

УДК 576, 577

ПОЛУЧЕНИЕ ЭМБРИОГЕННОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ *PAPAVER RUPIFRAGUM* BOISS. & REUT. И ЕЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**Н.И. Румянцева^{1,2}, Ю.А. Костюкова¹, М.В. Агеева¹**¹ КИББ ФИЦ КазНЦ РАН² КФУ**Введение**

Методы культуры клеток и тканей широко используются не только для оздоровления и микроклонального размножения растений, но и для получения клеточных культур суперпродуцентов вторичных метаболитов. Мак скалоломный *Papaver rupifragum* Boiss. & Reut. привлекает внимание исследователей как декоративное многолетнее растение с крупными оранжевыми цветами, а также как потенциальный источник лекарственных соединений. Представители рода *Papaver* синтезируют алкалоиды различного типа, разнообразные фенольные соединения (ФС) и эфирные масла, которые имеют широкий спектр биологической активности и могут оказывать анальгезирующее, противомикробное, противовирусное, антидиабетическое и другое действие [1]. Методы получения и культивирования клеточных культур разработаны для многих видов мака: *P. somniferum* [2–4], *P. bracteatum* [5, 6], *P. somniferum album*, *P. orientale splendidissimum* [4]. Отмечено, что лишь эмбрионные клеточные культуры *Papaver* обладают способностью к синтезу алкалоидов. Сведений о получении клеточных культур *P. rupifragum* нам не известно. Поэтому в задачи нашей работы входило получение эмбрионного каллуса *P. rupifragum*, его цитологическое изучение и гистохимическая характеристика соединений, синтезируемых в каллусе.

Материалы и методы

Семена *Papaver rupifragum* Boiss. & Reut. были получены из Ботанического сада лекарственных растений КГМУ. Для получения каллуса семена стерилизовали 2 мин в этиловом спирте, 10 мин в 45 % растворе “Белизны” и трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Проростки выращивали на среде MS [7] без гормонов, на свету. Через две недели проростки с корнями переносили на среду MS с добавлением 1 мг/л ИМК. Каллус, сформировавшийся на корнях, и эмбриониды на этом каллусе переносили на среду MS без гормонов. Дальнейшее субкультивирование каллуса с эмбрионидами проводили на этой же среде каждые 30 сут. Гистологические исследования выполняли на образцах каллуса и эмбрионидов, зафиксированных в эпоксидную смолу Epon 812, по методике, описанной ранее [8]. Электронно-микроскопические (ЭМ) исследования проводили на микроскопе (“Hitachi 7800”, Япония). Прижизненное исследование каллусной культуры осуществляли на препаратах, приготовленных на вибраторе VT100S (“Leica”, Германия) как описано ранее [8]. Срезы окрашивали толуидиновым синим (ТС) и Суданом III по общепринятой методике, локализацию терпенов определяли с помощью реактива NADI [9]. Депонирование алкалоидов изучали в УФ, на микроскопе Axio Scope A1 (“Carl Zeiss”, Германия), $\lambda=365$ nm. Срезы изучали с помощью микроскопа Jenamed (“Carl Zeiss”, Германия), используя программное обеспечение Axiovision Rel 4.6, и фотографировали с помощью цифровой камеры Axio Cam MRc5 (“Carl Zeiss”, Германия).

Результаты

Образование светло-коричневого каллуса наблюдали на корнях проростков *P. rupifragum* через две недели их культивирования на среде MS с добавлением 1 мг/л ИМК. Белые блестящие уплотнения на поверхности каллуса появлялись через 1–2 месяца (Рис. 1а, б). Проведенные гистологические исследования позволяют рассматривать первичные белые уплотнения как аномально развивающиеся эмбриониды (Рис. 1в, г). При последующем культивировании уплотнений на среде с ИМК в них происходила дифференцировка апикального и базального полюсов с образованием биполярной структуры (Рис. 1в), характерной для соматических зародышей, но дальнейшее развитие у эмбрионидов получал только апекс стебля. На среде с ИМК дифференцировка сосудистой системы в эмбриоидах была нарушена, наблюдали разрастание центральной зоны эмбриоида за счёт деления паренхимных клеток. При переносе на безгормональную среду MS уплотнения каллусировали, образуя мягкий ослизненный каллус (Рис. 1б).

Разрыхление уплотнений и формирование каллуса происходило в результате деления центральных паренхимных клеток, гибели и лизиса клеток протодермы. Новые эмбриониды возникали преимущественно из субповерхностных клеток. На Рис. 1б показано, что вновь возникающие эмбриониды лежат на поверхности каллуса, находятся на разных стадиях развития и покрыты слизистым секретом (Рис. 1б). Судя по многочисленности инициации новых эмбрионидов (Рис. 1б), к эмбриогенному развитию способно большое число клеток первичного каллусирующего эмбриоида.

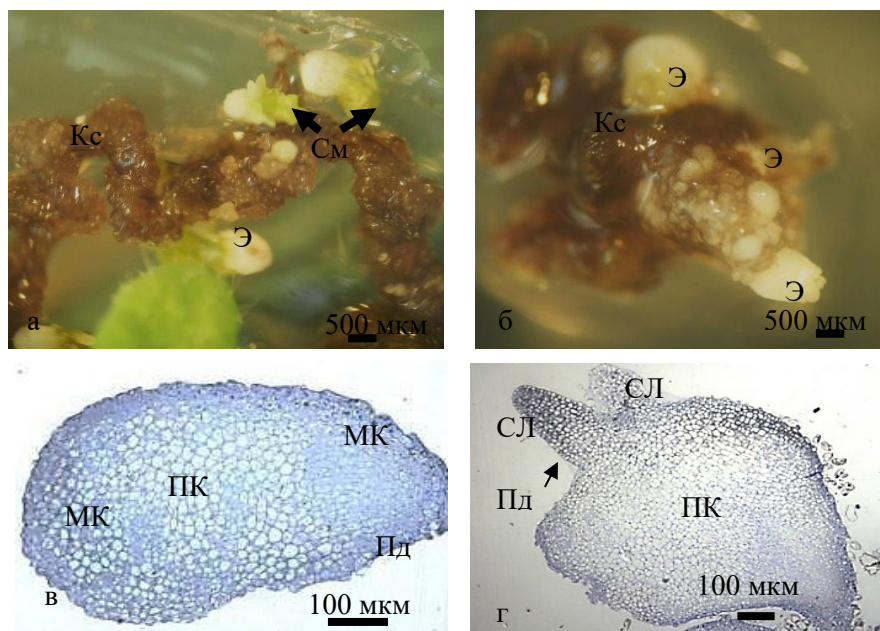


Рис. 1. Инициация каллусной ткани (а, б) и гистологическое изучение эмбрионидов (в, г) в первичном каллусе *P. rupifragum*. Кс – каллус, МК – меристематическая ткань, Пд – протодерма (указана стрелкой), СЛ – семядольные листья, Э – эмбриониды

Дальнейшее развитие эмбрионидов имело свои особенности. На среде MS мы очень редко наблюдали развитие отдельных зародышей, но отмечали образование своеобразных “луковок”, состоящих из “зубков”, представленных эмбриодами на стадии торпедо или формирования семядолей, и слитых боковыми стенками (Рис. 2а, в). Для таких структур мы ввели термин “комплексы слитых эмбрионидов” (КСЭ). Поперечный срез каллуса с КСЭ на разных стадиях развития показывает, что культура имеет гетерогенную структуру и образована мелкими глобулами (50–70 мкм), средними глобулами (200–300 мкм), крупными глобулами (около 1 мм), а также каллусными клетками между ними и вокруг них (Рис. 2а, б). Крупная глобула на рис. 2б является поперечным срезом КСЭ (Рис. 2а). Эпидермальные клетки, отделяющие эмбриониды друг от друга в КСЭ, фрагментарны. На продольном срезе КСЭ отчетливо видимый эпидермис характерен только для развивающихся семядолей; в базальной части КСЭ эпидермис фрагментарный (Рис. 2г). Развитие корней у КСЭ отсутствует. При субкультивировании на среде MS на свету в течение 1 месяца происходило развитие эмбрионидов от стадии глобулы до семядольной стадии и образования розеток листьев, ризогенез отсутствовал. Затем, “слившаяся” нижняя часть КСЭ каллусировала с образованием новых адвентивных эмбрионидов (Рис. 2б). Формирование новых эмбрионидов происходило преимущественно из субэпидермальных клеток КСЭ (Рис. 2б). Разрыхление базальной части КСЭ и образование новых глобулярных эмбрионидов сопровождалось выделением секрета, формирующего слой вокруг эмбрионидов (Рис. 2б, 3а-в). Поверхностная сеть экстраклеточного матрикса (ПСЭКМ), образованная секретирруемыми соединениями различной природы – морфологическая структура, характерная для проэмбрио и глобулярных эмбрионидов разных видов растений [10]. Проведённое нами гистохимическое исследование выявило, что в состав ПСЭКМ входят полисахариды, которые окрашиваются ТС в розовый цвет (Рис. 3а), а также вещества липофильной природы, которые окрашиваются Суданом III в оранжевый цвет (Рис. 3б). На электронной фотографии видно, что ПСЭКМ имеет нитчатую и мелкоглобулярную структуру (Рис. 3в)

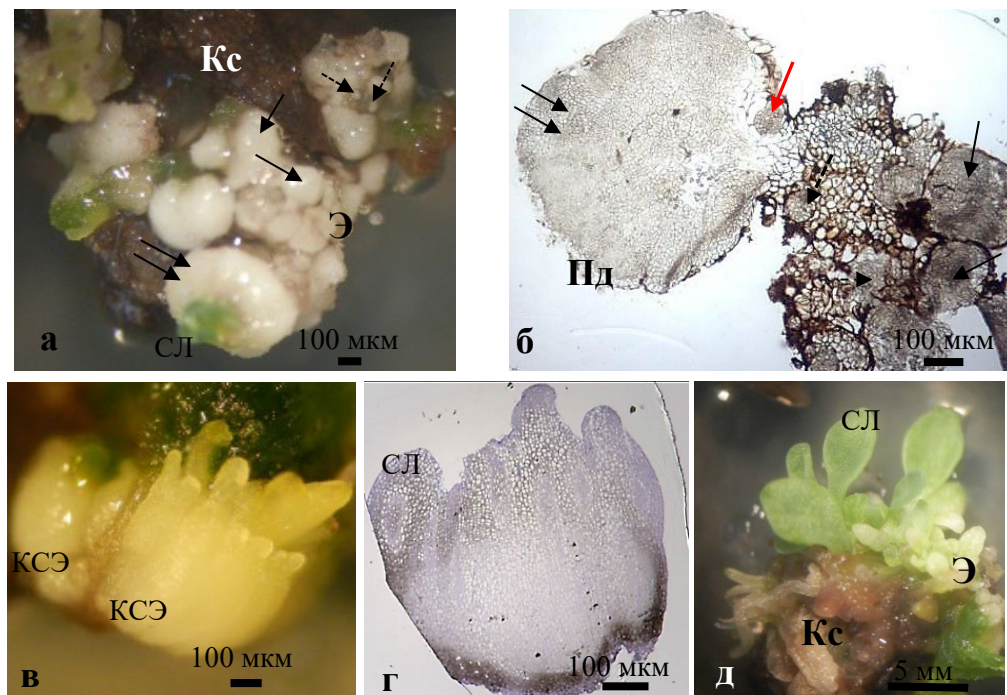


Рис. 2. Внешний вид каллуса и эмбриоидов *P. rupifragum* на разных стадиях развития (а, в, д) и их гистологические срезы (б, г). Кс – каллус, КСЭ – комплекс слитых эмбриоидов, Пд – протодерма, СЛ – семядольный лист, Э – эмбриоид; пунктирной стрелкой указаны мелкие глобулы, одной сплошной стрелкой – средние глобулы, двумя стрелками – КСЭ. Адвентивный эмбриоид указан красной стрелкой

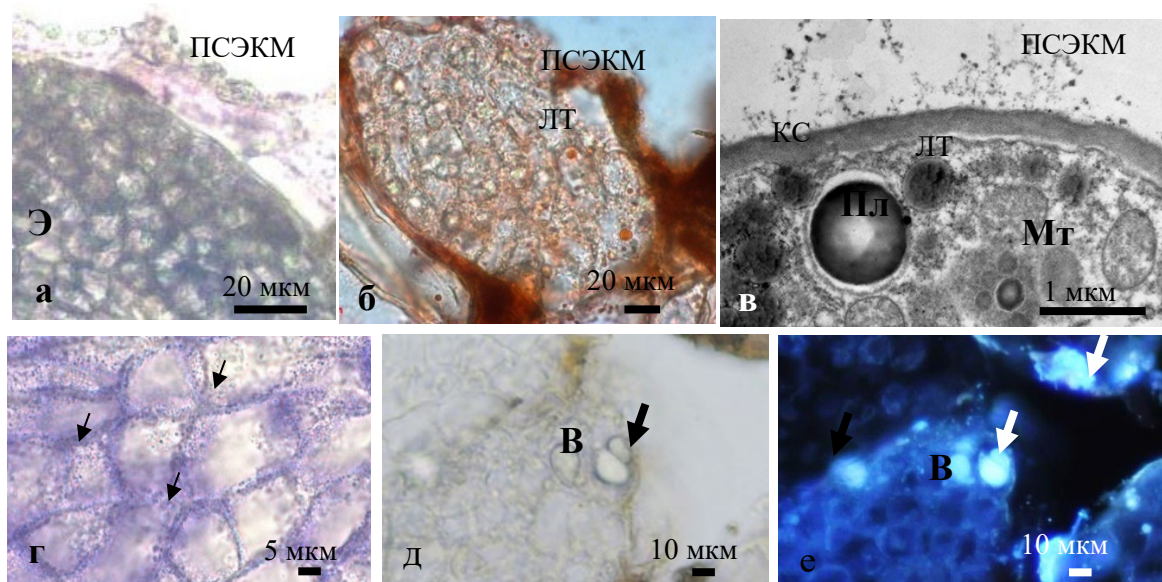


Рис. 3 Гистохимическое (а, б, г-е) и электронно-микроскопическое (в) изучение клеток эмбриоидов *P. rupifragum*. Ам – амилопласты, В – вакуоли, КС – клеточная стенка, ЛТ – липофильные тельца, М – митохондрия, ПСЭКМ – поверхностная сеть экстраклеточного матрикса. Тонкими стрелками указаны вакуоли, окрашиваемые реактивом NADl, толстыми стрелками – вакуоли, содержимое которых аутофлуоресцирует в УФ (д – проходящий свет, е – УФ).

Гистохимическое изучение показало, что в клетках эмбриоидов накапливаются как липофильные соединения, окрашиваемые Суданом III (Рис. 3б), так и терпены, окрашиваемые реактивом NADl (Рис. 3г) [9] (Рис. 3а, б, в). При этом оба реактива окрашивают в клетках мелкие округлые структуры (Рис. 3б, г). Известно, что липофильными соединениями могут быть либо эфирные масла, в состав которых входят терпены, либо жирные масла, основу которых составляют триглицериды. Но только терпены окрашиваются реактивом NADl. В вакуолях отдельных поверхностных клеток разрыхляющихся эмбриоидов при изучении в УФ выявляется автофлуоресценция вакуолярного содержимого, что может свидетельствовать о накоплении алкалоидов (Рис. 3д, е) [11]. Изучение ультраструктуры клеток эмбриоидов выявило, что липофильные тельца разной плотности и разного размера обнаруживаются в цитоплазме как протодермы, так и субповерхностных клеток (Рис. 4). В этих клетках также присутствуют крупные и мелкие вакуоли с чёрным осmioфильным преципитатом (Рис. 4а), возможно, фенольными соединениями, т. к. известно, что OsO_4 имеет к ним высокое сродство. Цитоплазма клеток плотная, в амилопластах – 3–5 крупных зерен крахмала. Митохондрии активные; цистерны ЭР многочисленные (Рис. 4б). На поверхности протодермы видна ПСЭКМ. Полученная каллусная культура сохраняет способность к формированию эмбриоидов на безгормональной среде MS более пяти лет.

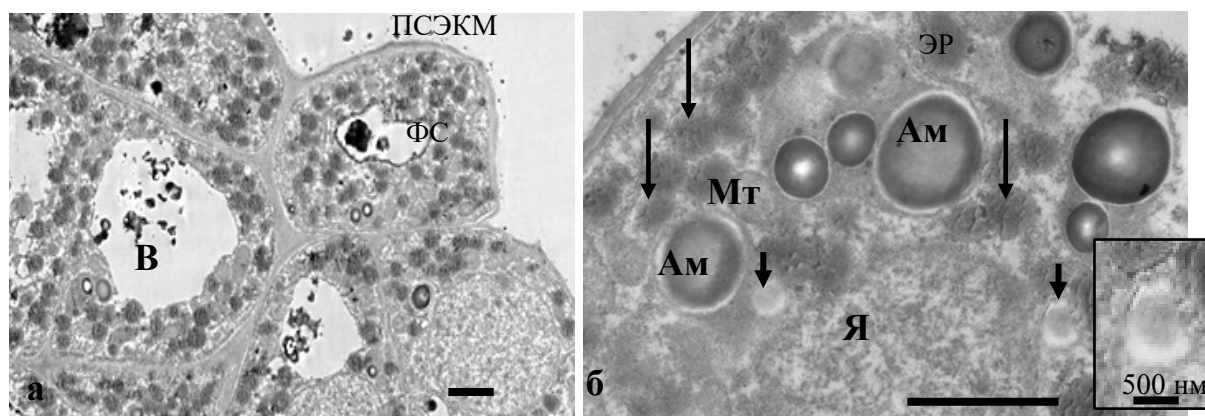


Рис. 4 Электронно-микроскопическое изучение эмбриоидов *P. rupifragum*. Ам – амилопласт, В – вакуоль, Мт – митохондрия, ПСЭКМ – поверхностная сеть экстраклеточного матрикса, ФС – фенольные соединения, Я – ядро. Стрелками разной длины указаны липофильные тельца различной плотности, масштабная линейка соответствует 2 мкм

Дискуссия

Проведенные исследования показали, что клеточная культура *P. rupifragum* является эмбриогенной и имеет гетерогенную структуру, поскольку состоит из каллусных клеток и эмбриоидов на разных стадиях развития. Получение такой культуры для *P. rupifragum* было описано впервые. Поддержание культуры происходит в результате повторяющихся циклов адвентивного эмбриодогенеза на безгормональной среде MS. Эмбриодогенно-компетентными являются отдельные субповерхностные клетки (или группы клеток) предсущствующего эмбриоида, в то время как остальная часть клеток эмбриоида подвергается каллусированию и, возможно, гибели. Особенностью гетерогенной культуры *P. rupifragum* является формирование многочисленных плотно прилегающих друг к другу или срастающихся (слитых) эмбриоидов. Образование КСЭ может быть обусловлено заложением нескольких близко локализованных клеток-инициалей и их синхронным эмбриодогенным развитием. Не исключено также, что в одном проэмбрио может формироваться несколько центров инициации вторичных проэмбрио. Кливажная полиэмбриония как бесполое формирование нескольких зародышей из отдельных клеток зиготического зародыша на его ранних стадиях развития описана для зародышей *in vivo* [12]. Есть достоверные доказательства, что кливажная полиэмбриония на стадии проэмбрио наблюдается в эмбриогенных культурах голосеменных [13]. Прямое образование эмбриоидов (без стадии каллуса) в культурах с повторяющимся циклами адвентивного эмбриодогенеза также может рассматриваться как пример кливажной полиэмбрионии.

Формирование эмбриоидов *P. rupifragum* сопровождалось развитием фибриллярной ПСЭКМ [14], описанной для эмбриогенных культур различных видов растений. Ранее ПСЭКМ, в состав которой входили арабиногалактановые белки и полисахариды, была обнаружена нами в эмбриогенном каллусе *F. tataricum* [15]. Гистохимически было показано, что в состав ПСЭКМ каллуса *P. rupifragum* входят полисахариды и соединения липофильной природы. Ранее липиды были идентифицированы в ПСЭКМ андрогенного каллуса пшеницы и камелии [16]. Предположительно, часть веществ, составляющих ПСЭКМ, имеет внутриклеточную природу и накапливается экстраклеточно в результате разрушения и гибели клеток каллусирующих эмбриоидов, богатых липофильными соединениями. Возможными функциями ПСЭКМ может быть контроль межклеточной адгезии, поддержание водного баланса, а также определенная организующая функция на ранних этапах дифференцировки соматических зародышей [16]. Как было уже отмечено, для эмбриоидов *P. rupifragum* было характерно накопление соединений липофильной природы. Известно, что семена маковых обогащены триглицеридами, жирными кислотами, токоферолом, предшественником которого является дитерпен фитол [1]. Синтез и накопление триглицеридов были описаны для эмбриогенных каллусов *P. somniferum* и *P. oriental* [17]. По мнению авторов, синтезируемые липиды выполняют энергетическую функцию, так как их содержание в клетках значительно снижалось при прорастании зародышей. Необходимо отметить, что липофильные соединения, накапливающиеся в семенах представителей рода *Papaver*, определяют ценность этого растения для пищевой и косметической промышленности [18]. В семенах мака накапливаются как насыщенные (пальмитиновая, стеариновая), так и полиеновые (линолевая, олеиновая, альфа-линоленовая) жирные кислоты. Наши исследования позволяют предположить, что эмбриогенный каллус *P. rupifragum* синтезирует не только липиды, но и терпены. Состав терпенов у маковых изучен слабо. В нескольких работах показано, что фитол – наиболее часто встречающийся терпен у маковых [1]. В листьях *P. rhoeas* выявлены терпен-содержащие стероиды и сесквитерпены [19].

Растения *P. rupifragum* способны к синтезу алкалоидов реадина, протопина, реагенина, магнофлорина [20]; в маке *P. atlanticum* доминирующими алкалоидами являются протопин и реадин [21]. Гистологические исследования эмбриоидов *P. rupifragum* не обнаружили млечников или других специализированных клеток, однако, ЭМ исследование клеток выявило вакуоли различной плотности. Согласно исследованиям Kutchan [5], накопление алкалоидов в тканях мака может происходить не только в специализированных структурах, но и в вакуолях. Было показано, что накопление сангвинарина и допамина в культуре клеток *P. bracteum* [5] и сангвинарина в культуре клеток *P. somniferum* [11] происходит в вакуолях. Изучение аутофлуоресценции клеточной культуры *P. rupifragum* в УФ позволяет предположить, что она обладает способностью к синтезу алкалоидов. Это предположение требует дальнейших биохимических исследований.

Заключение

Впервые получена эмбриогенная клеточная культура *P. rupifragum* при культивировании корней асептически выращиваемых растений на среде с 1 мг/л ИМК. Поддержание культуры осуществляется на безгормональной среде MS в результате адвентивного эмбриоидогенеза. Гистохимические исследования показали, что эмбриоиды синтезируют и накапливают липиды, ФС, эфирные масла, терпены и, возможно, алкалоиды. Полученная культура сохраняет способность к формированию эмбриоидов на безгормональной среде MS более пяти лет и может являться основой для дальнейшей разработки методов микроклонального размножения *P. rupifragum* и получения ценных лекарственных соединений.

Работа была выполнена в рамках Госзадания Казанского института биохимии и биофизики ФИЦ Казанского научного центра РАН (№ АААА-А18 – 118022790083–9). Измерения выполнены с использованием оборудования Распределенного коллективного спектро-аналитического Центра изучения строения, состава и свойств веществ и материалов ФИЦ КазНЦ РАН.

Литература

1. Butnariu M., Quispe C., Herrera-Bravo J. et al. Papaver Plants: Current insights on phytochemical and nutritional composition along with biotechnological applications // Hindawi oxidative medicine and cellular longevity. – 2022. – V. 2022, doi:10.1155/2022/2041769.
2. Nessler C. Somatic embryogenesis in the opium poppy *Papaver somniferum*. // Physiologia Plantarum. – 1982. – 55(4). – P. 453–458. doi:10.1111/j. 1399–3054.1982.tb04526.x.
3. Ovečka M., Bobák M., Blehová A., Křištín J. *Papaver somniferum* regeneration by somatic embryogenesis and shoot organogenesis // Biologia Plantarum. – 1997. – 40(3). – P. 321–328. doi:10.1023/a:1001049526976.
4. Kassem M., Jacquin A. Somatic embryogenesis, rhizogenesis, and morphinan alkaloids production in two species of *Opium poppy* // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2001. – 1(2). – P. 70–78. doi:10.1155/s1110724301000237.
5. Kutchan T., Ayabe S., Coscia C. Cytodifferentiation and papaver alkaloid accumulation // The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids. – 1985. – P. 281–294. doi:10.1007/978-3-642-70128-3_19.
6. Cline S., Coscia C. Ultrastructural changes associated with the accumulation and secretion of sanguinarine in *Papaver bracteatum* suspension cultures treated with fungal elicitor // Planta. – 1989. – 178(3). – P. 303–314. doi:10.1007/bf00391858.
7. Murashige Y., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Physiol. Plantarum. – 1962. – V.15. – P. 473–497.
8. Акулов А. Н, Костюкова Ю.А. Условия культивирования, гистологический и биохимический анализ каллусной культуры солодки *Glycyrrhiza glabra L* // Цитология. – 2021. – Т. 63. – № 6. – С. 590–604.
9. Demarco, D. Histochemical analysis of plant secretory structures // Histochemistry of single molecules. – 2017. – P. 313–330. doi:10.1007/978-1-4939-6788-9_24.
10. Šamaj J, Bobák M, Blehová A, Křištín J, Auxtová-Šamajová O. Developmental SEM observations on an extracellular matrix in embryogenic calli of *Drosera rotundifolia* and *Zea mays* // Protoplasma. – 1995. – V. 186. – P. 45–49
11. Alcantara J., Bird D., Franceschi V., Facchini P. Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured *Opium poppy* cells after elicitor treatment // Plant Physiology. – 2005. – 138(1). – P.173–183. doi:10.1104/pp.105.059287.
12. Батыгина Т.Б., Виноградова Г.Ю. Феномен полиэмбрионии. Генетическая гетерогенность семян // Онтогенез. – 2007. – Т. 38. – № 3. – С. 166–191.
13. Filonova L., Bozhkov P., Arnold S. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking // Journal of Experimental Botany. – 2005. – 51(343). – P. 249–264. doi:10.1093/jexbot/51.343.249
14. Румянцева Н.И. Арабиногалактановые белки: участие в росте и морфогенезе растений // Биохимия. – 2005. – Т. 70. – № 10. – С. 1301–1317.
15. Румянцева Н.И., Шамай Ё., Энзикат Х. – Ю., Сальников В.В., Фолькманн Д. Изменение поверхностной сети экстраклеточного матрикса в процессе циклического воспроизводства проэмбриональных клеточных комплексов в каллусе *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. // Докл. Акад. Наук. – 2003. – Т. 391. – № 1. – С. 123–127.
16. Konieczny R., Bohdanowicz J., Czaplicki A., Przywara L. Extracellular matrix surface network during plant regeneration in wheat anther culture // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2005. – 83(2). – P. 201–208. doi:10.1007/s11240-005-5771-9.
17. Schuchmann R. Wellmann E. Somatic embryogenesis of tissue cultures of *Papaver somniferum* and *Papaver orientale* and its relationship to alkaloid and lipid metabolism // Plant Cell Reports. – 1983. – 2(2). – P. 88–91. doi:10.1007/bf00270173.
18. Lančaričová A., Havrlentová M., Muchová, D., Bednářová, A. Oil content and fatty acids composition of poppy seeds cultivated in two localities of Slovakia // Agriculture (Polnohospodárstvo). – 2016. – 62(1). – P. 19–27. doi:10.1515/agri-2016-0003.
19. Christodoulakis S., Tsiarta M., Fasseas C. Leaf structure and histochemical investigation in *Papaver rhoeas* L. (Corn Poppy, Field Poppy) // Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants. – 19 (2). – P. 119–131. doi: 10.1080/10496475.2012.755942
20. Slavíková L., Slavík J. Alkaloids from *Papaver rupifragum* Boiss. et Reut. // Collection of Czechoslovak chemical communications. – 1980. – 45. – P. 761–763. doi:10.1135/ccc19800761.
21. Tábořská E., Bochořáková H., Věžník F. et al. Alkaloids from *Papaver atlanticum* Ball and *Papaver glaucum* Boiss. et Hauskn // Collection of Czechoslovak Chemical Communications. – 1986. – 51(10). – P. 2232–2239. doi:10.1135/cccc19862232.