

ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАЧАЛА МОРФОГЕНЕЗА В АНДРОКЛИННЫХ КАЛЛУСАХ ПШЕНИЦЫ *IN VITRO*

© 2011 Д.Ю. Зайцев

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 29.07.2011

Приведены данные гистологического анализа начала морфогенеза *in vitro* в андроклинных каллусах пшеницы в сопоставлении с данными локализации цитокининов. Установлено участие цитокининов на начальных этапах всех путей морфогенеза *in vitro*.

Ключевые слова: морфогенез, культура *in vitro*, пыльник, каллус, меристема, пшеница.

Современное развитие инновационных направлений биотехнологии растений требует новых фундаментальных данных о морфогенезе как в естественных условиях, так и в культуре *in vitro*.

Однако интенсивные исследования морфогенеза растений затруднены интегральным характером морфогенетических процессов, зависимостью их от многих внутренних и внешних факторов и их взаимодействий [1].

Принципиально важное свойство морфогенеза – универсальность его путей как в естественных условиях *in vivo*, так и в условиях культуры *in vitro* [2]. Такая универсальность позволяет выбрать более простую, чем целый организм, модель для изучения особенностей морфогенетических процессов, например, пыльник [3].

Удобной моделью могут служить каллусы, в том числе андроклинные, полученные в культуре *in vitro* изолированных пыльников из микроспор/клеток пыльцевого зерна на основе биологического феномена андрогенеза *in vitro*, или, короче, андроклинии [4].

Несмотря на то, что к настоящему времени накоплен значительный фактический материал, касающийся различных аспектов исследования андроклинных каллусов [5], многие вопросы остаются открытыми. Так, до сих пор не выявлены инициальные клетки/группы клеток андроклинных каллусов, в которых индуцируются пути морфогенеза *in vitro*, и факторы, стимулирующие морфогенез этих клеток. Далеким от окончательного решения остается и вопрос об участии фитогормонов в реализации морфогенетического потенциала клеток андроклинных каллусов. Полностью отсутствуют данные о локализации гормонов в каллусах (и не только андроклинных) в динамике развития *in vitro*.

Согласно литературным данным, необходимое условие для приобретения культивируемыми клетками каллусов злаков морфогенетической компетентности – присутствие в питательных средах экзогенных ауксинов, роль же цитокининов при этом минимальна.

При этом морфогенетическая компетентность клеток может достаточно долго поддерживаться

при культивировании *in vitro* каллусов на питательных средах, содержащих в качестве гормональных добавок только экзогенные ауксины. Однако для дальнейшей дифференциации морфогенетически компетентных клеток каллусов необходимы цитокинины, причем иногда достаточно наличие только эндогенных (в составе каллуса) цитокининов [6]. Известно, что цитокинины повышают аттрагирующую способность клеток, то есть способность аккумулировать питательные вещества за счет их транспорта из других тканей [7], что, в свою очередь, по нашему мнению, может способствовать дальнейшему развитию культивируемых клеток каллуса. Кроме того, известно, что аттрагирующая способность, как правило, характерна для меристематических клеток [7]. Исходя из этого, логично предположить, что в составе андроклинных каллусов имеются меристематические клетки, являющиеся инициальными при реализации различных путей морфогенеза *in vitro*, и характеризующиеся преимущественной локализацией в них цитокининов. В связи с этим цель данной работы заключалась в выявлении локализации цитокининов в клетках развивающихся *in vitro* андроклинных каллусов яровой мягкой пшеницы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве материала для исследования использовали гибридную линию яровой мягкой пшеницы Фотос, характеризующуюся высокой частотой образования *in vitro* андроклинных каллусов. Для получения андроклинных каллусов использовали метод культуры *in vitro* изолированных пыльников, модифицированный с учетом эмбриологических нюансов [8].

Цитокинины в клетках андроклинных каллусов выявляли методом иммулокализации фитогормонов с помощью антител, меченных коллоидным золотом [9].

Постоянные препараты, полученные согласно общепринятой методике [10], просматривали с применением микроскопа проходящего света Axio Imager.A1 (Carl Zeiss, Jena).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В культивируемых андроклинных каллусах

пшеницы наблюдали следующие пути морфогенеза *in vitro*: эмбриоидогенез – формирование эмбрионидов (зародышеподобных структур), гемморизогенез (формирование почки и корня), геммогенез (формирование почки), ризогенез (формирование корня). Именно такие же пути морфогенеза *in vitro* клеток андроклинных каллусов были выявлены нами ранее на примере других сортов и гибридных линий яровой мягкой пшеницы [11, 12], а также в культуре *in vitro* каллусов зародышевого происхождения у ряда сортов яровой мягкой пшеницы [13]. Такие наблюдения еще раз дают основания поддерживать положение об универсальности путей морфогенеза растений как в естественных условиях *in vivo*, так и в культуре *in vitro*.

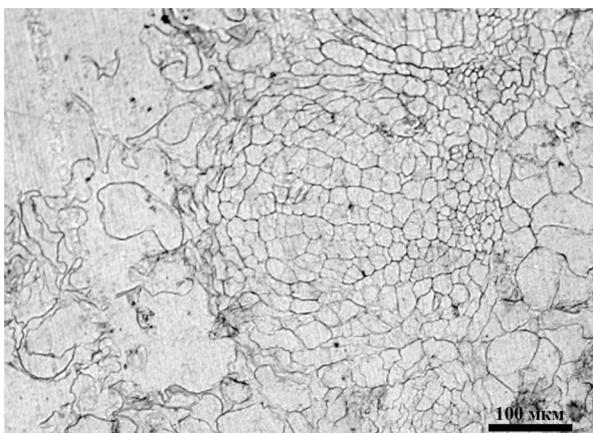


Рис. Локализация цитокининов в морфогенетическом очаге андроклинного каллуса пшеницы: *a* – контроль,

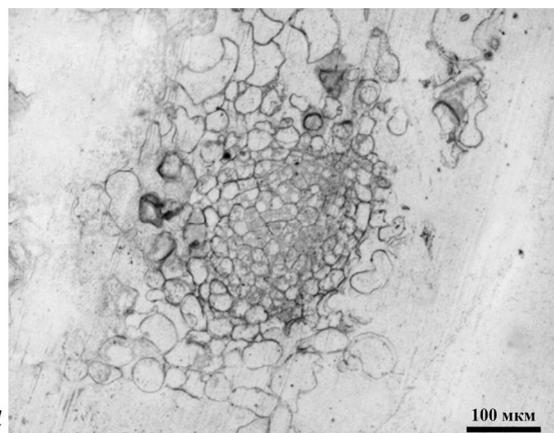
Установлено, что в ходе дальнейшего развития андроклинных каллусов в условиях *in vitro* цитокинины локализуются также преимущественно в клетках меристематической зоны, и, кроме того, в клетках развивающихся органов (апексов побега и корня) и клетках развивающихся эмбрионидов (вплоть до глобулярной стадии развития эмбрионидов).

Таким образом, нами проведен детальный цитогистологический анализ всех выявленных путей морфогенеза *in vitro* андроклинных каллусов в сопоставлении с данными локализации цитокининов.

Полученные данные продемонстрировали участие этих фитогормонов именно на начальных этапах всех путей морфогенеза *in vitro*, связанных с активными митотическими делениями и дифференциацией клеток меристематической зоны каллуса. Более того, самый начальный этап всех путей морфогенеза *in vitro* андроклинных каллусов универсален и состоит в обособлении в каллусе центральной меристематической зоны, преимущественно в клетках которой локализуются цитокинины. Такие данные еще раз подтверждают важную (и, по-видимому, определяющую) роль цитокининов в индукции митотической активности и дифференциации клеток как в естественных условиях [14], так и в условиях культуры *in vitro* [15].

Сопоставление данных детального цитогистологического анализа всех путей морфогенеза *in vitro* андроклинных каллусов пшеницы показало, что начальный этап всех путей универсален и состоит в обособлении в каллусе зоны меристематических клеток, отличающихся от остальных клеток каллуса плотной цитоплазмой и центральным расположением ядра. Для этих клеток характерны интенсивные деления. Такая зона клеток обозначена нами как морфогенетический очаг (рис.).

Методом иммунолокализации гормонов установлено, что цитокинины локализуются преимущественно именно в клетках такой меристематической зоны (рис., *б*), тогда как клетки периферической зоны не демонстрируют специфическую окраску на цитокинины.



б – наличие специфической окраски на цитокинины.

Таким образом, преимущественная локализация цитокининов в клетках меристематических зон андроклинных каллусов является одним из основных факторов, влияющих на дальнейшую дифференциацию клеток при морфогенезе *in vitro*.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 08-04-97045 и программой «Ведущие научные школы РФ» (грант № НШ 7637.2010.4, лидер Школы – член-корр. РАН Т.Б. Батыгина, БИН РАН, Санкт-Петербург).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутенко Р.Г. Клеточные и молекулярные аспекты морфогенеза растений *in vitro* // I Чайлахяновские чтения. Пушино, 1994. С. 7-26.
2. Батыгина Т.Б., Бутенко Р.Г. Морфогенетические потенции зародыша покрытосемянных растений // Ботан. журн. 1981. Т. 66. № 11. С. 1531-1547.
3. Батыгина Т.Б. Пыльничек как модель изучения морфогенетических потенций и путей морфогенеза // Эмбриология цветковых растений. Т. 1. СПб., 1994. С. 120-121.
4. Хохлов С.С. Общие вопросы гаплоидии // Гаплоидия и селекция. М.: Наука, 1976. С. 5-14.
5. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Морфогенез в андроклинных каллусах злаков // Успехи современной биологии. 2010. Т. 130. № 3. С. 247-257.
6. Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Куксо П.А. Морфогенез в культуре изолированных пыльников: роль фитогормонов // Успехи современной биологии. 1999. Т. 119. № 6. С. 567-577.

7. *Медведев С.С.* Физиология растений. СПб.: Изд. Санкт-Петербургского ун-та, 2004. 335 с.
8. *Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б.* Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. Уфа, 2002. 39 с.
9. *Веселов С.Ю., Вальке Р.С., Ван Онкелен Х., Кудоярова Г.Р.* Содержание и локализация цитокининов в листьях исходных и трансгенных растений табака // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 1. С. 34-40.
10. *Паушева З.П.* Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1988. 170 с.
11. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы / *Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимирова.* М.: Наука, 2005. 99 с.
12. От микроспоры к сорту / *Т.Б. Батыгина, Н.Н. Круглова, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимирова.* М.: Наука. 2010. 178 с.
13. *Круглова Н.Н., Катасонова А.А.* Незрелый зародыш как морфогенетически компетентный эксплант // Физиология и биохимия культурных растений 2009. Т. 41. № 2. С. 124-131.
14. *Чайлахян М.Х.* Гормональная регуляция роста и развития высших растений // Успехи современной биологии. 1982. Т. 95. Вып. 1. С. 23-34.
15. *Бутенко Р.Г.* Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М., 1999. 160 с.

CYTOPHYSIOLOGICAL ANALYSIS OF THE BEGINNING OF MORPHOGENESIS IN WHEAT ANDROCLINAL CALLUSES *IN VITRO*

© 2011 D.Yu. Zaitsev

Detailed histological analysis of the beginning of morphogenesis *in vitro* in wheat androclinal calluses in comparison with the date of cytokinin localization was made. It was established the participation of cytokinins at the initial stages of all morphogenesis *in vitro* pathways.

Key words: *morphogenesis, culture in vitro, anther, callus, meristem, wheat.*