

Б И О Л О Г И Я

УДК 573.086.581.085

Н. К. БИШИМБАЕВА

РЕГУЛЯЦИЯ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА И ДЛИТЕЛЬНОЕ ПОДДЕРЖАНИЕ ТОТИПОТЕНТНОСТИ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ ПШЕНИЦЫ И ЯЧМЕНЯ

(Представлена академиком НАН РК А. Н. Илялетдиновым)

Разработана концепция о цитофизиологических механизмах, лежащих в основе индукции, длительного поддержанияtotипотентности и регуляции соматического эмбриогенеза в культуре тканей зерновых злаков. Предложена теоретическая схема, демонстрирующая цикличность процессов инициации и дезинтеграции соматических эмбриоидов в длительно культивируемых эмбриогенных каллусах. Показана важная роль стресса, вызванного высокой концентрацией 2,4-Д, в индукции и длительном поддержании totипотентности. Впервые выявлена важная роль программирующей гибели клеток и выделяемых ими полисахаридов в регуляции процессов цитодифференцировки и морфогенеза в длительно культивируемых эмбриогенных каллусах.

Несмотря на уже более чем 70-летнюю историю существования метода культуры клеток и тканей, проблема клеточных и молекулярных основ морфогенеза и регенерации растений остается малоизученной [1]. В то же время внимание к этому вопросу не ослабевает и даже усиливается. В связи с развитием генетической трансформации растений в последние годы исследования в области соматического эмбриогенеза (СЭ) и регенерации растений *in vitro* значительно интенсифицировались. Все большую актуальность приобретают исследования, посвященные выяснению клеточных и молекулярных механизмов индукции и длительного поддержания totипотентности – способности реализовать программу развития целого растения из одиночных соматических клеток. Это, в свою очередь, позволяет выявить сигналы и индукторы различных этапов СЭ и создаст возможность целенаправленного регулирования процессами морфогенеза *in vitro*.

Соматический эмбриогенез *in vitro* является идеальной системой для изучения механизмов реализации totипотентности растительных клеток. Соматический эмбриогенез по определению А. М. Emons [2] – развитие из соматических клеток структур, сходных с зиготическими зародышами. Процесс соматического эмбриогенеза можно разделить на 2 этапа: 1) начальную фазу, когда некоторые клетки вдруг приобретают способность развиваться в эмбриоид, т.е. становятся собственно компетентным к эмбриоидогенезу; 2) переход к эмбриогенезу или развитию зародыша *in vitro*, начиная от фазы «глобулы» через стадии «сердца» и «торпеда» к фазам сфор-

мированного зародыша [3]. Принципиально важным моментом в изучении процесса соматического эмбриогенеза, по мнению Р. Г. Бутенко [3], является изучение самых ранних его этапов. При этом важно выяснить не только сигналы и индукторы этого процесса, но и механизмы, заставляющие дифференцированную клетку *in vitro* переключаться на другой путь развития.

В имеющихся литературных данных подробно исследованы поздние этапы СЭ, и, практически, нет объяснений тому, как некоторые клетки или группа клеток начинают детерминироваться для индукции эмбриогенеза. Пока нет ясного представления о природе факторов, благодаря действию которых в массе неорганизованно растущего каллуса возникают эмбриоиды и меристематические очаги, дающие начало эмбриогенным и органогенным структурам [3]. Кроме того, до сих пор не выяснены клеточные механизмы цитодифференцировки, обеспечивающие длительное поддержание эмбриогенного потенциала культивируемых клеток растений, в особенности зерновых злаков.

Нами в лаборатории клеточной биологии Института биологии и биотехнологии растений НЦБ РК проведен цикл работ по выяснению закономерностей цитодифференцировки в процессе индукции и длительного поддержания эмбриогенного потенциала в культуре тканей зерновых злаков – пшеницы и ячменя [4–6]. На этой основе были разработаны способы поддержания способности к регенерации растений при многократном субкультуривании *in vitro* тканей и клеток пшеницы и ячменя [7].

Создание удобных экспериментальных систем с четкой регуляцией соматического эмбриогенеза и длительным сохранением эмбриогенного потенциала является важным условием для изучения клеточных и молекулярных механизмов totipotентности. Нами получены такие системы – рыхлые эмбриогенные (РЭ) каллусы отечественных сортов ячменя и пшеницы, которые, благодаря одноклеточному происхождению эмбриоидов, могут служить идеальной моделью для изучения totipotентности [4, 5].

Изучали влияние различных фитогормонов (2,4-Д, БАП, АБК) и трофических факторов (гидролизат казеина, пролин) на процессы цитодифференцировки РЭ каллусов пшеницы и ячменя [8–10]. Для этого при помощи метода гистологического исследования проводили анализ структуры клеточных популяций РЭ каллусов, культивируемых на средах с различным составом. Подсчитывали соотношение разных типов клеток и морфогенных структур на 1 см² постоянного гистологического препарата, которые выражали в % к общему количеству клеток.

Выявлены следующие основные типы клеток и морфогенных структур: одиночные эмбриогенные (компетентные) клетки и 2-х, 3-х, 4-х клеточные проэмбрио; эмбриоиды на стадии глобулы; дифференцированные эмбриоиды; эмбриогенные клеточные комплексы (ЭКК); интенсивно окрашенные деградирующие клетки (ИОДК); пустые отмершие клетки [8, 9].

В результате, выявлено, что ключевым фактором питательной среды, регулирующим рост и эмбриогенный потенциал в РЭ каллусах пшеницы и ячменя, является 2,4-Д [8, 9]. Морфологическое изучение показало, что интенсивный рост и морфогенный потенциал РЭ каллусов поддерживаются при их многократном субкультивировании на среде с высокой концентрацией 2,4-Д (5,0–7,0 2,4-Д). Снижение концентрации 2,4-Д до 1,0 мг/л приводит к усилению процессов дифференциации эмбриоидов и к снижению интенсивности роста РЭ каллусов [8, 9].

Выявлено, что специфическими характеристиками РЭ каллусов, резко отличающими их от различных типов неэмбриогенных тканей (рыхлых, пленчатых, глобулярных) являются наличие ИОДК и накопление внеклеточных полисахаридов в межклеточном пространстве [4, 5].

Выявлены сходные закономерности влияния гормональных и трофических факторов на процессы цитодифференцировки в РЭ каллусах пшеницы и ячменя [8–10]. Так, высокие концентрации 2,4-Д (5,0–7,0 мг/л), низкие концентрации АБК (0,1 мг/л) и пролин усиливают процессы гибели ИОДК клеток и иницииации проэмбрио и подавляют процессы дифференциации эмбриоидов [8–10]. Низкие концентрации 2,4-Д (1,0 мг/л), цитокинин БАП (0,1–1,0 мг/л) и гидролизат казеина (1000 мг/л) обладают противоположным эффектом: снижают гибель ИОДК клеток и способствуют дальнейшей дифференциации эмбриоидов [8, 9]. Высокие концентрации АБК (1,0 мг/л) приводят к полной гибели клеток с образованием ИОДК и завершивших гибель «пустых» клеток [10].

Выявленная зависимость гибели клеток от гормональных и трофических факторов, сопряженность ее с процессом соматического эмбриогенеза, а также то, что увеличение количества деградирующих (ИОДК) клеток сопровождалось усилением [8, 9], а не снижением, роста каллусов привело нас к предположению, что мы имеем дело с программированной, т.е. физиологически полезной, гибеллю. В связи, с этим особое внимание нами было удалено изучению цитоморфологии интенсивно окрашенных деградирующих клеток.

Методами световой микроскопии, флуоресцентной и электронной микроскопии нами обнаружено, что ИОДК эмбриогенных каллусов пшеницы и ячменя обладают характерными чертами клеток с признаками программированной клеточной смерти (ПКС) [11, 12]. На основании этого мы пришли к выводу о том, что описанные для РЭ каллусов ИОДК клетки представляют собой не что иное, как клетки с признаками ПКС. В связи с этим выявленные нами ранее закономерности влияния гормональных и трофических факторов на гибель ИОДК клеток рассматриваются далее как закономерности, характерные для клеток с признаками ПКС.

Как указывалось выше, еще одной отличительной характеристикой эмбриогенных каллусов, отличающей их от неэмбриогенных тканей, является накопление полисахаридов во внеклеточном пространстве. Анализ гистологических препаратов РЭ каллусов показал, что при увеличении количества клеток с признаками ПКС

усиливалось и накопление внеклеточных полисахаридов. Процессы ПКС и накопление внеклеточных полисахаридов находились в сходной зависимости от концентрации 2,4-Д и других гормональных и трофических факторов – БАП, АБК, пролин и гидролизат казеина [8–10]. Наибольшее количество внеклеточных полисахаридов, как и клеток с признаками ПКС, выявлено на средах с высокой концентрацией 2,4-Д (5,0–7,0 мг/л) и АБК (1,0 мг/л) [8–10]. На гистологических препаратах наибольшую интенсивность окраски внеклеточных полисахаридов наблюдали вокруг клеток с признаками ПКС и клеток, завершивших гибель. На основании вышеизложенного нами было сделано заключение о том, что клетки с признаками ПКС участвуют в выделении полисахаридов в экстраклеточное пространство.

Электронно-микроскопическое изучение РЭ каллусов с высоким уровнем ПКС позволило подтвердить данные гистологических исследований об участии клеток с признаками ПКС в выделении экстрацеллюлярного матрикса [12].

Усиление процессов роста каллуса и инициации новых эмбриоидов на среде с интенсивным накоплением полисахаридов может свидетельствовать о рострегулирующей активности внеклеточных полисахаридов. Поэтому внеклеточные полисахариды были выделены из культуральной жидкости эмбриогенной суспензии и изучены на предмет их биологической активности. В результате была выявлена способность ингибировать рост растяжением колеоптилей пшеницы, вызываемый действием 2,4-Д, стимулировать энергию прорастания семян горчицы, рост и развитие проростков, повышать всхожесть и устойчивость семян к NaCl (неопублик. данные). На основании этого, нами сделано заключение о том, что вещества полисахаридной природы, секреируемые во внеклеточную среду клетками с признаками ПКС, обладают антиауксиновым, ростстимулирующим и антистрессовым эффектом.

В целом, в результате проведенного цитофизиологического исследования нами получены новые сведения об особенностях цитодифференцировки в длительно культивируемых эмбриогенных тканях. На основании этого нами создана гипотетическая схема, объясняющая механизмы длительного поддержания тотипотентности и регуляции соматического эмбриогенеза в каллусах пшеницы и ячменя [13, 14] (рис.).

Согласно этой схеме последовательность каскадных событий, запускаемых ауксином 2,4-Д, представляется следующей. Высокие концентрации 2,4-Д (5,0–7,0 мг/л) оказывают стрессовое действие на клетки каллусных тканей, блокируя процесс дифференциации 2-х, 3-х, 4-х клеточных проэмбрио и вызывая их дезинтеграцию. При этом эмбриоиды распадаются на клетки с признаками ПКС и одиночные эмбриогенно-компетентные клетки, вновь вступающие на путь эмбриондогенеза. Образующиеся эмбриоиды на стадии глобулы также могут диссоциировать по пути ПКС с образованием компетентных клеток. Так, в течение многократного субкультивирования эмбриогенных каллусов пшеницы и ячменя поддерживается их эмбриогенный потенциал.

Согласно предложенной схеме клетки с признаками ПКС в процессе гибели выделяют внеклеточные вещества полисахаридной природы, которые обладают антиауксиновым эффектом, т. е. ингибируют рост растяжением соседних клеток, вызываемый 2,4-Д. Вследствие этого клетки РЭ каллусов отличаются от типичных удлиненных каллусных клеток неэмбриогенных тканей и имеют сферическую форму.

Благодаря антистрессовому эффекту полисахаридов, гибель клеток соседних с апоптозными, происходящая под действием 2,4-Д, снижается. Вокруг некоторых из этих клеток откладывается каллозная оболочка, появление которой приводит к физиологической изоляции клеток и является маркерным признаком компетентности к эмбриондогенезу [15]. Так образуются одиночные эмбриогенно-компетентные клетки, в которых в условиях высокой концентрации 2,4-Д инициируются первые асимметричные деления с образованием 2-х, 3-х, 4-х клеточных проэмбрио (рис.).

В литературе имеются сведения о том, что ингибирование роста клеток растяжением может приводить к переключению программы их развития на путь митотических делений [16]. Все это приводит к тому, что наряду с усилением программированной гибели клеток при высоких концентрациях 2,4-Д усиливаются процессы роста и эмбриогенного потенциала каллусной ткани. Следовательно, в целом, программируемая гибель клеток оказывает положительное влияние на эмбриогенный каллус, как на систему, стимулируя его рост и поддерживая его эмбриогенный потенциал.

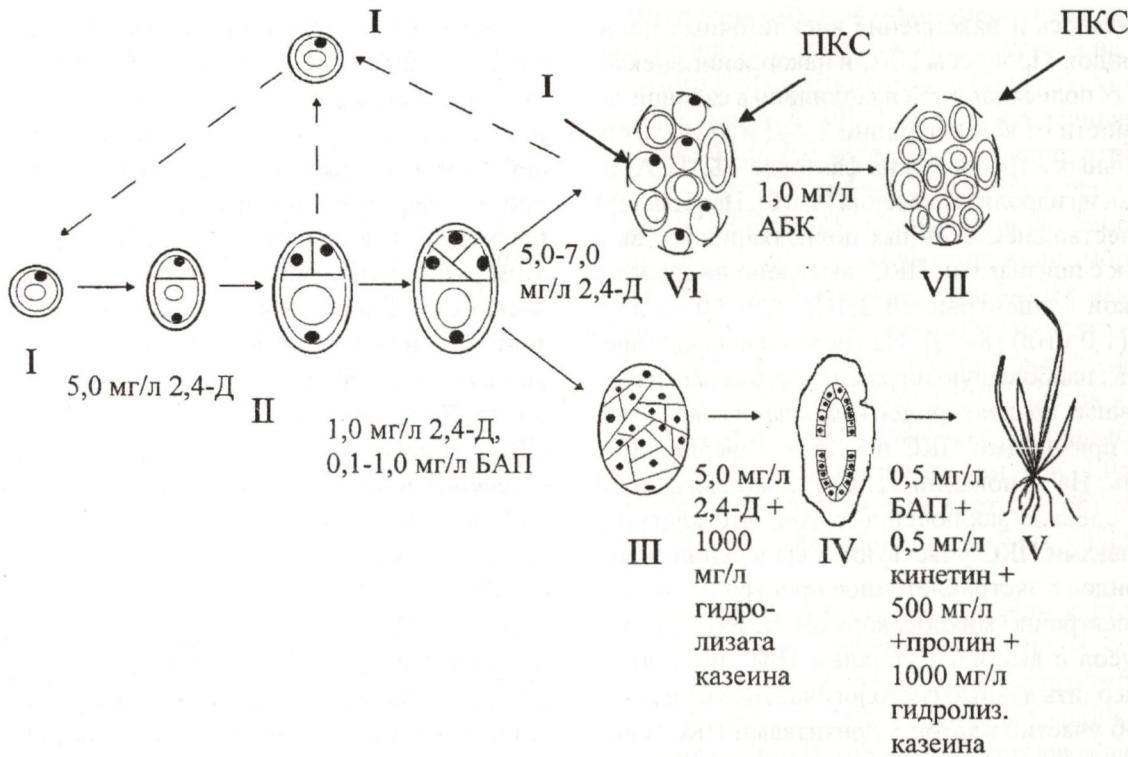


Схема длительного поддержанияtotипотенности и регуляции соматического эмбриогенеза в культуре тканей пшеницы и ячменя. Обозначения: I – одиночные компетентные к эмбриоидогенезу клетки, окруженные каллозной оболочкой; II – 2-х, 3-х, 4-х клеточные прозембрио, окруженные каллозной оболочкой; III – эмбриоид на стадии глобулы (каллозная оболочка отсутствует); IV – дифференцированный эмбриоид; V – регенерация растений; VI – частичная деградация клеток ранней глобулы (появление клеток с признаками ПКС); VII – полная деградация клеток глобулы (увеличение количества клеток с признаками ПКС)

Наши данные согласуются с литературными данными о влиянии высокой концентрации 2,4-Д на абортирование эмбриоидов двудольных растений [17]. Однако, данные о положительном влиянии апоптоза на поддержание пула компетентных клеток недифференцированных эмбриоидов получены нами впервые [18].

При снижении концентрации 2,4-Д до 1,0 мг/л стрессовое действие фитогормона снижается, гибели клеток не происходит. Соматические эмбриоиды имеют возможность к нормальному развитию и дифференциации вплоть до формирования целого растения при переносе на среду с цитокининами и трофическими факторами (рис.).

В схеме также отражена возможность регулирования процессов ПКС и соматического эмбриогенеза при помощи варьирования концентраций стрессового гормона АБК (рис.). При низких концентрации АБК (0,1 мг/л) наряду с процессами ПКС происходит стимулирование процесса инициации новых компетентных к эмбриогенезу клеток в эмбриогенных каллусах, в то время как при высоких концентрациях

(1,0 мг/л) – торможение процессов инициации и дифференциации эмбриоидов и тотальная гибель клеток по пути ПКС [10].

В целом, нами разработана концепция о цитофизиологических механизмах, лежащих в основе индукции, длительного поддержания totипотенности и регуляции соматического эмбриогенеза в культуре тканей пшеницы и ячменя. Предложена теоретическая схема, демонстрирующая цикличность процессов инициации и дезинтеграции соматических эмбриоидов в длительно totипотентных эмбриогенных каллусах. Показана важная роль стресса, вызванного высокой концентрацией 2,4-Д, в индукции и длительном поддержании totипотенности. Впервые выявлена роль програмированной гибели клеток и выделяемых ими полисахаридов в регуляции процессов морфогенеза и цитодифференцировки в длительно культивируемых эмбриогенных каллусах. Продемонстрировано, что РЭ каллусы пшеницы и ячменя представляют собой удобную модель для исследования клеточных механизмов totипотенности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moiseeva H.A. Молекулярные и клеточные механизмы морфогенеза в культуре клеток растений // Сб. науч. трудов. М., 1991. С. 166-185.
2. Emons A.M.C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects // Acta Bot Neerl. 1994. V. 43. P. 1-14.
3. Бутенко Р.Г. Тотипотентность культивируемых клеток в популяциях *in vitro* // Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. Учебное пособие. М.: МГУ «ФБК-Пресс», 1999. С. 48-71.
4. Денбаева М.Г., Бишимибаева Н.К. Метаморфоз каллусов ячменя и получение длительнокультивируемой рыхлой эмбриогенной ткани // Биотехнология. Теория и практика. 2000. № 1-2(3). С. 68-73.
5. Амирова А.К., Бишимибаева Н.К. Получение длительнокультивируемых рыхлых эмбриогенных каллусов пшеницы под действием 2,4-Д и КН2РО4 // Биотехнология, серия биологическая и медицинская. 2002. № 1. С. 60-65.
6. Бишимибаева Н.К., Денбаева М.Г., Амирова А.К., Рахимова Е.В. Особенности гистологического строения рыхлых эмбриогенных каллусов ячменя (*Hordeum vulgare*) // Изв. НАН РК. Сер: биол. и мед. 2001. №1-2. С. 7-14.
7. Rakimbayev I.R., Bishimbayeva N.K., Amirova A.K., Karabayev M.K. Obtaining and cytomorphological characterization of long-term embryogenic and regenerable wheat callus tissues // Izvestiya NAN RK. 2006. №3. P. 47-50.
8. Бишимибаева Н.К., Денбаева М.Г. Влияние 2,4-Д на структуру клеточных популяций рыхлого эмбриогенного каллуса ячменя // Материалы годичного собрания Всероссийского Общества Физиологов Растений. Вестник Башкирского университета, спец. выпуск, 2001. № 2(I). С. 107-110.
9. Амирова А.К., Бишимибаева Н.К. Влияние 2,4-Д на процесс соматического эмбриогенеза в длительно культивируемых каллусных тканях пшеницы // Биотехнология. Теория и практика. 2004. № 3-4. С. 42-47.
10. Бишимибаева Н.К., Амирова А.К., Денбаева М.Г. Влияние абсцисовой кислоты на состав клеточных популяций и морфогенез в культуре тканей пшеницы и ячменя // Поиск. Серия естественных и технических наук. 2007. №1. С. 136-138.
11. Бишимибаева Н.К. Обнаружение клеток с признаками программированной гибели в эмбриогенных каллусах пшеницы и ячменя // Известия НАН РК. 2006. № 1. С. 33-37.
12. Бишимибаева Н.К. Электронно-микроскопическое исследование программированной гибели клеток в культуре ткани зерновых злаков // Доклады НАН РК. 2007. №2. С. 75-79.
13. Бишимибаева Н.К., Денбаева М.Г. Влияние 2,4-Д на структуру клеточных популяций рыхлого эмбриогенного каллуса ячменя // Материалы годичного собрания Всероссийского общества физиологов растений. Вестник Башкирского университета. 2001. № 2. С. 107-110.
14. Бишимибаева Н.К., Амирова А.К., Денбаева М.Г., Рахимова Е.В., Рахимбаев И.Р. Культура тканей пшеницы и ячменя – модель для изучения процессов апоптоза и эмбриогенеза *in vitro* // Материалы I-Центрально-Азиатской конференции по пшенице. Алматы, 2003. С. 155.
15. Dubois T., Guedria M., Dubois J., Vasseur J. Direct Somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*: is callose an early marker // Ann. Bot. 1990. V. 65. P. 539-545.
16. Pennell R.I., Janniche L., Scofield G.N., Booij H., de Vries S.C., Roberts K. Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis // J. Cell. Biol. 1992. V. 119. P. 1371-1380.
17. Durzan D.J. Protein Ubiquination in diploid parthenogenesis and early embryos of Norway spruce // Int. J. Plant Sci. 1996. V. 157 (1). P. 17-26.
18. Bishimbayeva N.K. A role for apoptosis and polysaccharides secretion in the long-term somatic embryogenesis of cereals // Proceedings of International Symposium "Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources" 26-31 May 2002, Yalta, Ukraine. Bull. of State Nikit. Bot. Gard. 2002. № 86. P. 47-52.

Резюме

Дәнді дақылдар үлпа культурасындағы тотипотенттікі индукциясының, ұзак мерзім сақталуының және сомалық эмбриогенезді бақылауының цитофизиологиялық заңдылықтары жайлы концепциясы жасалынды. Ұзак мерзім эмбриогенді үлпаларындағы сомалық эмбриоидтардың инициациясы және дезинтеграциясы үрдістерінің цикл арқылы жүретін көрсететін теориялық сұлбасы ұсынылды. 2,4-Д-нің әсерімен пайда болған стресттің тотипотенттікін индукциясында және ұзак мерзім сақталуында маңызды ролі көрсетілді. Клеткалардың бағдарламалы өлүінің және олардың сыртқа бөлетін полисахаридтердің ұзак мерзім эмбриогенді каллус үлпаларындағы морфогенез және цитодифференцировка үрдістерін реттеу жолындағы маңызды ролі бірінші рет анықталды.

Summary

Concept of cytophysiological mechanism underlying the induction, long-term totipotency and regulation of somatic embryogenesis in tissue culture of cereals has been elaborated. Theoretical scheme demonstrated cyclity of the processes of somatic embryos initiation and disaggregation during the long-term maintenance of embryogenic potential has been proposed. Significant role of stress caused by high concentration of 2,4-D in the induction and long-term totipotency has been showed. The role of programmed cell death and extracellular polysaccharides produced by them in the regulation of cytodifferentiation and morphogenesis in the long-term embryogenic calli.

Институт биологии
и биотехнологии растений
НЦБ РК, МОН РК

Поступила 20.06.07г.