

КУЛЬТУРА КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

Каллюс (каллус; раневая меристема) – новообразование соединительной ткани на раневой поверхности растения в виде опробковевающей ткани, возникает в результате деления пограничных с раной клеток.

Элементы каллюса мало дифференцированы, однако вблизи его поверхности наблюдается рост, обусловленный активностью меристематических клеток. Впоследствии в каллюсе возможна дифференцировка его элементов и образование флоэмы, ксилемы и других тканей. Наружные клетки каллюса опробковевают. Для культивирования на выбранном органе делают надрез, на всей поверхности которого развивается ткань, состоящая из неорганизованно растущих клеток. Эта образовавшаяся ткань и культивируется в заданных условиях. В зависимости от вида растения и поставленной цели предварительно необходимо установить состав питательных сред и концентрации фитогормонов, требуемых для оптимального роста. Каллюсы могут выглядеть очень различно. Они бывают рыхлыми (объясняется присутствие эмбрионов (соматических зародышей) – зачатков нового организма на различных стадиях развития) или плотными. Окраска каллюса позволяет судить об образовании вторичных веществ. Если каллюс содержать в полной темноте, он беловато-желтый. На свету он образует хлорофилл и становится зеленым. Красный свет указывает на наличие антоциана и бетациана. Чтобы ослабить или устранить эти эффекты, в питательную среду добавляют поливинилпирролидон, глутатион или аскорбиновую кислоту. Коричневые клетки образуются перед отмиранием, поэтому такую ткань необходимо поместить в свежую среду. При длительном культивировании каллюсы могут терять свой морфогенетический потенциал. После нескольких смен питательных сред и при добавлении ростовых гормонов каллюс дифференцирует и регенерирует, образует осевые побеги, корни и, наконец, все растение целиком, способное к размножению и выращиванию в грунте. Однако большей частью каллюсы используются в качестве исходного материала для клеточного или суспензионного культивирования.

Суспензионная культура. Для суспензионных культур исходным материалом могут быть как изолированные целые клетки выбранного органа растения, так и измельченный каллюс. Образовавшиеся клетки помещают в жидкую питательную среду и культивируют при постоянном перемешивании. Рост суспензионной культуры происходит во многих случаях существенно быстрее, чем каллюсной культуры, поскольку скопления клеток поглощают питательные вещества значительно большей общей поверхностью, а у каллюса это происходит лишь в той его части, которая лежит на субстрате. При этом происходит деление клеток, новые клетки не отделяются, и их скопление увеличивается. С помощью особых

приемов суспензионную культуру можно перенести на твердую питательную среду. Здесь из клеток или комплексов клеток может образоваться способный к жизни каллюс. В суспензии могут возникнуть также и зародыши, которые после их переноса на агар образуют новое растение.

Сложность структурной организации - характерный признак каллусных культур. Каллусы не являются однородной совокупностью определенного типа клеток. Обычно (Бутенко, 1975) в основной ткани, состоящей из вакуолизированных паренхимных клеток, распределены отдельные лигнифицированные элементы (трахеиды) или четко ограниченные меристематические очаги.

Значительный интерес для исследователей представляет изучение ультраструктурной организации, паренхимных (паренхима – предшественница всех других тканей) и меристематических клеток, образующих каллусную ткань. Особое внимание уделено эмбриоидным (эмбриогенным) клеткам, дающим начало соматическим зародышам (эмбриоидам). По мнению Н.Н. Кругловой (1995) эмбриогенная клетка должна обладать особенностями, максимально приближающими ее к зиготе: меристематичностью и тотипотентностью. Тотипотентность (Батыгина, 1994) - свойство клетки иметь все присущие данной особи морфогенетические возможности, которые реализуются различными путями морфогенеза. Конечный результат проявления этого свойства, способы и формы его реализации могут быть различными, так как они обусловлены степенью тотипотентности клетки. В свою очередь, степень тотипотентности клетки определяется совокупностью факторов, главным образом, системой (ткань, орган, организм), из которой была взята клетка. Существует мнение (Yeung, 1995), что эмбриогенные клетки, как и меристематические, имеют небольшие размеры, плотную цитоплазму, однако в отличие от меристематических клеток, обычно содержат какие-либо запасные вещества (крахмал, липиды). Гальперин и Дженсен (Halperin, Jensen, 1967; цит. по Yeung, 1995) изучая особенности организации эмбриогенных клеточных комплексов моркови, пришли к выводу, что эмбриогенные клетки располагаются по периферии комплекса. Эти клетки обладали тонкой клеточной стенкой. Плотная цитоплазма содержала большое количество свободных рибосом и незначительное - крахмальных зерен. Ядро большое с диффузным хроматином. Между эмбриогенными клетками и вакуолизированными, нижележащими клетками комплекса, присутствовали многочисленные плазмодесмы.

Каллусные клетки паренхимного типа имеют иную ультраструктурную организацию. Например, паренхимные каллусные клетки гороха обладают следующими особенностями: тесное прилегание плазмалеммы к клеточной стенке и отсутствие плазмодесм; преобладание агранулярного ЭПР в виде коротких цистерн и почти полное отсутствие гранулярного ЭПР, в цитоплазме большое количество свободных рибосом и полисом; отсутствие пластоглобул в

пластидах, содержащих крахмал (в первой половине пассажа); развитие "кольцевых" крист в митохондриях (Полыгалова и др., 1994).

В процессе культивирования каллуса ультраструктура составляющих его клеток изменяется. Установлено, что перестройка цитоплазматических органелл паренхимных клеток в течение пассажа одинакова в культурах разных растений (Кордюм и др., 1980; Полыгалова и др., 1994). Известно, что каллусы в процессе роста проходят ряд фаз развития: 1) латентную или лаг - фазу; 2) экспоненциальную; 3) стационарную; 4) фазу гибели или деградации.

В период лаг-фазы пассажа (с 1-е по 3-и сутки) изменения ультраструктурной организации клеток свидетельствуют об активной подготовке клетки к пролиферации. Об этом говорят изменения поверхности ядра за счет глубоких инвагинаций, обилие рибосом, сгруппированных в полисомы, присутствие многочисленных цистерн агранулярного ЭПР и появление липидных капель, а также усиленное деление пластид. В фазе экспоненциального роста (10-е сутки) наиболее функционально активны пластиды и митохондрии. В пластидах начинает развиваться тилакоидная система. Митохондрии становятся конденсированными, в них появляется большое количество крист. В фазе стационарного роста значительно увеличивается вакуолизация клеток, ЭПР становится агранулярным, свободные цитоплазматические рибосомы обнаруживаются редко (Кордюм, 1980). В каллусных клетках гороха на стационарной фазе наблюдали появление осмиофильных капель, миелоноподобных тел как в цитоплазме, так и в вакуоли, накопление крахмала в пластидах и редукцию тилакоидной системы (Полыгалова и др., 1994). Напротив, в каллусных клетках моркови в фазе растяжения наблюдали исчезновение крахмала. Было обнаружено, что стареющие клетки этой культуры обычно лишены крахмала, тогда как в делящихся и растягивающихся клетках пластиды содержат крахмал. По мнению Е.Л. Кордюм (1980), исчезновение крахмала свидетельствует о том, что синтез полисахаридов (целлюлозы) в первую очередь связан с гидролизом крахмала пластид. Следовательно, в клетках всегда присутствуют некоторые структурно-функциональные особенности, которые могут возникать в зависимости от типа культуры, времени пересадки, условий культивирования.

В процессе культивирования каллусных культур изменяется не только ультраструктурная организация клеток, но и их морфология. Например, для каллусных культур ячменя выявили 8 основных морфологических типов клеток:

- 1) гигантские, удлинённые, сильно вакуолизированные клетки, без явно выраженного ядра (200-400 мкм) ;
- 2) молодые округлые паренхимные клетки, без четко выраженного ядра (40-60 мкм);
- 3) меристематические клетки (15-50 мкм);
- 4) большие клетки с зернистой цитоплазмой и большими ядрами (50-100 мкм)

- 5) мелкие меристематические клетки с сегментированным типом деления (15-20 мкм);
- 6) трахеиды;
- 7) паренхимные эпидермальные клетки;
- 8) клетки-трихомы.

Молодые паренхимные клетки ячменя могли трансформироваться во все типы клеток в зависимости от трофических и гормональных условий. По морфологическим признакам выделено несколько типов клеток каллусных тканей *Vicia faba* (Фролова, 1981). Наблюдаемое разнообразие исследователь рассматривала как результат перехода каллусных клеток от одного дифференцированного состояния (клетки меристематического типа с основной функцией деления) к другому типу дифференциации (клетки паренхимного типа, запасющие питательные вещества).

Таким образом, каллусные культуры растений имеют различные морфологические особенности, которые определяются их гистологической и цитологической организацией. Морфология каллусных культур коррелирует со способностью каллуса к морфогенезу. Так как спектр морфологического разнообразия у различных видов растений может быть достаточно широк, существует необходимость специального исследования типов каллусных культур, а возможно, и пересмотра морфологических критериев регенерационной способности.

Дифференциация клеток.

К сожалению, до настоящего времени отсутствует унифицированная терминология, применяемая в исследованиях процесса морфогенеза *in vivo* и *in vitro*. До сих пор существует разночтение в понимании процессов дифференциации и дифференцировки. Например, в работе "Терминология роста и развития высших растений" под редакцией М. Х. Чайлахяна (1982) дифференциация рассматривается как возникновение функциональных и структурных различий клеток и тканей в процессе развития растения, тогда как дифференцировка определяется как состояние специализации клеток. В Биологическом энциклопедическом словаре (1989) эти термины имеют иное значение: дифференциация - процесс расчленения системы первоначально единой и состоящей из одинаковых элементов на более или менее обособленные разнокачественные части; дифференцировка - возникновение различий между однородными клетками и тканями, изменение их в ходе развития особи, приводящее к формированию специализированных клеток, тканей, органов. Т. Б. Батыгина ("Хлебное зерно", с. 65, 1987 г.) предложила применение единого термина "дифференциация". По мнению исследователя: "Термин "дифференциация" и "дифференцировка" являются, по-видимому, вариантами перевода единственного латинского слова *differentia*, что служит еще одним доводом для применения только термина "дифференциация", то есть более

правильного перевода". В нашей работе мы придерживаемся мнения последнего автора, считая применение единого термина более целесообразным. Дифференциацию мы рассматриваем как процесс возникновения различий между однородными клетками и тканями, приводящий к их специализации (дифференцировке).

Согласно И.П. Ермакову и Н.П. Матвеевой. (1994), дифференциация в биологии рассматривается как последовательность сложных явлений: появление у клетки компетенции, становление детерминации и, наконец, активации. Детерминация (Чайлахян и др., 1982) означает приобретение развивающейся живой системой состояния готовности к реализации вполне определенных наследственных потенций и выбора определенного пути развития из нескольких потенциально возможных. Вступление клетки на определенный путь развития сопровождается одновременным ограничением возможности развития в других направлениях. Различают автономную детерминацию, происходящую за счет внутренних импульсов самой развивающейся системы, и индуцированную детерминацию, происходящую в результате индукции. Индукция (Чайлахян и др., 1982) - это влияние внешних факторов, приводящее к детерминации развития. Индуцированное развитие, как правило, лишь временно зависит от вызвавшего его фактора; после окончания периода детерминации для дальнейшего развития по выбранному пути нет необходимости в присутствии первоначального индуктора. При этом внешний индуктор может вызвать детерминацию лишь у той системы, которая обладает соответствующей компетенцией. Компетенция - способность клетки воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него (Чайлахян и др., 1982). Проявление внешних признаков, характерных для детерминированного пути развития – активация.

Вильямс и Махешваран (Williams, Maheswaran, 1986) считают, что клетки могут приобрести компетентность под влиянием низких или высоких температур, тяжелых металлов, гамма-радиации, в результате обработки этанолом. Все эти факторы действуют как стрессы. Число клеток, способных изменить свою программу развития под влиянием внешних условий, невелико по сравнению с общим числом клеток в популяции (0,1 - 3%) (Soalli, Chlyh, 1985). Это обстоятельство указывает на то, что для перехода к иному пути развития недостаточно присутствие сигнала (индуктора), а необходимо действие индуктора с готовностью клетки к ответу на него (компетентность), а возможно, и действие других факторов. На первом этапе клетки, способные воспринимать сигнал индуктора, детерминируются к выполнению программы развития. В этот период клетки не участвуют в пролиферации, в них накапливаются субстраты и энергия для последующих событий. Затем, детерминированные клетки быстро делятся, образуя клон эпигенетически тождественных им клеток меристематического очага.

Одним из факторов, определяющих перепрограммирование и детерминацию клеток,

является поляризация компетентных клеток.

Факторы, определяющие полярность клеток

В индукции дифференциации первым шагом является поляризация объекта, которая может быть инициирована как с помощью физических, так и химических воздействий. Отличительной особенностью поляризующих воздействий является их векторный направленный характер. При этом принципиальное значение имеют и тип поляризующего воздействия, и его количественный характер.

Полярность можно определить как существование функционально значимых ассиметричных структур, образующихся в ответ на воздействие пространственно ориентированных стимулов (внешних или внутренних) (Медведев, 1998).

В ходе дифференциации соматических зародышей моркови, по мере перехода к сердцевидной и торпедовидной стадиям, обнаруживаются специфические белки. Одни локализованы в базальной части зародыша, другие - в апикальной (Schiavone, Racusen, 1989). Эти полярно локализованные белки, вероятно, могут задавать апикально-базальный градиент, поскольку при экспериментальном разделении эмбриоида новые корни формируются только в апикальной части зародыша.

У растений при формировании физиологической оси полярности наиболее существенное значение имеет взаимодействие по крайней мере трех факторов - процесса активного базипетального транспорта фитогормона ауксина (ИУК), градиентов биоэлектрических потенциалов (БЭП), а также градиентов ионов кальция, создающихся за счет полярных потоков этого катиона (Медведев и др., 1989).

Полярный транспорт ИУК

Эндогенные градиенты биоэлектрических потенциалов, по-видимому, в первую очередь оказывают влияние на распределение в растительных тканях фитогормонов (Медведев и др., 1980). Обеспеченность тканей фитогормонами имеет определяющее значение в процессах эмбриогенеза и эмбриоидогенеза. Например, при переходе каллуса к образованию эмбриоидов в нем возрастает количество эндогенных ИУК и АБК. В тканях незембриогенного каллуса в два раза больше, чем в эмбриогенном, накапливается цитокинины (Rajasekaran et al., 1987).

Роль экзогенного ауксина при соматическом эмбриогенезе, как оказалось, зависит от природы используемого экспланта. Например, для приобретения морфогенного потенциала. экспланты из лепестков, гипокотилей, единичные клетки, изолированные из суспензионной культуры, требуют различной экспозиции в ауксине (1,2 и 7 дней соответственно) (Zimmerman, 1993).

Было установлено, что внешнее электрическое поле способно оказывать влияние на

процессы активного транспорта С-ИУК и эндогенного ауксина (Medvedev, Markova, 1990). Причем в обоих случаях пропускание через растительную ткань электрического тока стимулирует транспорт ИУК в направлении отрицательно заряженного электрода, что не может быть объяснено в рамках тропизмов Холодного-Вента. Было высказано предположение о том, что и нативные, и приложенные извне электрические градиенты способны влиять на работу мембранных белков - переносчиков ауксина, изменяя их активность или локализацию в плазматической мембране, что, в итоге, и является истинной причиной изменения параметров активного базипетального транспорта ИУК (Медведев и др., 1986).

Градиенты биоэлектрических потенциалов

В процессе дифференциации зиготы и зародыша, а также в ходе ризогенеза возникают "эмбриональные" электрические токи, формируется специфический рисунок силовых линий, указывающий на точки с максимальной скоростью роста и зоны закладки будущих органов растений (цит. по Батыгиной. 1998).

Важным условием для понимания процессов поляризации клеток явилось открытие трансцеллюлярных ионных потоков (Лайё, 1980). У растительных клеток, характеризующихся полярным типом роста (зигота, прорастающая пыльца, корневые волоски, ризоиды и т.п.), регистрируются электрические токи (движение положительных зарядов), входящие в растущие и выходящие из закончивших рост участков клетки. Эти электрические токи, как правило, предшествуют морфологическим изменениям и связаны с такими носителями зарядов, как ионы Ca^{2+} , K^{+} , H^{+} .

Вокруг дифференцирующихся эмбрионов дикой моркови уже на глобулярной стадии регистрируется электрическое поле со специфическим рисунком силовых линий, который сохраняется на протяжении всего его развития (Brawley et al., 1984). Наибольшая плотность входящего тока регистрировалась в зонах формирующихся семядолей и в области закладки апикальной меристемы корня. При этом плотность электрического тока в вышеуказанных зонах на каждой новой стадии развития зародыша возрастала. В аналогичных исследованиях эмбрионидов, полученных в каллусных культурах табака и суспензионной культуре клеток моркови, помимо электрического градиента между формирующимися семядолями и корнем было также обнаружено появление градиента pH вдоль оси эмбриоида (цит. по Батыгиной, 1997).

Полярные потоки ионов кальция

В растительных тканях помимо полярного транспорта ИУК обнаружены направленные потоки ионов Ca^{2+} . Активные полярные потоки ионов кальция, вероятно, необходимы для формирования градиентов этого катиона в первую очередь в клетках и тканях с поляризованным типом роста, а также в тканях с несформировавшейся сосудистой

системой.

Оверворд и Гримс (Overvorde, Grimes, 1994) изучали роль ионов кальция и кальмодулина в соматическом эмбриогенезе моркови. Было установлено, что для формирования эмбриоидов необходимо присутствие кальция в среде в концентрации не ниже 200 мкМ. С помощью флюоресцентных зондов обнаружено, что на сердечковидной и торпедовидной стадиях уровень Са-кальмодулинового комплекса повышается в зонах формирующихся семядолей и корня. Обработка блокаторами Са-каналов веропамиллом и нифедипином, а также Са-ионофором A23187 угнетало развитие эмбриоидов. Следовательно, для нормального эмбриогенеза необходим определенный градиент ионов кальция на плазматической мембране развивающихся клеток.

Итак:

Инициация морфогенеза у растений, по-видимому, начинается с , формирования полярных потоков ионов кальция, которые создают электрическую ось полярности и влияют на распределение в тканях фитогормонов. Вероятно, именно кальций несет первичную информацию о возникающем векторе поляризации. Вслед за появлением градиента ионов кальция может происходить становление вторичных градиентов: секреторных, мембранных, метаболических и др. И наконец, чувствительные к изменению активности ионов кальция элементы цитоскелета завершают структурную поляризацию клетки (Медведев, 1998).

Биохимические особенности морфогенных и неморфогенных каллусных культур

Во многих случаях эмбриогенные культуры идентифицируют по морфологическим критериям, однако, подобный визуальный отбор не возможен для раннего их выявления. Биохимическая диагностика морфогенного потенциала представляет значительную помощь в селекции каллусных культур, обладающих способностью к регенерации растений. Значительный интерес представляют результаты по изучению биохимических маркеров культур, обладающих эмбриогенным потенциалом.

Исследования Карлберга (Carlberg, 1987) выявили, что неэмбриогенные клеточные линии моркови характеризовались повышенной в 5-10 раз активностью протеаз и пониженной в 10-120 раз специфической активностью пероксидаз.

При изучении водорастворимых белков в морфогенных и неморфогенных каллусных культурах различных сортов яровой пшеницы (Озолина и др., 1995), было показано, что количество белков в морфогенном каллусе в 3-5 раз выше, чем в неморфогенном. В результате эксперимента выделен ряд изоферментов глютаматдегидрогеназы, пероксидазы, нитратредуктазы, которые могут являться маркерами морфогенеза.

Типы морфогенеза

Морфогенез *in vitro* и *in vivo* может осуществляться 4-мя самостоятельными путями (Батыгина, 1987):

- а) эмбриогенез - процесс развития зародыша, образующегося путем объединения гамет.
- б) соматический эмбриогенез или эмбриоидогенез
- в) органогенез (геммогенез - развитие вегетативных и цветочных почек; ризогенез - развитие корней)
- г) гистогенез - процесс формирования тканей.

Двумя путями морфогенеза, приводящими к воспроизведению растений из каллусных культур, являются органогенез и эмбриоидогенез.

Соматический эмбриогенез

(эмбриоидогенез)

Соматический эмбриогенез - процесс дифференциации диплоидных и гаплоидных клеток в целое растение без слияния гамет (Yeung et al., 1995). Структурной единицей соматического эмбриогенеза является эмбриоид (Батыгина, 1997). Возникновение соматических зародышей (эмбриоидов) в естественных условиях описано для многих видов растений. Эмбриоиды *in vivo* могут возникать на разных структурах и органах: из зиготы и зародыша (монозиготическая эмбриоидогения, например, у *Peonia*, *Triticum*, *Zea* и представителей *Orchidaceae*), листа (флоральная эмбриоидогения, например, у *Bryophyllum*, *Hammarbia paludosa*) и корня (ризогенная эмбриоидогения) (Батыгина, 1997).

Основными факторами, индуцирующими соматический эмбриогенез *in vitro*, являются экзогенные регуляторы роста. Под влиянием соответствующих индуктивных условий клетка, выполняющая роль зиготы при соматическом эмбриогенезе, изолируется от окружающих ее клеток толстой клеточной стенкой. (Бутенко, 1984; Williams Maheswaran, 1985; Yeung, 1995). Однако обособление клетки не всегда происходит с самых ранних этапов эмбриоидогенеза. По данным Томаса (Thomas et al., 1972, цит. по Yeung, 1995) полная изоляция эмбриоида лютика в каллусных культурах происходит лишь на многоклеточной стадии развития. По предположению Вильямс и Махешваран (Williams Maheswaran, 1986) полное изолирование необходимо лишь в том случае, когда соседние клетки не являются эмбриогенно детерминированными. Следовательно, степень изоляции зависит от степени детерминации как исходных, так и окружающих клеток. По мнению Стюарда (Steward, 1958; цит. по Кругловой, Горбуновой, 1997), физиологическая изоляция служит сигналом к выполнению программы развития по типу соматического эмбриогенеза.

Клетка эмбрионального типа характеризуется усиленной метаболической

активностью. [Это выражается в увеличении количества органелл, изменении морфологии ядра и вакуолярной системы. Усиленная метаболическая активность "превращает" эмбриогенно детерминированные клетки в аттрагирующий центр, куда транспортируются питательные вещества. Окружающие их каллусные клетки часто разрушаются, и развивающиеся соматические зародыши легко выпадают из массы каллусных клеток.

Общеприняты два пути возникновения соматических зародышей из культур тканей и органов, предложенные Шарпом (Sharp, 1982; цит. по Williams Maheswaran, 1985) - это прямой и непрямой пути. При прямом эмбриоидогенезе клетки экспланта компоненты (проэмбриогенно детерминированы) к развитию по пути соматического эмбриогенеза, необходимы лишь подходящие условия для реализации их потенциала. Соматические зародыши формируются из тканей экспланта без стадии образования каллусал Непрямой эмбриоидогенез состоит из нескольких этапов: 1) дедифференциации специализированных клеток; 2) приобретения ими эмбриогенного состояния для инициации развития по пути соматического эмбриогенеза. В этом случае, внутренняя клеточная программа должна быть "установлена вновь" путем дифференциации неэмбриогенных клеток или "индуцирована" в эмбриогенно детерминированных клетках (Decai Cui., 1988). По мнению Вильямс и Махешваран (Williams Maheswaran, 1986) в процессах прямого и непрямого соматического эмбриогенеза происходит индукция эмбриогенно детерминированных клеток, поэтому не существует особых различий между двумя этими процессами. Существует разница во времени приобретения эмбриогенной компетентности.

Эмбриоид, аналогично половому зародышу, проходит характерные стадии развития (глобулярную, сердцевидную, торпедовидную). Некоторые этапы развития эмбриоидов обнаруживают полную аналогию с таковыми у зиготических зародышей. Однако не всегда можно считать ход их развития тождественным. Во многих работах (Mc Cain, 1986; Батыгина, Круглова, 1994; Yeung, 1995) отмечается сходство лишь отдельных этапов развития зиготических и соматических зародышей. Ксу и Бейл (Xu, Beil, 1992) применяя метод сканирующей электронной микроскопии, обнаружили, что соматические зародыши *Medicago sativa* отличаются от зиготических зародышей по скорости роста. На самых ранних этапах развития темп роста соматических зародышей был медленнее зиготных, в то время как на поздних стадиях развития соматические зародыши опережали зиготные. (Соматические зародыши больше в 5 раз). Соматические зародыши люцерны отличались от зиготных и морфологически.

По мнению Т.Б. Батыгиной (1997), как половые, так и соматические зародыши характеризуются огромным полиморфизмом, среди них и других существуют переходные формы, а также аномалии. Параллелизм в развитии полового и соматического зародышей проявляется в основных закономерностях морфогенеза: полярности (биполярности и

формировании новой оси), симметрии (радиальная, билатеральная, дорзовентральная), клеточной и гистогенной дифференциации; в их развитии существуют критические стадии: заложение первых перегородок, дифференциация на органы, автономность и т.д.

Органогенез

Активно делящиеся каллусные клетки при определенных условиях могут перейти к организованному росту и формированию органов растений - органогенезу. В условиях *in vitro* может осуществляться геммогенез - развитие почек и ризогенез - развитие корней (Батыгина, 1987).

Формирование органов растений в каллусных культурах включает несколько фаз развития. Первая фаза органогенеза – переход недифференцированной растущей ткани к образованию регенерационной меристемы и закладке точек роста. На этой фазе осуществляется детерминация пути развития (геммогенез или ризогенез) и дифференциация зачатков органов. Во время второй-фазы - возникшие почки и корни переходят к активному росту.

Возникающие в каллусных культурах почки являются монополярными структурами, имеющими тесную связь с материнской каллусной тканью (Батыгина, 1987). Поэтому, для получения целого растения поэтапно используют среды, обладающие различными индуктивными свойствами. Для этого исследователи осуществляют последовательное культивирование каллуса сначала на среде, стимулирующей геммогенез, а затем – ризогенез.

Гистогенез

Дедифференциация – деления - дифференциация

При культивировании каллусных культур достаточно часто наблюдается процесс, при котором дифференциация заканчивается на уровне тканевой организации и вызвать другие формы морфогенеза не удастся.

Какая же ткань образуется?

Факторы, активирующие клеточные деления, часто вызывают образование камбия, который в каллусных культурах является эквивалентом сосудистого камбия, т.к. клетки, его составляющие, часто образуют трахеидоподобные образования, а в соответствующих условиях флоэму и ксилему. Однако обнаружение флоэмных клеток является более трудной задачей, но они также найдены в каллусных культурах (Aloni, 1980). В опытах с культурой клеток и тканей было замечено, что молодые клетки - спутники ситовидных трубок и секреторные клетки часто дифференцируются легче, чем паренхимные клетки (Raupardin,

1963; цит. по Калинин, 1973).

При исследовании индукции дифференциации под влиянием экзогенных фитогормонов или других внешних факторов была установлена необходимость градиента ауксинов (Гамбург, 1982). Показано, что ауксин является лимитирующим фактором при дифференциации сосудов ксилемы (Jacobs, 1970), при формировании трахеидных элементов в каллусах (Wetmore, Reir, 1963). При нанесении на поверхность каллуса сирени ИУК или НУК совместно с сахарозой наблюдали образование ксилемы и флоэмы, которые были объединены в клубочки, расположенные по круп' на некотором расстоянии от места нанесения (Wetmore, Reir, 1963). Повышение концентрации сахарозы приводило к увеличению доли флоэмных клеток в этих клубочках. Специфическая регуляторная роль сахарозы на фоне ауксина определялась также тем, что другие моносахара хорошо поддерживали клеточные деления и рост каллусной массы, т.е. были достаточны эффективны как источник энергии, но абсолютно не активны в индукции гистогенеза (Jeffs, Northcote, 1967; цит. по Бутенко, 1975). В опытах Алони (Aloni, 1980) показано, что низкие концентрации ИУК (0,1 мг/л) индуцируют появление в каллусах сирени, сои и моркови только флоэмных элементов, а высокие (до 1 мг/л) - также и ксилемных. Флоэмные элементы были расположены ближе к поверхности каллуса, а ассоциации ксилемных и флоэмных клеток находились во внутренних его частях.

Итак:

Таким образом, в каллусных культурах, где клетки неподвижны и контактируют друг с другом, важными факторами, определяющими характер, количество и расположение дифференцированных клеток, могут быть создающиеся в каллусах градиенты ауксина, других фитогормонов и питательных веществ (Гамбург и др., 1990).

Факторы, определяющие морфогенез *in vitro*

Выбор экспланта

Видовая принадлежность исходного растения. сезон, возраст и орган, из которого изолирован тканевый эксплант, гетерогенность или единообразие клеточного состава экспланта - все это оказывает влияние на способность культивируемых тканей и клеток к морфогенезу, иногда и определяет какой тип морфогенеза будет превалирующим в данной культуре (Бутенко, 1984).

Выбор экспланта играет первостепенную роль для успеха в работе по регенерации растений. Лучше всего отбирать экспланты у здоровых, сильных растений. Условия предварительного выращивания донорных растений также могут существенно влиять на последующий рост экспланта в культуре (например, качество удобрений, время года и

условия окружающей среды) (Тиссер, 1987). Например, у ячменя летние полевые растения формировали каллусы на 40-50% способные к регенерации, в то время как в зимнем тепличном материале частота регенерации была гораздо ниже (16-25 %) (Папазян, 1983).

Практически любая часть растения может быть использована для индукции каллусообразования (Тиссер, 1987; Ammirato, 1983). Однако для некоторых видов единственно приемлемыми для индукции морфогенных каллусов оказываются экспланты, выделенные из определенных органов. Например, для луковичных растений отмечена высокая регенерационная способность парных чешуй луковиц (Катаева, Бутенко, 1983). Среди генеративных органов весенне-цветущих видов рода *Crocus* L способностью к образованию морфогенного каллуса обладали все экспланты, за исключением пыльников и семязачатков (Чуб, Власова, 1994).

Важным фактором, определяющим способность к каллусообразованию, является генотип экспланта.

Показано, что регенерация растений многоэтапный процесс, включающий цито- и гистодифференцировку, образование морфогенных структур, побего- и корнеобразование. Интегральный характер регенерационной способности дает основание рассматривать ее как сложный количественный признак с полигенным контролем. Показано, что генетические факторы, определяющие интенсивность каллусообразований и регенерацию растений не связаны между собой (Давоян, 1987) и, вероятнее всего, контролируются разными генетическими механизмами (Карабаев, Джардемалиев, 1994).

Вместе с тем считается, что природа экспланта - более существенный фактор при реализации морфогенетического потенциала клеток, чем различия между генотипами (Марченко, 1996). При физиологическом подходе к исследованию процессов каллусогенеза и морфогенеза в основу ставится изучение проблемы компетентности клеток и подбор контролируемых условий для их пролиферации, дифференциации и, в конечном счете, регенерации.

Установлено, что ткани одного и того же органа также проявляют разную способность к морфогенезу. Данный феномен впервые обнаружен А.Н. Данилиной (1973; цит. по Дмитриевой, 1981) при культивировании корневых эксплантов моркови. Было продемонстрировано, что ткани флоэмного происхождения давали начало корням, а в тех же условиях ткани ксилемного происхождения формировали эмбриониды.

Итак:

Таким образом, выбор экспланта - важный фактор при получении эмбриогенных культур, но значительное влияние на индукцию каллусных культур и сохранение ими морфогенного потенциала оказывают также условия и способы культивирования каллусных культур. Первостепенное значение имеет состав среды культивирования.

Состав питательных сред для культивирования каллусных культур

Органы растений, ткани и клетки в большинстве случаев способны расти на среде, содержащей лишь основные питательные вещества, поставляемые сосудистой системой, такие как соли азота, сахарозу, некоторые аминокислоты, витамины и факторы роста. Однако, точный состав питательной среды должен быть подобран в зависимости от потребностей разных групп растений.

Основное требование к питательным средам - их полнота по составу минеральных солей и сбалансированность по содержанию компонентов (Марченко, 1996). Химический состав и физические свойства должны соответствовать тем задачам, которые выполняет среда.

Установлено, что отдельные **(1)** макросоли могут влиять на процессы морфогенеза. Так, Моноторо с сотрудниками (Monotogo et al., 1995) обнаружили, что лишь при низких концентрациях CaCl_2 (от 0 до 9 mM) возможно получить наибольший выход эмбриогенного каллуса *Nevea brasiliensis*. Существенным стимулирующим эффектом на процессы морфогенеза обладали среды, содержащие ионы азота. Например, присутствие NH_4^+ , в питательной среде было необходимо для индукции морфогенеза, тогда как NO_3^- или смесь аммонийного и нитратного азота были важны для дальнейшего развития почек (Муромцев и др., 1990). Источником редуцированного азота, присутствие которого необходимо для эмбриоидогенеза, помимо аммонийных солей, могут служить **(2)** гидролизат казеина или некоторые **(3)** аминокислоты. Например, ионы аммония и гидролизат казеина в низких концентрациях увеличивали эмбриодогенез у диких сортов моркови (Halperin et al., 1965), высокие концентрации триптофана повышали процент формирования эмбриогенного каллуса у некоторых сортов риса (Siriwardonas et al., 1983), частота инициации рыхлого эмбриогенного каллуса кукурузы прямо пропорционально увеличивалась при добавлении в среду пролина от 25 до 50 mM (Armstrong, green, 1985). Положительное влияние триптофана на инициацию каллусных культур и на поддержание соматического эмбриогенеза связывают с тем, что триптофан - предшественник ИУК и его экзогенное внесение в среду интенсифицирует синтез этого гормона (Siriwardonas, 1983).

Для некоторых видов растений факторами, влияющими на эмбриоидогенез, являются **(4)** микроэлементы. Например, ионы меди увеличивали частоту регенерации растений в каллусах ячменя (Danhlen, 1995), а ионы фосфора индуцировали соматический эмбриогенез в культуре тканей сорго (Эльконин, Пахомова, 1997).

Экспериментальные данные указывают, что наиболее эффективным способом индукции различных форм морфогенеза является манипулирование с составом и концентрациями **(5)** регуляторов роста в питательных средах. Согласно "Модели Скуга -

Миллера" (цит. по Хасси. 1987) образование побегов стимулируется при наличии преобладающих концентраций цитокинина по отношению к ауксину, тогда как обратное соотношение способствует образованию корней. Эта модель приемлема для большинства растений, однако, ее никоим образом нельзя считать универсальной, так как способность к морфогенезу зависит не только от соотношения ауксинов и цитокининов в среде культивирования, но и от других гормонов.

Показано (Ammirato, 1983; Zimmerman, 1995), что АБК ингибирует аномальную пролиферацию соматических зародышей и репрессирует их раннее прорастание. Известны результаты исследований (Lapena et al., 1995; Gerard et al., 1995), отмечающие положительное влияние гибберелловой кислоты на дифференциацию и развитие соматических зародышей.

'(6) Сахароза - наиболее часто используемый источник энергии и углеводов в культуральной среде. Подавляющее большинство исследователей при пассировании каллусной культуры не меняют концентрацию сахарозы в среде культивирования. Однако показано, что изменение концентрации сахарозы в среде влияет на морфогенетические особенности каллусных культур (Ahn et al., 1985). Например, высокие концентрации сахарозы в среде - 6 и 12% - способствовали повышению частоты инициации каллусогенеза из зародышей кукурузы, но для длительного культивирования предпочтительной была концентрация 2-3%. Помимо сахарозы на каллусогенез и морфогенез *in vitro* могут влиять другие источники углерода (Swedland et al., 1993). Установлено, что культивирование эмбрионного каллуса кукурузы на сорбите обеспечивало последующую пролиферацию только эмбрионного каллуса (Swedland et al., 1993). Добавление мальтозы в среду культивирования клеток аспарагуса стимулировало соматический эмбриогенез (Hisoto et al., 1997). Более того, на среде с мальтозой соматические зародыши обладали большей скоростью прорастания, по сравнению с культивированием на среде с сахарозой. Исследованиями М.А. Шаталовой (1998) показано, что помимо сахарозы, рост культуры клеток женьшеня поддерживают глюкоза, галактоза и мальтоза.

В качестве добавок питательные среды содержат (7) витамины. Тиамин необходим для роста растений, витамин Е регулирует агрегацию клеток, витамин Д увеличивает формирование корней (Flick et al., 1983). Важным условием для успешного выращивания культуры тканей является (8) pH питательной среды. Оптимальное значение pH для большинства растительных тканей лежит в пределах 5,0 - 6,0.

Влияние физических факторов на рост каллусных культур

Такие физические факторы, как интенсивность и качество света, температура,

влажность оказывают влияние на морфогенез *in vitro*. Мурасиге (цит. по Хасси, 1987) обнаружил, что оптимум освещенности для образования побегов у большинства травянистых растений, принадлежащих к различным родам, лежит в области 1000 лк, низкая освещенность, примерно 300 люкс, а также слишком высокая 3000 - 10000 лк, сильно подавляют рост. Оптимальная интенсивность света для большинства растений составляет 1000 -3000 лк, а оптимальный период освещенности составляет 14-16 часов (Катаева, Аветисов, 1981).

Имеются интересные данные о специфическом влиянии светового излучения различного спектрального состава на процессы органогенеза. Так, показано, что освещение синей частью спектра способствует формированию побегов у каллуса табака, а инициация корней у каллусов топинамбура происходит интенсивнее на красном свете (Высоцкий, 1986).

Температура культивирования обычно должна быть близкой к температуре естественного произрастания растений. Культуры тканей растений зоны умеренного климата хорошо растут при 20 - 25°C (Бутенко, 1987). Относительная влажность воздуха в камерах для выращивания культур *in vitro* должна поддерживаться на уровне 65 - 75 %.