

Богуспаев К.К.
МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ЭМБРИОГЕНЕЗА У РАСТЕНИЙ
В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА
(Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан)

В кратком обзоре рассмотрен эмбриогенез in vitro у растений – уникальный процесс, который может быть иницирован у целого ряда клеток отличных от зиготы и представляется важным инструментом исследования генетики и размножения растений. С точки зрения развития растений, андрогенез in vitro хорошая модель для изучения регуляции процессов образования зародыша из одной гаплоидной микроспоры. Механизм индукции андрогенеза in vitro обсуждается в связи с другими биологическими системами

Эмбриогенез у высших растений. Эмбриогенез эволюционировал как удачная стратегия репродукции высших многоклеточных организмов. Зиготический эмбриогенез у животных и растений начинается со слияния гаплоидных мужской и женской гамет, давая начало диплоидной зиготе. Зигота обладает способностью иницировать эмбриогенез, программу развития, которая ведет к образованию эмбриона с основными характеристиками зрелого растения. Этот широко закрепленный механизм репродукции имеет, тем не менее, основные отличия между царством животных и растений, так как эмбриогенез у цветковых растений включает двойное оплодотворение. Пыльцевое зерно (мужской гаметофит), трехклеточная структура, состоит из двух генеративных клеток, заключенных в вегетативную клетку [1]. При опылении вегетативная клетка служит в качестве «электростанции» для доставки (питания) генеративных клеток в зародышевый мешок (женский гаметофит). В зародышевом мешке двойное слияние генеративных клеток с яйцеклеткой и двумя ядрами центральной клетки дает начало диплоидной зиготе и триплоидному эндосперму соответственно [2]. Другое главное отличие между эмбриогенезом животных и растений состоит в способности эмбрионов растений развиваться *in vivo* и *in vitro* из широкого ряда клеточных типов отличных от зиготы. Развитие технологии получения эмбрионов растений бесполом путем имеет перспективы и экономическое приложение в растениеводстве, в наши дни эти биотехнологии представляют составную часть программы размножения важных агрономических зерновых культур.

Индукция соматического эмбриогенеза обычно достигается воздействием на соматическую клетку стрессом или гормонами. В зависимости от типа донорской ткани и условий обработки, зародыш может развиваться либо прямо из одной клетки или опосредованно через промежуточную фазу каллуса. Добавочный путь эмбриогенеза *in vitro* определяется способностью мужского или женского гаметофита необратимо переключаться с пути гаметофита к эмбриогенезу. Андрогенез относится к развитию зародыша из микроспоры или незрелого пыльцевого зерна, а гиногенез – из неоплодотворенной завязи *in vitro* и *in vivo* [3]. В противоположность апомиксису и соматическому эмбриогенезу, которые приводят к клональному размножению специфического генотипа, андрогенные и гиногенные растения отражают продукт мейотической сегрегации. Таким образом, они имеют отличительные черты только одного набора хромосом и являются гаплоидными растениями.

Индукция андрогенеза. Благодаря своей высокой регенерационной способности, ячмень (*Hordeum vulgare* L.), рапс (*Brassica napus* L.), табак (*Nicotiana spp.*) и пшеница (*Triticum aestivum* L.) используются как модельные виды при изучении механизмов стресс-индуцируемого андрогенеза [4]. Тем не менее, благодаря улучшению методов, молекулярные и морфологические исследования возможны теперь и на других видах растений, например у кукурузы (*Zea mays*) [5] и перце (*Capsicum annum* L.) [6]. При развитии пыльцы период андрогенеза представлен стадиями ассиметричного деления одноядерных микроспор, заканчиваясь образованием поляризованного пыльцевого зерна, содержащего генеративную клетку, заключенную в большую вегетативную цитоплазму. Вегетативная и генеративная клетка заметно различаются, маленькая конденсированная генеративная клетка затем подвергается дополнительному митотическому делению с образованием двух спермиев, тогда как в вегетативной клетке запускается программа интенсивного накопления запасных веществ, а именно крахмала и липидов, необходимых для дальнейшего созревания пыльцы. Общепринято, что после того как вегетативная цитоплазма двуядерной пыльцы начинает накапливать крахмал, андрогенез не может быть запущен. Другое важное замечание, основанное на практическом опыте - стрессовое воздействие, необходимое для переключения развития микроспор, сильно варьирует в зависимости от вида растения и его генотипа. У ячменя высокая регенерационная способность проявляется, когда микроспоры на средней и поздней одноядерных стадиях подвергаются голоданию и осмотическому стрессу, который достигается инкубацией пыльников в растворе манитола [7]. У пшеницы и табака высокий коэффициент индукции достигается периодом голодания в комбинации с тепловым шоком, тогда как только тепловой обработки достаточно для индукции андрогенеза у рапса и перца. Другие типы применяемых стрессовых воздействий запускают андрогенез в меньшей степени. Последние представлены обработкой клеток колхицином, азотным голоданием, обработкой ауксином, химикатами, гамма радиацией и воздействием холодом [8]. Так как многие стрессовые факторы могут запускать перепрограммирование микроспор в зародыш, похоже, что инициация андрогенеза стимулируется пересечением сигнальных путей, хотя конечно, различные стрессовые сигналы могут запускать похожие нисходящие пути. Аналогичная ситуация наблюдается во время индукции соматического эмбриогенеза, когда переход соматической клетки к эмбриогенезу

регулируется различными классами гормонов, а именно ауксином, цитокининами и абцизовой кислотой, так же как и повреждением, осмотическим стрессом, голоданием и ионами тяжелых металлов. Во время зиготического эмбриогенеза, тем не менее, стресс сам по себе не ответственен непосредственно за способность к зиготическому эмбриогенезу. Способность зиготы инициировать эмбриогенез кажется связанной с увеличением синтеза этилена и уровня эндогенного ауксина после оплодотворения. Интересно, что активные формы кислорода являются вторичными посредниками во время ауксин- и стресс-индуцированного эмбриогенеза. Активируемый митогенами протеинкиназный каскад (МАРК) может связывать ауксин, передавая сигнал на ответ на окислительный стресс и регуляцию клеточного цикла, и МАРК активируется через связанную со стрессом передачу сигнала АВА [9]. Таким образом, вероятно, что нисходящие регуляторные белки, такие как МАРК, играют важную роль при индукции эмбриогенеза в различных типах клеток.

Программа экспрессии генов во время приобретения микроспорами эмбриогенного потенциала. Анализ биохимических и молекулярных изменений во время стрессорного воздействия при индукции андрогенеза был центральной точкой исследований, направленных на понимание механизмов, вовлеченных в перепрограммирование микроспоры в зародыш [10]. Большинство генов идентифицированы как дифференциально экспрессируемые во время стрессового воздействия при индукции андрогенеза сопряжены с гормонами стресса, клеточной защитой против стресса, метаболизмом сахара-крахмал и протеолизом. Эти результаты свидетельствуют, что приобретение андрогенного потенциала в большинстве опирается на дедифференциацию - процесс в соответствии с которым существующий транскрипционный и трансляционный профиль, возможно, стирается или изменяется для того, чтобы блокировать развитие пыльцы и запустить развитие зародыша.

Опосредованная гормонами экспрессия генов. Известно, что растительные клетки образуют АВА в ответ на некоторые стрессы, например осмотический шок, засоление, холод и гипоксию [11]. Во время индукции андрогенеза у ячменя при обработке манитолом высокая регенерационная способность коррелирует с увеличением уровня осмотического стресса и АВА [12]. При инициации андрогенеза пшеницы Reynolds and Crawford изолировали ген, кодирующий ранний меченый по цистеину класс белка металлотioneина II (EcMt). Экспрессия EcMt гена зафиксирована через 6 часов после начала индукции в ауксин-содержащей среде. Промоутерная область EcMt гена пшеницы содержит АВА ответственный элемент, и его сверхрегуляция во время андрогенеза тесно связана с пиком эндогенной продукции АВА. Дальнейшие доказательства показали, что Ca^{2+} участвует в сигнальной трансдукции АВА, ведущей к экспрессии гена EcMt, процессе, который может включать кальмодулин. Член семейства алкоголь дегидрогеназ среди генов, чья экспрессия регулируется АВА. Интересно, что индукция ADH3 во время стресса при индукции андрогенеза ячменя связана с высокой способностью к регенерации, которая по очереди связана с увеличением уровня АВА. Таким образом, не известно играют ли EcMt и ADH3 регуляторную роль во время приобретения эмбриогенного потенциала, их регуляция АВА предполагает, что сигнальный каскад АВА может играть роль в активации специфической программы экспрессии генов во время инициации андрогенеза при стрессе. Куо et al изолировали имеющийся в избытке в эмбриогенной пыльце фосфопроtein (NtEPc) из микроспор табака после азотного голодания. NtEPc кодирует белок, который имеет небольшое сходство с некоторыми типами медь-связывающих гликопротеинов и ранним нодулином. Экспрессия NtEPc ограничивается периодом обработки микроспор при стрессе, вызывается низким pH и ингибируется цитокинином. Результаты свидетельствуют, что кроме сигнала АВА, другие гормональные сигнальные каскады возможно участвуют в перепрограммировании генной экспрессии во время индукции андрогенеза [13].

За последние годы значительно увеличилось количество информации, касающейся клеточных и молекулярных аспектов индукции андрогенеза и образования зародыша. Введение систем отслеживания клеток сыграло решающую роль в установлении главных морфологических характеристик эмбриогенных микроспор, так же как и в обнаружении путей развития индуцированных микроспор.

Литература

- 1 McCormick S. 1993. Male gametophyte development. *The Plant Cell* 5, 1265–1275
- Ahn JW, Lim JH, Kim GT, Pai HS. 2004. *Phytoalexin controls the proliferation and differentiation fates of cells in plant organ development. The Plant Journal* 38, 969–981.
- 2 Goldberg RB, de Paiva G, Yadegari R. 1994. *Plant embryogenesis: from zygote to seed. Science* 266, 605–614
- 3 Musial K, Bohanec B, Przywara L. 2001. *Embryological study on gynogenesis in onion (Allium cepa L.). Sexual Plant Reproduction* 13, 335–341
- 4 Touraev A, Vicente O, Heberle-Bors E. 1997. *Initiation of microspore embryogenesis by stress. Trends in Plant Science* 2, 297–302
- 5 Magnard JL, Le Deunff E, Domenech J, Rogowsky PM, Testillano PS, Rougier M, Risueño MC, Vergne P, Dumas C. 2000. *Genes normally expressed in the endosperm are expressed at early stages of microspore embryogenesis in maize. Plant Molecular Biology* 44, 559–574.
- 6 Bárány I, Testillano PS, Mitykó J, Risueño MC. 2001. *The switch of the microspore program in Capsicum involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. International Journal of Developmental Biology* 45, 39–40
- 7 Hoekstra S, van Zijderveld MH, Louwerse JD, Heidekamp F, van der Mark F. 1992. *Anther and microspore culture of Hordeum vulgare L. cv. Igri. Plant Science* 86, 89–96.

8 Pechan M, Keller AW. 1989. Induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* by gamma irradiation and ethanol stress. *In vitro* 25, 1073–1074.

9 Knetsch ML, Wang M, Snaar-Jagalska BE, Heimovaara-Dijkstra S. 1996. Abscisic acid induced mitogen-activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts. *The Plant Cell* 8, 1061–1067.

10 Mordhorst AP, Toonen MAJ, de Vries SC. 1997. Plant embryogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16, 535–576.

11 Zeevaart JAD, Creelman RA. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39, 439–473.

12 Hoekstra S, van Bergen S, van Brouwershaven IR, Schilperoort RA, Heidekamp F. 1996. The interaction of 2,4-D application and mannitol pretreatment in anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. *Journal of Plant Physiology* 148, 696–700.

13 Kyo M, Miyatake H, Mamezuka K, Amagata K. 2000. Cloning of cDNA encoding NtPEc, a marker protein for the embryogenic differentiation of immature tobacco pollen grains cultured in vitro. *Plant and Cell Physiology* 41, 129–137

Богуспаев К.К.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ АНДРОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЫЛЬНИКОВ (МИКРОСПОР) У МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ПШЕНИЦЫ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан)

В настоящей работе приведены результаты исследования процессов андрогенеза в культуре изолированных пыльников у межвидовых гибридов пшеницы. Цитозмбриологические исследования показали различные пути образования морфогенных структур при культивировании на среде Блейдза.

Повышение устойчивости и урожайности хлебных злаков является предметом активных исследований. Удельный вес биотехнологических методов в этих исследованиях постоянно возрастает. Гаплоидная технология, т.е. получение гомозиготных растений путем культивирования репродуктивных органов растения, является одним из таких методов. Гаплоидные клетки и растения позволяют легче обнаружить рецессивные мутации, редкие рекомбинации, экспрессию введенного извне генетического материала. Изогенные линии для получения гетерозисных гибридов на основе удвоенных гаплоидов можно создать в течение одного года, тогда как метод инбридинга требует для этого 4-6 лет [1].

Известно, что одним из эффективных методов получения новых форм растений устойчивых к болезням, с высоким содержанием белка в зерне и ряда других ценных признаков, является отдаленная гибридизация. При правильном сочетании межвидовой гибридизации и гаплоидной технологии можно значительно ускорить процессы селекции необходимых новых форм злаков. [2,3] Однако, несмотря на успехи, достигнутые в выведении новых сортов злаков с помощью методов биотехнологии, в том числе и геной инженерии, до сих пор не достаточно разработаны условия культивирования и методики получения, гаплоидных растений-регенерантов в культуре изолированных пыльников и микроспор межвидовых гибридов пшеницы. В связи с этим целью работы, являлось определение морфогенетического потенциала в культуре изолированных пыльников у полученных межвидовых гибридов мягкой пшеницы.

Материалы и методы

Для культивирования пыльников *in vitro* отделом биотехнологии КазНИИ Земледелия и растениеводства МСХ РК предложены линии, представляющие интерес для селекционеров: 8 межвидовых гибридов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) с дикой формой (*Triticum timopheevi*). Гибриды получены в результате реципрокных скрещиваний их между собой и с перспективными селекционными линиями из рабочей коллекции КазНИИ ЗР. Линии и гибриды мягкой пшеницы: №50. Казахстанская-10 x *T. timopheevi* (F2), №66. Саратовская-29 x *T. timopheevi* (F3), №78. Казахстанская-15 x *T. timopheevi* (F2), №79. Казахст.ранняя x *T. timopheevi* (F2), №80. Казахстанская-17 x *T. timopheevi* (F2), №30. Омская рубиновая x Казахстанская-17 (F1), №31. Омская рубиновая x Казахстанская-15 (F1), №34. Алмаз x 190 (211) (F1).

Растения выращивали на опытных полях отдела биотехнологии КазНИИ ЗР. Для выделения пыльников растения срезали на одноядерной стадии развития микроспор, морфологическим показателем которой является расположение второго листа на середине колоса, находящегося в трубке [4]. Срезанные колосья твердой пшеницы подвергали холодной предобработке при +9 С⁰ в течение 3-10 суток. Для мягкой пшеницы использован один срок предобработки 7 суток, который был определен как оптимальный в работах, проведенных в нашей лаборатории ранее.

Для культивирования пыльников использована среда Блейдза [4] с 0,25 мг/л 2,4-Д. Пробирки с пыльниками культивировали в термостате при 26 С. По истечении 35-40 суток, определяли количество андрогенных структур, образовавшихся в культуре пыльников. На основании этих данных вычисляли частоту андрогенеза в % к общему количеству культивируемых пыльников.

Результаты и их обсуждение