

УДК 573.086.581.085

Н.К. Бишимбаева
Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы, Казахстан
e-mail: gen_jan@mail.ru

Исследование клеточных механизмов длительного поддержания тотипотентности *in vitro* у зерновых злаков

Проведено изучение закономерностей морфогенеза и цитодифференцировки в культуре тканей пшеницы и ячменя методами световой, флуоресцентной и электронной микроскопии. На основании полученных результатов разработана концепция о цитофизиологических механизмах, лежащих в основе индукции и длительного поддержания тотипотентности в культуре тканей зерновых злаков. Предложена теоретическая схема, демонстрирующая цикличность процессов инициации и дезинтеграции соматических эмбриоидов в длительно культивируемых эмбриогенных каллусах. Установлена важная роль программированной клеточной смерти (ПКС) и полисахаридов, секретируемых в ходе ПКС, в регуляции процессов цитодифференцировки и морфогенеза в длительно культивируемых эмбриогенных каллусах.

Ключевые слова: каллусные ткани, соматический эмбриогенез, тотипотентность, программированная клеточная смерть, биологически активные вещества.

Н.К. Бишимбаева

Дәнді дақылдардың тотипотенттілігі ұзақ мерзімде *in vitro* жағдайында сақталуының клеткалық механизмдерін зерттеу

Жарық, флуоресцентті және электронды микроскопия әдістерімен бидай және арпа ұлпа культурасындағы морфогенез және цитодифференция заңдылықтарына зерттеу жүргізілді. Жүргізілген тәжірибелер негізінде дәнді дақылдар ұлпа культурасындағы тотипотенттіктің индукциялануының және ұзақ мерзімде сақталуының негізінде жататын цитофизиологиялық механизмдері жайлы теоретикалық концепциясы жасалынды. Ұзақ мерзім эмбриогенді ұлпалардағы сомалық эмбриоидтардың инициациясы және дезинтеграциясы үрдістерінің цикл арқылы жүретінін көрсететін теориялық сұлбасы ұсынылды. Клеткалардың бағдарламалы өлуінің және олардың сыртқа бөлетін полисахаридтердің ұзақ мерзім эмбриогенді каллус ұлпаларындағы морфогенез және цитодифференцировка үрдістерін реттеу жолындағы маңызды ролі анықталды.

Түйінк сөздер: каллус ұлпалары, сомалық эмбриогенез, тотипотенттік, клеткалардың бағдармалы өлуі, биологиялық белсенді заттар.

N.K. Bishimbayeva

Investigation of cell mechanisms of long-term maintenance of cereals' totipotency *in vitro*

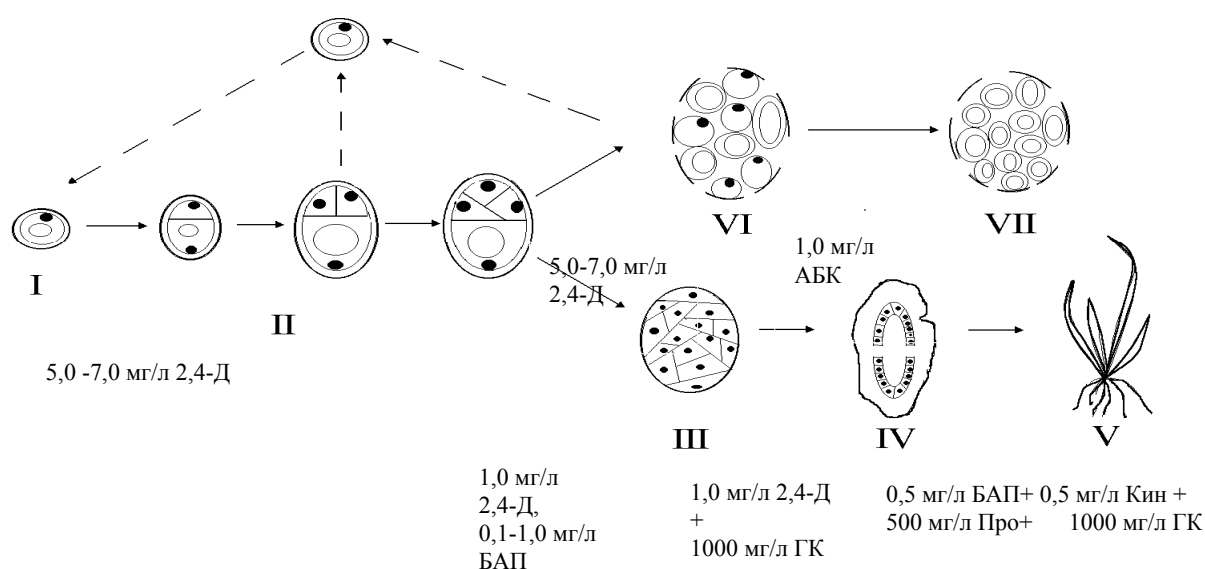
Investigation of the laws of morphogenesis and cytodifferentiation in tissue culture of wheat and barley has been conducted by the use of light-, fluorescent- and electron microscopy. Concept on the cytophysiological mechanisms underlying the induction and long-term maintenance of totipotency in tissue culture of cereals has been elaborated in the result of research. Theoretical scheme demonstrating cyclic recurrence of the processes of somatic embryos initiation and disaggregation during the long-term maintenance of embryogenic potential has been proposed. Significant role of programmed cell death (PCD) and extracellular polysaccharides secreted in the course of PCD in the regulation of cytodifferentiation and morphogenesis in the long-term embryogenic calli has been discovered.

Keywords: callus tissues, somatic embryogenesis, totipotency, programmed cell death, biologically active substances.

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. 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 тотипотентности - способности реализовать программу развития целого растения из одиночных соматических клеток. Это, в свою очередь, создаст возможность целенаправленного регулирования процессами морфогенеза *in vitro* и позволит решить проблему регенерации растений, лимитирующую широкомасштабную реализацию биотехнологических методов для улучшения так называемых «трудных» в этом отношении с/х культур, к которым относятся и зерновые злаки.

Соматический эмбриогенез *in vitro* является идеальной системой для изучения механизмов реализации тотипотентности растительных клеток. Соматический эмбриогенез по определению А.М. Emons [1] – развитие из соматических клеток структур, сходных с зиготическими зародышами. Принципиально важным моментом в изучении процесса соматического эмбриогенеза, по мнению Р. Г. Бутенко [2] 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 подобно исследованы поздние этапы СЭ, и, практически, нет объяснений тому, как некоторые клетки или группа клеток начинают детерминироваться для индукции эмбриоидогенеза. Пока нет ясного представления о природе факторов, благодаря действию которых в массе неорганизованно растущего каллуса возникают эмбриоиды и меристематические очаги, дающие начало эмбрионным и органогенным структурам [2]. Кроме того, до сих пор не выяснены механизмы цитодифференцировки, обеспечивающие длительное поддержание эмбриогенного потенциала *in vitro*, в особенности у зерновых злаков.



I – компетентные к эмбриоидогенезу клетки; II – 2-х, 3-х, 4-х - клеточные проэмбрио; III – эмбриоид на стадии глобулы; IV – дифференцированный эмбриоид; V – регенерация растения; VI – частичная деградация клеток ранней глобулы; VII – полная деградация клеток глобулы (состоит из клеток с признаками ПКС)

Рисунок 1 – Схема длительного поддержания тотипотентности и регуляции соматического эмбриогенеза в культуре тканей пшеницы и ячменя

Нами, в лаборатории клеточной биологии Института биологии и биотехнологии растений, проведен цикл фундаментальных исследований по выяснению закономерностей морфогенеза и цитодифференцировки в процессе индукции и длительного поддержания эмбриогенного потенциала в культуре тканей зерновых злаков [3-8, 11-13]. Создание удобных экспериментальных систем с четкой регуляцией соматического эмбриогенеза и длительным сохранением эмбриогенного потенциала является важным условием для изучения клеточных и молекулярных механизмов тотипотентности. Нами созданы такие системы: рыхлые эмбриогенные (РЭ) каллусы ячменя и пшеницы, которые могут служить идеальной моделью для изучения тотипотентности благодаря одноклеточному происхождению эмбриоидов и высокой отзывчивости к регуляции морфогенеза при помощи факторов среды [3, 4].

Методами световой и электронной микроскопии проведено исследование влияния фитогормонов на состав клеточных популяций длительно культивируемых рыхлых эмбриогенных (РЭ) каллусов пшеницы и ячменя в сравнении с неэмбриогенными тканями различной морфологии (рыхлые и плотные) [5, 6, 7]. В результате, нами выявлены особенности эмбриогенных каллусов, резко отличающие их от неэмбриогенных тканей: наличие интенсивно окрашенных деградирующих клеток

(ИОДК), накопление густой сети кислых полисахаридов в межклеточном пространстве, обособление сферических эмбриогенно-компетентных клеток, имеющих каллозную оболочку [5]. Методами световой, флуоресцентной [8] и электронной [6, 7] микроскопии нами обнаружено, что ИОДК эмбриогенных каллусов обладают характерными чертами клеток с признаками программированной клеточной смерти (ПКС): разрыв ядерной мембраны и выход ядерного материала в цитоплазму, сжатие цитоплазмы [9], образование периплазматического пространства и утолщение клеточной стенки [10]. Окрашиванием акридин оранжевым и по методу TUNEL в ИОДК обнаружены разрушение ядерного материала и межнуклеосомная фрагментация ДНК [8], являющиеся маркерными признаками апоптоза [9]. Исходя из этого, мы классифицировали ИОДК как клетки с признаками ПКС или апоптоза.

Нами установлено, что возрастание пропорции клеток с признаками ПКС в РЭ тканях под действием 2,4-Д сопровождается усилением накопления экстрацеллюлярных полисахаридов (ЭПС), стимуляцией роста и эмбриогенного потенциала каллусов [3, 4, 8]. Методами цитохимии и гистохимии обнаружено, что клетки с признаками ПКС в процессе гибели секретируют внеклеточные вещества полисахаридной природы [11]. При помощи биотестов *in vivo* и *in vitro* установлено, что кислые фракции секретируемых ЭПС обладают антиауксиновой активностью, т.е. ингибируют рост клеток растяжением, стимулируемый 2,4-Д; повышают устойчивость растений к стрессам; приводят к обособлению клеток каллуса при помощи каллозной оболочки и перепрограммированию их на эмбриоидогенный путь развития; стимулируют рост каллусных тканей [12].

На основании проведенных исследований разработана концепция о цитофизиологических закономерностях, лежащих в основе индукции и длительного поддержания тотипотентности в культуре тканей зерновых злаков. Предложена гипотетическая схема, демонстрирующая цикличность процессов инициации и дезинтеграции соматических эмбриоидов (СЭ) в длительно тотипотентных эмбриогенных каллусах (рисунке 1).

Согласно этой схеме последовательность событий, запускаемых фитогормоном 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 эмбриоидогенеза. Иницированные проэмбрио также могут вновь диссоциировать по пути ПКС с образованием компетентных клеток. Так в ходе многократного субкультивирования каллусов поддерживается их эмбриогенный потенциал. При снижении концентрации 2,4-Д до 1,0 мг/л стрессовое действие фитогормона снижается, гибели клеток не происходит, и СЭ имеют возможность к нормальному развитию и дифференциации вплоть до формирования целого растения.

На основе результатов цикла представленных в работе фундаментальных исследований нами разработаны следующие практически значимые технологии:

- генотип независимая биотехнология длительной регенерации растений *in vitro* для зерновых злаков, позволяющая значительно расширить спектр генетической изменчивости отечественной пшеницы и получить ценные формы;
- клеточная технология получения биостимуляторов роста и устойчивости растений с наномолярной активностью для биотехнологии и сельского хозяйства на основе секретируемых полисахаридов.

Литература

- 1 Emons A.M.C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects // Acta Bot Neerl. – 1994. – Vol. 43. – P. 1-14.
- 2 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.
- 3 Денебаева М.Г., Бишимбаева Н.К. Метаморфоз каллусов ячменя и получение длительнокультивируемой рыхлой эмбриогенной ткани // Биотехнология. Теория и практика. – 2000. – № 1-2(3). – С. 68-73.
- 4 Амирова А.К., Бишимбаева Н.К. Получение длительно культивируемых рыхлых эмбриогенных каллусов пшеницы под действием 2,4-Д и КН2РО4 // Биотехнология, серия биологическая и медицинская. – 2002. – № 1. – С. 60-65.
- 5 Бишимбаева Н.К., Денебаева 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.

- 6 Бишимбаева Н.К., Рахимова Е.В., Денебаева М.Г. Электронно-микроскопическое изучение клеток эмбрионных каллусов ячменя // Вестник КазНУ, серия биологическая. – 2007. – № 2 (32). – С. 121-127.
- 7 Бишимбаева Н.К., Рахимова Е.В., Амирова А.К., Рахимбаев И.Р. Электронно-микроскопическое изучение клеток эмбрионных каллусов пшеницы // Известия НАН РК, серия биологическая. – 2007. – №1. – С. 41-47.
- 8 Бишимбаева Н.К. Обнаружение клеток с признаками программированной гибели в эмбрионных каллусах пшеницы и ячменя // Известия НАН РК. – 2006. – № 1. – С. 33-37.11.
- 9 Фильченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз и рак. - Киев, 1999. - С. 181.
- 10 McCabe P.F., Levine A., Meijer P.J., Tapon, Pennel R.I. A programmed cell death pathway activated in cells cultured at low cell density // The Plant Journal. – 1997. – Vol. 12. – № 2. – P. 267-280.
- 11 Bishimbayeva N.K. A role for apoptosis and polysaccharides secretion in the long-term somatic embryogenesis of cereals // Bull. of State Nikit. Bot. Gard. – 2002. – № 86. – P. 47-52.
- 12 Бишимбаева Н.К., Амирова А.К., Муртазина А.С., McDougall G.I., Рахимбаев И.Р. Биологическая активность внеклеточных полисахаридов суспензионной культуры клеток пшеницы / Сборник статей, посвященный 70-летию профессора, доктора биологических наук Мамонова Л.К. Физиолого-биохимические и генетико-селекционные исследования растений в Казахстане. – Алматы. – 2010. – С. 103-112.

УДК 664.691.016.3

А.В. Витавская*¹, С.Ш., Асрандина², Ш. Кенжебаева², Б.А. Сарсенбаев³,
Ю.Г. Пронина¹, Д.Б. Баймуханова⁴, Ю.А. Синявский⁵, А.А. Ташимбаева²

¹АО Алматинский технологический университет, г. Алматы, Казахстан,

²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан,

³Алматинский филиал Центра биотехнологии РК, г. Алматы, Казахстан,

⁴ТОО «Илийский молочный завод, г. Алматы, Казахстан, ⁵ТОО «ОО Казахская Академия питания»

*e-mail: dlya_vitavskoi@mail.ru

Биопродукты со стевией – необходимая пища для казахстанцев

Обоснован выбор сырья для приготовления продуктов (хрустящие хлебцы, биохлеб – минус аппетит) повышенной питательной ценности с лечебно-профилактическими свойствами функционального назначения – листья стевии. Разработана технология приготовления продуктов, проведена сравнительная характеристика органолептических и некоторых физико-химических показателей образцов, выявлены оптимальные варианты добавки.

Ключевые слова: стевия, холодная технология, экологическая безопасность, хрустящие хлебцы, биохлеб – минус аппетит.

А.В. Витавская, С.Ш. Асрандина, Ш. Кенжебаева, Б. Сарсенбаев, Ю.Г. Пронина,

Д.Б. Баймуханова, Ю.А. Синявский, А.А. Ташимбаева

Қазақстандықтарға қажет – стевия қосылған бионімдер

Тағамдық құндылығы жоғары және профилактикалық – емдік қасиеттерге бай өнімдерді (қытырлақ нан және бионан – төмен тәбет) дайындау үшін қажетті өсімдік шикізаты – стевия өсімдігіне негіздеме жасалған. Нан өнімдерін дайындау технологиялары жасалған, сондай-ақ, салыстырмалы түрде органолептикалық және кейбір физико-химиялық көрсеткіштер берілген, қоспалардың оптималды үлгілері анықталған.

Түйінк сөздер: стевия, суық технология, экологиялық қауіпсіздік, қытырлақ нан, бионан – төмен тәбет.

A.V. Vitavskaya, S.Sh. Asrandina, Sh. Kenjebayeva, B. Sarsenbayev, Yu.G. Pronina, D.B. Baimyhanova, U.A.

Sinavski, A.A. Tashimbaeva

Bioproducts with the stevia - necessary food for kazakhstan citizens

The raw materials choice for preparation of products (crispbread, biobread, a minus appetite) the increased nutritional value with treatment-and-prophylactic properties of a functional purpose – stevia leaves is reasonable. The technology of preparation of products is developed, the comparative characteristic organoleptic and some physics – chemical indicators of samples is carried out, optimum options of an additive are revealed.

Keywords: the stevia, cold technology, ecological safety, crispbread, biobread - a minus appetite.

В целях реализации Приоритета 4 Здоровье, образование и благополучие граждан Казахстана, сформулированного в послании Президента страны народу Казахстана "Казахстан-2030" и утвержденной Государственной программы развития и здравоохранения РК «Салауатты Қазақстан» 2011-2015 годы (июль 2010 г.) активно реализуются и внедряются инновационные технологии в