

## ВЛИЯНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ЭКСПЛАНТА НА ИНДУКЦИЮ ЭМБРИОГЕННЫХ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ

Ю.А Костюкова, Н.И Румянцева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, Казань, Россия, *j.kostyukova@mail.ru, nat\_rumyantseva@mail*

**Аннотация.** Показано, что дифференцировка тканей семядолей незрелых зародышей гречихи татарской сопровождается синтезом запасных веществ: крахмала, липидов, белков. Белок – основное запасное вещество семядолей гречихи. Возрастающая дифференциация клеток незрелых зародышей сопровождалась увеличением временного периода индукции ПЭКК. Установлено, что прокамбиальные клетки семядолей являются инициальными клетками, из которых формируются ПЭКК, независимо от размера эксплантированного зародыша.

**Ключевые слова:** *гречиха татарская, незрелые зародыши, запасные соединения, инициальные клетки, эмбриогенный каллус*

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-1280-1284

Клеточные технологии, в основе которых лежит соматический эмбриогенез (СЭ), широко используются для быстрого размножения, криосохранения и генетической трансформации растений. Эмбриогенные культуры с высокой регенерационной активностью являются универсальным объектом для реализации таких технологий. В случае непрямого СЭ из эмбриогенных каллусных или суспензионных культур формирование эмбриоидов происходит из одной или нескольких клеток проэмбриональных клеточных комплексов (ПЭКК) или согласно другой терминологии – проэмбриогенных масс (ПЭМ). Клонирование ПЭКК осуществляется в ходе субкультивирования каллусов. Такой тип эмбриогенных культур характерен для многих однодольных и двудольных растений [Feher, 2014]. Наиболее оптимальными эксплантами для индукции эмбриогенных клеточных культур являются незрелые зародыши, поскольку они либо уже содержат эмбриогенно компетентные (тотипотентные) клетки, либо появление этих клеток может быть индуцировано действием гормонов или определенных стрессовых воздействий. В отличие от многих растений, для которых инициация эмбриогенных каллусов возможна только из зародышей строго определенного размера, для гречихи татарской размер зародыша может варьировать от 0.5 мм до 4 мм, с частотой индукции эмбриогенных каллусов близкой к 65% [Kostyukova, Rumyantseva, 2010]. При этом индукция эмбриогенных каллусов происходила только из семядолей незрелых зародышей. В задачу наших исследований входило 1. изучить дифференцировку клеток семядолей незрелых зародышей, находящихся на разных стадиях зрелости плода; 2. выявить клетки семядолей незрелых зародышей, деление которых приводит к образованию ПЭКК и последующему формированию эмбриогенного каллуса.

Для индукции эмбриогенного каллуса использовали зародыши разной длины от 1мм до 4 мм, выделенные на стадии водянистой, молочной, тестообразной и восковой спелости. Фиксацию материала, культивирование зародышей, гистологические исследования, проводили по методикам, описанным ранее [Румянцева и др., 1989; Kostyukova, Rumyantseva, 2010], электронно-микроскопические исследования – по методике, опубликованной в работе [Betekhtin et al., 2017].

Изучение гистологических срезов показало, что в семядолях зародышей 1-4 мм длины можно выделить следующие типы клеток: адаксиальный эпидермис, столбчатый

мезофилл, губчатый мезофилл, абаксиальный эпидермис и прокамбиальные тяжи (таблица). Клетки абаксиального эпидермиса имеют меньший размер и более густую цитоплазму по сравнению с клетками адаксиального эпидермиса. Прокамбиальные тяжи образованы мелкими, удлинёнными клетками и окружены паренхимными клетками обкладки.

Семядоли являются органами, в которых накапливаются определенные соединения, необходимые для прорастания зародыша и развития проростка. В семядолях зародышей гречихи татарской на разных стадиях их развития выявлены следующие запасные соединения: крахмал в виде крахмальных зерен (КЗ) в пластидах, липиды сферосом и запасные белки в вакуолях. Следует отметить, что пластиды с КЗ были немногочисленными. Увеличение размера и количества КЗ наблюдали только в губчатом мезофилле, в зародышах 3-4 мм длины. Распределение крахмала по клеткам зародышей разного размера имело свои особенности. КЗ у зародышей 1-2 мм были обнаружены только в клетках адаксиального эпидермиса, а также столбчатого и губчатого мезофилла. В зародышах 3 мм КЗ были выявлены и в клетках обкладки прокамбиальных тяжей, а в зародышах 4 мм - во всех тканях (в т.ч. и в абаксиальном эпидермисе), кроме прокамбия.

Накопление липидов в клетках семядолей было также невелико. Интересно, что у зародышей 1-2 мм липиды в виде сферосом выявлялись только в клетках абаксиального эпидермиса. У зародышей 3-4 мм - в клетках как абаксиального, так и адаксиального эпидермиса (таблица).

Накопление белка – наиболее значительный метаболический процесс, происходящий в ходе созревания семядолей гречихи. Если в зародышах 1-2 мм наблюдали только отдельные фибриллярные включения в вакуолях, то в клетках семядолей зародышей 3-4 мм вакуоли уже содержали либо крупные белковые глобулы, либо вакуоли были полностью заполнены белком. Белковые тела занимали большую часть клетки. В зародышах 1-2 мм обнаруживали белковые включения только в адаксиальном эпидермисе, а в зародышах 3-4 мм крупные белковые тела присутствовали во всех клетках, кроме прокамбиальных тяжей. Возрастание накопления белка в клетках семядолей коррелировало с изменением цвета незрелых зародышей гречихи от прозрачного к желтому. Например, белые зародыши 3 мм длины в запасящих вакуолях содержали лишь отдельные белковые глобулы, тогда как в желтых зародышах 3 мм вакуоли были полностью заполнены белком (таблица). Электронно-микроскопические исследования клеток семядолей показали, что белковые тела в клетках зародышей окружены мелкими вакуолями. Они плотно контактируют с одной стороны с расширенными цистернами ШЭПР, с другой – с мембраной тонопласта.

Известно, что вакуоли, заполненные запасными белками, могут быть окружены липидными тельцами – сферосомами [Wang et al., 2012]. Однако в нашем случае эти тельца не окрашивались Суданом III на полутонких срезах. Гистологические исследования показали, что наибольшее накопление запасных веществ наблюдается в клетках губчатого мезофилла незрелых зародышей, прилегающего к абаксиальному эпидермису, что можно рассматривать как признак более быстрой дифференциации этой ткани.

Формирование эмбрионного каллуса гречихи татарской происходит через первичное образование ПЭКК. Визуально образование ПЭКК на адаксиальной поверхности семядолей зародышей длиной 1 мм, 2 мм, 3 мм отмечали на 20-25 день культивирования. Эксплантированные зародыши каллусировали, не прорастая. Зародыши 4 мм на среде культивирования прорастали. Образование ПЭКК наблюдали уже на полностью раскрытых семядолях на адаксиальной поверхности на 30 день

культивирования. Возрастающая дифференциация клеток незрелых зародышей, синтез и накопление запасных соединений, сопровождались увеличением временного периода, необходимого для индукции эмбриогенных каллусных культур.

Таблица.

**Локализация запасных веществ в клетках незрелых зародышей гречихи татарской различной длины**

Размер и цвет зародыша	Стадия спелости плода	Ткани зародыша	Запасные соединения		
			Крахмальные зерна в пластидах	Белок в вакуолях	Липиды сферосом
1 мм, белый	Водянистая	Адаксиальный эпидермис	+	ФБ	-
		Абаксиальный эпидермис	-	-	++
		Мезофилл	+(ст), +(губ)	-	-
		<b>Прокамбиальные тяжи</b>	-	-	-
		Клетки обкладки ПрТ	-	-	-
2 мм, белый	Молочная	Адаксиальный эпидермис	+	ФБ	-
		<b>Субэпидермальные клетки адаксиального эпидермиса</b>	+	-	-
		Абаксиальный эпидермис	-	-	+
		Мезофилл	+(ст), +(губ)	-	-
		Прокамбиальные тяжи	-	-	-
		Клетки обкладки ПрТ	-	-	-
3 мм, белый	Молочная	Адаксиальный эпидермис	+	ФБ	-
		<b>Субэпидермальные клетки адаксиального эпидермиса</b>	+	-	-
		Абаксиальный эпидермис	-	-	+
		Мезофилл	+(ст), ++(губ)	-	-
		<b>Прокамбиальные тяжи</b>	-	-	-
		Клетки обкладки ПрТ	+	-	-
3 мм, желтый	Тестообразная	Адаксиальный эпидермис	+	+	+
		Абаксиальный эпидермис	+	+	+
		Мезофилл	+(ст), ++(губ)	+	-
		<b>Прокамбиальные тяжи</b>	-	-	-
		Клетки обкладки ПрТ	+	+	-
4 мм, желтый	Тестообразная, восковая	Адаксиальный эпидермис	+	+	+
		Абаксиальный эпидермис	+	++	+
		Мезофилл	+(ст), ++(губ)	++	-
		<b>Прокамбиальные тяжи</b>	-	-	-
		Клетки обкладки ПрТ	+	++	-

**Сокращения:** ПрТ – прокамбиальные тяжи, ст - столбчатый мезофилл, губ - губчатый мезофилл, ФБ - фибриллярный белок. Жирным шрифтом выделены клетки, деление которых приводит к формированию ПЭКК

Одним из факторов, определяющих компетентность клеток к внешним стимулам, является их уровень дифференцированности.

Гистологические исследования показали, что формирование ПЭКК в зародышах 1-2 мм происходит из клеток губчатого мезофилла, прилегающих к адаксиальному эпидермису (субэпидермальные клетки адаксиального эпидермиса) и прокамбиальных клеток, в более крупных зародышах – 3-4 мм длины образование ПЭКК идет

преимущественно из прокамбиальных клеток (в табл. выделено полужирным шрифтом). А.С. Кротовым [Кротов, 1975] было отмечено, что незрелые зародыши семян гречихи не обладают дифференцированными проводящими пучкам. Таким образом, в семядолях незрелых зародышей гречихи татарской ствольность прокамбиальных клеток поддерживается достаточно долго. Субэпидермальные клетки семядолей на водянистой - молочной стадии эндосперма (зародыши 1-2 мм длины) являются также наименее дифференцированными (таблица). Таким образом, инициальными клетками, из которых в семядолях незрелых зародышей образуются ПЭКК, являются субэпидермальные клетки адаксиальной поверхности семядолей зародышей 1-3 мм длины и прокамбиальные клетки зародышей 1-4 мм длины. При действии 2,4-Д компетентные клетки семядолей детерминируются на эмбриогенный путь развития. Первые деления формирования ПЭКК характеризуются неравным делением клеток, приводящим к образованию мелких пре-эмбриогенных комплексов, близким по строению к глобулярным зародышам. Дальнейший рост и дифференциация этих комплексов приводит к формированию ПЭКК, которые многими исследователями рассматриваются как аномальные соматические зародыши, образующиеся при нарушении транспорта ауксина искусственным гормоном 2,4-Д [Souter, Lindsey, 2000]. Циклическое воспроизведение ПЭКК в культуре *in vitro*, по-видимому, является своеобразной формой адвентивного эмбриоидогенеза.

Проведенные исследования позволяют заключить, что семядоли незрелых зародышей гречихи татарской помимо «идеального» экспланта для получения эмбриогенных культур, могут быть удобным объектом для изучения молекулярных процессов, лежащих в основе редетерминации прокамбиальных клеток в эмбриогенные, тотипотентные клетки.

#### Литература

- Кротов А.С., Лысов В.Н., Соколова И.И. Культурная флора СССР. – 1975. – 363 с.  
Румянцева Н.И., Сергеева Н.В., Хакимова Л.Е., Сальников В.В., Гумерова Е.А., Лозовая В.В. Органогенез и соматический эмбриогенез в культуре двух видов гречихи // Физиология растений. – 1989. – Т. 36. – С. 187–194.  
Betekhtin A., Rojek M., Jaskowiak J., Milewska-Hendel A., Kwasniewska J., Kostyukova Y., Kurczynska E., Rummyantseva N., Hasterok R. Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn // PLoS One. – 2017. – V. 12, No. 3. – doi: 10.1371/journal.pone.0173537.  
Feher A. Somatic embryogenesis — stress-induced remodeling of plant cell fate // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms. – 2015. – V. 1849, I. 4. – P. 385–402.  
Kostyukova Y., Rummyantseva N. Histological study of embryogenic callus induction in immature embryos of tartary buckwheat *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn // Proc. of the 11th International Symposium of Buckwheat. – 2010, July, 19-23. – P. 67–175.  
Souter M., Lindsey K. Polarity and signaling in plant embryogenesis // J Exp Bot. – 2000. – V. 51, No. 347. – P. 971–983.  
Wang X-D., Song Y., Sheahan M.B., Garg M., Rose R. From embryo sac to oil and protein bodies: embryo development in the model legume *Medicago truncatula* // New Phytology. – 2012. – V. 193. – P. 327–338.

## THE INFLUENCE OF EXPLANT CELL DIFFERENTIATION ON INDUCTION OF EMBRYOGENIC CALLI OF TARTARY BUCKWHEAT

Yu.A. Kostyukova, N.I. Rumyantseva

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia, *j.kostyukova@mail.ru, nat\_rumyantseva@mail*

**Abstract.** We showed that the differentiation of cotyledon tissues of Tartary buckwheat immature embryos was accompanied by accumulation of starch, lipids and proteins. Proteins were the main cotyledon reserve substances. The differentiation of cotyledon cells was accompanied by an increase in the time period of proembryonal cell complexes (PECC) induction. It was established that procambial cells of cotyledons are the initial cells from which PECC are formed, regardless of the size of embryo.

**Keywords:** *Tartary buckwheat, immature embryos, reserve substances, initial cells, embryogenic callus*