffe // *Advances in Botanical Research*. - 1994. – Vol. 20. – P. 42–123.
6. Shachar-Hill, Y. Nuclear magnetic resonance in plant biology / Y. Shachar-Hill, P.E. Pfeffer // Rockville: American Society of Plant Physiologists. – 1996.
7. Chudek, J.A. Magnetic resonance imaging of plants / Y. Shachar-Hill, P.E. Pfeffer // *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. – 1997. – Vol. 31. – P. 43–62.
8. Ishida, N. The NMR microscope, a unique and promising tool for plant science / N. Ishida, M. Koizumi, H. Kano // *Annals of Botany*. – 2000. – Vol. - 86. – P. 259–278.
9. MacFall, J.J. Magnetic resonance imaging of plants / MacFall J.J, As. H. Van // *The American Society of Plant Physiologists*.-1996. – P. 33–76.
10. Современные физические методы исследования полимеров / Под. ред. Г.Л. Слонимского. - М.: Химия, 1982.
11. Рот, Г.К. Радиоспектроскопия полимеров / Г.К. Рот, Ф. Келлер, Х. Шнайдер - М.: Мир, 1987.

12. Scheenen, T.W.J. Quantification of water transport in plants with NMR imaging / T.W.J. Scheenen, D. van Dusschoten, P.A. de Jager, H. Van As // J. Exp. Bot. 2000. - 51(351). - P. 1751-1759.
13. Windt, C.W. MRI of long-distance water transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar, castor bean, tomato and tobacco / C.W. Windt, E. Gerkema, J. Oosterkamp, H. Van As // Plant Cell Envir. – 2006. - 29(9). - P. 1715-1729.
14. Чижик, В.И. Ядерная магнитная релаксация. / В.И. Чижик //- Ленинград., изд-во Ленинградского университета, 1991.
15. Фаррар, Т. Импульсная и фурье-спектроскопия ЯМР / Т.мФаррар, Э. Беккер. - М: Мир, 1973.
16. Эмсли, Дж. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса высокого разрешения / Дж. Эмсли, Дж. Финей, Л. Сатклифф. - М.: Мир, 1968.
17. <http://www.nmr-design.com/ru/>
18. Грунин, Ю. Б Импульсный метод ЯМР для определения термодинамических характеристик адсорбционных процессов в биополимерах / Ю. Б.Грунин, Л. Ю.Грунин, Е. А.Никольская // Журн. физ. химии. – 2007. – Т.81, № 7. – С. 1165-1170.
19. Carr, H.Y. Purcell E.M. Physical Review B 94 (35), p. 630 – 638, 1954.
20. Meiboom, S., Gill D. The Review of Scientific Instruments B 29 (45), p. 688-691, 1958.
21. Грунин, Л.Ю. Протонная магнитная релаксационная спектроскопия природных полимеров : дис. ... канд. хим. наук : 02.00.04 : защищена 21.12.98 : утв. 14.05.99 / Грунин Леонид Юрьевич. – Йошкар-Ола, 1998. – 142 с.
22. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T.Murashige, F.Skoog // Physiologia Plantarum. – 1962. – Vol. 15. – P. 473 – 497.