

Факторы экспериментальной эволюции организмов.— Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А.— Київ: Логос.— 2009.— Т.7.— С. 245–250.

5. <http://faostat.fao.org/site/636/default.aspx#ancor>.

6. *Garces R., Mancha M.* One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues // *Analytical Biochemistry*.— 1993.— **211**.— P. 139–143.

7. *Лось Д.А.* Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // *Успехи биологической химии*.— 2001.— Т.41.— С. 163–198.

8. *Schnurbusch T., Mullers C., Becker H.C.* A mutant of *Brassica napus* with increased palmitic acid content // *Plant Breed.*— 1999.— V.119, №2.— P. 141–144.

9. *Thompson C.J., Movva N.R., Tizard R. et al.* Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus* // *The EMBO J.*— 1987.— V.6, N9.— P. 2519–2523.

### Резюме

Введение гена *суп11А1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> из митохондрий коры надпочечников быка в ядерный геном рапса влияет на количественный состав жирных кислот в листьях и семенах полученных биотехнологических растений. В результате проведенной газовой хроматографии эфиров жирных кислот, выделенных из семян T<sub>1</sub> поколения трансформантов, выявлена перспективная линия Bn12/93/14в, которая характеризуется увеличением доли олеиновой (C18:1) и уменьшением доли линоленовой (C18:3) кислот.

Введення гена *суп11А1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> з митохондрій кори надниркових залоз бика до ядерного геному ріпака впливає на кількісний склад жирних кислот в листі і насінні отриманих біотехнологічних рослин. В результаті проведеної газової хроматографії ефірів жирних кислот, виділених з насіння T<sub>1</sub> покоління трансформантів, виявлена перспективна лінія Bn12/93/14в, яка характеризується збільшенням частки олеїнової (C18:1) і зменшенням частки ліноленої (C18:3) кислот.

The *суп11А1* gene of cytochrome P450<sub>SCC</sub> from bovine adrenal cortex mitochondria introduction in the nuclear genome of oilseed rape affects the quantitative composition of fatty acids in the leaves and seeds of biotechnological plant obtained. Perspective line Bn12/93/14в, which is characterized by an increase in the proportion of oleic (C18:1) and a decrease in the proportion of linolenic (C18:3) acids revealed as a result of gas chromatography of fatty acids esters isolated from the seeds of T<sub>1</sub> transformant generation.

**СЕЛЬДИМИРОВА О.А., КРУГЛОВА Н.Н.**

*Учреждение Российской академии наук Институт биологии Уфимского НЦ РАН, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: Kruglova@anrb.ru*

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ ЭМБРИОДОГЕНЕЗА В КАЛЛУСАХ АНДРОКЛИННОГО И ЗАРОДЫШЕВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Биотехнологические методы культуры *in vitro* в настоящее время широко используются для решения прикладных задач селекции ценных сельскохозяйственных растений [8, 11, 12] и в частности яровой мягкой пшеницы — основного хлебного злака [6].

Практическую значимость большинства методов культуры *in vitro* определяет образование на конечном этапе полноценных фертильных растений-регенерантов. Один из путей регенерации растений *in vitro* — эмбриоидогенез в каллусных культурах различного происхождения. Формирование эмбриоидов — биполярных зародышеподобных структур — биотехнологически оптимальный путь регенерации растений *in vitro* [6], поскольку предполагает работу с генетически однородным материалом. В связи с этим основной вопрос при регенерации растений посредством эмбриоидогенеза *in vitro* — происхождение эмбриоида: считается, что одноклеточное происхождение эмбриоида снижает риск возникновения химерных растений-регенерантов. Генотип эмбриоида в случае образования в результате случайного объединения нескольких различных клеток каллусной ткани можно считать практически неидентифицируемым. Это обстоятельство исключает возможность использования эмбриоидов и растений, полученных из них, в генно-инженерных и клеточно-инженерных манипуляциях [8, 11–13].

До сих пор вопрос о клеточных механизмах формирования эмбриоидов в каллусных культурах остается дискуссионным. В связи с этим цель нашей работы заключалась в ультраструктурном анализе начальных этапов эмбриоидогенеза в каллусах андроклинного и зародышевого происхождения у яровой мягкой пшеницы.

#### **Материал и методы**

Материалом для исследования послужили сорта яровой мягкой пшеницы Скала, Башкирская 26 и Башкирская 28.

В работе использованы: метод культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы с учетом эмбриологических данных [4], метод культуры *in vitro* незрелых зародышей пшеницы в модификации [7], методы световой микроскопии (СМ) [1] и трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) [2]. Постоянные препараты просматривали и документировали с применением цифрового микроскопа проходящего света серии Микровизор  $\mu$ Vizo-103 (ЛОМО ФОТОНИКА, г. Санкт-Петербург). Объекты, подготовленные к исследованию методом ТЭМ, анализировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1200 EX (JEOL, Japan).

#### **Результаты и обсуждение**

Экспериментально установлено, что начальный этап морфогенеза *in vitro*, и в частности эмбриоидогенеза, в каллусах как андроклинного [6], так и зародышевого [3] происхождения, — формирование в каллусе параллельно его поверхности меристематической зоны (МЗ).

Согласно данным светооптического анализа, МЗ в каллусах обоих типов имеет сходное строение. Она представлена несколькими слоями клеток, структурная организация которых значительно отличается эти клетки от других клеток каллуса и позволяет рассматривать их как меристематические. Клетки МЗ имеют, как правило, изодиаметрическую форму и плотно прилегают друг к другу. Клетки содержат крупные центрально расположенные ядра, окруженные многочисленными мелкими вакуолями. Цитоплазма клеток МЗ

окрашивается значительно интенсивнее по сравнению с остальными клетками каллуса. Клетки нижележащих слоев имеют более крупные размеры по сравнению с клетками МЗ, вытянутую форму, сильнее вакуолизированы и, в целом, имеют признаки, характерные для клеток паренхимы. Между клетками появляются крупные межклетники. Клетки, лежащие выше МЗ сильно вытягиваются, вакуолизируются, и, в конечном итоге, подвергаются деструкции. Остатки таких клеток сохраняются на поверхности каллуса в виде гомогенного, интенсивно окрашивающегося слоя полисахаридной природы.

Методом ТЭМ в таких клетках выявлены высокое ядерно-плазменное отношение и плотная, за счет присутствия большого количества свободных рибосом, цитоплазма. Присутствуют единичные каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума (гЭПР). Пластиды и митохондрии ювенильны по внутренней структуре и почти одинаковы по размеру. Немногочисленные пластиды имеют очень слабо развитую систему внутренних мембран, представленную отдельными тилакоидами. В пластиде имеется небольшое количество крахмала в виде мелких крахмальных зерен. Многочисленные округлые митохондрии не имеют крист. Клеточные стенки тонкие, с многочисленными плазмодесмами. Такие ультраструктурные признаки характеризуют эти клетки как меристематические [5].

Не смотря на определенное сходство, в ультраструктуре клеток МЗ каллусов разного происхождения выявляются значительные различия. Так, в клетках МЗ андроклиных каллусов обнаруживается большое количество каналов агранулярного эндоплазматического ретикулума (аЭПР), с деятельностью которого, по-видимому, связан интенсивный синтез липидов, располагающихся преимущественно вдоль клеточной стенки. Пластиды содержат большее количество более крупных крахмальных зерен по сравнению с клетками МЗ каллусов зародышевого происхождения. Цистерны аппарата Гольджи (АГ) единичны и неактивны. В клетках МЗ каллусов зародышевого происхождения отсутствуют липидные включения и каналы аЭПР. АГ активен и представлен большим количеством диктиосом, цистерны которых заканчиваются секреторными пузырьками.

При переносе каллусов на среду для индукции эмбриодогенеза в клетках МЗ каллусов обоих типов происходят изменения. На светооптическом уровне они заключаются в том, что клетки МЗ становятся более рыхло расположенными за счет увеличения межклетников и утолщения клеточных стенок. Изменения отмечены и на ультраструктурном уровне. В клеточных стенках исчезают плазмодесмы, обнаруживаются только единичные разрушающиеся плазмодесмы. В пластиде продолжается аккумуляция крахмала. Количество митохондрий значительно возрастает, в них формируются кристы. В клетках МЗ андроклиных каллусов начинают появляться каналы гЭПР. Кроме того, в них значительно возрастает длина и количество каналов аЭПР, которые располагаются параллельными рядами вдоль клеточной стенки. В клетках МЗ каллусов зародышевого происхождения усиливается активность АГ: возрастает количество диктиосом, цистерны которых закан-

чиваются многочисленными секреторными пузырьками. Можно предположить, что в клетках МЗ каллусов обоих типов идет активная секреция, направленная на формирование утолщенной клеточной стенки: плазмалемма клеток МЗ андроклинных каллусов имеет многочисленные выросты, направленные в клеточную стенку, в клетках МЗ каллусов зародышевого происхождения отмечены многочисленные экзоцитозные пузырьки. В итоге клеточные стенки клеток МЗ каллусах обоих типов утолщаются и приобретают волокнистую структуру.

В ходе дальнейшего развития в МЗ каллусов обоих типов начинают отчетливо выделяться отдельные клетки с интенсивно окрашивающейся цитоплазмой, в то время как остальные клетки начинают сильно вакуолизироваться. В этих клетках присутствуют автофаговые вакуоли, по-видимому, обуславливающие их деструкцию. По данным ТЭМ клетки с плотной цитоплазмой в каллусах обоих типов характеризуются наличием хорошо развитого гЭПР. Митохондрии многочисленны, имеют хорошо развитую систему крист. В пластидах содержится большое количество крахмала, кроме того, в клетках андроклинного каллуса также содержится большое количество липидов. Такие данные позволяют говорить о том, что в этих клетках идет синтез конституционных веществ, необходимых для процессов, связанных с энергетическими затратами. В целом, эти клетки обладают всеми признаками, характерными для эмбриогенных клеток [9, 10, 14].

Светооптический анализ показывает, что именно в этих изолированных клетках с плотной цитоплазмой происходят деления, ведущие к формированию эмбриоидов. Одноклеточное происхождение эмбриоидов доказывается и данными ультраструктурного анализа: выявлено, что эмбриоиды в каллусах обоих типов окружены утолщенной оболочкой без плазмодесм, тогда как стенки между клетками эмбриоидов тонкие и содержат многочисленные плазмодесмы. Утолщенная оболочка, окружающая эмбриоиды, сохраняется и в ходе их дальнейшего развития и на светооптическом уровне выявляется в виде интенсивно окрашивающегося слоя полисахаридной природы, отделяющего формирующиеся эмбриоиды от массы каллуса.

### **Выводы**

Полученные нами данные свидетельствуют, что эмбриоиды в каллусах как андроклинного, так и зародышевого происхождения имеют одноклеточное происхождение из отдельных изолированных клеток. Однако изолированность клеток в каллусах различного происхождения достигается по-разному.

В клетках андроклинных каллусов в формировании клеточных стенок, по-видимому, активное участие принимает аЭПР, участие которого в формировании клеточных стенок считается вполне вероятным [5]. В зародышевом каллусе действует другой механизм изоляции клеток — за счет секреторной активности АГ.

В целом выявленное одноклеточное происхождение эмбриоидов в каллусах пшеницы разного происхождения позволяет рассматривать эмбриогенез как оптимальный путь регенерации растений и является основой

для создания биотехнологий клонирования хозяйственно ценных генотипов яровой мягкой пшеницы — основного хлебного злака.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории физиологии и генетики культивируемых клеток Казанского института биохимии и биофизики Казанского ИЦ РАН за помощь в проведении электроно-микроскопических исследований.

*Исследование поддержано грантом РФФИ-Поволжье (грант № 08-04-97045) и программой “Ведущие научные школы РФ” (грант №НШ 2096.2008.4).*

### Литература

1. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы.— М.: Изд-во МГУ, 2004.— 312 с.
2. Гайер Г. Электронная гистохимия.— М., 1974.— 341 с.
3. Катасонова А.А. Оптимизация технологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы в каллусной культуре *in vitro*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук.— Уфа: Институт биологии УНЦ РАН, 2007.— 25 с.
4. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы.— Уфа: ИБ УНЦ РАН, 2002.— 39 с.
5. Наумова Т.Н. Ультраструктурные аспекты эмбриогенеза // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции: Т.2. Семья / Ред. Т.Б. Батыгина. СПб.: Мир и семья, 1997.— С. 557–567.
6. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас / Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А.— М.: Наука, 2005.— 99 с.
7. Шаяхметов И.Ф. Соматический эмбриогенез и селекция злаковых культур.— Уфа: Изд-во Башкирск. ун-та, 1999.— 165 с.
8. Advances in haploid production in higher plants / Eds. Touraev A., Forster B.P., Jain S.M.— Springer Netherlands, 2009.— 347 p.
9. Feher A. Why somatic plant cell start to form embryos? // Plant Cell Monogr.— 2005.— V.2.— P. 85–101.
10. Namasivayam P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis // Plant Cell, Tiss. Org. Cult.— 2007.— V.90, №1.— P. 1–8.
11. Plant biotechnology and molecular markers / Eds Srivastava P.S., Narula A., Srivastava S.— New Delhi: Anamaya Publishers, 2004.— 325 p.
12. Plant cell and tissue culture — a tool in biotechnology. Basics and application / Eds. Neumann K.-H., Kumar A., Imani J.— Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2009.— 333 p.
13. Sussex I.M. The scientific roots of modern plant biotechnology // Plant Cell.— 2008.— V.20, №5.— P. 1189–1198.
14. Yeung E.C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis // *In vitro* embryogenesis in plants / Ed. T.A. Thorpe.— Dordrecht, Boston, London: Kluwer Acad. Publish., 1995.— P. 205–248.

### Резюме

Методами световой и трансмиссионной электронной микроскопии выявлено одноклеточное происхождение эмбриоидов в каллусах андроклинического и зародышевого происхождения у яровой мягкой пшеницы.

The single-cell origin of emryoids in androclonic and embryo-derived calli of spring wheat have been revealed by light and transmission electron microscopy.

СПИВАК Н.Я.<sup>1</sup>, СИНДАРОВСКАЯ Я.Р.<sup>2</sup>, ЛОЗОВАЯ О.И.<sup>1</sup>, САХНО Л.А.<sup>2</sup>,  
ГЕРАСИМЕНКО И.М.<sup>2</sup>, ОЛЕВИНСКАЯ З.М.<sup>1</sup>, ДИДЕНКО Л.Ф.<sup>1</sup>,  
ШЕЛУДЬКО Ю.В.<sup>2</sup>, КУЧУК Н.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Заболотного 154, г. Киев, 03680, Украина; e-mail: Spivak@serv.imv.kiev.ua

<sup>2</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,  
ул. Заболотного 148, г. Киев, 03680, Украина e-mail: ysheludko@ukr.net

## ИССЛЕДОВАНИЕ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА ОЖОГА ГРЕЧИХИ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА 2b ЧЕЛОВЕКА

Вирусные болезни растений являются важной проблемой сельского хозяйства. Вирусы способны резко снижать урожайность и ухудшать качество продукции ценных сельскохозяйственных культур. К настоящему времени разработаны новые подходы к стратегии защиты растений от вирусной инфекции, одним из которых является изучение развития вирусной инфекции в растительном организме, экспрессирующем ген интерферона человека. Интерфероны являются неспецифическими факторами защиты клеток от широкого спектра ДНК- и РНК-содержащих вирусов животных [1]. Существуют также данные, что интерферон после экзогенной обработки может повышать устойчивость растительных клеток к вирусным заболеваниям [2-4]. Антивирусный эффект был продемонстрирован и в результате экспрессии генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -интерферона в трансгенных растениях [5, 6]. С другой стороны, в ряде работ отмечено отсутствие достоверного защитного эффекта интерферона в растительных клетках [7, 8].

Целью настоящей работы являлось изучение восприимчивости растений табака, экспрессирующих ген интерферона человека, к фиторабдовирусу — вирусу ожога гречихи (ВОГ). Интерес использования минус-генного ВОГ мотивирован тем, что механизм его репродукции отличается от ранее изученных плюс-генных фитовирусов. Кроме того, ВОГ поражает ценные сельскохозяйственные культуры, в том числе гречиху, картофель, томаты, табак [9]. Полученные данные могут указать возможный механизм приобретения вирусостойчивости растений к фиторабдовирусам. В работе также было исследовано влияние вирусной инфекции на продукцию рекомбинантного интерферона в трансгенных растениях табака. Исследование накопления целевого белка при развитии вирусной инфекции в трансгенных растениях имеет значение для промышленной биотехнологии.

### Материалы и методы

В работе использованы растения табака *Nicotiana tabacum* сорта Wisconsin, несущие рекомбинантный (с растительным сигналом выведения белка в апопласт) или нативный ген интерферона альфа 2b человека (*inf b2b*) [10] и растения табака, несущие, помимо гена *inf b2b* (с растительным транспортным сигналом), ген *cry3A* (устойчивость к насекомым). Исполь-