

УДК 581.143.6:576.31

DOI 10.31040/2222-8349-2018-0-2-61-65

ПОТЕНЦИАЛЬНО МОРФОГЕННЫЙ КАЛЛУС ПШЕНИЦЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

© Н.Н. Круглова, О.А. Сельдимирова

В культивируемых *in vitro* изолированных пыльниках яровой мягкой пшеницы сорта Жница выявлен потенциально морфогенный тип андроклинных каллусов. Такой тип каллусов получен с использованием варианта питательной среды Potato II с введением синтетического ауксина 2,4-Д в концентрации 1.5 мг/л и одного пассажа каллусов на свежую питательную среду того же состава. Определен морфологический статус каллусов такого типа: рыхлая консистенция, белое окрашивание. Методом световой микроскопии проведено исследование гистологических особенностей таких каллусов, выявлена обширная зона меристематических клеток. После переноса полученных каллусов на питательную среду Blaydes с введением в ее состав ауксина ИУК в различных концентрациях определены пути морфогенеза их клеток *in vitro*: органогенез (в вариантах геммогенез, ризогенез и гемморизогенез) и эмбриоидогенез. Высказано мнение о возможности использования потенциально морфогенных каллусов в биотехнологических исследованиях пшеницы.

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

Биологический феномен андроклинии (андрогенез *in vitro*) состоит в переключении морфогенетической программы развития гаплоидных клеток пыльника (микроспор) под действием внешнего стрессового фактора с обычного в условиях *in vivo* гаметофитного пути, связанного с образованием пыльцевого зерна, на иной путь – спорофитный, в оптимальных условиях *in vitro* и *ex vitro* ведущий к формированию гаплоидного растения-регенеранта [1, 2 и др.].

Один из путей спорофитного развития гаплоидных клеток-микроспор ведет к образованию андроклинного каллуса – интегрированной гетерогенной системы, в данном случае формирующейся в результате пролиферации инициальной клетки-микроспоры и изначально состоящей из групп неоднородных клеток, имеющих морфогенетические потенции, которые в условиях *in vitro* реализуются различными путями [2].

В культивируемых изолированных пыльниках выявляют андроклинные каллусы обычно двух типов: морфогенные, клетки которых способны к дальнейшему морфогенезу *in vitro* и регенерации растений, и неморфогенные, клетки которых не обладают такой

способностью. 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 питательной среды) фитогормонов [3, 4].

Как правило, типы андроклинных каллусов злаков выявляют по их морфологическим показателям: морфогенные – компактные, узловатые, плотные, обычно белого цвета, неморфогенные – рыхлые, мягкие, водянистые, обычно желтоватой окраски [1–3 и др.]. Приводятся данные по электронному сканированию поверхности андроклинных каллусов злаков. Установлено, что поверхность морфогенных каллусов характеризуется гладкой, узловатой, ворсистой, бугорчатой формой. Это отличает их от неморфогенных каллусов, водянистая консистенция которых, как правило, затрудняет сканирование поверхности [5 и др.]. Достаточно активно проводятся сравнительные гистологические исследования андроклинных каллусов различных типов (обзор [6]).

Ранее нами в результате культивирования *in vitro* изолированных пыльников пшеницы также были выявлены андроклинные каллусы

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

двух типов – морфогенные и неморфогенные, установлен их морфологический и гистологический статус, продемонстрирована роль концентрации синтетического ауксина 2,4-Д в индукции каллусов определенного типа и установлены пути морфогенеза *in vitro* в каллусах [3, 4, 7]. Однако остались неясными как возможность индукции каллусогенеза *in vitro* при иных, ранее не исследованных, концентрациях этого гормона в питательной среде, так и возможные пути морфогенеза *in vitro* в полученных каллусах.

Цель данной работы – морфологический и гистологический анализ андроклинных каллусов пшеницы, полученных в культивируемых пыльниках пшеницы при определенной концентрации ауксина 2,4-Д, и выявление путей их морфогенеза *in vitro*.

Материал и методы исследования.

Объект исследования – сорт яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) Жница. Пыльники пшеницы этого сорта, согласно предварительной оценке [3], характеризуются высокой частотой образования андроклинных каллусов – до 70% от числа инокулированных пыльников.

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

Пыльники культивировали согласно методу культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы, основанного на применении данных эмбриологии растений. Андроклинные каллусы получали при концентрации синтетического ауксина 2,4-Д в составе

индукционной питательной среды Potato II в 1.5 мг/л. Для выявления путей морфогенеза *in vitro* в каллусах использовали среду Blaydes с введением ауксина ИУК различной концентрации [2].

Использовали предложенные нами комплексный цитофизиологический подход [8] и гистологические (светооптические) методы, модифицированные применительно к биотехнологическим исследованиям [9]. Гистологические препараты анализировали на базе Центра коллективного пользования “Агидель” УФИЦ РАН с использованием микроскопа проходящего света Axio Imager A1 (“Carl Zeiss”, Германия), оснащенного объективом EC Plan-NEOFLURAL 10×/0.3. Прижизненную съемку каллусов и сформировавшихся из них морфогенных структур вели с использованием стереомикроскопа Technival 2 (“Carl Zeiss”, Германия). Документацию изображений вели с использованием цифровой фотокамеры AxioCam MRc5 с программным обеспечением Axio Vision 4.7 (“Carl Zeiss”, Германия).

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

Результаты и обсуждение. Андроклинные каллусы, полученные при использовании индукционной среды Potato II с концентрацией 2,4-Д 1.5 мг/л, появлялись на поверхности пыльников на 28–30 сутки культивирования *in vitro* и морфологически характеризовались белым цветом, мягкой, рыхлой обводненной структурой, неопределенной формой (рис. 1, а).

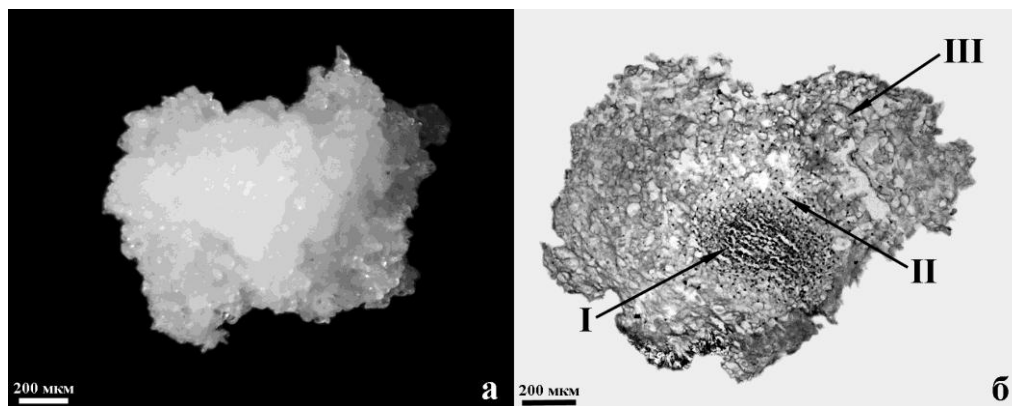


Рис. 1. Потенциально морфогенный андроклинный каллус пшеницы, появившийся на поверхности пыльника на 28-е сутки культивирования *in vitro*, по морфологическим (а) и гистологическим (б) данным. Пояснения в тексте

Гистологическим анализом в составе каллусов выявлены три зоны клеток (рис. 1, б). Зона I состояла из мелких меристематических клеток с относительно крупными ядрами, зона II представлена округлыми клетками с мелкими ядрами, клетки поверхностной зоны III имели неправильную форму и различный размер, характеризовались отсутствием ядер.

В связи с таким гистологическим статусом следовало предположить, что часть меристематических клеток I зоны, возможно, имеет морфогенетический потенциал для дальнейшего развития. Поэтому каллусы в первые же сутки после их появления на поверхности пыльников переносили на свежую индукционную среду Potato II прежнего состава также с концентрацией 2,4-Д в 1.5 мг/л. Вели гистологический контроль каллусов через каждые 2 суток культивирования. На 12-е сутки культивирования *in vitro* в таких условиях в них отмечалось значительное увеличение зоны меристематических клеток, при сохранении клеток поверхностной зоны (рис. 2). Клетки зоны II, по-видимому, реорганизовались в клетки зоны I.

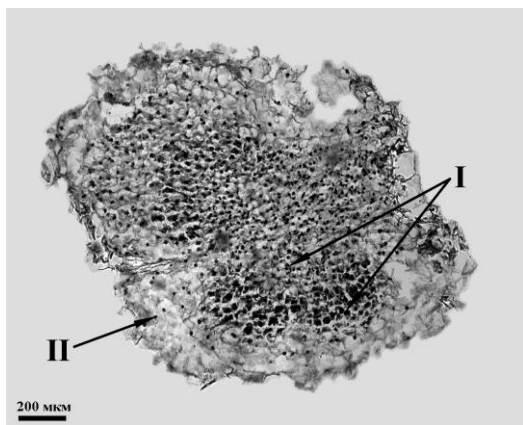


Рис. 2. Потенциально морфогенный андроклиный каллус пшеницы на 12-е сутки после переноса на свежую питательную среду (гистологические данные). Пояснения в тексте

Андроклинные каллусы после пассажа в течение 12 суток на индукционной среде Potato II переносили на среду Blaydes с различной концентрацией ауксина ИУК. На 7–9-е сутки культивирования *in vitro* в каллусах выявлены различные пути морфогенеза. Эмбриоидогенез *in vitro* состоял в формировании и развитии зародышеподобных структур – эмбриоидов (рис. 3, а, б) и индуцировался при концентрации ИУК в 0.5 мг/л. Органогенез *in vitro* по вариан-

ту геммогенеза (формирование почек, рис. 3, в, г) индуцировался при концентрации ИУК в 1.0 мг/л, по варианту ризогенеза (формирование корней, рис. 3, д, е) – при концентрации ИУК в 2.0 мг/л, по варианту гемморизогенеза (формирование почек и корней, рис. 3, ж, з) – при концентрации ИУК в 1.5 мг/л. При концентрациях ИУК свыше 2.0 мг/л в каллусах отмечался такой путь морфогенеза, как гистогенез в виде формирования в массе каллуса элементов проводящей ткани, не представляющий интереса в биотехнологической практике.

Выявление различных путей морфогенеза *in vitro* дало нам основание определить такой тип андроклиного каллуса как потенциально морфогенный. Таким образом, в результате культивирования *in vitro* пыльников пшеницы сорта Жница с использованием варианта индукционной питательной среды Potato II с введением синтетического ауксина 2,4-Д в концентрации 1.5 мг/л получены потенциально морфогенные андроклинные каллусы. Следует заметить, что у иных сортов пшеницы получение такого типа каллусов возможно при иных концентрациях 2,4-Д, поскольку зависимость отзывчивости пыльников на условия культивирования *in vitro* от генотипа хорошо установлена для пшеницы [3 и др.].

В литературе сведения о таком типе андроклиных каллусов, как потенциально морфогенный, нами не обнаружены. В абсолютном большинстве проанализированных источников, посвященных изучению каллусогенеза в культуре *in vitro* пыльников, отмечается появление двух контрастных типов каллусов – плотного узловатого и рыхлого обводненного, причем плотный каллус используется как морфогенетически перспективный (морфогенный), а рыхлый (неморфогенный) отбраковывается. Однако полученные нами данные о морфогенетических потенциях андроклиных каллусов пшеницы рыхлой консистенции заставляют пересмотреть уже сложившееся представление о неморфогенной природе рыхлых каллусов. Кроме того, рыхлый морфогенный каллус должен вызывать определенный интерес с тех позиций, что, возможно, является ценным источником клеточных суспензий и протопластов, также обладающих регенерационной способностью (этот вопрос требует специального исследования). Полученные данные могут вызвать интерес и биотехнологов. Действительно, если количество морфогенных каллусов ценного генотипа

ограничено, то в биотехнологической практике можно использовать потенциально морфогенные каллусы. Более того, у таких каллусов отмечены ускоренные темпы морфогенеза по сравнению с аналогичными событиями у типичного морфогенного каллуса, выявленными нами ранее [3, 7]. Важно подчеркнуть, однако, что для более точной идентификации потенциально морфогенных андроклиных каллусов необходим их гистологический контроль.

Полученные данные хорошо согласуются с ранее полученными нами сведениями о высокой морфогенетической лабильности каллусов пшеницы различного происхождения [1–4, 10] и еще раз подтверждают важность подбора адекватной для получения определенного типа каллусов концентрации гормонов в составе индукционной питательной среды *in vitro* и роль гормонов в проявлении тотипотентности клеток каллуса.

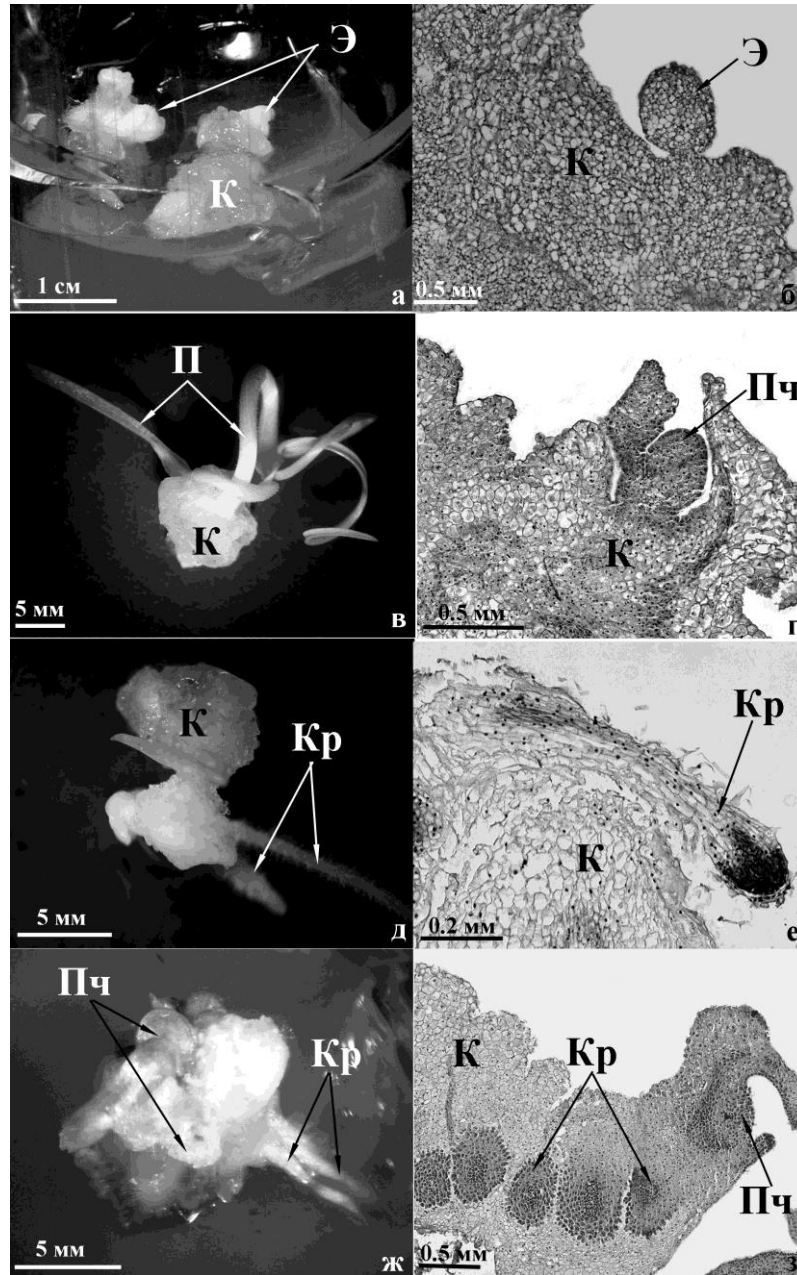


Рис. 3. Пути морфогенеза *in vitro* клеток потенциально морфогенных андроклиных каллусов пшеницы (по морфологическим и гистологическим данным): а, б – эмбриоидогенез, в, г – геммогенез, д, е – ризогенез, ж, з – гемморизогенез. Пояснения в тексте.

Условные обозначения: К – каллус, Кр – корень, П – побег, Пч – почка, Э – эмбриоид

Литература

1. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы / Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимирова. М.: Наука, 2005. 99 с.
2. От микроспоры – к сорту / Т.Б. Батыгина, Н.Н. Круглова, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимирова. М.: Наука, 2010. 174 с.
3. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.
4. Сельдимирова 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.
5. Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Абрамов С.Н., Сельдимирова О.А. Андрогенные эмбриониды и каллусы пшеницы: данные сканирующей электронной микроскопии // Известия РАН. Сер. биол. 2001. № 2. С. 191–197.
6. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Морфогенез в андроклиных каллусах злаков: цитогистологические особенности // Успехи соврем. биол. 2010. Т. 130, № 3. С. 247–257.
7. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Пути морфогенеза *in vitro* клеток андроклиного каллуса пшеницы // Физиология растений и генетика. 2013. Т. 45, № 5. С. 382–389.
8. Сельдимирова 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 биол. 2016. № 2. С. 155–161.
9. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений / Круглова Н.Н., О.В. Егорова, О.А. Сельдимирова, Д.Ю. Зайцев, А.Е. Зинатуллина. Уфа: Гилем, Башк. энцикл., 2013. 128 с.
10. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N. et al. Changes in distribution of zeatin and indoloil-3-acid in cells during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat // In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 2016. V. 52, № 3. P. 251–264.

References

1. Kruglova N.N., Batygina T.B., Gorbunova V.Yu., Titova G.E., Seldimirova O.A. Embryological basis of androclonic wheat. Moscow, Nauka, 2005. 99 p.
2. Batygina T.B., Kruglova N.N., Gorbunova V.Yu., Titova G.E., Seldimirova O.A. From microspore to cultivar. Moscow, Nauka, 2010. 174 p.
3. Kruglova N.N., Seldimirova O.A. Wheat regeneration *in vitro* and *ex vitro*. Ufa, Gilem, 2011. 124 p.
4. Seldimirova O.A., Kruglova N.N. Balance of endogenous and exogenous hormones and *in vitro* morphogenetic pathways in wheat androclonic calli. Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN, 2015, no. 1, pp. 33–39.
5. Kruglova N.N., Gorbunova V.Yu., Abramov S.N., Seldimirova O.A. Androgenous embryoids and wheat calli: Scanning electron microscopy analysis. Izvestiya RAN. Biology, 2001, no. 2, pp. 191–197.
6. Kruglova N.N., Seldimirova O.A. Morphogenesis in cereal androclonic calli: Cytohistological features. Uspekhi sovremennoy biologii, 2010, vol. 130, no. 3, pp. 247–257.
7. Kruglova N.N., Seldimirova O.A. Pathways of *in vitro* cellular morphogenesis in wheat androclonic callus. Fiziologiya rasteniy i genetika, 2013, vol. 45, no. 5, pp. 382–389.
8. Seldimirova O.A., Titova G.E., Kruglova N.N. Integrated morphohistological approach to studying morphogenic structures in *in vitro* culture of wheat anthers. Izvestiya RAN. Biology, 2016, no. 2, pp. 155–161.
9. 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, Bashkirskaya entsiklopediya, 2013. 128 p.
10. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N. et al. Changes in distribution of zeatin and indoloil-3-acid in cells during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant., 2016, vol. 52, no. 3, pp. 251–264.

POTENTIALLY MORPHOGENIC WHEAT CALLUS IN *IN VITRO* CULTURE

© N.N. Kruglova, O.A. Seldimirova

Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre, RAS,
69, prospekt Oktyabr'ya, 450054, Ufa, Russian Federation

A potentially morphogenic type of androclonic calli was found in isolated anther *in vitro* culture of the spring wheat cv. Zhnitsa. This type of calli was obtained using the nutrient medium Potato II supplemented with synthetic auxin 2,4-D in a concentration of 1.5 mg/L and one passage of calli into fresh nutrient medium of the same composition. The morphological status of this type of calli was determined as friable texture and white colouring. Analysis of histological features of these calli was performed using the optical microscopy method, and a wide domain of meristematic cells was identified. After the transfer of the obtained calli into the nutrient medium Blaydes with different concentrations of IAA, different pathways of calli *in vitro* morphogenesis were revealed: organogenesis (gemmaogenesis, rhizogenesis and gemmorhizogenesis) and embryoid genesis. The opinion was put forward regarding the possibility of using potentially morphogenic calli in wheat biotechnological investigations.

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