УДК 573.086.581.085

Н.К. БИШИМБАЕВА, Е.В. РАХИМОВА, А.К. АМИРОВА, И.Р. РАХИМБАЕВ*

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОК ЭМБРИОГЕННЫХ КАЛЛУСОВ ПШЕНИЦЫ

*(Алматинский филиал Национального центра биотехнологии МОН РК, *Институт ботаники и фитоинтродукции МОН РК)*

Проведено электронно-микроскопическое изучение эмбриогенных каллусов (ЭК) пшеницы. Выявлены слабовакуолизированные, сильновакуолизированные клетки и деградирующие клетки различной морфологии: с пристеночной локализацией цитоплазмы, с полным лизисом содержимого цитоплазмы, деградирующие по типу псевдоплазмолиза. Для деградации клеток ЭК пшеницы наиболее характерным является усиление вакуолизации клеток, формирование чашевидных инвагинаций пластид, разбухание митохондрий. Некоторым клеткам свойственны разрушение ядерной оболочки и выход ядерного материала в цитоплазму. Выявлено, что некоторые деградирующие клетки ЭК выделяют экстрацеллюлярные вещества.

Эмбриогенные каллусы являются идеальной моделью для изучения механизмов клеточной дифференцировки и морфогенеза в процессе длительного поддержания эмбриогенного потенциала растений. При исследовании строения рыхлых эмбриогенных (РЭ) каллусов зерновых злаков показано, что эмбриогенный потенциал в этом типе тканей поддерживается за счет эмбриогенных клеточных комплексов (ЭКК), состоящих из мелких изодиаметрических (эмбриогенных) и вакуолизированных клеток [1, 2]; охарактеризована ультраструктура обоих типов клеток. В мелких изодиаметрических клетках ядро занимает центральную позицию, цитоплазма плотная, вакуоли мелкие, органеллы равномерно распределены по всей цитоплазме, много митохондрий, пластид, диктиосом и микротелец [1, 2]. В вакуолизированных клетках, которые локализуются около эмбриогенных единиц, часто наблюдали скопления шероховатого эндоплазматического ретикулума со спиральными полисомами. Клетки, находящиеся на дальней дистанции от ЭКК, характеризовались большой вакуолью и митохондриями с электронно-плотным матриксом и хорошо развитыми кристами; плазмодесмы между вакуолизированными клетками отсутствовали. После отделения клеток друг от друга авторы отмечают наличие тонкой сети фибриллов в межклеточном пространстве [1].

Выявлено, что в процессе развития РЭ тканей эмбриогенные клетки пролиферируют и генерируют новые эмбриогенные клетки, соматические зародыши и вакуолизированные клетки [1]. В результате ЭКК диссоциируют на кластеры, состоящие из эмбриогенных и вакуолизированных клеток, разделенных значительным межклеточным пространством. Такой же процесс фрагментации ЭКК наблюдался в каллусных культурах *Ranunculus esceleratus* [3, 4] и в клеточных культурах *Daucus carota* [5, 6]. E. Thomas с соавт. [3], P.F. Fransz и J.H. Schell [1] предположили, что условиями, способствующими формированию рыхлой морфологии эмбриогенного каллуса, являются дифференциация и окончательная гибель вакуолизированных клеток.

Тем не менее вопросы цитоморфогенеза рыхлого эмбриогенного каллуса редко обсуждаются в литературе, и клеточные механизмы цитодифференцировки, обеспечивающие длительное поддержание эмбриогенного потенциала культивируемых клеток зерновых злаков, до сих пор не выяснены. Для восполнения этого пробела нами изучена структура клеточных популяций РЭ каллусов пшеницы и выявлено, что деградация клеток ЭКК не только имеет значение для формирования рыхлой морфологии РЭ каллусов, как было предположено предыдущими авторами [1, 3], но и тесно связана с наличием эмбриогенного потенциала [7]. Так, нами установлено, что количество интенсивно окрашенных деградирующих клеток прямо коррелирует с уровнем инициации соматических зародышей [7]. В целях выяснения особенностей ультраструктуры деградирующих клеток, обусловливающих их роль в процессах морфогенеза *in vitro*, нами предпринято электронно-микроскопическое исследование клеток эмбриогенных каллусов пшеницы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили длительно культивируемые рыхлые эмбриогенные (РЭ) каллусы пшеницы. Для электронно-микроскопического исследования были зафиксированы каллусы, культивируемые на среде Мурасиге и Скуга с 1,0 мг/л АБК. Продолжительность светового и темнового периодов составляла 16 и 8 ч соответственно, температура +26 °С, длительность культивирования 28 сут.

Каллусы фиксировали в 2%-ном глутаральдегиде (2,5 ч) с последующей дофиксацией в 1%-ном тетроксиде осмия (2 ч) на какодилатном буфере (рН 7,4). После отмывки от фиксаторов обезвоживали в этаноле и заключали в смесь Эпон-Аралдит. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Ultracut с помощью стеклянных ножей, контрастировали уранил-ацетатом и фотографировали при помощи трансмиссионного электронного микроскопа Jem-100B при 80 кВ. Для выявления внеклеточных веществ полисахаридной и гликопротеиновой природы материал для электронной микроскопии окрашивали соответственно алциановым синим и бромфеноловым синим по методике М. Бармичевой [8]. Размеры ядер и клеточных органелл определяли по электронно-микроскопическим снимкам медианных срезов этих органелл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в результате гистологического исследования рыхлых эмбриогенных каллусов пшеницы нами выявлены следующие основные типы клеток [7]: 1) одиночные компетентные к эмбриоидогенезу клетки диаметром 10–15 мкм; 2) 2-, 3-, 4-клеточные проэмбрио; 3) ранние глобулы; 4) интенсивно окрашенные деградирующие клетки (ИОДК) (20–40 мкм); 5) пустые отмершие клетки с утолщенной клеточной стенкой. Среди описанных нами типов клеток наибольший интерес представляют ИОДК, так как их появление коррелирует с приобретением специфической рыхлой морфологии и эмбриогенного потенциала в РЭ каллусах пшеницы [7]. Наибольший выход ИОДК (до 66,8%) нами выявлен в варианте среды с 1,0 мг/л АБК [9], поэтому для электронно-микроскопического исследования были использованы РЭ каллусы пшеницы, культивируемые на этой среде.

В результате электронно-микроскопического изучения РЭ каллусов пшеницы нами выявлены клетки различной морфологии: слабовакуолизированные клетки эмбриоидов, сильновакуолизированные и деградирующие клетки.

Слабовакуолизированные клетки эмбриоидов. Из всех обнаруженных нами типов клеток цитоплазма слабовакуолизированных клеток эмбриоидов выглядит наиболее электронно-плотной (рис. 1, а). Рибосомы встречаются в значительном количестве. Они могут наблюдаться как в свободном состоянии, так и ассоциированные с цистернами эндоплазматического ретикулума (ЭР) – на поверхности их наружных мембран. Кроме того, часть рибосом встречается в виде полисомных агрегатов. У клеточной стенки описываемых клеток отмечены пузырьки, на наружной поверхности мембраны которых находятся прикрепленные рибосомы (так называемые «окаймленные пузырьки).

Митохондрии вытянутые или удлиненные (в среднем 1,38х0,40 мкм), с длинными кристами, параллельными друг другу. Матрикс митохондрий несколько плотнее, чем цитозоль. В митохондриях хорошо заметны миторибосомы, интрамитохондриальные гранулы отмечаются крайне редко.

Эндоплазматический ретикулум развит очень хорошо. Длинные и средней длины цистерны ЭР окутывают ядро, образуя так называемый ретикулярный чехол (рис. 1, а). Кроме того, такие цистерны характерны для периферии клетки, где они располагаются преимущественно параллельно клеточной оболочке. Иногда цистерны контактируют с плазмалеммой и выглядят как ее инвагинации, и только при внимательном рассмотрении можно сделать вывод о контакте ЭР с плазмалеммой. Небольшие цистерны ЭР часто окружают вакуоли и митохондрии, контактируя с ними. В некоторых клетках трубочки и короткие цистерны ЭР формируют густую разветвленную сеть. Количество агранулярного ретикулума и соотношение агранулярных и гранулярных элементов сильно колеблется от клетки к клетке.

Из литературы известно, что шероховатый ЭР участвует в синтезе гликопротеинов, гладкий ЭР – в синтезе терпеноидов и транспорте веществ внутри клетки [10]. В слабовакуолизированных клетках эмбриоидов РЭ каллусов пшеницы эндоплазматический ретикулум представ-

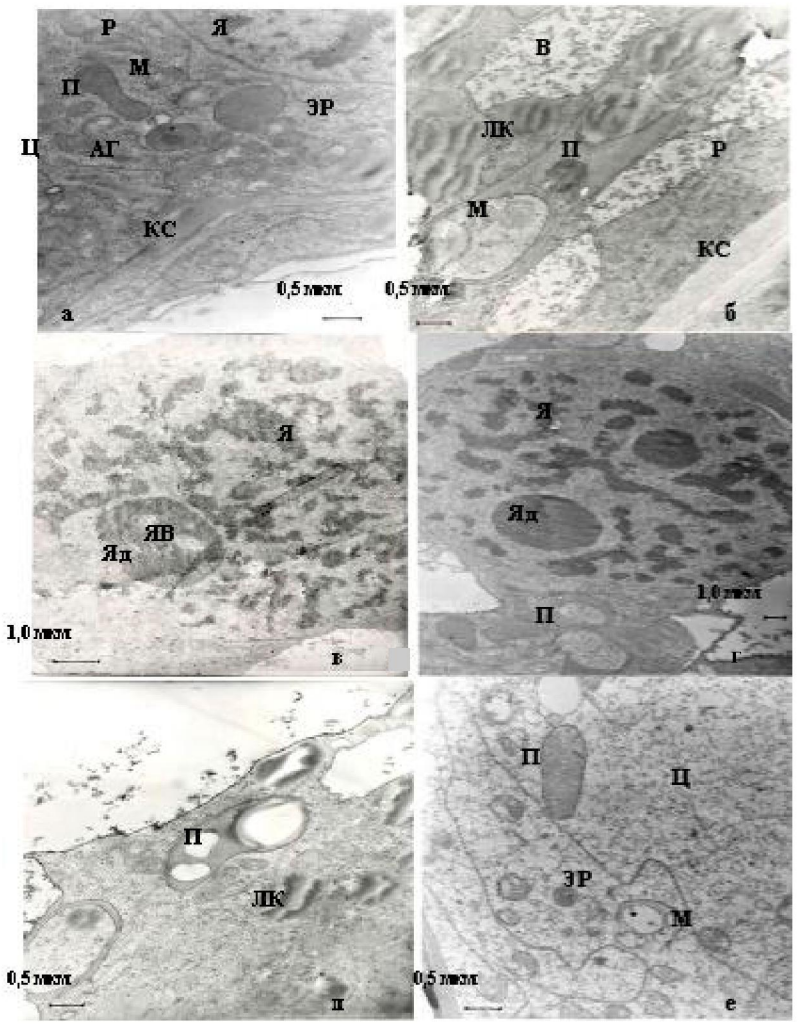

Рис. 1. Ультраструктура деградирующих клеток в РЭ каллусах пшеницы (1,0 мг/л АБК, Га-Os). КС – клеточная стенка; Ц – цитоплазма; Я – ядро; Р – рибосомы; ЭР – эндоплазматический ретикулум; М – митохондрии; Яд – ядрышко; ЯВ – ядрышковая вакуоль; П – пластиды; ЛК – липидная капля; В – вакуоль; АГ – аппарат Гольджи. а – г – слабовакуолизированные клетки: а – фрагмент слабовакуолизированной клетки; б – чашевидные инвагинации пластид, заполненные цитоплазмой с митохондриями, рибосомами и липидами; в – присутствие вакуоли в ядрышке; г – ядро слабовакуолизированной клетки; д – фрагмент сильновакуолизированной клетки; е – разреженность цитоплазмы деградирующих клеток, вызванная разрушением тонопласта вакуолей и лизисом содержимого цитоплазмы

лен шероховатым ретикулумом, что может свидетельствовать о синтезе гликопротеинов.

Пластиды в слабовакуолизированных клетках каллуса пшеницы характеризуются высокой полиморфностью своей формы. В большинстве описываемых клеток пластиды имеют удлиненную форму (в среднем 1,84х0,75 мкм). Плотность стромы пластид выше, чем таковая митохондрий или цитозоля. У некоторых пластид не выражена двумембранная оболочка, а имеется лишь одна из мембран. В некоторых пластидах отмечаются также проламеллярное тельце, зачатки ламеллярной системы или 1–2 мелкие пластоглобулы. В описываемых клетках наблюдаются пластиды гантелевидной и неправильной формы.

Для многих из них характерны чашевидные инвагинации (рис. 1, б), заполненные цитоплазмой с митохондриями, рибосомами и липидами. Подобные инвагинации отмечены у лейкопластов в клетках нектарника *Heracleum sp.* в период максимума цветения, в клетках нектарников *Cucumis sativus* на завершающем этапе старения и непосредственно перед отмиранием, в клетках секретирующей эфирномасличной железки *Ribes nigrum*, в клетках смоляного хода растущей хвои *Pinus sibirica* [11].

Согласно выводам некоторых авторов [12] описанные особенности строения характерны для пластид, встречающихся в секреторных клетках сосудистых растений и продуцирующих вторичные метаболиты – терпены и гликопротеины.

Вакуолярная система слабовакуолизированных клеток развита довольно слабо. Мелкие вакуоли часто содержат пузырьки или остатки непереваренной цитоплазмы, крупным свойствен хлопьевидный осадок. Аппарат Гольджи представлен достаточно хорошо и состоит из 3–12 цистерн, сложенных стопочкой и окруженных отчленяющимися от них пузырьками. Необходимо отметить, что среди этих пузырьков не наблюдаются «окаймленные».

Ядро описываемых клеток довольно крупное, в среднем 10,89х8,88 мкм в диаметре, центральную позицию занимает редко, что, вероятно, связано с прогрессирующей вакуолизацией клеток. Ядерная оболочка на срезах слегка волнистая, на наружной мембране отмечаются редкие рибосомы.

Ядрышко крупное, в среднем 3,63х2,55 мкм в диаметре, с ядрышковыми вакуолями (рис. 1, в). Присутствие вакуолей в ядрышке считается одним из признаков, характерных для секреторных клеток [13]. В некоторых ядрах наблюдаются два ядрышка, одно из которых значительно крупнее второго (2,64х2,17 и 1,85х1,53 мкм соответственно) (рис. 1, г). Конденсированный хроматин представлен длинными высококонтрастными тяжами-хромонемами. Некоторые хромонемы контактируют с ядерной оболочкой. Тип ядра хромонемный. Наличие конденсированного хроматина в виде хромонем – признак высокой функциональной активности клеток [14]. Из продуктов запаса характерны довольно многочисленные липидные капли.

Таким образом, присутствие довольно большого количества шероховатого ЭР свидетельствует об активном синтезе гликопротеинов в слабовакуолизированных клетках эмбриоидов. Наличие хорошо представленного аппарата Гольджи, пластид гантелевидной формы с чашевидной инвагинацией, присутствие вакуолей в ядрышке – все эти признаки, характерные для секреторных клеток, имеются в слабовакуолизированных клетках.

Сильновакуолизированные клетки. В этих клетках вакуоль занимает наибольшую часть объема (рис. 1, д). Клетка буквально заполнена несколькими крупными вакуолями с редким рассеянным осадком. В некоторых из них встречаются непереваренные липидные капли.

Цитоплазма оттеснена к клеточной стенке, и в ней наблюдаются мелкие вакуоли с пузырьками. Распределение рибосом в цитозоле идентично таковому в слабо вакуолизированных клетках.

Митохондрии удлиненные, с хорошо развитыми кристами. Средний размер 1,28х0,57 мкм. У некоторых органелл матрикс несколько просветлен, а кристы выглядят разбухшими. По нашей визуальной оценке количество диктиосом при прогрессирующей вакуолизации клеток не меняется, а количество липидных капель возрастает (рис. 1, д).

В сильновакуолизированных клетках отмечены пластиды с проламеллярными тельцами, со слабым развитием ламеллярной системы и с пластоглобулами, группирующимися вокруг проламмеллярного тельца. Размеры пластид несколько выше, в среднем 3,19х1,19 мкм. Многие имеют чашевидную форму. Кроме того, появляются пластиды с крахмальными зернами. Иногда крахмальное зерно занимает почти весь объем органеллы.

Содержание и тип ЭР не меняются по мере вакуолизации, однако цистерны, примыкающие к клеточной оболочке, выглядят значительно короче. По-видимому, происходит их фрагментация. Цистерны, окружающие ядро, сохраняют свои размеры. Структура ядра идентична описанной выше. Однако необходимо отметить, что нити конденсированного хроматина не примыкают к ядрышкам, а находятся на некотором расстоянии от них.

Деградирующие клетки. Деградация клеток в РЭ каллусов пшеницы может происходить несколькими путями. При деградации клеток с пристеночной локализацией цитоплазмы образуется крупная центральная вакуоль с редкими фибриллами, которая оттесняет цитоплазму к клеточной стенке, и цитоплазма при этом сильно уплотняется.

В других клетках цитоплазма становится разреженной (рис. 1, е), количество полисомных агрегатов резко уменьшается. По-видимому, в первую очередь разрушается тонопласт некоторых вакуолей и содержимое цитоплазмы равномерно распределяется по всей клетке.