

УДК 581.143.6:576.31

DOI: 10.31040/2222-8349-2019-0-1-25-29

**ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ЗАРОДЫША ПШЕНИЦЫ В СТАДИИ ОРГАНОГЕНЕЗА *IN VIVO*, ОПТИМАЛЬНОЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МОРФОГЕННОГО КАЛЛУСА *IN VITRO***

© Н.Н. Круглова, О.А. Сельдимирова, А.Е. Зинатуллина

Проведено гистологическое исследование инокулируемых зародышей яровой мягкой пшеницы Жница на разных стадиях развития *in vivo* (согласно авторской периодизации) с целью выявления статуса зародыша в стадии, оптимальной для получения морфогенного каллуса *in vitro*. Установлено, что начало морфогенному каллусу дают незрелые зародыши, инокулированные на подстадии 3 стадии органогенеза, при концентрации 2,4-Д в питательной среде 1.0–4.0 мг/л. Выявлен гистологический статус таких зародышей: обособление зачатков органов зародыша и их тканевая дифференциация; все органы зародыша представлены активно развивающимися меристематическими клетками, не покрытыми плотной клеточной стенкой. В дальнейшем морфогенный каллус формируется из эпидермальных клеток щитка, находящихся в контакте с питательной средой.

В целом полученные данные свидетельствуют, что при прочих равных условиях компетентность клеток зародыша пшеницы *in vivo* к формированию морфогенного каллуса *in vitro* зависит не столько от внешних стимулов, сколько от статуса клеток зародыша в момент инокуляции, а именно – их меристематичности. Для злаков, по-видимому, именно природа экспланта *in vivo* является основным фактором, определяющим морфогенетическую способность клеток зародыша к формированию каллуса и дальнейшую регенерацию растений из клеток каллуса *in vitro*. С другой стороны, клетки такого зародыша не только морфогенетически компетентны, но и являются исходными для меристематических клеток морфогенного каллуса, имеющих все морфогенетические возможности, присущие данной особи и 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 каллуса, по-видимому, можно расценивать в определенном смысле и как стволовые клетки.

Ключевые слова: органогенез зародыша *in vivo*, каллус *in vitro*, яровая мягкая пшеница, *Triticum aestivum* L.

Регенерация растений из культивируемых *in vitro* каллусов различного происхождения – неотъемлемая часть ряда биотехнологий. Отдельная проблема в этой области – выявление особенностей экспланта, в условиях *in vitro* дающего начало каллусу – интегрированной системе клеток, образующейся как экзогенно (в результате пролиферации поверхностных клеток различных тканей растительного организма), так и эндогенно (в глубине тканей); изначально состоящей из однородных клеток, постепенно преобразующихся в систему групп гетерогенных клеток с видоспецифичными морфогенетическими потенциями, которые реализуются различными путями морфогенеза [по: 1–3].

Тотипотентные клетки каллуса в ходе дальнейшего культивирования способны развиваться по различным путям морфогенеза *in vitro*, включая регенерацию растения (обзор [4]).

Одни из активно используемых эксплантов при разработке биотехнологий хлебных злаков – зрелые и незрелые зародыши. В ходе культивирования из зародышей формируются каллусы обычно двух типов: морфогенные, клетки которых способны к дальнейшему морфогенезу *in vitro* и регенерации растений, и неморфогенные, клетки которых не обладают такой способностью (по [2]). Нами выявлено формирование и потенциально морфогенных зародышевых каллусов у пшеницы [5].

КРУГЛОВА Наталья Николаевна – д.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: kruglova@anrb.ru

СЕЛЬДИМИРОВА Оксана Александровна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: seldimirova@anrb.ru

ЗИНАТУЛЛИНА Анна Евгеньевна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: aneta@ufaras.ru

Как правило, типы зародышевых каллусов злаков выявляют по их морфологическим показателям: морфогенные – компактные, узловатые, плотные, обычно белого цвета, неморфогенные – рыхлые, мягкие, водянистые, обычно желтоватой окраски [2]. Достаточно активно проводятся сравнительные гистологические исследования каллусов различных типов (обзор [4]). На примере злаков хорошо установлено, что в образовании того или иного типа каллуса определяющую роль играет баланс эндогенных (в составе пыльника в момент инокуляции) и экзогенных (в составе индукционной среды) фитогормонов [6].

В качестве экспланта для получения *in vitro* морфогенного каллуса у злаков перспективно использование зародышей. При характеристике инокулируемого зародыша исследователи обычно указывают либо длину зародыша, либо сутки после опыления, на которые зародыш извлекается из зерновки; при этом не указывается стадия развития зародыша, отсутствует его гистологическое описание.

В связи с этим нами проведено гистологическое исследование инокулируемых зародышей пшеницы на разных стадиях развития с целью выявления статуса зародыша в стадии, оптимальной для получения морфогенного каллуса *in vitro*.

**Материал и методы исследования.** Объект исследования – сорт яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) Жница. Зародыши пшеницы этого сорта, согласно предварительной оценке [2], характеризуются высокой частотой образования каллусов – до 90% от числа инокулированных зародышей.

Донорные растения выращивали в полевых условиях на экспериментальных участках научного стационара Уфимского Института биологии УФИЦ РАН (Уфимский район) и срезали на 2.0–25.0 сут после искусственного опыления.

На питательные среды инокулировали зародыши, изолированные через определенное время после искусственного опыления на следующих стадиях эмбриогенеза (согласно авторской периодизации [7]): четырехклеточный зародыш (2.0–2.5 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 (4.5–8.0 сут после опыления, длина зародыша 0.4–0.6 мм), подстадия 2 (8.5–12.0 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 (17.5–20.0 сут после опыления, длина зародыша 2.1–2.2 мм); зрелый зародыш (21.0–25.0 сут после опыления, длина зародыша 2.3–2.6 мм). Незрелые зародыши на стадии зиготы и стадии двухклеточного зародыша в экспериментах не использовали, поскольку миниатюрность зародышей на этих стадиях эмбриогенеза представляет значительную методическую трудность.

Для индукции каллусообразования использовали среду, составленную по прописи Мурашиге–Скуга (по [2]), pH 5.8, с введением 0.2 мг/л кинетина и 2,4-Д в следующих концентрациях: 0.0 (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°C.

Вели визуальную оценку морфологических показателей морфогенных/неморфогенных каллусов.

Использовали предложенные нами гистологические (светооптические) методы, модифицированные применительно к биотехнологическим исследованиям [8]. Гистологические препараты зародышей и каллусов анализировали с использованием микроскопа проходящего света Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Germany), оснащенного объективом EC Plan-NEOFLURAL 10×0.3. Документацию изображений вели с использованием цифровой фотокамеры AxioCam MRc5 с программным обеспечением Axio Vision 4.7 («Carl Zeiss», Германия).

Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Microsoft Office Excel 2010.

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

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на стадиях четырехклеточного и многоклеточного зародыша, на подстадии 1 стадии органогенеза при всех концентрациях 2,4-Д в питательной среде и в безгормональном контроле ответной реакции зародышей не наблюдали. Такие зародыши постепенно дегенерировали.

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на подстадии 2 стадии орга-

ногенеза на всех вариантах сред с 2,4-Д через 5–7 сут культивирования наблюдали формирование неморфогенных обводненных каллусов желтоватого цвета, неопределенной формы, рыхлой мягкой консистенции. Пролиферация каллусов была скудной, и в ходе дальнейшего культивирования такие каллусы постепенно дегенерировали. По данным цито-гистологического анализа, такие каллусы представлены рыхло расположенными крупными клетками с большими межклетниками, ядра в клетках отсутствуют. В контрольном безгормональном варианте каллусообразования не наблюдали, экспланты постепенно дегенерировали.

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на подстадии 3 стадии органогенеза, через 5–7 сут культивирования при концентрации 2,4-Д в питательной среде 1.0–4.0 мг/л формировались морфогенные каллусы, в которых в ходе дальнейших экспериментов отмечались различные процессы морфогенеза, в том числе ведущие к формированию регенерантов. В остальных случаях, в том числе в контрольном безгормональном варианте, из таких зародышей формировались неморфогенные каллусы, также представленные крупными безъядерными вакуолизированными клетками неправильной формы.

Зародыши, инокулированные на стадии сформированного зародыша, при культивировании *in vitro* на среде с добавлением 2,4-Д (все концентрации) через 5–7 сут формировали неморфогенные водянистые каллусы. Через 10–12 сут культивирования на безгормональной питательной среде (контроль) зародыши давали начало проросткам регенерантов.

Зародыши, инокулированные на стадии зрелого зародыша, через 7–9 сут культивирования *in vitro* давали начало проросткам регенерантов при всех использованных концентрациях 2,4-Д в питательной среде и в контроле.

Таким образом, формирование морфогенного (регенерационно способного) каллуса в условиях выполненных экспериментов отмечено только при культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на подстадии 3 стадии органогенеза. По морфологическим данным такие каллусы представляют собой структуры плотной компактной консистенции, матового желтоватого цвета, узловатой формы (рис. 1, а).

Гистологический анализ показал, что клетки морфогенного каллуса, несмотря на определенную гетерогенность, главным образом однородны

и плотно прилегают друг к другу. По таким признакам, как правильная изодиаметрическая форма, незначительная вакуолизация и наличие крупных ядер, занимающих центральное положение, большинство клеток каллуса можно характеризовать как меристематические (рис. 1, б).

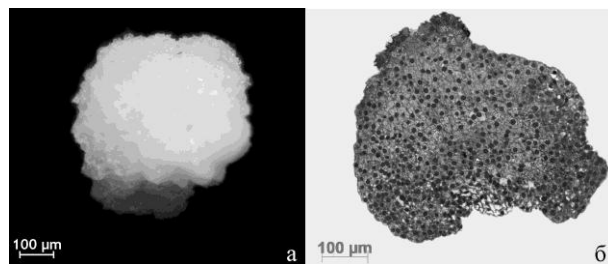


Рис. 1. Морфогенный каллус пшеницы по морфологическим (а) и гистологическим (б) данным. Пояснения – в тексте

Согласно проведенным экспериментам, основным условием формирования *in vitro* морфогенных каллусов является использование незрелых зародышей пшеницы на подстадии 3 стадии органогенеза (12.5–17.0 сут после опыления, длина зародыша 1.5–2.0 мм). Зародыш на этой стадии характеризуется определенным гистологическим статусом: происходит обособление зачатков органов (единственной семядоли – щитка, апекса побега, главного зародышевого корня, колеоптиля и эпибласта) и их тканевая дифференциация; все органы такого зародыша представлены активно развивающимися меристематическими клетками, не покрытыми плотной клеточной стенкой (рис. 2).

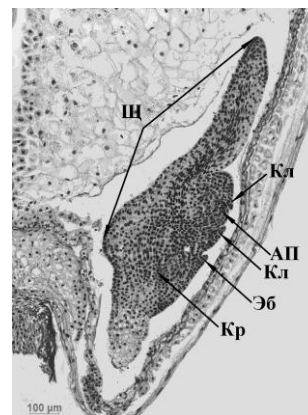


Рис. 2. Незрелый зародыш пшеницы сорта Жница на подстадии 3 стадии органогенеза (по гистологическим данным). Условные обозначения: АП – апекс побега, Кл – колеоптиль, Кр – главный зародышевый корень, Щ – щиток, Эб – эпибласт. Пояснения – в тексте

Как свидетельствуют данные дальнейших гистологических исследований, морфогенный каллус формируется из эпидермальных клеток щитка, находящегося в контакте с питательной средой.

Концентрация 2,4-Д также играет определенную роль в индукции формирования морфогенного каллуса, однако, на нашем мнении, не главенствующую, поскольку использование одной и той же концентрации этого синтетического ауксина вело к различной реакции разновозрастных зародышей пшеницы. Более того, в ряде вариантов отзывчивость экспланта не зависела от наличия 2,4-Д в среде.

Данные, полученные для пшеницы сорта Жница, соответствуют проведенным нами ранее аналогичным исследованиям пшеницы сортов Симбирка [9] и Саратовская 55 [10]. Во всех случаях морфогенный каллус получали из незрелых зародышей на подстадии 3 стадии органогенеза, на 15–17 сут после опыления. Такое сходство результатов может свидетельствовать об определенной универсальности стадии эмбриогенеза яровой мягкой пшеницы, во время которой зародыши компетентны к формированию морфогенного каллуса в условиях *in vitro*.

В целом полученные данные свидетельствуют, что при прочих равных условиях компетентность клеток зародыша пшеницы к формированию морфогенного каллуса в условиях *in vitro* зависит не столько от внешних стимулов, сколько от статуса клеток зародыша в момент инокуляции, а именно – их меристематичности.

Для злаков, по-видимому, именно природа экспланта является основным фактором, определяющим морфогенетическую способность клеток зародыша к формированию каллуса и дальнейшую регенерацию растений из клеток каллуса в условиях культуры *in vitro*. С другой стороны, клетки такого зародыша не только морфогенетически компетентны, но и являются исходными для меристематических клеток морфогенного каллуса, имеющих все морфогенетические возможности, присущие данной особи и 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 каллуса, по-видимому, можно расценивать в определенном смысле и как стволовые клетки, в понимании Т.Б. Батыгиной (по [1]).

*Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-Ф18-118022190099-6 на 2018–2022 гг.*

*Исследования проведены с использованием приборов ЦКП «Агидель» УФИЦ РАН.*

### Литература

1. От микроспоры – к сорту / Т.Б. Батыгина, Н.Н. Круглова, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдиминова. М.: Наука, 2010. 174 с.
2. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.
3. Круглова Н.Н. Каллус как модель для изучения формирования структуры высшего растения // Известия Уфимского научного центра РАН. 2011. № 3–4. С. 17–22.
4. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А. Морфогенез в андроклиных каллусах злаков: цитогистологические особенности // Успехи соврем. биол. 2010. Т. 130, № 3. С. 247–257.
5. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А. Потенциально морфогенный каллус пшеницы // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 2.
6. Сельдиминова О.А., Круглова Н.Н. Баланс эндогенных и экзогенных гормонов и пути морфогенеза в андроклиных каллусах пшеницы *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2015. № 1. С. 33–39.
7. Круглова Н.Н. Периодизация эмбриогенеза пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // Известия Уфимского научного центра РАН. 2012. № 2. С. 21–24.
8. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений / Н.Н. Круглова, О.В. Егорова, О.А. Сельдиминова, Д.Ю. Зайцев, А.Е. Зинатуллина. Уфа: Гилем, 2013. 128 с.
9. Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш как морфогенетически компетентный эксплантат // Физиол. и биохим. культ. раст. 2009. Т. 41, № 2. С. 124–131.
10. Катасонова А.А., Круглова Н.Н. Зародыш пшеницы как компетентный эксплант для получения морфогенных каллусов *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2011. № 2. С. 27–31.

### References

1. Batygina T.B., Kruglova N.N., Gorbunova V.Yu., Titova G.E., Seldimirova O.A. From microspore to cultivar. Moscow, Nauka, 2010. 174 p.
2. Kruglova N.N., Seldimirova O.A. Wheat regeneration *in vitro* and *ex vitro*. Ufa, Gilem, 2011. 124 p.
3. Kruglova N.N. Callus as a model for studying the formation of higher plant structure. Izvestiya

Ufimskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk, 2011, no. 3–4, pp. 17–22.

4. Kruglova N.N., Seldimirova O.A. Morphogenesis of cereal androclonic calli: Cytohistological features. *Uspekhi sovremennoy biologii*, 2010, vol. 130, no. 3, pp. 247–257.

5. Kruglova N.N., Seldimirova O.A. Potentially morphogenic wheat callus. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*, 2018, no. 2, pp. 61–65.

6. Seldimirova O.A., Kruglova N.N. Balance of endogenous and exogenous hormones and *in vitro* morphogenesis pathways in wheat androclonic calli. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*, 2015, no. 1, pp. 33–39.

7. Kruglova N.N. Periodization of wheat morphogenesis as a methodical aspect of biotechnological developments. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*, 2012, no. 2, pp. 21–24.

8. Kruglova N.N., Egorova O.V., Seldimirova O.A., Zaytsev D.Yu., Zinatullina A.E. Optical microscope as a tool in plant biotechnology. Ufa, Gilem, 2013. 128 p.

9. Kruglova N.N., Katasonova A.A. Immature embryo as a morphogenetically competent explant. *Fiziologiya i biokhimiya kulturnukh rasteniy*, 2009, vol. 41, no. 2, pp. 124–131.

10. Katasonova A.A., Kruglova N.N. Wheat embryo as a competent explant for obtaining morphogenous calli *in vitro* *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*, 2011, no. 2, pp. 27–31.



## **THE HISTOLOGICAL STATUS OF WHEAT EMBRYO AT THE STAGE OF ORGANOGENESIS *IN VIVO* AS OPTIMAL STAGE TO OBTAIN OPTIMUM MORPHOGENIC**

© N.N. Kruglova, O.A. Seldimirova, A.E. Zinatullina

Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre  
of the Russian Academy of Sciences,  
69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

Histological study of inoculated spring soft wheat embryos at the different stages of development *in vivo* (according to the author's periodization) was conducted in order to identify the embryo status at the stage optimal for obtaining morphogenic callus *in vitro*. It was found that the beginning of morphogenic callus is given by immature embryos inoculated at the substage 3 of organogenesis stage, at the concentration of 2,4-D in the nutrient medium 1.0–4.0 mg/l. The histological status of such embryos is revealed namely: the separation of embryonic organs and its tissue differentiation; all embryo organs consist of actively developing meristematic cells, which not covered by a dense cell wall. Later the morphogenic callus is formed from epidermal cells of the scutellum, which are in contact with the nutrient medium.

In general, the obtained data suggest that all other things being equal the competence of the wheat embryo cells *in planta* to the formation of morphogenic callus *in vitro* depends not only on external incentives, but on the status of the embryo cells at inoculation, namely, their meristematic. For cereals, apparently, it is the nature of the explant *in vivo* that is the main factor determining the morphogenetic ability of embryo cells to form callus and further regeneration of plants from callus cells *in vitro*. On the other hand, the cells of such embryo are not only morphogenetically competent, but also are the source for meristematic cells of morphogenic callus, having all the morphogenetic capabilities inherent in this individual and realized by various ways of morphogenesis *in vitro*, i.e. totipotent. Moreover, the embryo cells giving rise to a full (fertile) plants-regenerants through the stage of formation of morphogenic callus *in vitro*, apparently, can be regarded in a sense and as stem cells.

Key words: embryo organogenesis *in vivo*, callus *in vitro*, spring soft wheat, *Triticum aestivum* L.