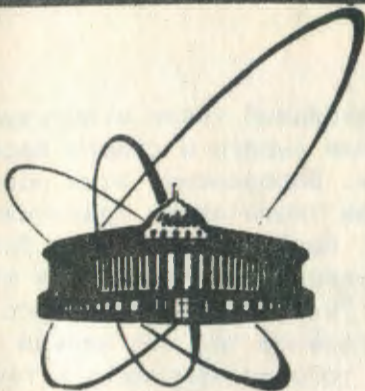


89-45



Объединенный
институт
ядерных
исследований
Дубна

P19-89-45

Э.Гацек, Э.Н.Исмаилова

**ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ ПРИБОР
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИНАМИКИ РОСТА
РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ in vitro**

Направлено в журнал "Физиология растений"

1989

Для измерения динамики роста растительной ткани используют такие интегральные тесты, как измерение сырого и сухого веса ткани в течение определенного времени. Определение этих показателей обычно связано со взвешиванием ткани путем удаления ее с поверхности питательной среды колб, пробирок или чашек Петри, в которых она росла. При таких манипуляциях накладывается несколько отрицательных факторов, таких, как, например: стресс ткани, возможность инфицирования, а главное то, что нельзя пронаблюдать динамику роста одного и того же инокулята в течение всего пассажа без раздражающих факторов. Поэтому для построения кривой динамики роста необходимо обеспечить каждую точку отдельными инокулятами, которые после взвешивания в культуру не возвращаются. Таким образом, традиционное измерение динамики роста ткани требует большого объема растительной ткани, среды, посуды, и является достаточно громоздкой работой. В литературе описаны приборы, позволяющие измерять рост и развитие клеточных суспензий^{/1/} и каллусных тканей^{/2/}. Первый прибор работает по принципу определения плотности суспензий, культивируемых в жидкой среде, и поэтому не может применяться для измерений динамики роста каллусных тканей. Использование второго типа прибора требует применения специальных контейнеров и выращивания растительной ткани на жидкой среде с использованием подложки, что усложняет работу. Собранный нами прибор позволяет выращивать растительную ткань на твердой агаризованной среде и снимать динамику роста без удаления растительной ткани с поверхности питательной среды, что устраняет ряд нежелательных явлений.

КОНСТРУКЦИЯ ПРИБОРА

Принципиальная схема прибора представлена на рис.1. Источником света является стандартное осветительное устройство с осветителем микроскопа 12/50, представляющее собой дополнительное устройство к микроскопу ERGAVAL, с галогенной проекционной лампой 12 В x 50 Вт^{/2/}; в основной части прибора использованы части микроскопа МБС-9, а именно - стол микроскопа 9 с кронштейном 8, который дополнен фотометрическим устройством 3 с линзой 15 и селеновым фотоэлементом 4. Измерения мощ-

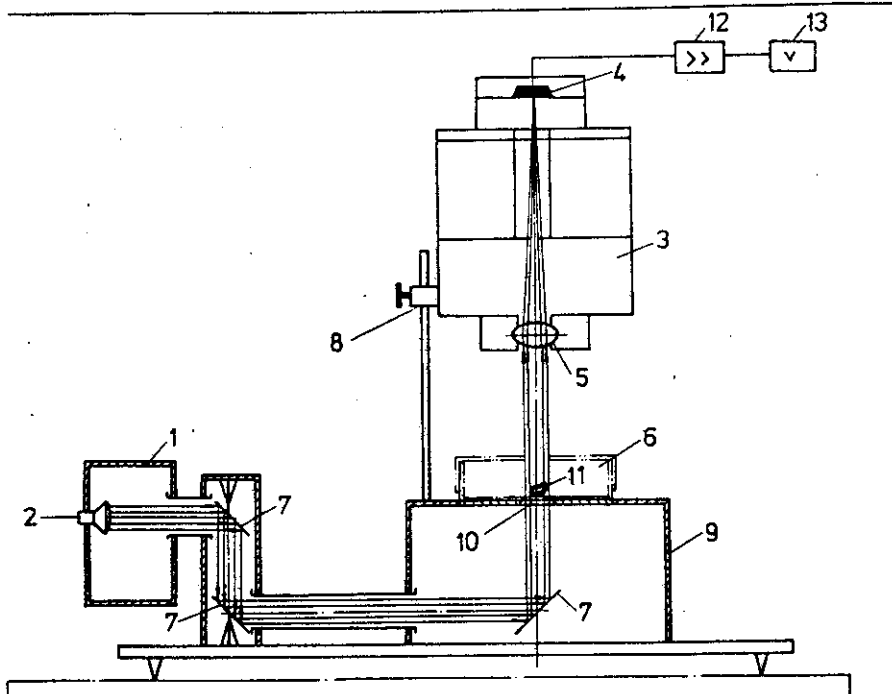


Рис.1. Фотометрический прибор для определения динамики роста растительных тканей. 1 - осветительное устройство, 2 - галогеновая лампа, 3 - фотометрическое устройство, 4 - фотозлемент, 5 - объектив, 6 - чашка Петри, 7 - зеркало, 8 - кронштейн, 9 - стол микроскопа, 10 - диафрагма, 11 - каллус, 12 - усилитель тока, 13 - измерительный прибор.

ности пучка света усиливаются стандартным усилителем постоянного тока 10 и измеряются прибором В7-22А 11.

ПРИНЦИП РАБОТЫ ПРИБОРА

Пучок параллельного света отражается в трех плоских зеркалах, освещая каллус, который находится на агаризованной среде в чашке Петри. После прохождения через среду и каллус пучок фокусируется линзой и попадает на селеновый фотозлемент. Чувствительным измерительным прибором определяется ток падающего на фотозлемент света, вызванный пучком. Возможность использования подобного типа прибора базируется на предположении

о том, что уменьшение потока света в пучке пропорционально объему измеряемого каллуса.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ПОКАЗАНИЯМИ ФОТОМЕТРА И МАССОЙ КАЛЛУСА

Для определения корреляции между показаниями нашего прибора, которые в дальнейшем будем называть фотоиндексом /ФИ/ и массой каллуса, нами были поставлены опыты на растительной ткани руты душистой для двух штаммов R-15 и R-20, которые отличались биосинтетической активностью и имели внешние морфологические отличия. Измерения корреляции проводили для каждого штамма в 14 чашках Петри, высаживая по 9 инокулятов в каждую чашку и выращивая их в течение 28 суток. Через каждые трое суток производили измерения фотоиндекса на приборе. Как видно из рис.1, ослабление пучка света связано не только с объемом каллуса, но даже с толщиной слоя среды, находящегося непосредственно под ним. Поэтому необходимо для каждого измеряемого инокулята высчитывать вклад питательной среды в поглощение пучка света. В связи с этим необходимо вначале определить поглощение света слоем питательной среды, показания "занулить", и после этого произвести измерение поглощения света непосредственно инокулятом. После определения ФИ снимали по одной чашке Петри для взвешивания сырого и сухого веса. Результаты произведенных опытов представлены на рис.2 и 3 для штамма R-15 и на рис.4, 5 - для штамма R-20. Как видно из представленных кривых, зависимость между ФИ, сырым и даже сухим весом имеет прямолинейный характер. Такая зависимость сохраняется для сырого веса в диапазоне от 50-600 мг, для сухого веса - в диапазоне от 4-40 мг. В таблице представлены значения коэффициентов корреляции.

Таблица

Вес	Шт. R-15		Шт. R-20	
	k	b	k	b
Сухой	0,4255	0,2792	0,3424	-1,5747
Сырой	7,8442	-28,1689	7,4409	-52,7192

РУТА ДУШИСТАЯ R-15
 $Y=0,42551X + 0,2792$

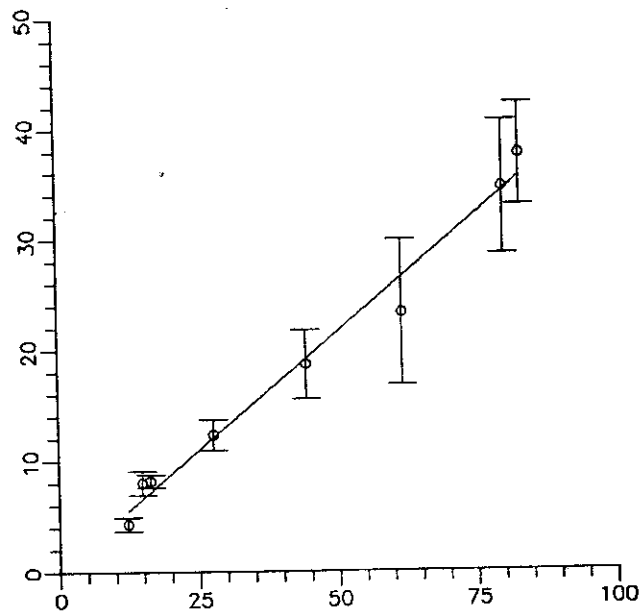


Рис.2. Кривая корреляции между фотоиндексом и сухим весом для штамма R-15. По оси абсцисс - значения фотоиндекса, по оси ординат - сухой вес /в мг/.

РУТА ДУШИСТАЯ R-15
 $Y=7,844167X + -28,1689$

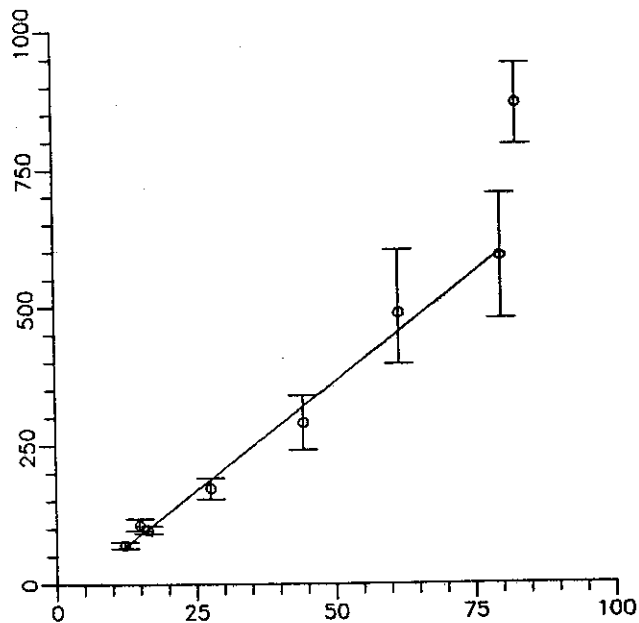


Рис.3. Кривая корреляции между фотоиндексом и сырым весом для штамма R-15. По оси абсцисс - значения фотоиндекса, по оси ординат - сырой вес /в мг/.

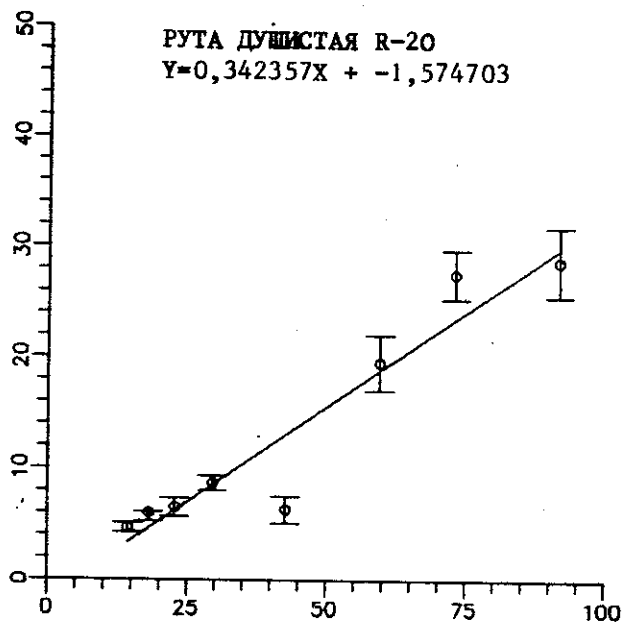


Рис. 4. Кривая корреляции между фотоиндексом и сухим весом для штамма R-20. По оси абсцисс - значения фотоиндекса, по оси ординат - сухой вес /в мг/.

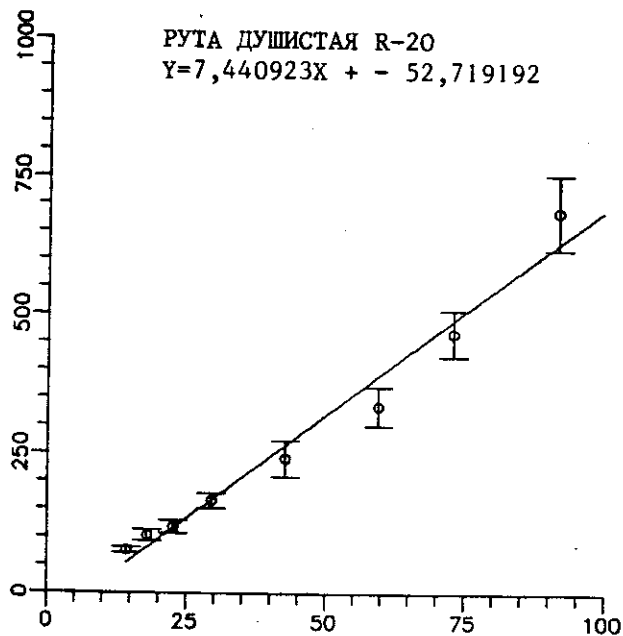


Рис. 5. Кривая корреляции между фотоиндексом и сырым весом для штамма R-20. По оси абсцисс - значения фотоиндекса, по оси ординат - сырой вес /в мг/.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИНАМИКИ РОСТА ФОТОМЕТРИЧЕСКИМ И СТАНДАРТНЫМ МЕТОДАМИ

Для определения динамики роста растительной ткани фотометрическим методом нами были поставлены по два параллельных опыта для штаммов R-15 и R-20. В первых опытах проводили измерения ФИ через трое суток, а значения роста ткани для каждой точки получали из уравнения $Y = kX + b$, где k и b для разных штаммов представлены в таблице. В параллельных опытах значения динамики роста растительной ткани определяли как фотометрическим методом /В/, так и стандартным /А/. Результаты этих опытов отражены на рис.6-9. Как видно из представленных рисунков, кривые динамики роста, полученные путем измерения ФИ, полностью совпадают с кривыми динамики роста, полученными стандартным методом путем взвешивания ткани. Следует заметить, что эти значения полностью совпадают только в диапазоне от 3 по 25 день. При дальнейшем росте за счет большого увеличения объема ткани измерение ФИ затруднено, так как диаметр диафрагмы в измерительном приборе равен 20 мм. В случае необходимости измерений больших объемов тканей можно увеличить размер диаф-

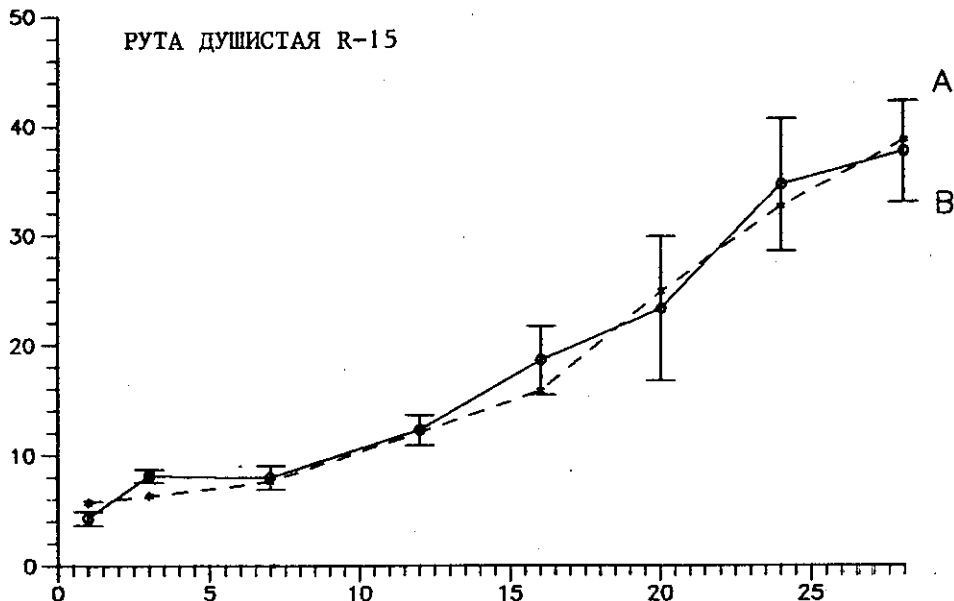


Рис.6. Определение динамики сухого веса фотометрическим /В/ и стандартным /А/ методами для штамма R-15. По оси абсцисс - время /сутки/, по оси ординат - сухой вес /в мг/.

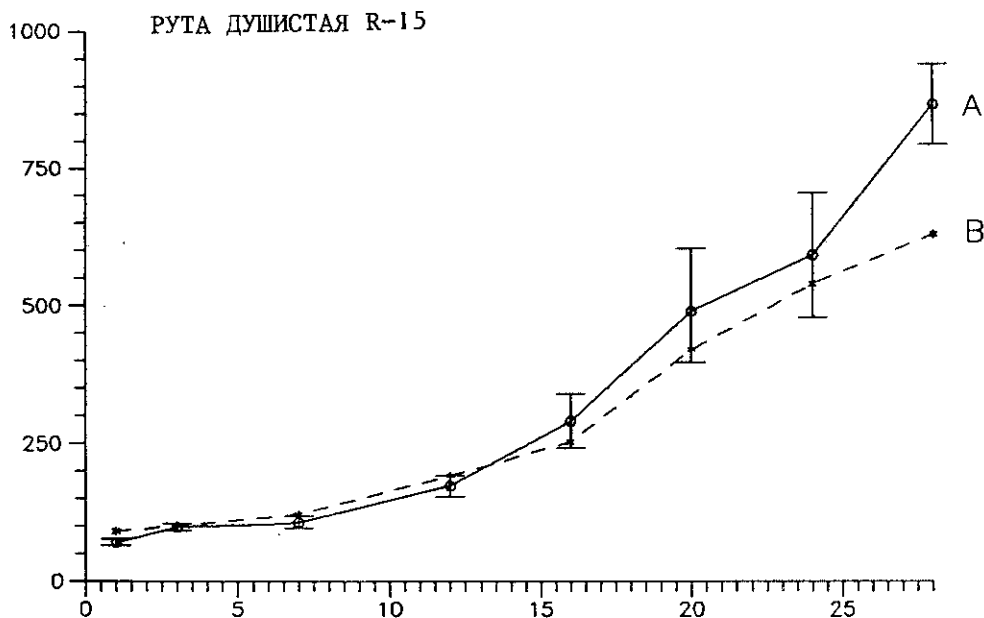


Рис.7. Определение динамики сырого веса фотометрическим /В/ и стандартным /А/ методами для штамма R-15. По оси абсцисс - время /сутки/, по оси ординат - сырой вес /в мг/.

рагмы, что повлечет за собой дополнительное определение коэффициента поглощения, связанное с изменением диафрагмы.

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1/ Поглощение света каллусной тканью коррелирует с изменением ее массы.

2/ Корреляция носит прямолинейный характер и описывается уравнением $Y = kX + b$.

3/ Кривые динамики роста растительной ткани, полученные фотометрическим методом, полностью совпадают с кривыми динамики роста, полученными стандартным методом. Этот вывод справедлив только для каллусов, не превышающих размеров диафрагмы прибора.

Таким образом, разработанный нами фотометрический метод определения роста растительной ткани позволяет снимать динамику роста простым и надежным способом без удаления ткани с поверхности питательной среды. Этот метод может найти применение

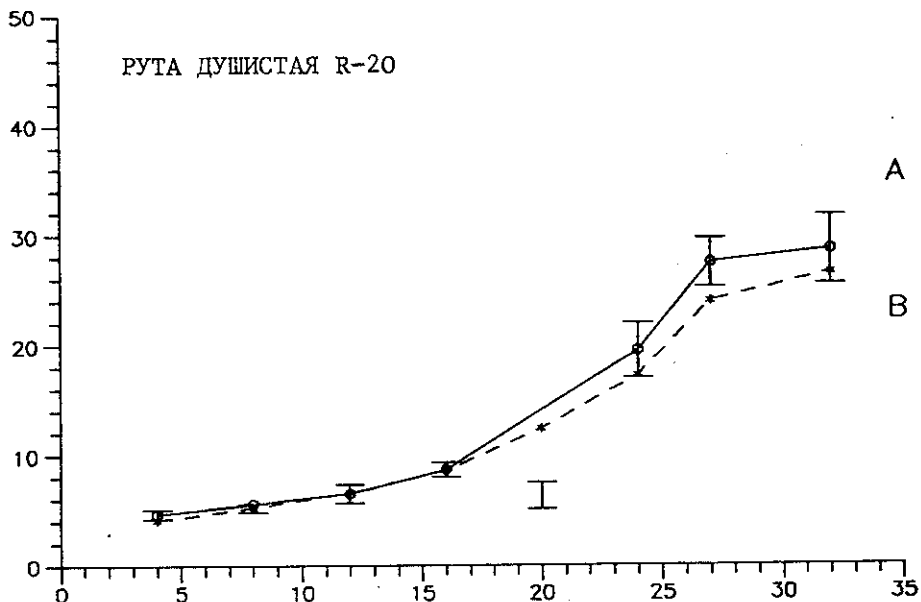


Рис.8. Определение динамики сухого веса фотометрическим /В/ и стандартным /А/ методами для штамма R-20. По оси абсцисс - время /сутки/, по оси ординат - сухой вес /в мг/.

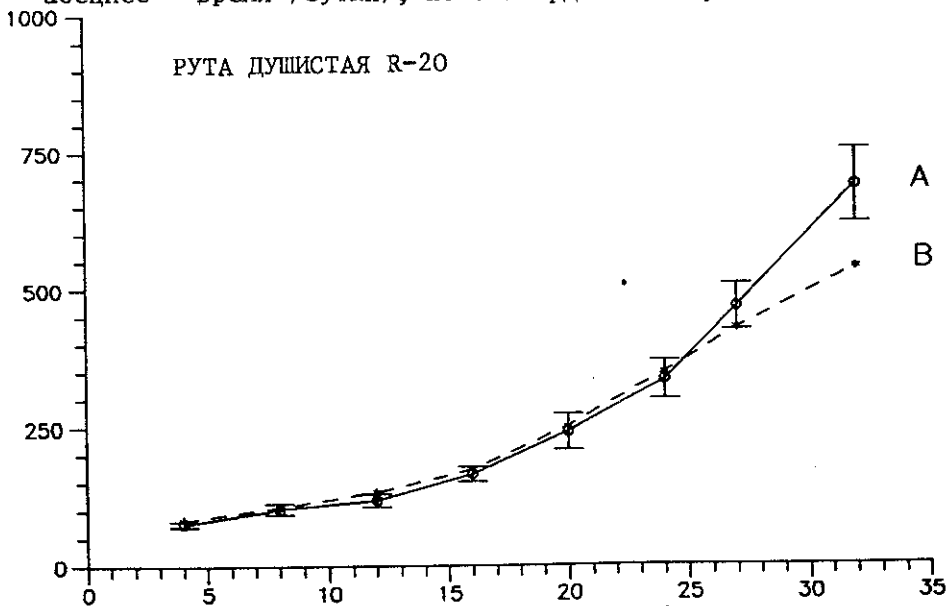


Рис.9. Определение динамики сырого веса фотометрическим /В/ и стандартным /А/ методами для штамма R-20. По оси абсцисс - время /сутки/, по оси ординат - сырой вес /в мг/.

в биотехнологических, биохимических, физиологических, радиобиологических исследованиях с применением растительных тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wilson S.B., King P.J., Street H.E. - J.Exp.Botany, 1971, vol.22, n.70, p.177.
2. Krul W.R., Combs M. - Plant Physiol, 1975, 55, p.578.

Рукопись поступила в издательский отдел
24 января 1989 года.