

УДК 633.11:581.143.5

ПУТИ МОРФОГЕНЕЗА IN VITRO КЛЕТОК АНДРОКЛИННОГО КАЛЛЮСА ПШЕНИЦЫ

Н.Н. КРУГЛОВА, О.А. СЕЛЬДИМИРОВА

*Институт биологии Уфимского научного центра Российской академии наук
450054 Уфа, просп. Октября, 69
e-mail: kruglova@anrb.ru*

Выявлены пути морфогенеза in vitro меристематических клеток андроклинных каллюсов пшеницы. Показано, что индукция определенного пути морфогенеза определяется соотношением между содержанием эндогенного ауксина (ИУК) в каллюсе (внутренний сигнал) и концентрацией этого ауксина в питательной среде (внешний сигнал). Дана цитогистологическая оценка каждому из выявленных путей морфогенеза.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., культура in vitro пыльников, андроклиния, каллюс, морфогенез in vitro, фитогормоны.

Феномен андроклинии, или андрогенеза in vitro, состоит в образовании в условиях культуры in vitro способного к репродукции растения-регенеранта (спорофита) из морфогенетически компетентной клетки пыльника (гаметофита) [7].

Ранее на примере коллекции сортов и гибридных линий яровой мягкой пшеницы нами было установлено, что инициальной клеткой андроклинии является сильновакуолизирующая микроспора (по периодизации развития пыльника злаков [13]); показано принципиальное сходство этой клетки с инициальными клетками других систем размножения [7, 10—12].

Один из путей реализации спорофитной программы развития in vitro микроспоры состоит в формировании гетерогенной структуры — каллюса, в данном случае — андроклинного [17]. При значительном морфологическом разнообразии андроклинных каллюсов среди них выделяют два основных типа: морфогенные и неморфогенные, характеризующиеся соответственно наличием или отсутствием морфогенетических потенциалов и способности к регенерации растений [7, 9, 12, 14]. Разработанный нами [14] гормональный способ регуляции морфогенеза микроспоры пшеницы in vitro на индукционной среде дает возможность получать и использовать в экспериментальной работе именно морфогенные каллюсы. На примере пшеницы методами световой и электронной микроскопии нами дана цитогистологическая оценка таких каллюсов [14] и начального этапа их морфогенеза in vitro на индукционной среде в виде формирования морфогенетического очага [21].

Большой интерес вызывают пути морфогенеза in vitro клеток андроклинного каллюса после переноса на регенерационную среду. Известно, что роль основных индукторов, регуляторов и координаторов про-

цессов морфогенеза растений как в естественных условиях, так и в условиях *in vitro* играют фитогормоны, в частности, ауксин индолил-3-уксусная кислота (ИУК) [19, 32, 33]. В литературе накоплен обширный эмпирический материал по изучению влияния различных фитогормонов, в том числе ИУК, на морфогенез в культуре *in vitro* пыльников и андроклиновых каллюсов [9]. В то же время вопрос о роли соотношения эндогенных (в составе каллюса) и экзогенных (в составе культуральной среды) фитогормонов в регуляции путей морфогенеза *in vitro* клеток андроклиновых каллюсов окончательно не решен. Немногочисленные работы по выявлению цитогистологических особенностей отдельных путей морфогенеза в андроклиновых каллюсах *in vitro* [15].

Цель работы состояла в выявлении путей морфогенеза *in vitro* андроклиновых каллюсов пшеницы на регенерационной среде в зависимости от соотношения эндогенного и экзогенного ауксина (ИУК), а также в цитогистологической оценке этих путей.

Методика

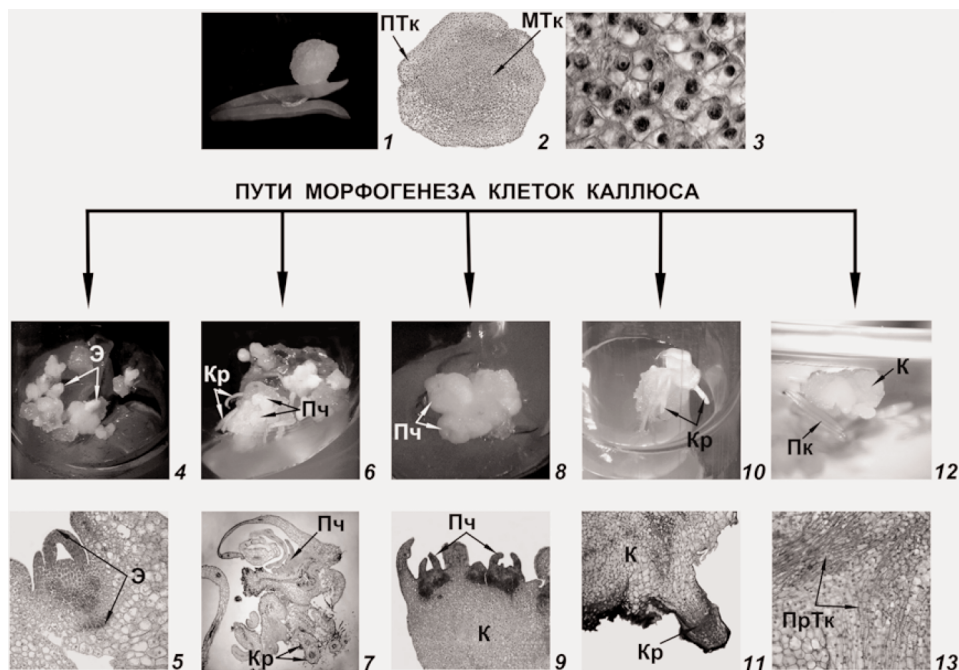
Объектами исследования были сорта яровой мягкой пшеницы Жница и Соналика, пыльники которых высокоотзывчивы на условия культивирования *in vitro*. Для экспериментов использовали донорные растения, выращенные в полевых условиях научного стационара Института биологии Уфимского научного центра РАН (Уфимский район).

Андроклиновые каллюсы получали согласно методу культуры *in vitro* пыльников с использованием индукционной среды Potato II (по [6]). Часть каллюсов переносили на регенерационную среду, составленную по прописи Блейдза [25] с добавлением ИУК (0,1–3,0 мг/л). Часть каллюсов, полученных на индукционной среде, и часть каллюсов в динамике культивирования *in vitro* на регенерационной среде анализировали общепринятыми цито-гистологическими методами [2]. Препараты просматривали с помощью светового микроскопа Axio Imager A1 («Carl Zeiss», Германия) при различном увеличении, фотографировали с применением цифровой камеры AxioCam MRc5 («Carl Zeiss», Германия).

Содержание эндогенной ИУК в пыльниках и каллюсах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) [18], концентрацию ИУК — методом ELISA [5], пользуясь стандартными наборами для иммуноферментного анализа (Фармхиминвест, г. Уфа). Все эксперименты проводили в трех повторностях. Полученные результаты обработаны статистически с применением программы Microsoft Office Excel 2003.

Результаты и обсуждение

Каллюсы, появившиеся на поверхности пыльников на 28–32-е сутки культивирования, характеризовались белым матовым цветом, плотной компактной структурой и узловатой формой (рисунок, 1). При их светоптическом анализе выявлены две зоны клеток. Зона I, занимающая основной объем каллюса, представлена меристематическими клетками (см. рисунок, 2, 3), зона II содержала вакуолизированные паренхимные клетки с мелкими ядрами (см. рисунок, 2). Аналогичные данные получены нами ранее при исследовании морфогенного андроклинового каллюса пшеницы линии Фотос [14].



Пути морфогенеза *in vitro* клеток андроклинного каллуса пшеницы:

1 — морфогенный андроклинный каллус, полученный в культуре *in vitro* пыльников пшеницы линии Соналика на 28-е сутки культивирования на среде Potato II ($\times 1,2$); 2 — продольный срез морфогенного андроклинного каллуса ($\times 20$); 3 — продольный срез участка меристематической ткани морфогенного андроклинного каллуса ($\times 100$); 4 — эмбриониды на морфогенном андроклинном каллусе (22-е сутки культивирования на среде для регенерации Blaydes, $\times 1,1$); 5 — продольный срез эмбриоида ($\times 60$); 6 — почки и корни на морфогенном андроклинном каллусе (21-е сутки культивирования на среде для регенерации Blaydes, $\times 1,1$); 7 — продольный срез почки и корней ($\times 40$); 8 — почки на морфогенном андроклинном каллусе (19-е сутки культивирования на среде для регенерации Blaydes, $\times 1,3$); 9 — продольный срез почеч ($\times 60$); 10 — корни на морфогенном андроклинном каллусе (25 сут культивирования на среде для регенерации Blaydes, $\times 1,2$); 11 — продольный срез корня ($\times 60$); 12 — морфогенный андроклинный каллус, в котором формируется проводящая ткань (26-е сутки культивирования на среде для регенерации Blaydes, $\times 1,5$); 13 — участок каллуса с сосудами проводящей ткани ($\times 100$); К — морфогенный андроклинный каллус; Кр — корень; МТк — меристематическая ткань; Пк — пыльник; ПрТк — проводящая ткань; ПТк — паренхимная ткань; Пч — почка; Э — эмбриоид

Результаты анализа содержания эндогенной ИУК в пыльниках перед инокуляцией на индукционную среду и в каллусах, появившихся на поверхности пыльников, продемонстрировали значительные различия и пыльников, и каллусов изученных сортов пшеницы по содержанию этого гормона (таблица). В целом, по классификации [5], сорт Соналика следует отнести к высокоауксиновой группе, сорт Жница — к низкоауксиновой.

Содержание эндогенной индолуксусной кислоты в пыльниках и каллусах пшеницы

Сорт	Содержание ИУК, нг/г сухого вещества	
	В пыльниках перед инокуляцией на среду	В каллусах на поверхности пыльника
Соналика	392,7 \pm 23,3	568,5 \pm 24,9
Жница	63,9 \pm 3,6	94,3 \pm 12,8

П р и м е ч а н и е: значимо на 5 %-м уровне. В таблице приведены средние величины со стандартными погрешностями.

Часть каллюсов в 1-е сутки после их появления на поверхности пыльников переносили на регенерационные среды, различавшиеся только концентрацией ИУК (0,1–3,0 мг/л). В ходе дальнейшего развития (19–26 сут культивирования) в каллюсах обоих сортов выявлены такие пути морфогенеза *in vitro*, как эмбриоидогенез, органогенез (геммогенез, ризогенез, гемморизогенез) и гистогенез. На рисунке, 4–13 приведены морфологические и цитогистологические характеристики этих путей на примере каллюсов сорта Соналика. Так, эмбриоидогенез состоял в формировании биполярных зародышеподобных структур (эмбриоидов) с закрытым радикулярным полюсом, при этом апексы побега и корня формировались сопряженно с самых первых этапов развития (см. рисунок, 4, 5). В случае гемморизогенеза в каллюсе формировались почки и корни; их развитие происходило разобщенно как пространственно, так и по времени (см. рисунок, 6, 7). Геммогенез состоял в формировании только почек (см. рисунок, 8, 9), а ризогенез — только корней (см. рисунок, 10, 11). Следует отметить, что, как и в естественных условиях [3], почки формировались экзогенно (на поверхности каллюса), а корни — эндогенно (в толще каллюса). Еще один выявленный путь морфогенеза — гистогенез — состоял в формировании ткани (в данном случае — проводящей) (см. рисунок, 12, 13).

Индукция определенного пути морфогенеза *in vitro* определялась соотношением содержания эндогенной ИУК в каллюсе при инокуляции на регенерационную среду и концентрацией внесенной (экзогенной) ИУК в составе этой среды. Так, в каллюсах высокоауксиновой линии Соналика эмбриоидогенез индуцировался на среде с концентрацией ИУК 0,1 мг/л, геммогенез — 0,25, гемморизогенез — 0,5, ризогенез — 1,5, гистогенез — 2,0 мг/л. В каллюсах низкоауксинового сорта Жница эмбриоидогенез отмечен при концентрации ИУК в среде 0,5 мг/л, геммогенез — 1,0, гемморизогенез — 1,5, ризогенез — 2,0, гистогенез — 2,5 мг/л. В целом для индукции одного и того же пути морфогенеза в каллюсах высокоауксинового сорта Соналика требуется более низкая концентрация экзогенной ИУК, чем в каллюсах низкоауксинового сорта Жница.

Аналогичные пути морфогенеза *in vitro* клеток андроклинных каллюсов выявлены у других культурных злаков [28, 29, 35]. Однако при этом авторы, как правило, только констатируют пути морфогенеза *in vitro* каллюсов, ограничиваясь морфологическими характеристиками их развития без цитогистологического анализа.

Сопоставление литературных и полученных экспериментальных данных дает основание сделать вывод, что указанные пути морфогенеза *in vitro* достаточно универсальны. Тем самым получает подтверждение концепция об универсальности путей морфогенеза цветковых растений как в естественных условиях, так и в условиях культуры *in vitro* [4].

Полученные данные еще раз подтверждают и важнейшую роль ИУК в индукции и координации морфогенеза растений *in vitro*. Действительно, индукция каждого из выявленных в ходе экспериментов путей морфогенеза *in vitro* клеток каллюса пшеницы (эмбриоидогенез, органогенез в виде гемморизогенеза, геммогенеза и ризогенеза, а также гистогенез) определялась главным образом концентрацией ИУК в составе регенерационной среды. Продемонстрирована также принципиальная возможность регуляции путей морфогенеза *in vitro* клеток каллюса путем под-

бора адекватного для индукции желаемого пути соотношения содержания эндогенной ИУК в каллусе и концентрации экзогенно внесенной ИУК в культуральной среде.

Важнейший фактор эффективного индукционного действия фитогормона — наличие в растительной ткани специфических компетентных клеток-мишеней, восприимчивых к действию этого гормона. Концепция клеток-мишеней, предложенная около 30 лет назад [31], к настоящему времени получила хорошее экспериментальное подтверждение при изучении различных аспектов действия гормонов растений [20, 22, 32, 34]. По-видимому, эффект экзогенной ИУК также должен быть обусловлен наличием в составе морфогенного андроклининого каллуса специфических клеток-мишеней, компетентных к действию этого ауксина. В качестве таких клеток-мишеней следует рассматривать меристематические клетки каллуса (см. рисунок, 2, 3), поскольку их участие в морфогенезе растений хорошо установлено [1, 30].

Однако вопрос о том, какая именно меристематическая клетка каллуса вступит на путь морфогенеза и даст начало либо эмбриоиду, либо тому или иному органу (почке, корню), либо ткани в ходе развития на регенерационной среде, остается открытым. Большую роль в данном случае должны играть, на наш взгляд, механизмы так называемого позиционного контроля морфогенеза, концепция которого [27] уже получила убедительные доказательства, например, в работах по анализу клеточных клонов в ходе развития зародыша и проростка некоторых мутантных форм *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. [26]. Применительно к каллусу такой контроль означает, что определяющее значение в индукции развития меристематической клетки по пути морфогенеза имеют ее расположение в структуре каллуса и межклеточные взаимодействия. Среди каллусных клеток возникают самые различные трофические и гормональные взаимодействия, часть которых может способствовать реализации морфогенетического потенциала компетентных меристематических клеток. Все это хорошо согласуется с мнением о том, что в процессе развития многоклеточного организма из зиготы по мере увеличения числа клеток, обособления стволовых (камбиальных) клеток, органогенеза и так далее происходит изменение как межклеточной, так и внутриклеточной среды, что приводит к последовательному изменению сигналов, поступающих от геной сети одной клетки к другой [24]. Иначе говоря, на «входы системы управления» морфогенезом могут поступать сигналы не только из внешней среды, но и из внутренней среды самого развивающегося организма.

Для объяснения путей развития компетентных клеток-мишеней каллуса применима и концепция о существовании особого класса наследственных единиц, ячеек функциональной наследственной памяти — эпигенов как систем генов, имеющих не менее двух устойчивых режимов функционирования подчиненных им генов и способных сохранять каждый из режимов в последовательном ряду генераций [23]. Вполне вероятно, что при морфогенезе *in vitro* происходит реализация эпигеномных программ развития компетентной клетки-мишени каллуса. Рассматриваемая ситуация усложняется тем, что сами каллусные клетки-мишени, способные к развитию по определенному пути морфогенеза *in vitro* с формированием эмбриоидов, органов или тканей, берут начало от одной гаплоидной клетки — микроспоры, реализующей в данном случае спорофитную программу развития. Более того, в зависимос-

ти от условий культивирования (главным образом, гормонального состава индукционной среды) микроспора может развиваться по спорофитному пути не только через этап формирования каллюса, как рассматривалось выше, но и альтернативно — через этап формирования эмбриоида [16] (путь так называемого прямого эмбриоидогенеза, в отличие от рассмотренного выше пути непрямого эмбриоидогенеза в каллюсе). По-видимому, в условиях наших экспериментов не следует отрицать проявления эпигенеза — последовательного формирования под действием сигналов внутренней среды (в нашем случае — эндогенной ИУК) развивающейся ткани (андроклинного каллюса) все более усложняющихся (по сравнению с микроспорой, которая может развиваться только по двум альтернативным спорофитным путям) блоков наследственной программы.

В целом морфогенез *in vitro* клеток андроклильных каллюсов вызывает большой теоретический и практический интерес.

Авторы выражают искреннюю признательность д-ру биол. наук Р.Н. Чураеву (Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа) за критическое обсуждение рукописи статьи.

Работа выполнена в рамках программы «Ведущие научные школы РФ» (грант № НШ 7637.2010.4; лидер школы — Т.Б. Батыгина, чл.-кор. РАН, БИН РАН, Санкт-Петербург).

1. Барлоу П.У. Деление клеток в меристемах и значение этого процесса для органогенеза и формообразования растений // Онтогенез. — 1994. — 25, № 5. — С. 5—28.
2. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г. и др. Справочник по ботанической микрортехнике. — М., 2004. — 312 с.
3. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. — СПб, 2002. — 232 с.
4. Батыгина Т.Б. Хлебное зерно. — Л.: Наука, 1987. — 103 с.
5. Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н., Абрамов С.Н. Индукция андрогенеза *in vitro* у яровой мягкой пшеницы. Баланс эндогенных и экзогенных фитогормонов // Изв. РАН. Сер. Биология. — 2001. — № 1. — С. 31—36.
6. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. — Уфа: ИБ УНЦ РАН, 2002. — 39 с.
7. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю. и др. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. — М.: Наука, 2005. — 99 с.
8. Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Куксо П.А. Морфогенез в культуре изолированных пыльников: роль фитогормонов // Успехи соврем. биологии. — 1999. — 119, № 6. — С. 567—577.
9. Круглова Н.Н., Дубровная О.В. Морфогенез андроклильных каллюсов злаков *in vitro* // Физиология и биохимия культ. растений. — 2011. — 43, № 1. — С. 15—25.
10. Круглова Н.Н., Куксо П.А. Инициальная клетка андроклинии // Там же. — 2006. — 38, № 4. — С. 279—291.
11. Круглова Н.Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — СПб., 2002. — 48 с.
12. Круглова Н.Н. Морфогенез в культуре *in vitro* пыльников пшеницы: эмбриологический подход. — Уфа: Гилем, 2001. — 203 с.
13. Круглова Н.Н. Периодизация развития пыльника злаков как методологический аспект изучения андрогенеза *in vitro* // Изв. РАН. Сер. Биология. — 1999. — № 3. — С. 275—281.
14. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю. Цитофизиологические особенности различных типов андроклильных каллюсов пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. — 2007. — 39, № 1. — С. 42—50.
15. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Морфогенез в андроклильных каллюсах злаков: цитогистологические особенности // Успехи соврем. биологии. — 2010. — 130, № 3. — С. 247—257.
16. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*. — Уфа: Гилем, 2011. — 124 с.

17. *Круглова Н.Н.* Унификация терминологии при разработке инновационной биотехнологии андроклининой гаплоидии *in vitro*: постановка проблемы // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — **41**, № 6. — С. 476—486.
18. *Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И.* Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител // Физиология растений. — 1986. — **33**, № 6. — С. 1221—1227.
19. *Медведев С.С., Шарова Е.И.* Биология развития растений. Т 1. Начала биологии развития растений. Фитогормоны. — СПб., 2011. — 253 с.
20. *Романов Г.А.* Рецепторы фитогормонов // Физиология растений. — 2002. — **49**, № 4. — С. 615—625.
21. *Сельдимирова О.А., Катасонова А.А., Круглова Н.Н.* Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллюсах различного происхождения у пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. — 2011. — **43**, № 4. — С. 297—306.
22. *Цыганкова В.А., Галкина Л.А., Мусатенко Л.И., Сытник К.М.* Генетический и эпигенетический контроль роста и развития растений. Молекулярно-генетический контроль проведения и реализации сигналов ауксина // Биополимеры и клетка. — 2005. — **21**, № 3. — С. 187—219.
23. *Чураев Р.Н.* Контуры неканонической теории наследственности: от генов к эпигенам // Журн. общей биологии. — 2005. — **66**, № 1. — С. 13—36.
24. *Чураев Р.Н.* Эпигенетика: генные и эпигенные сети в онто- и филогенезе // Генетика. — 2006. — **42**, № 9. — С. 1276—1296.
25. *Blaydes D.F.* Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean // *Physiol. plant.* — 1966. — **19**, N 3. — P. 748—753.
26. *Dolan L.* Positional information and mobile transcriptional regulators determine cell pattern in the *Arabidopsis* root epidermis // *J. Exp. Bot.* — 2006. — **57**, N 1. — P. 51—54.
27. *Jaeger J., Irons D., Monk N.* Regulative feedback in pattern formation: towards a general relativistic theory of positional information // *Development.* — 2008. — **135**, N 19. — P. 3175—3183.
28. *Konieczny R., Swierczynska J., Czaplinski A.Z., Bohdanowicz J.* Distribution of pectin and arabinogalactan protein epitopes during organogenesis from androgenic callus of wheat // *Plant Cell Rep.* — 2007. — **26**, N 3. — P. 355—363.
29. *Krzewska M., Czyczyto-Mysza I., Dubas E. et al.* Quantitative trait loci associated with androgenic responsiveness in triticale (*×Triticosecale* Wittm.) anther culture // *Ibid.* — 2012. — **31**, N 11. — P. 2099—2108.
30. *Meristematic tissues* in plant growth and development / Eds M.T. McManus, B. Veit. — Sheffield: Sheffield Acad. Press, 2002. — 301 p.
31. *Osborne D.J.* Concepts of target cells in plant differentiation // *Cell Differ.* — 1984. — **14**, N 3. — P. 161—169.
32. *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action* / Ed. P.J. Davies. — Dordrecht; Heidelberg; London; New York: Springer, 2010. — 802 p.
33. *Plant propagation by tissue culture* / Eds E.F. George, M.A. Hall, G.-J. De Klerk. — Dordrecht: Springer, 2008. — 502 p.
34. *Strnad M., Novak O., Rolcik J. et al.* Phytohormone targeting in plant tissues // *BMC Proceed.* — 2011. — **5**, N S7. — P. 75.
35. *Wang L., Lin G., Zhao D. et al.* Tissue culture system for different hybrid of indica rice // *J. Agr. Univ.* — 2011. — **18**, N 2. — P. 13—17.

Получено 07.05.2013

ШЛЯХИ МОРФОГЕНЕЗУ *IN VITRO* КЛІТИН АНДРОКЛІННОГО КАЛЮСУ ПШЕНИЦІ

Н.М. Круглова, О.О. Сельдимірова

Інститут біології Уфимського наукового центру Російської академії наук

Виявлено шляхи морфогенезу *in vitro* меристематичних клітин андрокліниних калюсів пшениці. Показано, що індукція певного шляху морфогенезу визначається співвідношенням між вмістом ендогенного ауксину (ІОК) в калюсі (внутрішній сигнал) і концентрацією цього ауксину в поживному середовищі (зовнішній сигнал). Дано цитогістологічну оцінку кожному з виявлених шляхів морфогенезу.

THE PATHWAYS OF MORPHOGENESIS IN VITRO OF WHEAT ANDROCLYNIC
CALLUS CELLS

N.N. Kruglova, O.A. Seldimirova

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

The pathways of morphogenesis in vitro of meristematic cells of wheat androclinic calli were revealed. It was shown that the induction of certain pathway of morphogenesis is defined by the ratio of the endogenous IAA content in callus (internal signal) and the concentration of this auxin at the culture medium (external signal). The cyto-histological estimation of each revealed morphogenesis pathway is given.

Key words: *Triticum aestivum* L., anther culture in vitro, androcliny, callus, morphogenesis in vitro, phytohormones.