

Министерство образования и науки Украины  
Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина  
Биологический факультет  
кафедра молекулярной биологии и биотехнологии

Реферат

по курсу «Получение и использование каллусных культур»

по теме: «Эпигенетическая регуляция у растений: морфогенез *in vitro*»

Выполнила:  
студентка 5 курса  
биологического факультета  
группы БМ — 51  
Потапова Валерия Игоревна

Проверила:  
к.б.н., доцент,  
Авксентьева Ольга Александровна

Харьков 2019

## Содержание

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Морфогенез растений in vitro.....                                   | 3  |
| 2. Эпигенетика растений.....                                           | 5  |
| 3. Взаимосвязь эпигенетической регуляции у растений и морфогенеза..... | 8  |
| 4. Выводы.....                                                         | 32 |
| 5. Список использованной литературы.....                               | 33 |

# 1. Морфогенез растений *in vitro*

Каллюс в условиях *in vitro* представляет собой ткань, состоящую из дедифференцированных клеток, характеризующихся постоянным неорганизованным ростом и пролиферацией.[1]

Каллюсные ткани способны образовываться практически из любой части растения: из асептически проросшего семени, отрезков стеблей и корней, изолированной паренхимы корнеплода, изолированной сердцевины стеблей, из тканей, которые содержат камбий (стебель и корень), из листьев, органов цветка, зародышей, плодов.[2]

Развитие каллусной ткани *in vitro* может осуществляться в трех различных направлениях. Первый путь — это стойкая дифференцировка. Клетки приобретают способность расти на среде без гормонов, т. е. становятся гормоннезависимыми культурами и превращаются в опухолевые, т. е. постоянно делящиеся клетки.[2]

Второй путь — это развитие в стабильную каллусную ткань, которое заканчивается старением и отмиранием. По сути клетки претерпевают вторичную дифференцировку и прекращают делиться после достижения стационарной фазы роста. Подобная дифференцировка не ведет к морфогенезу, а приводит к старению каллусной ткани.[2]

Третий путь — это вторичная регенерация целого растения, т. е. морфогенез (возникновение организованных структур из неорганизованной клеточной массы). Морфогенез может проходить по типу органогенеза (образования отдельных органов, из которых формируется целое растение) и соматического эмбриогенеза (в этом случае сразу образуется зародыш (имеет меристему корня и меристему верхушечной почки), а из него развивается целое растение).[2]

Итак, под морфогенезом понимают образование и дифференциацию тканей и органов многоклеточного организма. Морфогенетические модели растений *in vitro* базируются на свойстве тотипотентности – способности одной клетки развиваться в целый организм, обладание ею всеми потенциями будущего организма. В основе тотипотентности растительных клеток лежит факт сохранения в них полной базовой структуры ДНК индивидуума в ходе дифференциации и специализации составляющих его клеток и тканей. Тотипотентность меристематических клеток реализуется в ходе их деления и дифференциации, тогда как тотипотентность специализированных клеток реализуется посредством дедифференциации с последующей новой дифференциацией. В основе де- и дифференциации клеток лежат процессы, связанные с изменением состояния хроматина и изменением дифференциальной активности генов.[5]

На процесс морфогенеза каллусной ткани оказывают влияние как внутренние, так и целый ряд внешних факторов. Наиболее существенными внутренними факторами, влияющими на дифференцировку, являются видовая принадлежность растения, из которого выделен эксплантат и орган, из которого был получен эксплантат. [2]

К внешним факторам, влияющим на морфогенез, необходимо отнести: состав питательной среды, температуру, световой режим. Наиболее сложным фактором морфогенеза является соотношение между цитокининами и ауксинами, которые входят в состав питательных сред.[2]

Пути морфогенеза *in vitro* могут быть классифицированы следующим образом:

- 1) Эмбриогенез, или культура зародышей, представляет собой стерильную культуру зиготических зародышей. Зародыш изолируют из семени

или семяпочки и помещают в искусственные условия, заменяющие эндосперм. Последующее развитие и прорастание зародыша происходит так же, как это было бы в семени.

2) Соматический эмбриогенез, или эмбриоидогенез представляет собой процесс формирования зародышевых структур из соматических клеток. Соматический зародыш (эмбриоид) – это независимая двухполюсная структура, не соединенная сосудами с тканью, из которой происходит. Возникает эмбриоид из глобулярного проэмбрио. Такие зародыши в дальнейшем могут развиваться и прорасти в регенеранты через стадии, соответствующие тем, что встречаются при развитии зиготы.

3) Органогенез – появление и рост побегов из каллуса или инициация и рост побегов из пазушных почек, развивающихся на культивируемых верхушках побегов и образовавших впоследствии адвентивные корни (гемморизогенез). Органогенез подразделяется на геммогенез - образование почек, и ризогенез – образование корней. Побег и корень – это однополюсные структуры, физически связанные с тканью, из которой они происходят. Иногда начало побегам могут дать корни. Масса клеток, возникшая из детерминированных клеток, называется меристематическим очагом, если затем в ней дифференцируются зачатки стебля или корня.

4) Гистогенез – процесс формирования тканей.[1]

## **2. Эпигенетика растений**

Активность генов зависит не только от факторов транскрипции, специфичных для данного гена, но также от целого комплекса факторов, способных прямо или косвенно влиять на структуру хроматина . Поэтому у эукариотов важные элементы развития находятся также и под эпигенетическим контролем.[6]

Эпигенетика изучает стабильные, передаваемые в длинном ряду клеточных делений и даже в ряду поколений изменения уровня экспрессии генов, не связанные с изменениями последовательности нуклеотидов в ДНК. [6]

Эпигенетический статус организма определяется характером и уровнем метилирования ДНК, посттрансляционными модификациями гистонов, присутствием изоформ гистонов и характером укладки хроматина.[6]

### **Модификация ДНК**

Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов в основном реализуются посредством стойких модификаций хроматина в тех участках, где эти гены расположены. Эпигенетическая регуляция активности генов главным образом проявляется в их долгосрочной репрессии. Известно значительно меньше примеров стойкого повышения уровня генной экспрессии. Поэтому наиболее изучены именно механизмы эпигенетической репрессии, а не активации генов. Транскрипционное подавление генов достигается ремоделированием хроматина, метилированием ДНК и метилированием гистонов.[6]

Хроматин-ремоделирующий комплекс участвует в АТФ-зависимом скольжении гистоновых октамеров, составляющих ядро нуклеосом, вдоль

цепи ДНК. Таким образом, достигается реорганизация нуклеосомной структуры хроматина.[6]

Поскольку линкерная ДНК более доступна для транскрипции, чем нуклеосомная, уровень транскрипции многих генов может быть изменен самим фактом перемещения гистоновых октамеров вдоль молекулы ДНК. Работа хроматинремоделирующего комплекса необходима для дальнейших модификаций хроматина, главной из которых является метилирование ДНК – важнейшая детерминанта эпигенетики.[6,7]

Модификация гистонов. Еще одним эпигенетическим механизмом, позволяющим контролировать экспрессию генов, являются химические модификации гистонов.[6,7]

Гистоны в составе нуклеосомы имеют обращенные наружу N-концы полипептидов, которые могут подвергаться многочисленным модификациям. Эти модификации очень сильно влияют на уровень транскрипции генов, находящихся в контакте с модифицированными гистонами. Некоторые из этих модификаций, такие как фосфорилирование и, в меньшей степени, ацетилирование, носят динамичный характер.[6]

### **Участие малых РНК в регуляции экспрессии генов**

sРНК являются агентами РНК-интерференции, необходимой как для метилирования ДНК и гистонов, так и для устойчивой посттранскрипционной репрессии генов, передаваемой при клеточном делении как метастабильное состояние цитоплазмы.[6]

Малые РНК делятся на две большие группы: микроРНК (miRNAs) и малые интерферирующие РНК (short interfering RNAs, siRNAs).[6]

К микроРНК (miРНК) относятся эндогенные РНК, которые не кодируют белки и играют ключевую роль в подавлении экспрессии генов или путем расщепления транскриптов этих генов, или за счет блокирования

трансляции мРНК. Таким способом микроРНК могут контролировать уровень экспрессии почти половины известных генов, кодирующих синтез факторов транскрипции.[6,7]

Малые интерферирующие РНК (siРНК) способны осуществлять направленную деградацию или блокировать трансляцию РНК определенной последовательности и участвовать, таким образом, в регуляции экспрессии генов и защите генома от вирусов и транспозонов.[6]

МикроРНК могут передаваться по симпласту от клетки к клетке, а также передвигаться по флоэме на большие расстояния. Процесс РНК-интерференции играет важную роль не только в защите клеток от транспозонов и вирусов, но также в регуляции процессов развития и ряда других функций растительных организмов.[6,7]

### **3. Взаимосвязь эпигенетической регуляции у растений и морфогенеза**

Увеличение численности населения мира приводит к тому, что возникает дефицит достаточного количества продуктов питания и энергии. Использование методов размножения *in vitro* с целью разведения растений является одним из способов решения проблемы дефицита ресурсов. Это важные биотехнологические инструменты для массового производства растений (Лойола-Варгас и Очоа-Алехо 2012; Лойола-Варгас и Васкес-Флота 2006; Роберт и др. 1987). Методы культивирования растительных клеток и тканей *in vitro* являются основой многих программ разведения и микроразмножения, а также важны для научных исследований и биологических вопросов (Miguel and Marum 2011; Peña-Ramírez et al. 2012; Robert et al. 1992). Однако во время культивирования *in vitro* растения должны справляться с различными условиями микроокружения, такими как компоненты питательной среде, экзогенное добавление регуляторов роста растений, влажность и т. д. (Cassells and Curry 2001; Gaspar et al. 1996; Джойс и др. 2003). Клеточная пролиферация, ткани и формирование органов требуют высокой координации между несколькими факторами, такими как генетика и эпигенетика (Jaenisch and Bird 2003; Miguel и Marum 2011; Smulders and de Klerk 2011; Zhang and Ogas 2009; Zhao et al. 2001a). Важность эпигенетических изменений в условиях *in vitro* из-за уязвимости некоторых растений к этим условиям рассматривалась в разных системах (De-la-Pena et al. 2012; Fiuk et al. 2010; Joyce et al. 2003; Nic-Can et al. 2013). Некоторые авторы даже предложили рассматривать эпигенетику как биомаркер морфогенеза *in vitro* (Causevic et al. 2006).

Эпигенетика может быть определена как ковалентные модификации, происходящие в хроматине, позволяющие клеткам поддерживать

определенные различные характеристики, несмотря на то, что они содержат один и тот же генетический материал. Если хроматин плотно упакован из-за метилирования ДНК и / или модификаций гистонов, гены, которые находятся в зоне гетерохроматина, не будут доступны для механизма транскрипции. Как следствие, определенный ген или гены будут молчать или их экспрессия будет заметно снижена (Cheung and Lau 2005; Paszkowski and Whitham 2001; Wolffe and Matzke 1999). Эпигенетические механизмы сохраняют активные или репрессивные состояния (Cheung и Лай 2005; Финнеган и соавт. 1998), поддерживая полное молчание экспрессируемых генов или активируя гены, которые были заглушены ранее. Сегодня эпигенетика позволяет понять генетическую организацию, участвующую в регуляции генов с помощью метилирования ДНК, модификации гистонов и микроРНК (Bird 2007; Chen et al. 2010; Feil 2009; Rottach et al. 2009).

Эпигенетические теории в первую очередь подчеркивают взаимодействие между генами и окружающей средой. Согласно этим теориям, среда играет основополагающую роль в определении эпигенетических изменений, происходящих в геноме индивида, которые в конечном итоге влияют на развитие организма и процесс его наследственности (Bräutigam et al. 2013; Springer 2013; Yakovlev et al. 2011). Эпигенетические процессы следует считать уникальными по причине того, что в отличие от генетических вариаций, они могут быть изменены непосредственно окружающей средой, а в некоторых случаях эпигенетические изменения могут наследоваться последующими поколениями (Becker and Weigel 2012; Springer 2013; Yakovlev et al. 2011). Об эпигенетических вариациях на нескольких уровнях сообщалось во время и после воздействия на них условий культивирования *in vitro* (De-la-Pena et al. 2012; Kaeppler and Phillips 1993b; Miguel and Marum 2011; Smykal

и другие. 2007; Valledor и соавт. 2007a), а также во время дифференцировки и дедифференцировки клеток в системах регенерации растений *in vitro* (Miguel and Marum 2011; Yang et al. 2013).

Эпигенетические процессы лежат в основе нескольких типов фенотипической пластичности, увеличивая эволюционный потенциал организмов в ответ на экологические проблемы (Bräutigam et al. 2013), которые потенциально могут быть весьма актуальны в контексте прогнозируемых глобальных изменений окружающей среды (Hirsch et al. . 2013).

### **Метилирование ДНК**

Метилирование ДНК является наиболее изученным эпигенетическим механизмом у эукариот (Ford 2013; Piccolo and Fisher 2014; Smith and Meissner 2013) и связано с генной регуляцией (Allis et al. 2007), глушением генов у трансгенных растений, ретротранспозонами и вирусной инфекцией. (Fu et al. 2013; Giménez et al. 2006; Pooggin 2013). Этот регуляторный механизм опосредуется добавлением метильной группы в положении 5<sup>\*</sup> пиримидинового кольца цитозина в ДНК. Это метилирование может происходить на цитозиновых основаниях в ЦГ, ЦНГ или ЦНН (где Н может быть Ц, А или Т), хотя, в случае ЦНН, оно не очень распространено. Например, в метиломе *Arabidopsis thaliana* было обнаружено, что ЦГ представляет 22–24%, СНГ 7–8% и СНН 2% цитозин-метилованных оснований (Cokus et al. 2008; Feng et al. 2010; Lister et al. др. 2008). Кроме того, у риса (*Oryza sativa*) и черного хлопкового дерева (*Populus trichocarpa*) было обнаружено высокое метилирование цитозина в ЦГ (59,4 и 41,9 соответственно; Feng et al. 2010).

## Метилирование ДНК в процессе органогенеза

Органогенез - это морфогенетический процесс, который включает индукцию новых побегов из неорганизованных тканей или непосредственно из эксплантов ткани материнского растения (George et al. 2008; Ikeuchi et al. 2013). Органогенез является очень важным инструментом, который используется для массового размножения нескольких видов, представляющих экономический интерес, таких как виноград (*Vitis vinifera*) (Novak и Juvova 1983), ананас (*Ananas comosus*) (Sripaoraya et al. 2003), агава (*Agave tequilana*) (Valenzuela-Sánchez et al. 2006) и перец чили (*Capsicum chinense*) (Santana-Buzzy et al. 2005). Существует два типа органогенеза: прямой и непрямой. Прямой органогенез определяется как образование органов непосредственно на поверхности культивируемых интактных эксплантов (George et al. 2008). Этот тип органогенеза может обеспечить надежный метод для размножения из-за его способности обеспечивать высокую скорость регенерации растений за короткое время. Чтобы создать полноценную и функциональную ткань из другого растительного источника, необходимы сложные регуляторные механизмы для доставки точного транскрипционного сообщения в клетку. В большинстве случаев скорость регенерации зависит от природы исходного эксплантата и генотипа (George et al. 2008). Пунктом не менее важным, чем генотип, является регуляция специфических генов. Одним из важных регуляторных механизмов, обнаруженных в органогенезе, является метилирование ДНК - процесс, о котором недавно появилась важная информация. Например, Wang et al. (2012), работая с органогенезом кустовой лилии (*Clivia miniata*), обнаружили, что растения, регенерированные из кончиков побегов, демонстрировали более низкие скорости метилирования ДНК, чем растения, регенерированные из молодых листьев или молодых

лепестков, что позволяет предположить, что изменение метилирования регенерированных проростков было связано с природой эксплантов.

Хотя во многих работах предполагается, что низкие уровни метилирования ДНК во время культивирования *in vitro* связаны с молодым фенотипом (Fraga et al. 2002; Hasbún et al. 2007; Valledor et al. 2007a), другие утверждают, что увеличение уровня метилирования достигается в ювенильных тканях (Baurens et al. 2004; Hasbún et al. 2005; Monteuis et al. 2008). Эти противоречивые ответы в условиях *in vitro* могут быть также связаны со временем культивирования (Diaz-Sala et al. 1995), компонентами среды (Arnholdt-Schmitt 1993; LoSchiavo et al. 1989) или природой эксплантата (Hasbún и др. 2005; Ван и др. 2012).

Однако не только предрасположенность эксплантата может влиять на метилирование ДНК и ответ эксплантата, но также и внешние факторы, такие как температура (Хао и Дэн 2003) и среда *in vitro* / *ex vitro* (De-la-Pena et al. 2012), Хао и Дэн (2003), работая над прямым органоогенезом из кончиков побегов яблони, обнаружили, что воздействие низкой температуры (4 ° C) на ткани в течение длительного периода времени может повлиять на метилирование ДНК, но ни последовательность ДНК, ни плоидность не изменяются. С другой стороны, De-la-Peña et al. (2012) обнаружили у двух видов рода *Agave* (*A. angustifolia* и *A. fourcroydes*), что изменения в метилировании ДНК из-за культуры *in vitro* и *ex vitro* были различными в зависимости от вида исследования и условий окружающей среды. Например, в условиях *in vitro* *A. angustifolia* демонстрирует более низкий уровень метилирования, чем у *A. fourcroydes*; однако, когда оба вида были переведены в условия *ex vitro*, уровни метилирования ДНК между ними существенно не различались. Этот вывод свидетельствует о том, что быстрая пластичность некоторых растений при адаптации к изменяющимся условиям окружающей

среды обусловлена эпигенетическими механизмами и что эти механизмы можно использовать в качестве инструмента для улучшения приспособленности популяций путем создания растений, лучше приспособленных к климатическим проблемам.

Абиотические стрессы, подобные тем, которые вызваны условиями окружающей среды, по-видимому, влияют на метилирование ДНК и органогенез; однако также было обнаружено, что биотический стресс оказывает влияние на этот эпигенетический механизм. Например, Giménez et al. (2006) оценили закономерности метилирования у растений *Musa*, полученных в результате прямого органогенеза, и обнаружили связь между метилированием ДНК и устойчивостью к токсинам *Mycosphaerella fijiensis*. Результаты этого исследования показали, что растения с повышенными уровнями метилирования ДНК, обычно связанными с репрессией генов, были связаны с более устойчивыми фенотипами. Между тем растения с низким уровнем метилирования ДНК, как правило, имеют более восприимчивые фенотипы. Эти изменения в гипо- или гиперметилировании изменяют не только поведение генов, но и модификации белков (Pavokovic and Krsnik-Rasol 2012). Например, Pavoković и Krsnik-Rasol (2012) оценили влияние гипометилирования и гиперметилирования на гликозилирование белка и его влияние на функции, стабильность и организацию белка у растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris*), полученных прямым органогенезом. Чтобы доказать, действительно ли метилирование ДНК влияет на гликозилирование, авторы применили гиперметилирующие агенты 2–4, дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-D) и гипометилирующий препарат 5-азацитидин к сахарной свекле в культурах *in vitro* и сравнили гликопротеиновые структуры клеток. , Они обнаружили, что обработка модифицировала N- и O-связанные гликопротеиновые паттерны, влияя на клеточный метаболизм, дифференцировку клеток и морфогенез.

Были также проведены исследования метилирования ДНК на непрямой органогенез. Непрямой органогенез, который определяется как формирование органов из каллусных тканей, также обладает огромным потенциалом для микроразмножения (Ikeuchi et al. 2013) и необходим для регенерации и разведения растений, которые были генетически трансформированы (George et al. 2008) или не могут разводиться прямыми методами (Gamborg and Phillips 1995). Потенциал этой морфогенетической процедуры и метилирования ДНК для ее достоверности для микроразведения очевиден (Wang et al. 2012). Важность метилирования ДНК при непрямом органогенезе недавно была опубликована Li et al. (2011), который оценил влияние ключевых эпигенетических генов, таких как METHYLTRANSFERASE 1 (MET1), KRYPTONITE (KYP), гистона H3 лизина 4 (H3K4) деметилазы JUMONJI14 (JMJ14) и гистонацетилтрансферазы HAC1 на экспрессию WUSCHEL (WUS) .

Результаты, полученные с помощью бисульфитного секвенирования и иммунопреципитации хроматина, показали, что регуляторные области WUS были модифицированы как метилированием ДНК, так и модификациями гистонов во время развития. Кроме того, было продемонстрировано, что метилирование ДНК может изменяться в орган-специфической манере для генов, представляющих изменения в уровнях экспрессии и потенциальных ролях во время органогенеза. Некоторые авторы пытались выделить гены-кандидаты, участвующие в органогенезе, контролируемые эпигенетическими механизмами. Например, Maury et al. (2012) провели оценку органогенных и неорганогенных клеточных линий сахарной свеклы *in vitro* для оценки динамики метилирования ДНК на геномном или генном уровнях во время регенерации органов. Они обнаружили, что эпиаλληли, которые, как предсказывают, способствуют соматоклональной изменчивости (Tanurdzic et al. 2008), могут быть установлены в отношении состояния развития из разных генетических фонов в ответ на передачу сигналов окружающей среды, таких

как условия культивирования *in vitro* в определенных областях гена. Соответствующий отчет показывает, что включение метильных групп в генные тела общего генома в трех различных тканях *P. trichocarpa* не влияет на транскрипцию, но может играть роль в ингибировании активации транспонируемых элементов (TE) (Vining et al. 2013). Кроме того, сообщалось, что у *P. trichocarpa* скорость метилирования ДНК варьирует на генетическом и хромосомном уровнях во время дифференцировки и регенерации *in vitro* (Vining et al. 2013). Во время разработки *in vitro* было обнаружено, что 45% дифференциально метилированных генов претерпевали временное метилирование, переходя от метилированного в каллусе к деметилированному в регенерантных растениях.

Другими явлениями *in vitro*, регулируемые эпигенетическими изменениями, являются привыкание, омоложение и морфологические изменения (Smulders and de Klerk 2011). Субкультивирование растений и явление привыкания являются одними из тех негативных факторов, которые существуют в системах *in vitro* и стимулируют эпигенетические и фенотипические изменения, которые могут быть наследственными (Meins 1989; Peredo et al. 2006), но обратимыми (Meins и Foster 1985; Smulders and de Klerk 2011) Smulders et al. 1995). Например, Meins и Thomas (Meins and Thomas 2003) обнаружили, что культивируемые клетки табака из эксплантатов стволовой коры цитокинин автотрофного фенотипа демонстрируют конститутивный цитокининовый фенотип. Однако, когда эти растения были регенерированы в культуре *in vitro*, привычный фенотип избегался некоторыми регенерированными растениями. Авторы предполагают, что некоторые локусы могут быть деметилированы во время культивирования *in vitro*, генерируя метилированные эпиаλληли. Таким образом, кажется, что привычный признак может быть наследственным, но, в зависимости от условий *in vitro*, привыкание может быть обращено вспять, путем глушения

определенного локуса. С другой стороны, Pischke et al. (2006), работая над характеристикой привыкших и не привыкших к культуре клеток *A. thaliana* на основе транскриптома, обнаружили, что метилтрансфераза MET1 была повышена в 3,5 раза, а области перегруппированной метилазы 1 были усилены в 2,1 раза в привыкших каллусах. Кроме того, хромометилазы CMT1 и CMT3 были увеличены в 5,5 и 3,2 раза соответственно в привыкших каллусах. Это говорит о том, что существует четкая регуляция в моделях метилирования между привыкшими и не привыкшими культурами.

### **Метилирование ДНК важно для индукции и развития эмбриона**

Соматический эмбриогенез (СЭ) - это процесс, при котором соматические клетки дифференцируются в соматические зародыши (Elmeer 2013; Joshi et al. 2013). Соматические зародыши морфологически напоминают зиготические зародыши и таким же образом вырастают в проростки (George et al. 2008). Соответственно, зиготический эмбриогенез был использован в качестве первого шага для сравнения и характеристики онтогенеза у соматических эмбрионов. Как и органогенез, СЭ может быть прямым или непрямым. Во время прямого СЭ соматические эмбрионы дифференцируются напрямую от эксплантата без какого-либо промежуточного развития каллуса (Williams and Maheswaran 1986). Эксплантаты, из которых наиболее вероятно развитие путем прямого эмбриогенеза, включают микроспоры, яйцеклетки, эмбрионы и проростки (George et al. 2008), хотя экспланты листьев также очень чувствительны (Quiroz-Figueroa et al. 2006).

На СЭ влияют многие факторы (Elmeer 2013; Joshi et al. 2013); однако было обнаружено, что метилирование ДНК играет важную роль в индукции и развитии как зиготических, так и соматических зародышей (Nic-Can et al. 2013). Метилирование ДНК важно в эмбриогенезе растений, но его роль не

была выяснена, пока LoSchiavo et al. (1989) сообщили о сильном влиянии уровня ауксинов на 5-метилцитозин в ДНК клеток культуры моркови. Они сообщили об изменениях уровня метилирования во время СЭ в отсутствие гормонов, и что эмбриогенез блокировался после применения гипометилирующих препаратов, таких как азацитидин, этионин или этоксикарбонилпиримидины. Кроме того, был выделен мутант, устойчивый к действию гипометилирующих препаратов, и он обладал высокой частотой образования опухолей во время регенерации.

Вьехо и соавт. (2010), работая с каштаном (*Castanea sativa*), обнаружили, что к половому эмбриогенезу причастна динамика метилирования ДНК. Временное деметилирование ДНК происходит в оплодотворенных яйцеклетках, коррелируя с началом полового эмбриогенного процесса. Это в отличие от неоплодотворенных яйцеклеток, в которых уровень метилирования повышен и индуцирует деградацию. Основываясь на анализах *in vitro*, авторы продемонстрировали, что временное деметилирование сразу после оплодотворения необходимо для достижения зрелости соматических эмбрионов. Этот отчет подтверждает гипотезу, которая предполагает влияние динамики метилирования ДНК во время полового эмбриогенеза. Основываясь на этом сообщении, возможно, что метилирование ДНК играет важную роль в индукции развития у соматических эмбрионов.

Наблюдение за многочисленными генетическими ошибками у регенерированных растений в культуре *in vitro* сфокусировало внимание на увеличении частоты мутаций одного гена, поломок хромосом, активаций транспонируемых элементов, изменений количественных признаков и модификации паттернов метилирования ДНК (Kaeppler and Phillips 1993a). В этот момент доказательства указывают на то, что высокая частота гипометилирования ДНК является результатом процесса культивирования

ткани. С другой стороны, Santos и Favereiro (2002) изучали участие метилирования ДНК в непрямом СЭ. Авторы провели эксперимент с контрастирующими линиями *Medicago truncatula* с точки зрения потенциала для СЭ. Обработка 5-азацитидином приводила к потере регенерационной способности в эмбриогенной линии за счет уменьшения продукции соматических зародышей; это также уменьшило скорость пролиферации каллусов неэмбриогенной линии. Анализ паттернов метилирования с помощью чувствительных к метилированию ферментов рестрикции показал корреляцию между гипометилированием ДНК и нарушением компетенции СЭ.

Контрастные результаты были сообщены Chakrabarty et al. (2003), который оценил закономерности метилирования цитозина во время непрямого СЭ в сибирском женьшене (*Eleutherococcus senticosus*). Анализ HPLC на геномной ДНК из двух линий каллуса (эмбриогенной и неэмбриогенной) выявил различные глобальные скорости метилирования ДНК, которые были значительно снижены в эмбриогенном каллусе по сравнению с неэмбриогенным. Это различие в метилировании ДНК между эмбриогенным и неэмбриогенным каллусом может способствовать развитию генной экспрессии и эмбриогенной активности. Более того, Leljak-Levaníć et al. (2004) сообщили о появлении повторяющейся картины в динамике метилирования ДНК во время не прямой СЭ для трех линий тыквы (*Cucurbita pepo* L.). Авторы обнаружили корреляцию между самыми высокими показателями метилирования ДНК на ранних стадиях развития эмбрионов. Когда эмбрионы достигли более зрелого состояния, метилирование ДНК снижалось как на культуральной среде, не содержащей ауксина, так и на среде, дополненной 5-азацитидином. Когда в среду добавляли 5-азацитидин, эмбриогенные признаки культивируемой ткани сохранялись даже через 2 месяца в этом состоянии. Основываясь на полученных результатах, авторы предполагают, что СЭ может

вызываться стрессовыми состояниями, проявляющимися в изменениях метилирования. Что интересно, так это то, что изменения эпигенетики во время культивирования *in vitro* также влияют на генетическую изменчивость. Например, было обнаружено сосуществование генетических и эпигенетических изменений, вызванных культивированием *in vitro* регенерированных растениях ржи (*Secale cereale* L.; Linacero et al. 2011). Благодаря использованию чувствительных к метилированию ферментов рестрикции было установлено, что генетические изменения произошли у 73% (сорт Ailés) и 30% (сорт Merced) растений, тогда как эпигенетические изменения произошли у 50 и 73% сортов Ailés и Merced. соответственно. Это означает, что низкочастотные генетические изменения могут обеспечить большие эпигенетические изменения и наоборот. Также было обнаружено, что генетическая изменчивость связана с наличием мишеней CCGG, что свидетельствует о наличии общего механизма, связывающего генетические и эпигенетические явления.

### **Гистоновые модификации в клеточных культурах *in vitro***

В растительных клеточных и тканевых культурах модификации гистонов также играют важную роль в дедифференцировке и пролиферации клеток. Получение целого растения путем дедифференцировки культуры клеток *in vitro* является яркой демонстрацией пластичности и тотипотентности клеток растения. Эта дедифференцировка была изучена главным образом в системах протопластов и включает приобретение компетенции для плюрипотентной компетенции путем повторного входа в S-фазу клеточного цикла (Williams et al. 2003; Zhao et al. 2001b), связанную с реорганизацией хроматина (Avivi et al. . 2004). Хроматин организован через структурные единицы, называемые нуклеосомами. Несмотря на физические ограничения доступа ядерных факторов к ДНК, нуклеосомы способны обеспечивать доступ

определенных специфически связывающихся белков к ДНК посредством модификаций гистонов, тем самым регулируя транскрипцию и репликацию генов (Kornberg 1974; Phillips 1963). Гистоны H2A, H2B, H3 и H4 претерпевают ковалентные модификации в различных положениях их аминоконцевых хвостов (богатых остатками аргинина и лизина) различными химическими метками, такими как метилирование, ацетилирование, убиквитинирование, фосфорилирование, биотинилирование и ADP-рибозилирование (Джонсон и др. 2004; Чжан и др. 2007). Различные комбинации модификаций гистонов важны для тонкой настройки регуляции транскрипции (Pfluger and Wagner 2007). Как правило, ацетилирование коррелирует с активацией транскрипции генов; напротив, метилирование при активации или репрессии генов зависит от типа модифицированных остатков (Pfluger and Wagner 2007; Roudier et al. 2009; Тарик и Пашковский 2004). Например, метилирование H3K4 позволяет активировать транскрипцию, в то время как метилирование гистона H3 лизина 9 (H3K9) связано с его репрессией (Li et al. 2007; Shilatifard 2006). Генерация цельных растений из недифференцированных клеток, культивируемых *in vitro*, включает в себя динамическую регулировку метилирования / деметилирования H3K9, которая необходима для сохранения клеточной пластичности растительных клеток в ответ на специфические сигналы окружающей среды. Было обнаружено, что ген KRYPTONITE (KYP) / SUVH4, который кодирует фермент H3K9 метилтрансферазу, участвует в транскрипции генов, связанных с клеточным циклом, важным для нормальной дедифференцировки, и мутации этого гена (*kur-2*) приводит к образованию дефектного каллуса (Grafi et al. 2007). С другой стороны, в культуре клеток протопластов было обнаружено, что увеличение ацетилирования гистона H3 лизина 9 (H3K9ac), H3K14ac и модификации H3K9me вовлечено в перераспределение гетерохроматина, что позволяет активировать гены-мишени pRb / E2F, что дает доступ к переходу в S-фазу клеточного цикла (Williams et al. 2003).

## **Метилирование и ацетилирование гистонов при соматической изменчивости, привыкании и омоложении**

Во время регенерации растений *in vitro* ожидаются идентичные клоны (Jain et al. 1998). Однако эта система индуцирует появление соматических вариаций, характеризующихся морфологическими, биохимическими, молекулярными, генетическими и эпигенетическими изменениями (De-la-Pena et al. 2012; Larkin and Scowcroft 1981; Nic-Can et al. 2013; Phillips et al. 1994; Schellenbaum и др. 2008; Smulders and de Klerk 2011), которые могут увеличить или уменьшить урожайность растений в поле. Эпигенетические изменения часто носят временный характер и могут быть обращены вспять, но в некоторых случаях это может занять много времени (Brettell and Dennis 1991). Было показано, что модификации гистонов и их различные комбинации важны для правильной клеточной дедифференцировки и пролиферации, клеточной идентичности и развития растений во время культивирования клеток (Ikeuchi et al. 2013). Кроме того, тонкая настройка между различными гистоновыми метками важна в регуляции соматической изменчивости. Цветочные аномалии в культуре *in vitro* являются явным результатом соматической изменчивости (Jaligot et al. 2000). Эпигенетический контроль, по-видимому, имеет решающее значение для координации развития цветков риса (Sun and Zhou 2008) и азалии (Meijón et al. 2009). Например, было обнаружено, что метилирование ДНК и деацетилирование H4 действуют одновременно и скоординированно, реструктурируя хроматин и регулируя экспрессию генов во время развития апикальной меристемы побега и дифференцировки цветков (Meijon et al. 2010, 2009). Следовательно, возможно, что культивирование *in vitro* каким-то образом нарушает эпигенетическую координацию, вызывающую соматическую изменчивость. Выше упоминалось, что метилирование ДНК, по-видимому, участвует в привыкании к цитокилинам, но некоторые

сообщения показали, что модификации гистонов также играют важную роль в этом явлении. Анализ на основе транскриптома в хорошо зарекомендовавшей себя клеточной культуре *Arabidopsis* с привыканием показал, что члены семейства гистонацетилтрансферазы и гистондеацетилазы были активированы. Кроме того, пять предполагаемых кодируемых гистоновых метилтрансфераз были повышены, а одна понижена, что указывает на динамическое состояние эпигенетической регуляции хроматина в приученной клеточной культуре (Pischke et al. 2006). Цитокинины участвуют не только в привыкании, но и в омоложении (Greenwood 1987). Омоложение растений признано необходимым условием успешного микроразмножения зрелых деревьев (Valledor et al. 2007a, b), и было указано, что цитокинин способствует этому омоложению (Greenwood 1987). Однако модификации гистонов, по-видимому, являются переключением между зрелыми и ювенильными изменениями. У сосны (*Pinus radiata*) высокие уровни ацетилирования гистона H4 (H4ac) и H3K4me3 были обнаружены в незрелых иглах, связанных с эухроматином, которые можно легко перепрограммировать в тотипотентные клетки. Незрелые иглы показали низкий уровень H4ac и высокий уровень метилирования H3K9me3, которые образуют составную часть рестриктивного гетерохроматина, затрудняя входение клеток в программу дедифференцировки-редифференцировки, которая приведет к формированию новых органов (Valledor et al. 2010).

### **Репрессивная метка H3K27me3 играет важную роль в регуляции ауксина и органогенезе**

H3K27me3 является одним из наиболее изученных эпигенетических маркеров и играет важную роль в динамической регуляции экспрессии генов во время развития растений (Chanvivattana et al. 2004; Kinoshita et al. 2001; Lindroth et al. 2004; Makarevitch et al. 2013; Schubert и др. 2005). Некоторые

авторы даже предположили, что удаление H3K27me3 может быть важным механизмом активации генов в ответ на сигналы развития у растений (Liu et al. 2010; Pontvianne et al. 2010). Этот знак нацелен на межгенные районы, гены транспонируемых и неперемещаемых элементов (Charron et al. 2009), а недавний отчет указывает, что H3K27me3 контролирует экспрессию около 9006 генов в *Arabidopsis* (Lafos et al. 2011), и некоторые из них связаны с дифференцировкой клеток, развитием растений и передачей сигналов ауксина. Lafos et al. (2011) показали, что H3K27me3 регулирует транскрипционные ответы на ауксин, и половина репрессорных генов AUX / IAA покрыта этой репрессивной эпигенетической меткой. Более того, факторы ауксинового ответа (ARF), которые могут активировать или подавлять транскрипцию генов, модулированных ауксином (Ulmasov et al. 1999), также регулируются H3K27me3. Ауксины также являются ключевыми регуляторами роста растений, необходимыми для индукции клеточной дедифференцировки и образования каллуса (Mendoza and Kaeppler 2002; Skoog et al. 1957). Недавно было обнаружено, что процессы дедифференцировки клеток и генерации каллуса коррелируют с репрограммированием всего генома с помощью H3K27me3 (He et al. 2012). В листьях были обнаружены высокие уровни H3K27me3 в генах пути ауксина; это контрастирует с каллусом, в котором уровни были резко снижены, предполагая, что передача сигналов ауксина активируется во время превращения листьев в каллус (He et al. 2012). Кроме того, H3K27me3 участвует в транспорте ауксина (Cazzonelli et al. 2013). Cazzonelli et al. (2013) обнаружили, что этот эпигенетический маркер обогащен промотором PIN6, снижающим экспрессию этого гена и влияющим на развитие корня. Следовательно, кажется, что H3K27me3 может быть ключевым элементом в регуляции передачи сигналов ауксинов во время органогенеза и развития. С другой стороны, было обнаружено, что снижение H3K27me3 или потеря функции генов, кодирующих метилтрансферазы H3K27, делают возможным развитие дедифференцировки клеток и

образование соматических зародышей (Chanvivattana et al. 2004).

Исследования показали, что Polycomb репрессивный комплекс 2 действует как метилтрансфераза H3K27 и ответственен за размещение метки H3K27me3 в локусах-мишенях (Holec and Berger 2012; Lindroth et al. 2004). У арабидопсиса некоторые фенотипы, наблюдаемые у мутанта белка группы поликомба (PcG) FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE), характеризуются ранней летальностью во время развития семян (Katz et al. 2004) и цветоподобных структур в гипокотиле и корнях (Kinoshita et al. 2001). У арабидопсиса потеря активности PcG провоцирует дефекты идентичности органов (Katz et al. 2004; Kinoshita et al. 2001), а истощение активности FIE снижает H3K27me2 и H3K27me3, что вызывает драматический эффект в организации эухроматина, что указывает на важную роль PcG белков для опосредования различных маркеров в развитии растений (Lindroth et al. 2004). Хотя существует большое количество информации об эпигенетической регуляции с помощью модификаций гистонов в культуре ткани, необходимы дополнительные исследования для выяснения генов, вовлеченных в этот процесс.

### **Метилирование гистонов в соматическом эмбриогенезе**

СЭ долгое время считался важным инструментом для размножения растений, и регуляция многих генов, вовлеченных в этот процесс, становится более ясной. Сообщалось, что экспрессия фактора транскрипции WUS регулируется H3K9me2 во время регенерации побегов у *Arabidopsis* (Li et al. 2011), тогда как H3K27me3 необходим для регуляции BABY BOOM1 и LEAFY COTYLEDON1 (LEC1) в СЭ кофе (*Coffea canephora*) (Nic-Can et al. 2013), предполагая, что клеточная пластичность соматических клеток для регенерации всего организма может быть опосредована эпигенетическими механизмами. Этот репрессивный признак также участвует в передаче

сигналов ауксина во время развития зиготического эмбриогенеза (Bouyer et al. 2011; Lafos et al. 2011).

Помимо метилирования, ацетилирование также выполняет важную функцию во время эмбриогенеза. Динамические модификации гистонов, преимущественно деацетилирование гистонов H3 и H4, происходят во время митоза фазоспецифичным образом в культивируемых клетках табака (Li et al. 2005). Гены LEC экспрессируются на эмбриональной стадии, и было обнаружено, что препараты с ингибитором гистондеацетилазы трихостатином А оказывают влияние на экспрессию HAP3A, гена типа LEC1, ингибируя прогрессирование прорастания эмбрионов у ели обыкновенной (*Picea abies*) (Удденберг и др. 2011).

### **миРНК**

Хотя многие эпигенетические исследования в условиях *in vitro* были сосредоточены на метилировании ДНК и модификациях гистонов, miRNAs не рассматривались с той же скоростью. Малое количество доступной информации о них наводит на мысль о высокой биологической важности, которую эти маленькие молекулы могут иметь в ближайшем будущем. Регуляторные механизмы, которые опосредуют различные биологические процессы, такие как клеточная смерть у эукариотических организмов, выполняются небольшими некодирующими РНК (sRNAs) (Agrawal et al. 2003; Carlsbecker et al. 2010; Ivey and Srivastava 2010). У растений, среди малых РНК, микроРНК (miRNAs) и малые интерферирующие РНК играют центральную роль в подавлении экспрессии генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях (Agrawal et al. 2003; Kaufmann et al. 2010; Molnar et al. 2010). Во время биогенеза miRNA многие белки необходимы для формирования, обработки и транспортировки этих небольших молекул. Например, DICER-LIKE1 (DCL1) является одним из наиболее изученных и

важных участников в формировании микроРНК. DCL1 представляет собой эндорибонуклеазу, ответственную за расщепление длинных dsРНК и / или пре-миРНК до dsРНК дуплексов определенной длины во время биогенеза миРНК. miRNAs участвуют в защите растений, реакции на стресс, прорастании семян, цветении и развитии (Ivey и Srivastava 2010; Molnar et al. 2010; Sunkar et al. 2012), и важность miRNAs в культуре тканей растений (РТС) была недавно выявлена (Chen et al. 2013; Li et al. 2012; Luo et al. 2006; Miguel and Marum 2011; Wu et al. 2011). Факторами окружающей среды в условиях *in vitro*, которым подвергаются растения, являются концентрация регуляторов роста растений и стресс, как механический, так и биологический. Было обнаружено, что miRNAs очень важны в передаче сигналов гормонов (Carlsbecker et al. 2010; Ivey и Srivastava 2010; Liang et al. 2012; Liu et al. 2007) и реакциях на стресс (Carlsbecker et al. 2010; Ivey and Srivastava 2010 ; Mallory и др., 2004; Nodine and Bartel, 2010), в которой используется сеть связи между клетками, запускающая дифференцировку тканей в системах тканевых культур. miRNAs появились как потенциальные медиаторы межклеточной коммуникации, но больше доказательств мобильности miRNAs еще предстоит выяснить.

### **миРНК и микроразмножение**

Эпигенетическая оценка растений, полученных путем микроразмножения показывает, что они связаны с чертами, относящимися к омоложению, например, производства элитных растений (Gao et al. 2010; Jain 1997; Joyce et al. 2003; Kaeppler and Phillips 1993b; Swartz et al. 1981), улучшение органогенной и / или эмбриогенной способности (Valledor et al. 2010) и соматоклональных вариаций для достижения определенных характеристик (Hadi and Bridgen 1996) или их предотвращения (Jaligot et al. 2000). В этом смысле, у экономически важных видов, которые получают путем

микроразмножения, таких как клубника, было обнаружено, что во время культивирования *in vitro* активируется miR156 (Li et al. 2012). Эта miRNA необходима для стимуляции появления всех признаков ювенильных листьев и регулирует время перехода от ювенильного к взрослому путем нацеливания на пути экспрессии, которые контролируют несколько аспектов фазового изменения (Wu et al. 2009). Другие исследования клубники, сравнивающие дифференциальную экспрессию между обычными растениями и растениями, полученными микроразмножением, показывают, что miR169a и miR169b подавляются в растениях, полученных микроразмножением, в то время как miR535 и miR390 активируются. (Li et al. 2009). Стоит отметить, что miR390 контролировал передачу сигналов ауксина путем определения концентрации этого регулятора роста растений внутри клетки (Yoon et al. 2010) и что было обнаружено, что miR169a подавляется азотным голоданием (Zeng et al. 2014). Интересно, что в большинстве растений, полученных микроразмножением, азот не является ограниченным питательным веществом. Следовательно, представляется, что в условиях *in vitro* регуляция miRNAs контролируется различными факторами в культуральной среде, такими как ауксины, позволяя дифференцированной ткани достигать потенциала роста и приобретать физиологические и молекулярные характеристики ювенильных растений.

В целях микроразмножения, омоложение считается биотехнологическим потенциалом у PTCs, главным образом у видов, которые являются «сложными в размножении» и не могут подвергнуться разведению по причине того, что они являются достаточно зрелыми организмами (Greenwood 1987; Merkle and Dean 2000). Одной из стратегий, используемых для этого, является использование прививки и микротрансплантации с ювенильной тканью (Jonard 1986; Peña-Ramírez et al. 2012; Revilla et al. 1996). В недавних исследованиях было показано, что miRNAs могут перемещаться в трансплантируемых тканях между клетками, чтобы нести сигнал для отображения эпигенетических модификаций в других тканях (Liang et al. 2012;

McGarry and Kragler 2013; Molnar et al. 2010; Рисунок 1). Было установлено, что при трансплантации *Sequoia sempervirens* паттерны экспрессии и предсказания возможных генов-мишеней малых РНК указывают на возможные функции контроля эффективности фотосинтеза и достаточной компетентности клеток корней во время омоложения растений. Кроме того, увеличение miR156 и уменьшение miR172 во время омоложения растений позволяют предположить, что эти две микроРНК активно влияют на фазовый переход между ювенильным и взрослым (Chen et al. 2013) периодами. Было обнаружено, что этот miR156 был высоко экспрессирован в растениях, полученных микроразмножением (Li et al. 2012), поэтому, по-видимому, существует связь между экспрессией miR156 и омоложением в растениях, полученных методом микроразмножения.

### **миРНК и соматический эмбриоидогенез**

Недавние генетические анализы предполагают, что miRNAs могут быть вовлечены в формирование, дифференцировку и эмбриогенез меристемы. Мутации некоторых ключевых генов, связанных с биогенезом miRNA, вызывают дефекты эмбриогенеза и развития меристемы. Например, Nodine and Bartel (2010) предположили, что miRNA156 важна во время клеточной дифференцировки среди стадий эмбрионов, и что разрушение miR156 опосредует регуляцию двух факторов транскрипции SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE (SPL). Предполагается, что эта miRNA ответственна за преждевременную экспрессию генов SPL10 и SPL11 у эмбрионов dcl1 и, возможно, за дефекты формирования паттерна dcl1 у эмбрионов на восьми клеточной стадии, а затем за правильное деление клеток гипофиза и субпротодермы. Таким образом, присутствие определенных микроРНК в определенных тканях, по-видимому, способствует молчанию генов, которые не нужны для определенных стадий развития. У соматических

зародышей сладкого апельсина Wu et al. (Wu et al. 2011) обнаружили, что несколько miRNAs важны во время СЭ. Например, miR156, miR168 и miR171 участвуют в процессе индукции соматического зародыша, miR159, miR164, miR390 и miR397 предназначены для образования зародышей глобулярной формы, а miR166, miR167 и miR398 необходимы для образования эмбрионов на стадии семядолей. С другой стороны, Мэллори и соавт. (Mallory et al. 2004) обнаружили, что присутствие miR167 на последней стадии морфогенеза эмбрионов отрицательно регулирует экспрессию генов ARF, таких как ARF2, ARF6 и ARF8. ARF8 регулирует уровни свободной AIA в клетке, контролируя GH3-подобную экспрессию; также этот белок важен во время хранения и разложения ауксина (Sanan-Mishra et al. 2013; Tian et al. 2004). miR390 косвенно контролирует ARF2, ARF3 и ARF4, регулируя формирование паттерна листьев, развитие по времени и инициацию латерального корня (Fahlgren et al. 2006; Marin et al. 2010; Yoon et al. 2010). Что касается miR164, известно, что он взаимодействует с пятью членами семейства транскрипционных факторов NAC-домена (Guo et al. 2005; Rhoades et al. 2002). Среди них NAC1 участвует в модуляции роста боковых корешков, тогда как CUPSHAPED COTYLEDONS 1 (CUC1) участвует в развитии меристемы и отделении надземных органов, таких как цветочные органы (Mallory et al. 2004; Fig. 2).

Присутствие потока ауксина и специфических микроРНК в определенных тканях - это те два события, которые необходимы для правильного формирования эмбриона и последующей структуры (Ivey and Srivastava 2010; Millner 1995; Tian et al. 2004). В эмбрионном каллусе риса наблюдается координация между уникальными miRNAs в дифференцированных тканях (Luo et al. 2006), поддерживающая клетки меристемы и способствующая эмбриогенезу в богатой гормональной среде по сравнению с таковой без гормональной среды. Такое исследование необходимо для понимания механизма, который позволяет поддерживать

меристематические клетки, а также образование и развитие эмбрионов. Наличие уникальных микроРНК в различных условиях (например, состав среды, температура, условия окружающей среды) в высокоэмбриогенных видовых культурах является целью для будущего применения в качестве биотехнологических инструментов для достижения регенерации *in vitro* с помощью СЭ видов, которые плохо подвергаются разведению, таких как бобы (*Phaseolus vulgaris*), кофе (*C. arabica*) и перец чили (*Capsicum chinense*).

### **Проблемы и возможности изучения эпигенетики**

Внедрение методов *in vitro* полезно для многих сортов и людей, которые зависят от них. Сообщалось, что регенерация растений с использованием систем *in vitro*, как правило, связана с наличием изменчивости среди регенерантов (Duncan 1996). Однако эпигенетический механизм такой регенерации не использовался, хотя он мог бы принести большую пользу для максимизации условий размножения в важных и сложных для культивирования сортах растений.

Необходимо учитывать важность эпигенетических исследований в сельском хозяйстве, поскольку они могут оказать огромное влияние на программы снабжения продовольствием, которые необходимы из-за последствий глобального изменения климата. Необходимо проанализировать специфические модификации в развивающихся соматических и зиготических эмбрионах с целью выяснения регуляторных эпигенетических механизмов, которые лежат в основе прорастания семян у растений, сложно поддающихся культивированию. Кроме того, важно исследовать основные эпигенетические механизмы *in vitro*, чтобы максимизировать производство растений высококачественными сортами и контролировать транспонируемые элементы, избегая или стимулируя соматоклональные вариации. Поскольку культура тканей *in vitro* генерирует широкий спектр эпигенетических вариаций, она

может быть включена в программы селекции растений для создания лучших и более разнообразных сортов, адаптированных к окружающей среде, без использования чужеродных генов.

Поскольку было доказано, что метилирование ДНК может наследоваться последующими поколениями, успех этого процесса позволит установить первую линию обнаружения между эмбрионными и неэмбрионными образцами. Кроме того, имеются сообщения о стабильности паттернов метилирования ДНК посредством культивирования *in vitro* и акклиматизации *ex vitro* у нескольких видов, таких как мирт (*Myrtus communis*) (Parra et al. 2001), агава (De-la-Pena et al. 2012) и миндаль (Martins et al. 2004). Эта стабильность может играть важную роль в массовом размножении элитных индивидуумов, не возвращаясь к образованию трансгенных линий. Однако более качественное понимание эпигенетической регуляции путем метилирования ДНК или модификаций гистонов, морфогенетических процессов и других соответствующих явлений, таких как рост и распределение продуктов фотосинтеза по агрономически желательным признакам и устойчивость / толерантность к биотическим и абиотическим стрессам, - это лишь некоторые из тех, которые необходимы для выполнения очень важной и трудоемкой работы по модуляции сельскохозяйственных культур для улучшения производства продуктов питания и метаболитов которые представляют интерес, продления срока годности и многих других ограничений для удовлетворения потребностей растущего населения мира. С другой стороны, в случае miRNAs, можно было бы подумать, что в будущем знания о подвижности miRNA в культуре тканей могут полностью реализовать свой потенциал в качестве стратегии для разведения видов, сложно поддающихся разведению, таких как деревья, с целью стимуляции омоложения. Кроме того, секреция малых РНК в культуральную среду была обнаружена в клетках животных (Wang et al. 2010); следовательно, заманчиво предположить, что растения могут также секретировать миРНК в среду. Если

это так, было бы интересно исследовать эффекты, которые может оказывать добавление определенных малых РНК в питательные среды для растений, сложно поддающихся разведению.

## Выводы

Основной идеей данного обзора было донести мысль, что эпигенетические изменения неотделимы от генетических, и по своей значимости ни в чем им не уступают. На сегодняшний день, тема эпигенетической регуляции морфогенеза *in vitro*, на мой взгляд, изучена недостаточно хорошо для того, чтобы использовать имеющуюся информацию с целью практического применения. Это связано, прежде всего, с тем, что сами по себе эпигенетические маркеры существуют в очень малых концентрациях, а также то, что все эпигенетические показатели по своей природе очень динамичны (хотя это не мешает им зачастую передаваться по наследству). Также сложности при изучении связи эпигенетики и морфогенеза связаны с подборкой оптимальных условий для культивирования различных видов и сортов, так как они могут значительно различаться у разных видов, а это, как известно, влечет определенные финансовые затраты.

На мой взгляд, все исследования, которые связаны с темой эпигенетики являются значимым шагом на пути к более прогрессивному и биотехнологически развитому будущему. Эпигенетическая регуляция поможет осуществлять более тонкую модуляцию различных процессов морфогенеза *in vitro*, что не может не отразиться на возможности более широкого применения данных методов на практике. А это — увеличение урожайности, повышение устойчивости к неблагоприятным климатическим условиям, иммунитет к возбудителям различных заболеваний, быстрое получение биомассы в необходимых объемах и т. п.

## **Список использованной литературы**

1. Культура клеток и тканей растений, Тимофеева О.А., Румянцева Н.И.: учебное пособие - Казань, 2012. - 91 с.
2. Божков А.И. Биотехнология: фундаментальные и промышленные аспекты. – Харьков: Федорко, 2008. – 265 с.
3. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. –Изд. 2-е. СПб.: Изд-во С.-Петербур. Ун-та, 2010. – 228с.
4. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
5. Морфогенез у растений *in vitro*, Ю. Н. Журавлев, А. М. Омелько. - Физиология растений, 2008, том 55, № 5, с. 643-664.
6. Генетическая и эпигенетическая регуляция развития растительных организмов (обзор), С.С. Медведев, Е.И. Шарова, - Journal of Siberian Federal University. Biology 2 (2010 3) 109-129
7. Эпигенетические механизмы и их роль в развитии растений, М. А. Лебедева\*, В. Е. Творогова, О. Н. Тиходеев. - ГЕНЕТИКА, 2017, том 53, No 10, с. 1115–1131.
8. Review. In vitro culture: an epigenetic challenge for plants, Rosa Us-Camas, Gustavo Rivera-Solís Fátima Duarte-Aké ,Clelia De-la-Peña. - Plant Cell Tiss Organ Cult, 2014. - 16 p. DOI 10.1007/s11240-014-0482-8