

УДК 576.3.7.086.83:58

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-0-3-28-33

ВЫЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ АВТОНОМНОСТИ *IN PLANTA* ЗИГОТИЧЕСКИХ ЗАРОДЫШЕЙ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© Н.Н. Круглова, О.А. Сельдимирова, А.Е. Зинатуллина, В.И. Никонов

Экспериментально методом эмбриокультуры *in vitro* выявлена стадия относительной автономности зиготических зародышей *in planta* ряда генотипов яровой мягкой пшеницы. Установлено, что данной стадии соответствует сформированный зародыш на 17.5–20.0 сут после искусственного опыления, при длине 2.0–2.4 мм (в зависимости от генотипа). Согласно гистологическим данным, такой зародыш характеризуется наличием всех типичных для зародышей злаков органов: щиток (семядоля), лигула (выrost щитка), дифференцированная почечка, состоящая из апекса побега и первого листа, колеоптиль, эпибласт, колеориза, зародышевый корень. Подтверждено высказанное ранее предположение авторов о том, что оценку относительной автономности зародыша следует давать не только по признаку формирования проростка на безгормональной среде *in vitro*, но и по формированию из такого проростка полноценного фертильного растения в условиях *ex vitro*.

Сходные данные получены авторами ранее для других генотипов яровой мягкой пшеницы, поэтому можно полагать, что стадия сформированного зародыша универсальна в качестве критической стадии относительной автономности зародыша у этой группы хлебных злаков.

Полученные данные могут иметь значение при оптимизации (а именно – ускорении) биотехнологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы методом эмбриокультуры *in vitro*.

Ключевые слова: зиготический зародыш, эмбриогенез *in planta*, эмбриокультура *in vitro*, относительная автономность зародыша, яровая мягкая пшеница, *Triticum aestivum* L.

Введение. Повышение эффективности использования основной хлебной культуры – яровой мягкой пшеницы – в селекционных программах во многом базируется на реализации морфогенетического потенциала растений. С этой целью для пшеницы разработаны биотехнологические методы, основанные на использовании культуры *in vitro* различных эксплантов [1–4 и др.]. Так, биотехнологический метод эмбриокультуры *in vitro*, предполагающий использование зрелых зародышей, позволяет наиболее полно выявить и реализовать онтогенетические программы развития зародыша (обзор [5]). В то же время, на наш взгляд, возможна оптимизация биотехнологического процесса

получения растений-регенерантов методом эмбриокультуры *in vitro* за счет использования зародышей на более ранних стадиях развития.

Хорошо установлено, что развитие зиготического зародыша в естественных условиях *in planta* (эмбриогенез) представляет собой единый процесс, в результате которого из одной исходной клетки – зиготы – формируется зародыш, обладающий всеми морфогенетическими потенциями взрослого растения [6].

Установлено также, что в процессе эмбриогенеза зародыш злаков проходит через ряд критических стадий, различающихся как по происходящим морфофизиологическим процессам, функциональной нагрузке, продолжительности,

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

СЕЛДИМИРОВА Оксана Александровна – к.б.н., Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, e-mail: seldimirova@anrb.ru

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

НИКОНОВ Владимир Иванович – к.с.-х.н., Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Уфимского федерального исследовательского центра РАН

так и значению этой стадии для дальнейшего развития растения. Каждая из стадий эмбриогенеза, несмотря на все разнообразие происходящих в это время процессов, направлена на реализацию морфогенетического потенциала зародыша и онтогенетической программы особи в целом [7].

Одна из критических стадий зиготического эмбриогенеза растений *in planta* – автономность – как особое структурно-функциональное свойство зародыша, характеризующее его саморегуляцию и независимость от окружающих материнских тканей и проявляющееся в способности зародышевой системы завершить нормальный эмбриогенез вне материнского организма. Предложено различать полную и относительную автономность зиготического зародыша растений. Полная автономность достигается по завершении прорастания семени и образования проростка, когда прекращаются все структурные и функциональные связи с материнским организмом. Относительную автономность зародыш приобретает, когда становится независимым от ряда физиологических и биохимических факторов материнского организма [8].

Использование зиготического зародыша в критической стадии относительной автономности, на наш взгляд, перспективное направление оптимизации (ускорения) получения хозяйственно ценных растений биотехнологическим методом эмбриокультуры *in vitro*.

Однако важно предварительно выявить критическую стадию относительной автономности зиготического зародыша *in planta*. Экспериментальный способ выявления стадии относительной автономности зиготического зародыша *in planta* состоит в инокуляции разновозрастных зародышей *in vitro*. Предложено выявлять стадию относительной автономности по способности изолированного зародыша в условиях *in vitro* завершить нормальный эмбриогенез и дать нормальный проросток на простой безгормональной среде, содержащей минеральные соли, сахарозу и витамины [8].

В то же время, по нашему мнению, следует дать оценку относительной автономности зародыша *in planta* не только по признаку формирования проростка на безгормональной среде *in vitro*, но и по формированию из такого проростка полноценного фертильного растения далее, в условиях *ex vitro*. Немаловажное значение имеет и сравнение фенофаз развития регенерантов *in vitro* и *ex vitro* с аналогичными показателями донорных растений пшеницы в полевых условиях.

В связи с этим цель данной работы заключалась в выявлении критической стадии относительной автономности зародышей ряда генотипов яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. с оценкой морфометрических, временных и морфологических показателей таких зародышей.

Материал и методы. Материалом для исследования послужили 7 генотипов яровой мягкой пшеницы из коллекции лаборатории селекции и семеноводства яровой пшеницы Башкирского НИИ сельского хозяйства УФИЦ РАН: Тулайковская 108, Башкирская 28, Экада 113, Л43466, Л43479, Л43510, Экада 232. Данные генотипы перспективны для климатической зоны Южного Урала и используются в селекционных программах лаборатории.

Донорные растения выращивали в полевых условиях на экспериментальных участках научного стационара Уфимского Института биологии УФИЦ РАН (Уфимский район). Вели фенологические наблюдений за сезонным ритмом роста и развития донорных растений пшеницы в полевых условиях.

Для выявления критической стадии относительной автономности колосья срезали на 2.0–20.0 сут после искусственного опыления.

Применили авторский метод эмбриокультуры *in vitro* яровой мягкой пшеницы с учетом оригинальных эмбриологических и культуральных нюансов [9]. При этом для культивирования использовали незрелые зиготические зародыши, изолированные через определенное время после искусственного опыления на следующих стадиях эмбриогенеза (согласно авторской периодизации [10]): четырехклеточный зародыш (2.0–2.5 сут после искусственного опыления, длина зародыша 0.12–0.14 мм); многоклеточный зародыш (3.0–4.0 сут после искусственного опыления, длина зародыша 0.15–0.2 мм); органогенез в трех подстадиях: подстадия 1 (4.5–8.0 сут после искусственного опыления, длина зародыша 0.4–0.6 мм), подстадия 2 (8.5–12.0 сут после искусственного опыления, длина зародыша 0.8–1.3 мм), подстадия 3 (12.5–17.0 сут после искусственного опыления, длина зародыша 1.5–2.0 мм); сформированный зародыш (17.5–20.0 сут после искусственного опыления, длина зародыша 2.1–2.4 мм).

Незрелые зародыши на стадии зиготы и стадии двухклеточного зародыша в экспериментах не использовали: миниатюрность зароды-

шей на этих стадиях эмбриогенеза представляет значительную методическую трудность.

Инокулируемые зародыши культивировали *in vitro* с использованием полной среды Мура-сиге – Скуга с добавлением в качестве гормонального компонента синтетического аналога ауксина 2,4-Д в различной концентрации: 0.0 мг/л (контроль), 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 мг/л. Культивирование проводили в темноте, при температуре +26°C. Ввели визуальную оценку морфологических показателей сформировавшихся структур – морфогенных / неморфогенных каллусов и проростков (всходов) регенерантов.

Гистологические исследования постоянных препаратов зиготических зародышей вели согласно [11] с применением 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).

Проростки растений-регенерантов в фенотипе 3-го листа переносили на регенерационную среду *in vitro* с добавлением в качестве гормонального компонента 0.2 мг/л кинетина. Регенеранты в фенотипе кушения переносили в условия *ex vitro* в вегетационные сосуды и вели наблюдения за их дальнейшим развитием на лабораторной площадке (температура +20...22°C, освещенность 16–18 тыс люкс, 16 час света/8 час темноты) до фенотипа полной спелости зерна.

Развитие донорных растений и растений-регенерантов оценивали визуально согласно общепринятым фенологическим фазам развития злаков. Провели общепринятую лабораторную оценку всхожести зерновок путем их проращивания в чашках Петри в темноте во влажных условиях в течение 3-х сут.

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

Результаты и обсуждение. Выявлено, что начало проросткам растений-регенерантов дали только зародыши, инокулированные на стадии сформированного зародыша через 9–13 сут (в зависимости от генотипа) культивирования *in vitro* на безгормональной питательной среде (контроль).

Согласно гистологическим данным, такой зародыш характеризуется наличием всех типичных для зародышей злаков органов: щиток (семядоля), суспензор, лигула (вырост щитка), апекса побега, колеоптиль, эпибласт, колеориза, зародышевый корень; зародыш в большей своей части окружен эндоспермом (рис.).

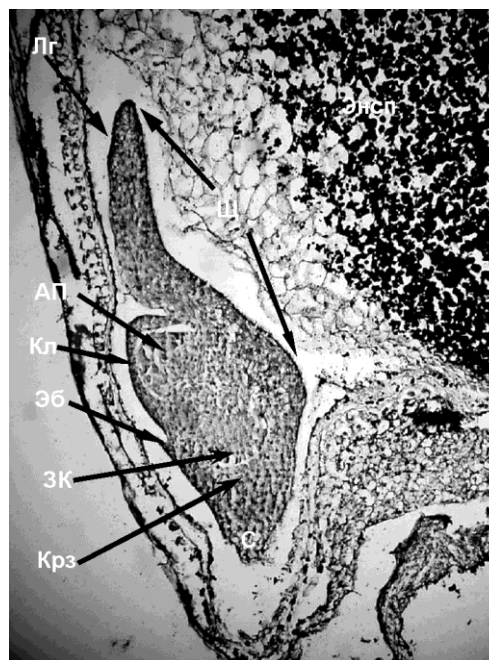


Рис. Зародыш пшеницы сорта Башкирская 28 в критической стадии относительной автономности. Постоянный препарат, продольный срез, ×150. Условные обозначения: Ап – апекс побега, ЗК – зародышевый корень, Кл – колеоптиль, Крз – колеориза, Лг – лигула, С – суспензор, Щ – щиток, Эб – эпибласт, Энсп – эндосперм

В остальных случаях:

- формировались морфогенные каллусы (инокуляция зародышей на подстадии 3 стадии органогенеза, при концентрации 2,4-Д в питательной среде 1.0–4.0 мг/л);

- формировались неморфогенные каллусы (инокуляция зародышей на подстадии 2 стадии органогенеза при всех вариантах сред с введением 2,4-Д; инокуляция зародышей на подстадии 3 стадии органогенеза, при концентрации 2,4-Д в питательной среде 5.0–8.0 мг/л, а также контроль; инокуляция сформированных зародышей при всех концентрациях 2,4-Д);

- происходила постепенная дегенерация зародышей (инокуляция зародышей на стадии четырехклеточного и многоклеточного зародыша подстадии 1 стадии органогенеза при всех

концентрациях 2,4-Д в питательной среде и в безгормональном контроле, а также инокуляция зародышей на подстадии 2 стадии органогенеза, контроль).

Проростки регенерантов в фенофазе 3-го листа переносили на регенерационную среду, где они развивались до фенофазы кушения.

Далее регенеранты переносили в почвенных условиях *ex vitro*, где они проходили фенофазы стеблевания, выхода в трубку, колошения, цветения, молочной, восковой и полной спелости зерна.

В целом регенеранты как в условиях *in vitro*, так и в условиях *ex vitro* развивались согласно фенофазам, сходным по последовательности и продолжительности с фенофазами донорных растений *in planta* в полевых условиях.

Достаточно высокое качество зерновок регенерантов, полученных из сформированных зародышей, подтверждается их лабораторной всхожестью (таб.).

Таким образом, сформированный зародыш следует оценивать как относительно автономный у пшеницы изученных генотипов.

Заключение. Полученные результаты подтвердили высказанное нами [12] предположение о том, что оценку автономности зародыша *in planta* следует давать не только по признаку формирования проростка на безгормональной среде *in vitro*, но и по формированию из такого проростка фертильного растения в условиях *ex vitro*. Аналогичные данные получены нами ранее для яровой мягкой пшеницы других сортов: Симбирка [12], Саратовская 55 [13, 14], Скала, Жница, Башкирская 26, Салават Юлаев и Экада 70 [15], поэтому можно полагать, что стадия сформированного зародыша универсальна в качестве критической стадии относи-

тельной автономности зародыша у яровой мягкой пшеницы.

Полученные данные об относительной автономности сформированного зародыша могут быть использованы при оптимизации (ускорении) биотехнологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы методом эмбриокультуры *in vitro*. Действительно, зародыш пшеницы достигает стадии «сформированный зародыш» на 12–14 сут ранее стадии «зрелый зародыш», что дает биотехнологу выигрыш во времени и экономии средств.

Кроме того, полученные данные могут иметь определенное значение в биотехнологической практике, когда цель технологии состоит в получении регенерантов при минимизации соматональной изменчивости, с образованием на конечном этапе *ex vitro* полноценных фертильных регенерантов.

Исследования проведены с использованием приборов Центра коллективного пользования «Агидель» УФИЦ РАН.

Литература

1. Круглова Н.Н. Каллус как модель для изучения формирования структуры высшего растения // Известия Уфимского научного центра РАН. 2011. № 3. С. 17–22.
2. Круглова Н.Н. Оптимизация биотехнологии получения растений пшеницы в культуре *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2012. № 3. С. 57–61.
3. Сельдиминова О.А., Круглова Н.Н. Формирование полиэмбрионидов в культуре *in vitro* как этап биотехнологии клонирования пшеницы // Известия Уфимского научного центра РАН. 2014. № 1. С. 22–26.
4. Сельдиминова О.А., Титова Г.Е., Круглова Н.Н. Андроклинные «сиамские зародыши» пшеницы *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2015. № 4 (1). С. 137–142.

Т а б л и ц а

Лабораторная всхожесть зерновок регенерантов исследованных генотипов яровой мягкой пшеницы

Генотип	Лабораторная всхожесть зерновок, %
Башкирская 28	87.4±3.2
Л43479	86.1±1.4
Л43466	84.1±1.8
Л43510	82.3±2.6
Экада 113	78.4±3.7
Экада 232	77.4±2.3
Тулайковская 108	74.7±2.8

5. Elhiti M., Stasolla C. The Use of Zygotic Embryos as Explants for In Vitro Propagation: An Overview // *Plant Embryo Culture: Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. V. 170 / Eds Thorpe T.A., Yeung E.C. New York: Humana Press, 2011. P. 229–255. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8_17

6. Hove C.A., Lu K.-J., Weijers D. Building a plant: cell fate specification in the early *Arabidopsis* embryo // *Development*. 2015. V. 142. P. 420–430. doi:10.1242/dev.111500

7. Батыгина Т.Б. Эмбриогенез злаков // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / ред. Т.Б. Батыгина. СПб: Мир и семья, 1997. С. 528–538.

8. Васильева В.Е., Батыгина Т.Б. Автономность зародыша // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. Семя / ред. Т.Б. Батыгина. СПб: Мир и семья, 1997. С. 579–588.

9. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.

10. Круглова Н.Н. Периодизация эмбриогенеза пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // Известия Уфимского научного центра РАН. 2012. № 2. С. 21–24.

11. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений / Н.Н. Круглова, О.В. Егорова, О.А. Сельдимирова, Д.Ю. Зайцев, А.Е. Зинатуллина. Уфа: Гилем, 2013. 128 с.

12. Круглова Н.Н. Выявление критической стадии автономности зародыша пшеницы в культуре *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2013. № 1. С. 42–45.

13. Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплант // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41. С. 124–131.

14. 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.

15. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С. Критическая стадия автономности зародыша пшеницы *in planta* // Биомика. 2018. № 1. В печати.

References

1. Kruglova N.N. Callus as a model for studying the structural formation of a higher plant. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN*, 2011, no. 3, pp. 17–22.

2. Kruglova N.N. Optimization of biotechnology to obtain wheat plants in *in vitro* culture. *Izvestiya*

Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN, 2012, no. 3, pp. 57–61.

3. Seldimirova O.A., Kruglova N.N. Formation of polyembryoids in *in vitro* culture as a stage of wheat cloning biotechnology. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN*, 2014, no. 1, pp. 22–26.

4. Seldimirova O.A., Titova G.E., Kruglova N.N. Wheat androclonic "Siamese embyuos" *in vitro*. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN*, 2015, no. 4 (1), pp. 137–142.

5. Elhiti M., Stasolla C. The use of zygotic embryos as explants for *in vitro* propagation: An overview. In: *Plant embryo culture: Methods in molecular biology (methods and protocols)*. Vol. 170. T.A. Thorpe, E.C. Yeung (eds). New York, Humana Press, 2011, pp. 229–255. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8_17

6. Hove C.A., Lu K.-J., Weijers D. Building a plant: Cell fate specification in the early *Arabidopsis* embryo. *Development*, 2015, vol. 142, pp. 420–430. doi:10.1242/dev.111500

7. Batygina T.B. Embryogenesis in cereals. *Embriologiya tsetkovykh rasteniy. Terminologiya i kontseptsii*. Vol. 2: Semya. T.B. Batygina (ed.). St. Petersburg, Mir i semya, 1997, pp. 528–538.

8. Vasilyeva V.E., Batygina T.B. Embryo autonomy. *Embriologiya tsetkovykh rasteniy. Terminologiya i kontseptsii*. Vol. 2. Semya. Batygina T.B. (ed.). St. Petersburg, Mir i semya, 1997, pp. 579–588.

9. Kruglova N.N., Seldimirova O.A. Wheat regeneration *in vitro* and *ex vitro*. Ufa, Gilem, 2011. 124 p.

10. Kruglova N.N. Periodization of wheat embryogenesis as a methodological aspect of biotechnological developments. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN*, 2012, no. 2, pp. 21–24.

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

12. Kruglova N.N. Determination of the critical stage of wheat embryo autonomy in *in vitro* culture. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN*, 2013, no. 1, pp. 42–45.

13. Kruglova N.N., Katasonova A.A. Immature wheat embryo as morphogenetically competent explant. *Fiziologiya i khimiya kulturnykh rasteniy*, 2009, vol. 41, pp. 124–131.

14. Katasonova A.A., Kruglova N.N. Wheat embryo as a competent explant to obtain morphogenic calli *in vitro*. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN*, 2011, no. 2, pp. 27–31.

15. Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E., Veselov D.S. The critical stage wheat embryo autonomy *in planta*. *Biomika*, 2018, no. 1 (in press).



IDENTIFICATION OF RELATIVE AUTONOMY *IN PLANTA* OF ZYGOTIC EMBRYOS IN SPRING SOFT WHEAT FOR BIOTECHNOLOGICAL RESEARCH OPTIMIZATION

© N.N. Kruglova¹, O.A. Seldimirova¹, A.E. Zinatullina¹, V.I. Nikonov²

¹ Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences,
69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

² Bashkir Research Institute of Agriculture – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences,
5/2, bulvar Davletkildeeva, 450098, Ufa, Russian Federation

Using the embryo culture *in vitro* method, we have experimentally identified the stage of relative autonomy *in planta* of zygotic embryos of a number of spring soft wheat genotypes. It is found that this stage corresponds to the formed embryo in 17.5–20.0 days after artificial pollination, with a length of 2.0–2.4 mm (depending on the genotype). According to histological data, such an embryo is characterized by the presence of all organs typical for the cereal embryos: scutellum (cotyledon), ligule (outgrowth of the scutellum), differentiated bud consisting of a shoot apex and the first leaf, coleoptile, epiblast, coleorhiza, and embryonic root. The previously proposed authors' assumption has been confirmed that an assessment of the embryo relative autonomy should be based not only on the formation of a germ on a non-hormonal medium *in vitro*, but also on the formation of a full-fledged fertile plant from such a germ under the *ex vitro* conditions.

Similar data have been previously obtained by the authors for other spring soft wheat genotypes. Thus, it can be assumed that the stage of the formed embryo is universal as a critical stage of the embryo relative autonomy in this group of cereals.

The data obtained can be of importance in optimizing (namely, accelerating) the biotechnology for producing spring soft wheat regenerants via the embryo culture *in vitro* method.

Key words: zygotic embryo, embryogenesis *in planta*, embryo culture *in vitro*, embryo relative autonomy, spring soft wheat, *Triticum aestivum* L.