

УДК 58.085

НЕЗРЕЛЫЙ ЗАРОДЫШ ПШЕНИЦЫ КАК МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИ КОМПЕТЕНТНЫЙ ЭКСПЛАНТАТ

Н.Н. КРУГЛОВА, А.А. КАТАСОНОВА

*Институт биологии Уфимского научного центра Российской академии наук
450054 Уфа, просп. Октября, 69*

Проведен сравнительный анализ отзывчивости разновозрастных зародышей пшеницы на условия культивирования *in vitro* при различных концентрациях 2,4-Д в питательной среде. Установлено, что основным условием формирования *in vitro* морфогенных каллюсов является инокуляция незрелых зародышей пшеницы на подстадии 3 стадии органогенеза зародыша, согласно авторской периодизации. Показано, что морфогенетическая компетентность такого зародыша определяется его цитогистологическим статусом.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., зародыш, каллюс, морфогенез *in vitro*, 2,4-Д.

Получение морфогенных каллюсов и последующая регенерация растений — неотъемлемая часть многих растительных биотехнологий. Трудности, зачастую возникающие при прохождении этих этапов, особенно характерны для культивируемых *in vitro* различных эксплантатов злаков. Несмотря на то что регенерация растений из каллюсов описана для многих представителей этого семейства (пшеницы [6, 8, 9, 12], кукурузы [15], риса [13], ячменя [2, 5], сорго [18, 20]), совершенствование системы культивирования *in vitro* эксплантатов остается актуальным для злаков.

Отдельная проблема в этой области — выявление условий формирования морфогенных каллюсов. Имеющиеся в литературе данные сводятся, как правило, к сведениям о составе (главным образом, фитогормональном) и рН питательной среды, использование которой способствовало формированию морфогенных каллюсов [14, 21, 24 и др.].

Однако остается открытым один из самых важных вопросов: каковы особенности эксплантата, в условиях *in vitro* дающего начало морфогенному каллюсу, тотипотентные клетки которого в ходе дальнейшего культивирования способны развиваться по различным путям морфогенеза *in vitro*, в том числе по пути регенерации растения. Это, на наш взгляд, непростой вопрос. Хорошо известно, что использование экзогенных факторов (фитогормоны, абиотические факторы) не всегда приводит к индукции формирования морфогенного каллюса и путей морфогенеза в нем.

В качестве эксплантата для получения *in vitro* морфогенного каллюса у злаков перспективно использование незрелых зародышей [4, 22, 26]. При описании инокулируемого зародыша исследователи, как правило, указывают либо его длину, либо сутки после опыления, на которые незрелый зародыш извлекался из зерновки [5, 19, 27]; при этом, за редким

исключением (например, работа [4]), не указывается «возраст» (стадия развития) зародыша, отсутствует четкое морфологическое и цитогистологическое описание зародыша, инокулируемого на питательную среду.

В связи с этим нами проведено цитогистологическое исследование инокулируемых незрелых зародышей пшеницы на разных стадиях развития с целью уточнения особенностей морфогенетически компетентного зародыша в стадии, оптимальной для получения морфогенного каллуса *in vitro*.

Методика

В качестве объекта исследований использовали яровую мягкую пшеницу *Triticum aestivum* L. сорта Симбирка. Согласно предварительным данным, зародыши этого сорта характеризуются высокой отзывчивостью на условия культуры *in vitro* [7]. Семена предоставлены лабораторией селекции яровой пшеницы Башкирского НИИ СХ РАСХН согласно Договору о творческом сотрудничестве. Растения выращивали на экспериментальных участках научного стационара Института биологии УНЦ РАН (Уфимский район), срезали на 2,5–25,0 сут после искусственного опыления.

Зародыши инокулировали на следующих последовательных стадиях развития, согласно авторской периодизации [11]: четырехклеточный зародыш (2,5 сут после опыления, длина зародыша 0,12–0,14 мм); многоклеточный зародыш (3,0–4,0 сут после опыления, длина зародыша 0,15–0,2 мм); органогенез в трех подстадиях: подстадия 1 (5,0–6,5 сут после опыления, длина зародыша 0,4–0,6 мм), подстадия 2 (8,5–10,0 сут после опыления, длина зародыша 0,8–1,3 мм), подстадия 3 (12,5–17,0 сут после опыления, длина зародыша 1,5–2,0 мм); сформированный зародыш (20,0 сут после опыления, длина зародыша 2,1–2,2 мм); зрелый зародыш (22,0–25,0 сут после опыления, длина зародыша 2,3–2,6 мм).

Использовали метод культуры *in vitro* незрелых зародышей пшеницы [16] в модификациях [17] и [12]. Для индукции каллюсообразования применяли среду, составленную по прописи Мурасиге–Скуга [23], рН 5,8, с введением 0,2 мг/л кинетина и 2,4-Д в различных концентрациях: без 2,4-Д (контроль); 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 мг/л. Зародыши, размещенные на питательной среде щитком вниз, инкубировали в темноте при 27 °С.

Постоянные препараты зародышей и каллюсов готовили по общепринятой методике [1] в модификации [10]. Препараты фотографировали с помощью микровизора проходящего света μ VIZO-103 (ОАО «ЛОМО», Санкт-Петербург). Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Microsoft Office Excel 2003. Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным данным, отзывчивость/неотзывчивость зародышей на условия культивирования *in vitro* при прочих равных условиях определялась стадией эмбриогенеза и концентрацией 2,4-Д в питательной среде (таблица).

Отзывчивость разновозрастных зародышей яровой мягкой пшеницы сорта Симбарка на условия культивирования *in vitro*

Стадия эмбриогенеза	Время после опыления, сут	Контроль (без 2,4-Д)	Концентрация 2,4-Д, мг/л										
			1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0			
Четырехклеточный зародыш	2,5	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
	3,0	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
	4,0	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
Подстадия 1 стадии органогенеза	5,0	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
	6,5	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
Подстадия 2 стадии органогенеза	8,5	Д	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК
	10,0	Д	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК
Подстадия 3 стадии органогенеза	12,5	Д	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК
	14,0	Д	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК
Сформированный зародыш	15,0	Д	МК	МК	МК	МК	МК	МК	МК	МК	МК	МК	МК
	16,0	Д	МК	МК	МК	МК	МК	МК	МК	МК	МК	МК	МК
Зрелый зародыш	17,0	Д	МК	МК	МК	МК	МК	МК	МК	МК	МК	МК	МК
	20,0	П	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК
Зрелый зародыш	22,0	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П
	25,0	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П	П

Примечание. Д — дегенерация эксплантата; П — формирование проростка; НМК — формирование неморфогенного каллуса; МК — формирование морфогенного каллуса.

Так, культивирование *in vitro* зародышей, инокулированных на стадиях четырехклеточного и многоклеточного зародыша, а также на подстадии 1 стадии органогенеза, в условиях наших экспериментов приводило к постепенной дегенерации эксплантатов на всех вариантах сред, в том числе и в контроле.

Культивирование *in vitro* зародышей, инокулированных на подстадии 2 стадии органогенеза, при концентрациях 2,4-Д 1,0–8,0 мг/л через 5–7 сут вело к формированию обводненных каллюсов желтоватого цвета, неопределенной формы, рыхлой консистенции. По данным цитогистологического анализа, каллюс представлен крупными клетками, зачастую без ядер, и большими межклетниками. Такой каллюс охарактеризован нами как неморфогенный. Действительно, по результатам дальнейших

экспериментов, при культивировании каллюса в нем не удалось индуцировать морфогенез и регенерацию растений. В контрольном варианте каллюсообразования не наблюдали, все эксплантаты постепенно дегенерировали.

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на подстадии 3 стадии органогенеза, при концентрации 2,4-Д 1,0–4,0 мг/л через 3–5 сут наблюдали формирование плотных компактных каллюсов матового желтовато-белого цвета, узловатой формы (рис. 1, а). В ходе дальнейших экспериментов установлено, что именно в таких каллюсах отмечается морфогенез, а в последующем — регенерация растений. Такие каллюсы обозначены нами как морфогенные. Цитогистологический анализ показал, что клетки морфогенного каллюса, несмотря на определенную гетерогенность, в основном однородны, плотно прилегают друг к другу. По таким признакам, как правильная изодиаметрическая форма, незначительная вакуолизация, наличие крупных ядер, занимающих центральное положение, и плотная клеточная стенка (см. рис. 1, б),

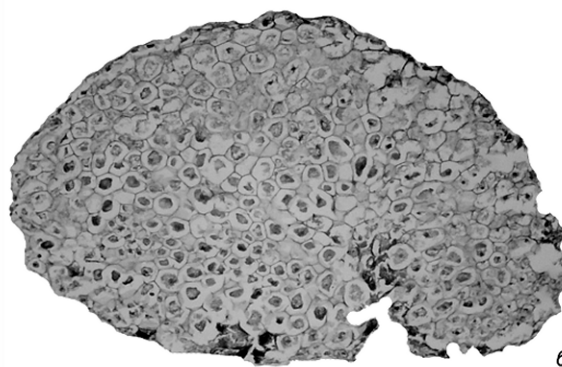
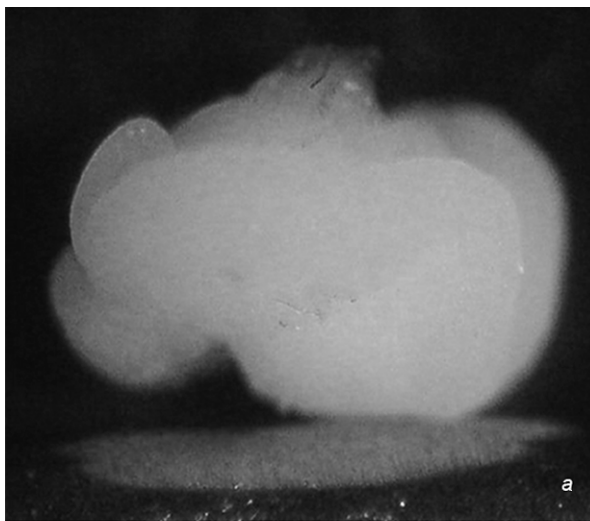


Рис. 1. Морфогенный каллюс, образовавшийся из зародыша, инокулированного на подстадии 3 стадии органогенеза (среда Мурасиге—Скуга, 2,0 мг/л 2,4-Д, 7 сут культивирования *in vitro*):

а — общий вид, $\times 15$; б — постоянный препарат, продольный срез, $\times 200$

большинство клеток каллюса можно характеризовать как меристематические.

Цитогистологическое исследование инокулированных зародышей — «родоначальников» морфогенных каллюсов показало, что на подстадии 3 стадии органогенеза происходят обособление зачатков органов зародыша и их тканевая дифференциация; все органы такого зародыша представлены активно развивающимися меристематическими клетками, не покрытыми плотной клеточной стенкой (рис. 2).

При концентрации 2,4-Д 5,0—8,0 мг/л через 5—7 сут культивирования зародышей, инокулированных на подстадии 3 стадии органогенеза, наблюдали формирование неморфогенных каллюсов. В контрольном варианте этой части экспериментов все эксплантаты дегенерировали.

Зародыши, инокулированные на стадии сформированного зародыша, на питательной среде без 2,4-Д (контроль) через 10—12 сут культивирования давали начало проросткам. Стадия сформированного зародыша, приходящаяся на 20-е сут после опыления, по-видимому, соответствует стадии автономности зародыша [3]. При культивировании сформированного зародыша на средах с концентрацией 2,4-Д 1,0—8,0 мг/л через 5—7 сут наблюдали образование неморфогенного каллюса.

Зародыши, инокулированные на стадии зрелого зародыша, через 7—9 сут давали начало проросткам при всех концентрациях 2,4-Д и в контроле.

Полученные результаты об оптимальной для индукции формирования морфогенного каллюса стадии развития зародыша согласуются с рядом литературных данных по пшенице (например, [25]). Более того, от-

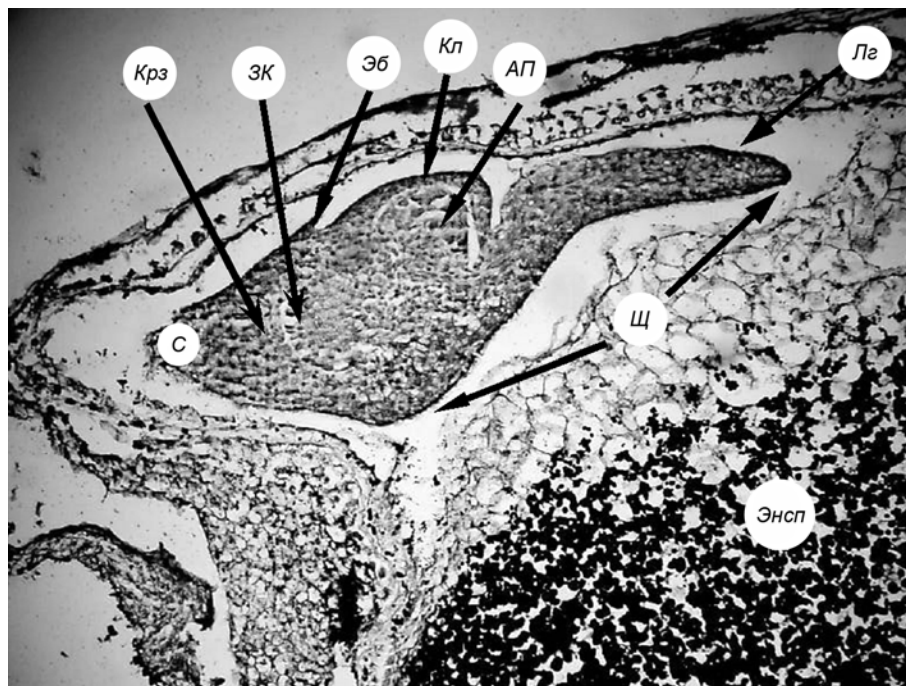


Рис. 2. Зародыш на подстадии 3 стадии органогенеза, постоянный препарат, продольный срез, $\times 150$:

Ап — апекс побега; ЗК — зародышевый корень; Кл — колеоптиль; Крз — колеориза; Лг — лигула; С — суспензор; Щ — щиток; Эб — эпибласт; Энсп — эндосперм

мечено уменьшение морфогенетических потенций у каллюсов, полученных из более зрелых зародышей [4].

Таким образом, согласно результатам проведенных экспериментов, основным условием формирования *in vitro* морфогенных каллюсов является инокуляция зародышей яровой мягкой пшеницы на подстадии 3 стадии органогенеза. Зародыш на этой стадии имеет определенный цитогистологический статус: наличие органов на ранней стадии развития со значительным количеством меристематических клеток. Такой цитогистологический статус зародыша должен коррелировать с его физиологическим состоянием, однако для выяснения этого вопроса необходимы специальные исследования.

Согласно полученным результатам, концентрация 2,4-Д также играет определенную роль, однако, на наш взгляд, не главенствующую, поскольку использование одной и той же концентрации этого синтетического ауксина вело к различной реакции разновозрастных зародышей пшеницы. Более того, в ряде контрольных случаев отзывчивость эксплантата не зависела от наличия 2,4-Д в среде. В целом полученные данные свидетельствуют, что при прочих равных условиях компетентность клеток зародыша пшеницы к формированию морфогенного каллюса в условиях *in vitro* зависит не столько от внешних стимулов, сколько от статуса клеток эксплантата в момент инокуляции, а именно — их меристематичности.

Полученные результаты еще раз подтверждают ранее высказанное мнение, что для злаков именно природа эксплантата является основным фактором, определяющим морфогенетическую способность клеток зародыша к формированию каллюса и дальнейшую регенерацию растений из клеток каллюса в условиях культуры *in vitro* (по [4]). Кроме того, клетки такого зародыша не только морфогенетически компетентны, но и являются исходными для меристематических клеток морфогенного каллюса, имеющих все морфогенетические возможности, реализующиеся различными путями морфогенеза *in vitro*, т.е. тотипотентных. Более того, клетки зародыша, дающие начало полноценным (фертильным) растениям-регенерантам через этап формирования *in vitro* морфогенного каллюса, по-видимому, можно расценивать в определенном смысле и как ствольные клетки.

Исследования выполнены при поддержке РФФИ (проект № 08-04-97405), Академии наук Республики Башкортостан (проект № 40/40-П), а также по программе «Ведущие научные школы РФ» (проекты НШ 4834.2006.4, НШ 2096.2008.4).

1. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г. и др. Справочник по ботанической микро-технике. Основы и методы. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 2004. — 312 с.
2. Белинская Е.В. Создание признаковой коллекции ячменя по способности к андрогенезу *in vitro* и ее использование в генетических и биотехнологических исследованиях // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2007. — 5, № 1, 2. — С. 11—20.
3. Васильева В.Е., Батыгина Т.Б. Автономность зародыша // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. — Т. 2: Семя. — СПб.: Мир и семья, 1997. — С. 579—588.
4. Гапоненко А.К., Мунтян М.А., Маликова Н.И., Созинов А.А. Регенерация растений пшеницы *Triticum aestivum* L. *in vitro* // Цитология и генетика. — 1985. — 19, № 5. — С. 335—342.
5. Дунаева С.Е., Лукьянова М.В., Ковалева О.Н., Козырева О.Г. Способность незрелых зародышей к образованию растений-регенерантов в культуре *in vitro* у ранне- и поздне-

- спелых сортов ячменя. I. Регенерация растений в первичном каллусе, полученном от незрелых зародышей // Физиология растений. — 2000. — 47, № 1. — С. 53—57.
6. *Игнатова С.А.* Биотехнологические основы получения гаплоидов, отдаленных гибридов и соматических регенерантов зерновых и бобовых культур в различных системах in vitro: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Одесса, 2004. — 48 с.
 7. *Катасонова А.А., Круглова Н.Н., Шаяхметов И.Ф.* Этапы биотехнологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы путем эмбриоидогенеза в каллусной культуре in vitro // Изв. Челябинск. НЦ УрО РАН. — 2006. — 2(32). — С. 78—82.
 8. *Копертех Л.Г., Бутенко Р.Г.* Нативные фитогормоны экспланта и морфогенез пшеницы in vitro // Физиология растений. — 1995. — 42, № 1. — С. 115—118.
 9. *Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю. и др.* Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: Атлас. — М.: Наука, 2005. — 99 с.
 10. *Круглова Н.Н., Егорова О.В., Сельдимирова О.А. и др.* Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений. — Уфа: Гилем, 2008. — 119 с.
 11. *Круглова Н.Н.* Периодизация развития зародыша пшеницы для биотехнологических исследований // Аграрная Россия. — 2008. — № 3. — С. 20—22.
 12. *Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А.* Регенерация пшеницы in vitro и ex vitro. — Уфа: Гилем, 2008. — 139 с.
 13. *Кучеренко Л.А.* Морфологическая разнокачественность каллусных тканей риса и ее связь с регенерационной способностью // Физиология растений. — 1993. — 40, № 5. — С. 797—801.
 14. *Пиралов Г.Р., Абраимова О.Е.* Влияние биологических особенностей исходного материала и состава питательных сред на каллусогенез и регенерацию в культуре незрелых зародышей кукурузы // Физиология и биохимия культ. растений. — 1997. — 29, № 1. — С. 44—50.
 15. *Сатарова Т.Н.* Прямая регенерация растений в культуре пыльников кукурузы // Там же. — 2002. — 34, № 2. — С. 152—177.
 16. *Суханов В.М., Папазян Н.Д.* Условия получения каллуса и регенерантов в культуре незрелых зародышей пшеницы // Апомиксис и цитоэмбриология растений. — Саратов, 1983. — № 5. — С. 124—128.
 17. *Шаяхметов И.Ф.* Соматический эмбриогенез и селекция злаковых культур. — Уфа: Изд-во Башк. ун-та, 1999. — 165 с.
 18. *Эльконин Л.А., Тырнов В.С., Суханов В.М., Ишин А.Г.* Регенерация растений в культуре тканей сорго // Докл. ВАСХНИЛ. — 1984. — № 4. — С. 7—9.
 19. *Chang Y., von Zitzewitz J., Hayes P.M., Chen T.H.H.* High frequency plant regeneration from immature embryos of an elite barley cultivar (*Hordeum vulgare* L. cv. Morex) // Plant Cell Res. — 2003. — 21, N 8. — P. 733—738.
 20. *Hagio T.* Adventitious shoot regeneration from immature embryos of sorghum // Plant Cell, Tissue. Organ Cult. — 2002. — 68, N 1. — P. 65—72.
 21. *Huang X.-Q., Wei Z.-M.* High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays* L.) // Plant Cell Rep. — 2004. — 22, N 11. — P. 793—800.
 22. *Li Z.Y., Xia G.M., Chen H.M., Guo G.Q.* Plant regeneration from protoplast derived from embryogenic suspension culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) // J. Plant Physiol. — 1992. — 139, N 1. — P. 714—718.
 23. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // Physiol. Plant. — 1962. — 15, N 3. — P. 473—497.
 24. *Pellegrineschi A., Brito R.M., McLean S., Hoisington D.* Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and NaCl on the establishment of callus and plant regeneration in durum and bread wheat // Plant Cell, Tissue, Organ Cult. — 2004. — 77, N 3. — P. 245—250.
 25. *Przetakiewicz A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A.* The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale // Ibid. — 2003. — 73, N 3. — P. 245—256.
 26. *Sharma V.K., Rao A., Varshney A.* Comparison of developmental stages of inflorescence for high frequency plant regeneration in *Triticum aestivum* L. and *T. durum* Desf. // Plant Cell Rep. — 1995. — 15, N 1. — P. 227—231.
 27. *Vikrant Rashid A.* Comparative study of somatic embryogenesis from immature and mature embryos and organogenesis from leaf-base of Triticale // Plant Cell, Tissue, Organ Cult. — 2001. — 64, N 1. — P. 33—38.

Получено 19.08.2008

НЕЗРІЛИЙ ЗАРОДОК ПШЕНИЦІ ЯК МОРФОГЕНЕТИЧНО КОМПЕТЕНТНИЙ
ЕКСПЛАНТАТ

Н.М. Круглова, А.О. Катасонова

Институт биологии Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа

Проведено порівняльний аналіз відгуку різновікових зародків пшениці на умови культивування *in vitro* за різних концентрацій 2,4-Д у поживному середовищі. Встановлено, що основною умовою формування *in vitro* морфогенних калюсів є інокуляція незрілих зародків пшениці на підстаді 3 стадії органогенезу зародка, згідно з авторською періодизацією. Показано, що морфогенетична компетентність такого зародка визначається його цитогістологічним статусом.

IMMATURE WHEAT EMBRYO AS THE MORPHOGENETICALLY COMPETENT
EXPLANT

N.N. Kruglova, A.A. Katasonova

Institute of Biology of Ufa Scientific Center of Russian Academy of Sciences
69 pr. Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia

The comparative analysis of responsiveness of wheat uneven-age embryos on culture *in vitro* conditions at various concentration 2,4-D in a nutrient medium was carried out. It was established, that the main condition of morphogenic calli formation *in vitro* is the inoculation of wheat immature embryos on the substage 3 of the embryo organogenesis stage (under the author periodization). The morphogenetic competence of such embryo is defined by its cytohistological status.

Key words: *Triticum aestivum* L., embryo, callus, morphogenesis *in vitro*, 2,4-D.