

УДК 581.143.6:57.086.3

DOI: 10.31040/2222-8349-2021-0-4-41-47

**АНДРОКЛИННЫЕ КАЛЛУСЫ ПШЕНИЦЫ:
ДАННЫЕ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

© О.А. Сельдимирова

Методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) при культивировании *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы гибридной линии Фотос изучены процессы формирования каллусов разных типов, а также пути морфогенеза в каллусах морфогенного типа. Доказано микроспориальное гаплоидное происхождение каллусов. Определен морфологический статус полученных каллусов. Показано, что морфогенный каллус состоит из мелких, плотно упакованных меристематических клеток, покрытых внеклеточным веществом. Такой тип каллусов получен с использованием варианта индукционной питательной среды Potato II с введением синтетического ауксина 2,4-Д в концентрации 1.0 мг/мл. Неморфогенный каллус состоит из крупных, удлинённых, рыхло расположенных клеток с гладкой поверхностью. Этот тип каллусов получен с использованием варианта питательной среды Potato II с введением 2,4-Д в концентрации 2.0 мг/мл. Установлено, что при введении в питательную среду для регенерации Blaydes различных концентраций ИУК в морфогенных каллусах реализуются следующие пути морфогенеза *in vitro*: эмбриоидогенез (без введения ИУК), гемморизогенез (0.5 мг/л), ризогенез (1.5 мг/л). Выявлены дегенеративные изменения клеток неморфогенных каллусов. Подтверждена принципиальная возможность регуляции путей морфогенеза *in vitro* каллусов в необходимом для исследования направлении при биотехнологических исследованиях.

Ключевые слова: культура пыльников *in vitro*, каллус, СЭМ, морфогенез, 2,4-Д, ИУК, яровая мягкая пшеница.

Одно из приоритетных научных направлений – создание с использованием современных биотехнологических методов новых сортов сельскохозяйственных растений, в том числе хозяйственно ценных злаков, включая яровую мягкую пшеницу. Регенерация растений в каллусах, полученных в культуре *in vitro* изолированных пыльников, – один из таких методов, основанный на феномене андроклиной гаплоидии [1]. Именно образование на конечном этапе полноценных фертильных растений-регенерантов определяет практическую значимость биотехнологического метода андроклинных каллусных культур *in vitro*.

Несмотря на достаточно широкое применение этого подхода, остаются нерешёнными некоторые принципиальные вопросы. Основная проблема, связанная с разработкой эффективной биотехнологии массового стабильного получения фертильных андроклинных растений-регенерантов в каллусной культуре, состоит в их низком выходе. Решение этой проблемы напрямую связано с выявлением путей морфо-

генеза *in vitro* каллусов и возможностью регуляции этих путей в нужном биотехнологу направлении в контролируемых экспериментальных условиях *in vitro*. В основе получения растений-регенерантов в каллусных культурах лежит исключительное свойство растительной клетки – её тотипотентность как свойство иметь все морфогенетические возможности, присущие данной особи и реализующиеся различными путями морфогенеза [1, 2]. Конечный результат этого свойства, способы и формы его осуществления могут быть различными в зависимости от степени тотипотентности клетки. Как правило, регенерация растений *in vitro* обычно осуществляется посредством эмбриоидогенеза (соматического эмбриогенеза) или гемморизогенеза (органогенеза *de novo* побегов и корней) [1–6]. Регенерация посредством гемморизогенеза рассматривается как биотехнологически более выгодная, так как индуцировать органогенез сравнительно проще и надежнее, чем эмбриоидогенез. В то же время индукция эмбриоидогенеза предполагает работу с гене-

тически однородным материалом, что необходимо при разработке биотехнологий клонирования хозяйственно ценных генотипов [1, 7]. Следует также отметить, что идентификация путей регенерации *in vitro* осуществляется, как правило, визуальным способом. Однако такая идентификация нередко бывает ошибочной.

Нерешенным остается вопрос, какие именно типы андроклиных каллусов способны к регенерации растений. Как правило, типы каллусов злаков выявляют по их морфологическим показателям: морфогенные (способные к регенерации) – компактные, узловатые, плотные, обычно белого цвета, неморфогенные (не способные к регенерации) – рыхлые, мягкие, водянистые, обычно желтоватой окраски [1, 3–6]. Однако имеются и противоположные данные, где в качестве морфогенных рассматриваются полупрозрачные желтые рыхлые каллусы [8]. Нами выявлен особый тип каллуса – потенциально морфогенный, характеризующийся мягкой, рыхлой и обводненной структурой [9].

Остается спорным вопрос и о происхождении андроклиных каллусов, так как остается возможность того, что они берут начало от соматических клеток стенки пыльника.

Существенную помощь в решении этих вопросов оказывает метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), позволяющий получить точное представление о пространственной организации изучаемых образцов и достаточно широко применяющийся при изучении морфогенеза *in vitro*, в том числе у злаков [1, 3]. В связи с этим целью работы состояла в изучении методом СЭМ разных типов андроклиных каллусов, полученных в культуре *in vitro* пыльников пшеницы.

Материал и методы исследования.

Объект исследования – гибридная линия яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) Фотос, пыльники которой согласно предварительной оценке при культивировании *in vitro* характеризуются высокой частотой образования морфогенных структур – до 80% от числа инокулированных пыльников [1].

Донорные растения выращивали в полевых условиях научного стационара Уфимского Института биологии УФИЦ РАН (Уфимский район).

Пыльники культивировали *in vitro* согласно [1]. В работе применяли методический подход, основанный на получении данных о содержании эндогенной ИУК в культивируемых *in vitro* образцах, согласно которым линия Фотос относится к высокоауксиновым генотипам [1]. Для индукции андроклиных каллусов использовали среду Potato II с концентрацией 2,4-Д в 1.0 и 2.0 мг/л для получения морфогенных и неморфогенных каллусов соответственно. Затем каллусы переносили на среду Blaydes с введением ауксина ИУК различной концентрации: 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 и 2.0 мг/л. Образцы для изучения методом СЭМ готовили согласно [3] и исследовали с помощью сканирующих электронных микроскопов JSM-35 и JSM-6390 (Jeol, Japan).

Результаты и обсуждение. Формирование андроклиных каллусов на обоих вариантах сред начиналось с делений спорогенных клеток пыльника – микроспор (рис. 1), что доказывает их гаплоидное происхождение. Такие доказательства необходимы, так как именно последующая дигаплоидизация приводит к закреплению набора полезных признаков, что вносит вклад в ускорение селекционного процесса.

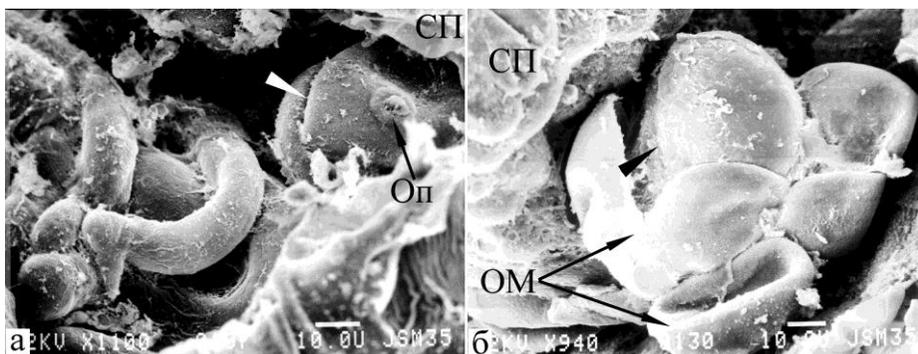


Рис. 1. Деления микроспор в пыльниках на 3-е сутки культивирования *in vitro* на среде Potato II, содержащей 2,4-Д в концентрации 1.0 (а) и 2.0 (б) мг/л. Условные обозначения: Оп – оперкулум, ОМ – оболочка микроспоры, СП – стенка пыльника. Наконечниками стрелок указаны места деления. Масштаб: 10 мкм

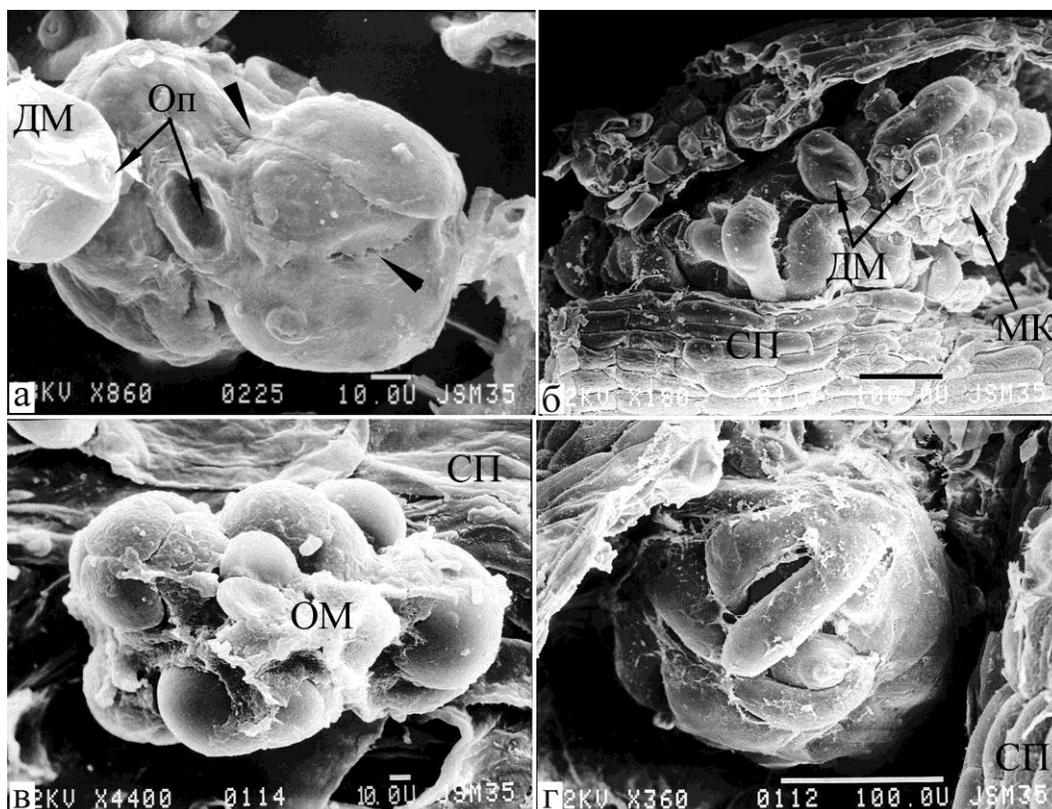


Рис. 2. Формирование 4-клеточного (а) и многоклеточных (б–г) каллусов на на 5-е (а, в) и 7-е (б, г) сутки культивирования *in vitro* на среде Potato II, содержащей 2,4-Д в концентрации 1.0 (а, б) и 2.0 (в, г) мг/л. Условные обозначения: ДМ – дегенерировавшие микроспоры, МК – морфогенный каллус, Оп – оперкулум, ОМ – оболочка микроспоры, СП – стенка пыльника. Наконечниками стрелок указаны плоскости деления клеток. Масштаб: а, в – 10 мкм, б, г – 100 мкм

В ходе дальнейших равных делений формируется сначала 4-клеточный (рис. 2, а), а затем многоклеточный (рис. 2, б–г) каллусы. Микроспоры, не давшие начало каллусам, дегенерируют (рис. 2, а, б) и остаются на каллусах в виде тонкой пленки (рис. 2, в). Следует отметить некоторую асинхронность в развитии каллусов на разных вариантах среды, а также разницу в форме и размерах клеток. Так, если вначале клетки каллусов, формирующихся на обоих вариантах сред, имеют сходные размеры и сферическую форму (рис. 2, а, в), то через некоторое время клетки каллусов, полученные на среде с меньшей концентрацией 2,4-Д (предположительно морфогенных) имеют хотя и удлиненную, но довольно компактную форму (рис. 2, б). Клетки же каллусов, полученных на среде с большей концентрацией 2,4-Д (предположительно неморфогенных), в несколько раз длиннее (рис. 2, г). Известно, что основной физиологический ответ растений на действие ауксинов – рост клеток растяжением. Поскольку 2,4-Д – это синтетический ауксин,

возможно, такое удлинение клеток каллусов на среде с повышенной концентрации 2,4-Д вызвано ее ауксиноподобным действием.

Также следует отметить, что на этих этапах при относительном сохранении размеров каллусов, количество в них клеток увеличивается (срав. рис. 2, а, б и 2, в, г). Вероятно, это связано с накоплением так называемой «критической массы». Согласно эмбриологическому закону критической массы, «все системы на разных уровнях иерархии от молекулярного до надорганизменного характеризуются определенной критической массой. Количество элементов критической массы зависит от генотипа и различных факторов, что задает форму, структуру и функцию» [2, с. 150–151]. Таким образом, критическая масса определяет «порог факторов», необходимый для пролиферации, дифференциации, специализации и апоптоза и являющийся видоспецифичным, а устойчивость структуры зависит от ее критической массы, что обуславливает систему надежности индивидуума в целом [3, с. 151].

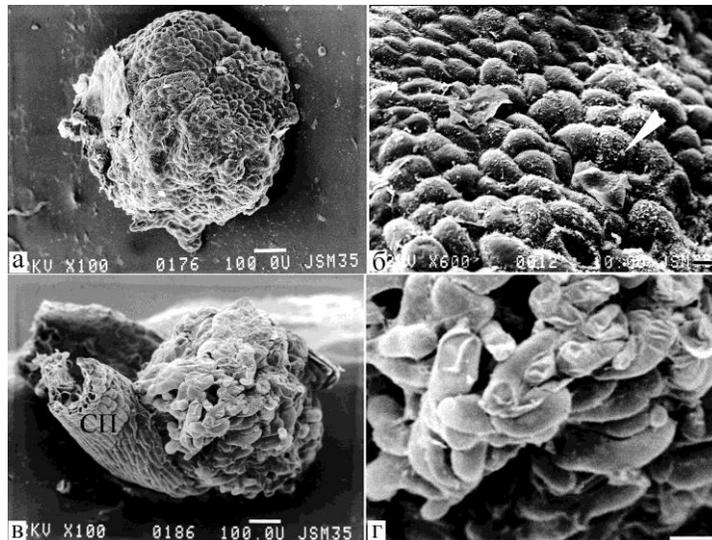


Рис. 3. Различные типы каллусов, полученные на 21-е сутки культивирования *in vitro* на среде Potato II с концентрацией 2,4-Д в 1.0 (а, б) и 2.0 (в, г) мг/л. Условные обозначения: СП – стенка пыльника. Наконечником стрелки указано внеклеточное вещество. Масштаб: а, в – 100 мкм, б – 10 мкм, г – 50 мкм

В ходе дальнейшего развития каллусы накапливают клеточную массу, через 21 сутки культивирования *in vitro* на среде Potato II разрывают стенку пыльника и появляются на его поверхности (рис. 3).

Каллусы, полученные на разных вариантах среды Potato II, значительно различаются по характеристикам составляющих их клеток. Так, каллусы, полученные на среде с концентрацией 2,4-Д 1.0 мг/л, состоят из мелких, плотно упакованных, полусферических меристематических клеток. Такие каллусы мы рассматриваем как морфогенные.

Каллусы, полученные на среде с концентрацией 2,4-Д 2.0 мг/л, состоят из длинных, обводненных, рыхло расположенных клеток, имеющих гладкую поверхность и значительно более крупные размеры по сравнению с клетками каллусов, полученными на среде с пониженным содержанием 2,4-Д (срав. рис. 3, б и 3, г). Такие каллусы мы рассматриваем как неморфогенные.

Интересно отметить, что на поверхности клеток морфогенных каллусов обнаруживается внеклеточное вещество (рис. 3, б), возможно, это внеклеточный матрикс. Такой внеклеточный полисахаридный матрикс играет важную роль в межклеточном взаимодействии, ионном статусе клеточных стенок и их проницаемости, а также играет важную сигнальную роль в регуляции процессов развития у растений [10, 11]. В том числе это вещество рассматривается как морфогенный маркер в каллусных культурах

in vitro [10], хотя имеются сведения об обнаружении внеклеточного матрикса и в неморфогенных каллусных культурах [10, 11], на основании чего авторами сделан вывод о генотип-зависимом проявлении этого признака. Результаты, сходные с нашими, были получены в работе [10] на примере морфогенных каллусов актинидии, полученных из эндосперма. Возможно, что в нашем случае в компактных каллусах также синтезируется внеклеточный матрикс, который является маркером их морфогенного статуса, однако это предположение требует дополнительных исследований методами иммуногистохимии.

Через 28 суток культивирования на среде Potato II полученные каллусы переносили на питательную среду Blaydes для регенерации, дополненную ИУК в различных концентрациях.

У неморфогенных каллусов не обнаруживались признаки индукции каких-либо путей морфогенеза *in vitro* ни на одном варианте среды Blaydes. Хотя каллусы и увеличивались в размерах (возможно, за счет стимулирующего рост растяжением воздействия ИУК), однако через какое-то время эти структуры останавливались в развитии и дегенерировали. Также возможно, что часть увеличивавшихся в размерах каллусов обладала признаками потенциально морфогенных и имела в своем составе клетки, все еще способные к делениям [9]. На рис. 4 отображены морфологические характеристики таких каллусов на некоторых вариантах среды Blaydes.

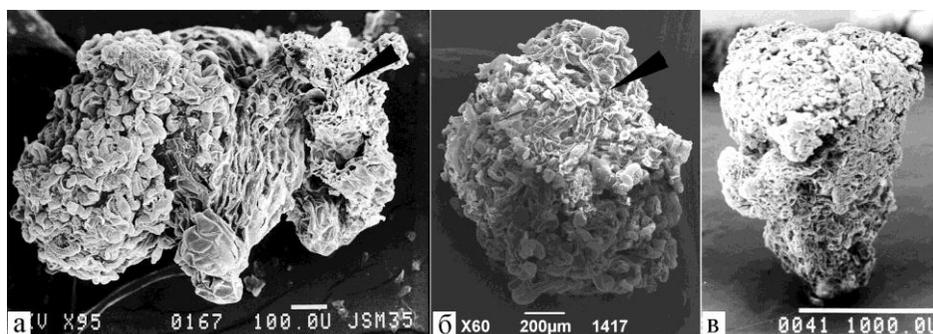


Рис. 4. Неморфогенные калусы через 14 суток культивирования *in vitro* на среде Blaydes с концентрацией экзогенной ИУК в 0.0 (а), 1.0 (б) и 2.0 (в) мг/л. Наконечниками стрелок указаны дегенерировавшие участки калусов. Масштаб: а – 100 мкм, б – 200 мкм, в – 1000 мкм

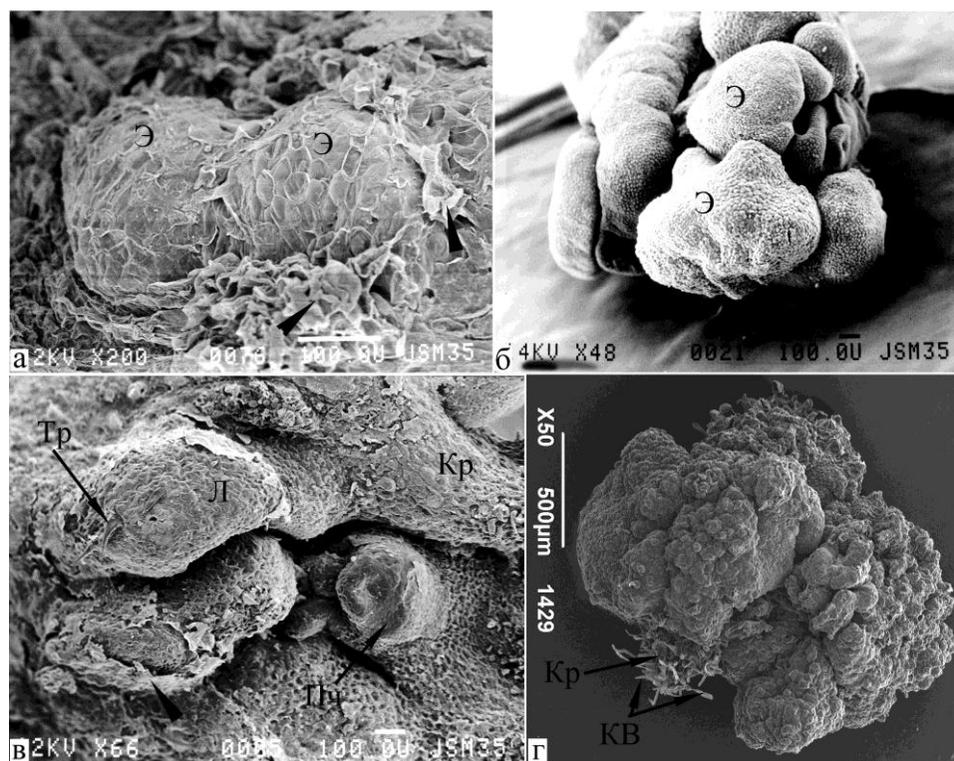


Рис. 5. Пути морфогенеза в морфогенных каллусах пшеницы при культивировании *in vitro* на среде Blaydes: эмбриоидогенез через 14 (а) и 28 (б) суток культивирования на среде без добавления экзогенной ИУК, гемморизогенез через 28 суток культивирования на среде с концентрацией ИУК 0.5 мг/л (в), ризогенез через 14 суток культивирования на среде с концентрацией ИУК 1.5 мг/л (г). Условные обозначения: КВ – корневой волосок, Кр – корень, Л – лист, Пч – почка, Тр – трихома, Э – эмбриоид. Наконечниками стрелок указано внеклеточное вещество. Масштаб: а–в – 100 мкм, г – 200 мкм

При культивировании морфогенных каллусов *in vitro* на среде Blaydes выявлены следующие пути морфогенеза: эмбриоидогенез – формирование зародышеподобных структур – эмбриоидов (рис. 5, а, б; преимущественно на варианте среды без добавления экзогенной ИУК), гемморизогенез – формирование побегов и корней (рис. 5, в; при концентрации ИУК в 0.5 мг/л) и ризогенез –

формирование корней (рис. 5, г; при концентрации ИУК в 1.0–1.5 мг/л). При концентрации экзогенной ИУК в среде в 2.0 мг/л признаков морфогенеза не обнаруживалось, а каллусы со временем начинали приобретать признаки неморфогенности.

Важно подчеркнуть, что на начальных этапах формирования эмбриоидов, побегов и листьев на поверхности каллусов также обна-

руживается внеклеточное вещество (рис. 5, а, в), что лишним раз подтверждает участие этого вещества в процессах морфогенеза.

Таким образом, методом СЭМ нами идентифицированы пути морфогенеза *in vitro* морфогенных каллусов, индуцированные при внесении в регенерационную среду Blaydes определенных концентраций экзогенной ИУК. Полученные данные еще раз подтверждают необходимость подбора адекватных концентраций гормонов, необходимых для получения определенного типа каллуса и индукции путей морфогенеза *in vitro*, ведущих к регенерации растений. Сочетание разработанного нами методического подхода, основанного на подбore баланса эндогенных (в составе культивируемого объекта) и экзогенных (в составе питательной среды) гормонов [1] и метода сканирующей электронной микроскопии может стать удобным инструментом для оптимизации биотехнологических приемов, используемых в селекции яровой мягкой пшеницы.

Авторы выражают искреннюю благодарность заведующей лабораторией эмбриологии и репродуктивной биологии БИН РАН (г. Санкт-Петербург) к.б.н. Г.Е. Титовой за большую помощь в проведении работ по сканированию поверхности каллусов пшеницы.

Работу проводили на базе ЦКП «Агидель» УФИЦ РАН (Уфа) и ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург).

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190099-6.

Литература

1. Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдмирова О.А. От микроспоры – к сорту. М.: Наука, 2010. 174 с.
2. Батыгина Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: Изд-во «ДЕАН», 2014. 712 с.
3. Сельдмирова О.А., Титова Г.Е., Круглова Н.Н. Комплексный морфолого-гистологический подход к изучению морфогенных структур в культуре *in vitro* пыльников пшеницы // Известия РАН. Серия биологическая. 2016. № 2. С. 155–161.
4. Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдмирова О.А. Каллусогенез как путь морфогенеза *in vitro* у злаков // Онтогенез. 2018. Т. 49, № 5. С. 273–288.
5. Круглова Н.Н., Сельдмирова О.А., Зинатуллина А.Е. Каллус *in vitro* как модельная система для

изучения органогенеза растений // Известия Уфимского научного центра РАН. 2019. № 2. С. 44–54.

6. Зинатуллина А.Е. Цитофизиологические особенности контрастных типов каллусов *in vitro* // Успехи современной биологии. 2020. Т. 140, № 2. С. 183–194.

7. Сельдмирова О.А., Круглова Н.Н. Особенности начальных этапов эмбриогенеза *in vitro* в каллусах пшеницы различного происхождения // Известия РАН. Серия биол. 2013. № 5. С. 565–573.

8. López-Ruiz B.A., Juárez-González V.T., Sandoval-Zapotitla E., Dinkova T.D. Development-Related miRNA Expression and Target Regulation during Staggered *In Vitro* Plant Regeneration of Tuxpeño VS-535 Maize Cultivar // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20, № 9: 2079. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20092079>.

9. Круглова Н.Н., Сельдмирова О.А. Потенциально морфогенный каллус пшеницы в культуре *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 2. С. 61–65.

10. Popielarska-Konieczna M., Sala K., Abdullah M., Tuleja M., Kurczyńska E. Extracellular matrix and wall composition are diverse in the organogenic and non-organogenic calli of *Actinidia arguta* // Plant Cell Reports. 2020. V. 39, №6. P. 779–798.

11. Pilarska M., Popielarska-Konieczna M., Ślesak H., Kozieradzka-Kiszkurno M., Góralski G., Konieczny R., Bohdanowicz J., Kuta E. Extracellular matrix surface network is associated with non-morphogenic calli of *Helianthus tuberosus* cv. Albik produced from various explants // Acta Soc. Bot. Pol. 2014. V. 83, № 1. P. 67–73.

References

1. From microspore to variety / Batygina T.B., Kругlova N.N., Gorbunova V.Yu., Titova G.E., Seldimirova O.A. Moscow: Nauka, 2010, 174 p.
2. Batygina T.B. developmental biology of plants. Symphony of Life. St. Petersburg St. Petersburg: Publishing house «DEAN», 2014, 712 p.
3. Seldimirova O.A., Kругlova N.N., Titova G.E. A complex morpho-histological approach to the *in vitro* study of morphogenic structures in a wheat anther culture // Biology Bulletin, 2016, vol. 43, no. 2, pp. 121–126.
4. Kругlova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A. Callusogenesis as an *in vitro* Morphogenesis Pathway in Cereals // Russ. J. Dev. Biol., 2018, vol. 49, no. 5, pp. 245–249.
5. Kругlova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. Kallus *in vitro* kak model'naja sistema dlja izuchenija organogeneza rastenij // Izvestija Ufimskogo NC RAN, 2019, no. 2, pp. 44–54.
6. Zinatullina A.E. Citofiziologicheskie osobennosti kontrastnyh tipov kallusov *in vitro* // Uspеhi sovremennoj biologii, 2020, vol. 140, no. 2, pp. 183–194.

7. Seldimirova O.A., Kruglova N.N. Properties of the initial stages of embryoidogenesis *in vitro* in wheat calli of various origin // *Biology Bulletin*, 2013, vol. 40, no. 5, pp. 447–454.

8. López-Ruiz B.A., Juárez-González V.T., Sandoval-Zapotitla E., Dinkova T.D. Development-Related miRNA Expression and Target Regulation during Staggered *In Vitro* Plant Regeneration of Tuxpeño VS-535 Maize Cultivar // *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 9: 2079. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20092079>.

9. Kruglova N.N., Seldimirova O.A. Potencial'no morfogennyj kallus pshenicy v kul'ture *in vitro* // *Izvestija Ufimskogo NC RAN*, 2018, no. 2, pp. 61–65.

10. Popielarska-Konieczna M., Sala K., Abdullah M., Tuleja M., Kurczyńska E. Extracellular matrix and wall composition are diverse in the organogenic and non-organogenic calli of *Actinidia arguta* // *Plant Cell Reports*, 2020, vol. 39, no. 6, pp. 779–798.

11. Pilarska M., Popielarska-Konieczna M., Ślesak H., Kozieradzka-Kiszkurno M., Góralski G., Konieczny R., Bohdanowicz J., Kuta E. Extracellular matrix surface network is associated with non-morphogenic calli of *Helianthus tuberosus* cv. Albik produced from various explants // *Acta Soc. Bot. Pol.*, 2014, vol. 83, no. 1, pp. 67–73.



WHEAT ANDROCLINIC CALLI: DATA OF SCANNING ELECTRONIC MICROSCOPY

© O.A. Seldimirova

Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
69, prospekt Oktyabrya, 450054, Ufa Russian Federation

The processes of formation different types of calli, as well as the morphogenesis pathways in morphogenic calli, were studied by scanning electron microscopy (SEM) during anther culture *in vitro* in hybrid line Fotos of spring soft wheat. The microspore haploid origin of calli has been proven. The morphological status of the obtained calli was determined. It was shown that morphogenic callus consists of small densely packed meristematic cells covered with extracellular substance. This type of calli was obtained using a variant of the Potato II induction culture medium, added by 1.0 mg/l synthetic auxin 2,4-D. Nonmorphogenic callus consists of large, elongated, loosely located cells with a smooth surface. This type of calli was obtained using a variant of the Potato II culture medium, added by 2.0 mg/l 2,4-D. It was found that the introduction of various IAA concentrations into the Blaydes nutrient medium for regeneration in morphogenic calli implements the following pathways of morphogenesis *in vitro*: embryoidogenesis (without IAA addition), gemmorhizogenesis (0.5 mg/l), and rhizogenesis (1.5 mg/l). Revealed degenerative changes in cells of nonmorphogenic calli. The fundamental possibility of regulating of the morphogenesis pathways of *in vitro* of morphogenic calli in the direction necessary for research in biotechnological research has been confirmed.

Key words: anther culture *in vitro*, callus, SEM, morphogenesis, 2,4-D, IAA, spring soft wheat.