

## АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ ПШЕНИЦЫ К УСЛОВИЯМ *EX VITRO*: РАБОТА УСТЬИЦ

© 2011 Е.В. Мартыненко<sup>1</sup>, Н.Н. Круглова<sup>1</sup>, О.В. Дубровная<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

<sup>2</sup>Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, г. Киев

Поступила 27.05.2011

Исследован устьичный аппарат листьев регенерантов пшеницы, полученных в условиях высокой влажности и низкой освещенности *in vitro*, в процессе их постепенной адаптации к условиям пониженной влажности воздуха и высокой освещенности *ex vitro*. Установлено, что к концу эксперимента регенеранты *ex vitro* и интактные растения имели сходные значения устьичной проводимости. Сравнительный цитологический анализ устьиц адаптированных *ex vitro* регенерантов и интактных растений *in vivo* продемонстрировал их морфологическое сходство при меньших размерах устьиц регенерантов. Предложенный способ постепенной адаптации к условиям *ex vitro* позволяет добиваться высокой выживаемости регенерантов.

**Ключевые слова:** выживаемость регенерантов, устьичная проводимость, яровая мягкая пшеница *Triticum aestivum* L., адаптация.

Большинство биотехнологических методов культуры *in vitro* направлено на получение в конечном этапе полноценных фертильных растений-регенерантов. Основная проблема в этой области исследований – низкая выживаемость растений-регенерантов при переносе их из условий культуры *in vitro*, характеризующихся высокой влажностью воздуха и низкой освещенностью, в посткультуральные условия *ex vitro*, характеризующиеся пониженной влажностью воздуха и высокой освещенностью.

Разработка эффективной системы получения полноценных, с качественными семенами, растений-регенерантов остается актуальной и до настоящего времени. Несмотря на то, что накоплен значительный фактический материал, касающийся различных аспектов исследования выживаемости растений-регенерантов, многие вопросы остаются открытыми. Так, слабо изучена работа устьичного аппарата в процессе развития регенерантов *in vitro* и *ex vitro* и особенно в критический момент переноса регенерантов из условий *in vitro* в условия *ex vitro*. Согласно литературным данным, регенеранты, полученные *in vitro*, имеют низкую выживаемость при переносе в условия *ex vitro* из-за формирования у них аномального устьичного аппарата [1-5]. Однако в литературе отсутствуют данные детальных физиологических и цитологических исследований устьиц растений-регенерантов, адаптируемых к условиям *ex vitro*.

В связи с этим цель данной работы заключалась в физиологической и цитологической оценке устьиц растений-регенерантов пшеницы в процессе развития *in vitro*, в критический момент переноса из условий *in vitro* в условия *ex vitro* и в процессе адаптации к условиям *ex vitro*.

Мартыненко Елена Викторовна, канд. биол. наук, e-mail: evmart08@mail.ru; Круглова Наталья Николаевна, докт. биол. наук, e-mail: kruglova@anrb.ru; Дубровная Оксана Васильевна, докт. биол. наук, e-mail: dubrovny@ukr.net

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования послужила яровая мягкая пшеница сорта Башкирская 26, перспективная для климатической зоны Южного Урала, [6] семена которой были любезно предоставлены к.с.-х.н. В.И. Никоновым, заведующим лабораторией селекции и семеноводства Башкирского НИИ СХ РАСХН (г. Уфа).

Предварительно было выявлено, что незрелые зародыши этого сорта пшеницы с высокой отзывчивостью формируют морфогенные каллусы в условиях культуры *in vitro*. Для данного эксперимента использовали растения-регенеранты в фенотипической фазе кушения, полученные *in vitro* из морфогенных каллусов зародышевого происхождения, и интактные растения в той же фенотипической фазе. Растения-регенеранты до 7-х сут фенотипической фазы кушения выращивали *in vitro* в пробирках в климатической камере MLR-351H (Sanyo, Japan) при 16-часовом фотопериоде, освещенности 25000 лк. Затем их переносили в почвенную смесь и в течение 5-ти сут содержали в той же климатической камере при относительной влажности воздуха (ОВВ) 90 % и щадящем световом режиме (освещенность 16000 лк). На следующем этапе эксперимента ОВВ в климатической камере снижали до 60 %. На 8-е сут эксперимента растения-регенеранты переносили на воздух на светоплощадку при освещенности 16000 лк и 16-часовом фотопериоде. С 13-х сут и до конца эксперимента освещенность составляла 25000 лк.

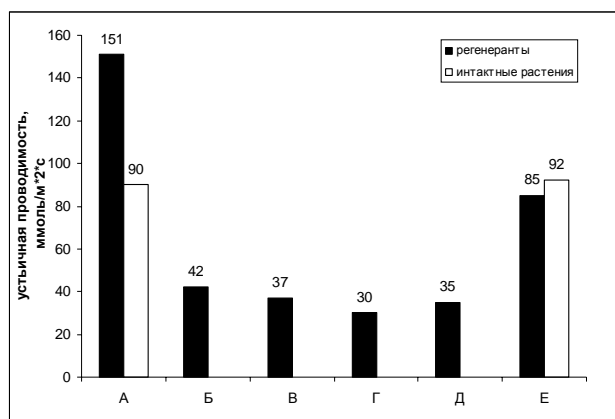
Интактные растения до 7-х сут фенотипической фазы кушения и далее выращивали на светоплощадке при 16-часовом фотопериоде и освещенности 25000 лк.

Для физиологической оценки реакции устьиц растений обеих групп использовали показатель устьичной проводимости, характеризующий степень открытости устьиц, что позволяет оценить интенсивность транспирации и сдвиги в водном обмене. Интенсивность транспирации и сдвиги в водном обмене. Показатель устьичной проводимо-

сти измеряли с помощью автоматического порометра (МК Delta-T, UK). Временные цитологические препараты, полученные согласно общепринятой методике [7] просматривали на микроскопе проходящего света Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Jena). Статистическую обработку полученных результатов проводили, используя программы Excel с учетом основных статистических параметров.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве точки отсчета использовали показатель устьичной проводимости «пробирочных» растений-регенерантов на 7-е сут фенофазы кушения, находящихся в климатической камере (освещенность 25000 лк), перед их высадкой в почвенную смесь. Устьичная проводимость таких растений-регенерантов составила 151 мМоль/м<sup>2</sup>с, что в 1,7 раза превышало устьичную проводимость интактных растений того же возраста (90 мМоль/м<sup>2</sup>с), растущих в почвенной смеси на светоплощадке при той же освещенности (рис. 1А). Возможно, это обусловлено более высокой относительной влажностью воздуха в пробирках.



**Рис. 1.** Устьичная проводимость растений-регенерантов в процессе адаптации к условиям *ex vitro* в сравнении с аналогичными показателями интактных растений: А – растения-регенеранты в пробирках перед высадкой в почвенную смесь и интактные растения в почвенной смеси (освещенность 25000 лк); Б – 1-е сут эксперимента, растения-регенеранты в почвенной смеси (ОВВ 90 %, освещенность 16000 лк); В – 5-е сут эксперимента, растения-регенеранты в почвенной смеси (ОВВ 90 %, освещенность 16000 лк); Г – 7-е сут эксперимента, растения-регенеранты в почвенной смеси (ОВВ 60 %, освещенность 16000 лк); Д – 10-е сут эксперимента, растения-регенеранты в почвенной смеси (воздух, освещенность 16000 лк); Е – 15-е сут эксперимента, адаптированные растения-регенеранты и интактные растения в почвенной смеси (воздух, освещенность 25000 лк)

В критический момент переноса регенерантов в условия *ex vitro* показатель устьичной проводимости резко снижался (до 42 мМоль/м<sup>2</sup>с) по сравнению с «пробирочными» растениями (рис. 1Б). На 5-е сут эксперимента его значение составило 37 мМоль/м<sup>2</sup>с (рис. 1В). Уменьшение устьичной проводимости в данном случае можно расценивать как следствие фотоактивной реакции устьиц на понижение освещенности.

На следующем этапе эксперимента ОВВ в климатической камере уменьшали до 60 %. Показатель устьичной проводимости продолжал падать и на 7-е сут эксперимента достиг 30 мМоль/м<sup>2</sup>с (рис. 1Г).

На 8-е сут опыта устьичная проводимость перенесенных на светоплощадку растений-регенерантов (освещенность 16000 лк и 16-часовой фотопериод) начинала повышаться и на 10-е сут эксперимента достигла 35 мМоль/м<sup>2</sup>с (рис. 1Д), что свидетельствует о начале адаптации растений-регенерантов к изменившимся условиям.

Повышение освещенности светоплощадки до 25000 лк на 13-е сут эксперимента привело к резкому повышению показателя устьичной проводимости адаптируемых растений-регенерантов, и на 15-е сут эксперимента этот показатель (85 мМоль/м<sup>2</sup>с) был сопоставим с аналогичным показателем интактных растений (92 мМоль/м<sup>2</sup>с) (рис. 1Е). Возможно, такое резкое повышение обусловлено увеличением степени открытости устьиц под действием света. С другой стороны, оно свидетельствует о нормализации функционирования устьиц у растений-регенерантов. Степень выживаемости растений-регенерантов, по имеющимся в литературе сведениям [8,9], в среднем, составляет 50-60 %. При предложенном нами варианте постепенной адаптации растений-регенерантов к условиям *ex vitro* отмечена высокая выживаемость растений-регенерантов – 83 %.

Проведенный морфометрический анализ выявил, что устьица растений-регенерантов, адаптированных к условиям *ex vitro* (на 15-е сут эксперимента), морфологически не отличаются от устьиц интактных растений в той же фазе развития (рис. 2). В то же время устьица регенерантов имеют меньшие размеры. Так, длина устьиц растений-регенерантов составляла, в среднем, 55.04±1.45 мкм, тогда как у интактных растений она была равна 67.71±1.49 мкм.

Согласно литературным данным, уменьшение размеров устьиц характерно для растений-регенерантов и других представителей цветковых растений, причем авторы также отмечают нормальное функционирование устьиц растений-регенерантов [10-15].

Таким образом, данные по устьичной проводимости растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы, полученных *in vitro* и адаптированных к условиям *ex vitro*, свидетельствуют о нормальном функционировании устьиц при их меньших размерах. Предложенный нами вариант постепенной адаптации к условиям *ex vitro* позволит добиваться высокой выживаемости растений-регенерантов.

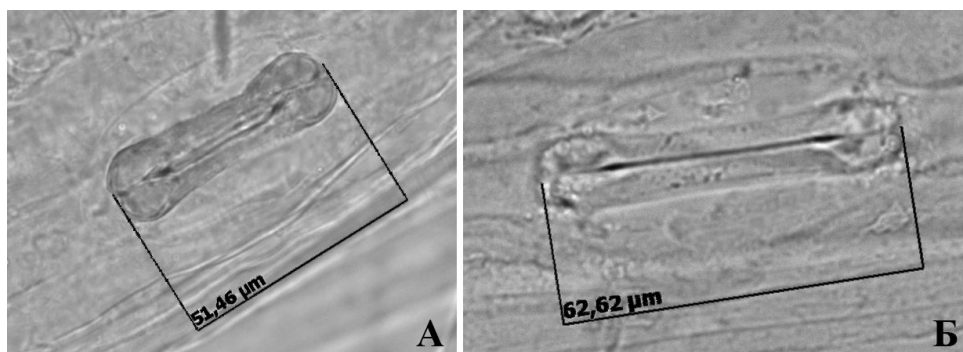


Рис. 2. Морфология устьиц адаптированных растений-регенерантов (А) и интактных растений (Б) в фенофазе кушения на 15-е сут эксперимента.

Авторы благодарны к.б.н. Веселовой С.В. и к.б.н. Зайцеву Д.Ю. за помощь в проведении части экспериментальной работы.

Работа выполнена при поддержке РФФИ-Поволжье (грант № 08-04-97045), а также по программе «Ведущие научные школы РФ» (грант № НШ 7637.2010.4).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sallanon H., Tort M., Coudret A. The ultrastructure of micropropagated and greenhouse rose plant stomata // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1993. V. 32 P. 227-233.
2. Pospisilova J. Effect of air humidity on the development of functional stomatal apparatus // Biologia Plantarum. 1996. V. 38. № 2. P. 197-204.
3. Noe N., Bonini L. Leaf anatomy of highbush blueberry grown in vitro and during acclimatization to ex vitro conditions // Biologia Plantarum. 1996. V. 38. № 1. P. 19-25.
4. Fordham M.C., Harrison-Murray R., Knight L. Effects of leaf wetting and high humidity on stomatal function in leafy cutting and intact plants of *Corylus maxima* // Physiologia Plantarum. 2001. V. 113. P. 233-240.
5. Joshi P., Joshi N., Purohit S.D. Stomatal characteristics during micropropagation of *Wrightia tomentosa* // Biologia Plantarum. 2006. V. 50. № 2. P. 275-278.
6. Характеристика сортов сельскохозяйственных культур, включенных в Госреестр по Республике Башкортостан. Пособие для агрономов / [под ред. Д.Б. Гареева]. Уфа, 1997. 96 с.
7. Плушова З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1988. 170 с.
8. Plant biotechnology and molecular markers / [Eds Srivastava S., Narula A., Srivastava S.]. New Delhi: Anamaya Publishers, 2004. P. 325.
9. Plant cell and tissue culture – a tool in biotechnology. Basics and application / [Eds Neumann K.-H., Kumar A., Imani J.]. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. P. 333.
10. Gribble K., Sarafis K., Nailon J., Holford P., Uwins P. Environmental scanning electron microscopy of the surface of normal and leaves of *Gypsophila paniculata* (Babies, Breath) cultured in vitro // Plant Cell Reports. 1996. V. 15 P. 771-776.
11. Ali-Ahmad M., Hughes G.H., Safadi F. Studies on stomatal function, epicuticular wax and stem-root transition region of polyethylene glycol-treated and nontreated in vitro grape plantlets // In vitro Cellular and Developmental Biology Plant. 1998. V. 34. P. 1-7.
12. Estrada-Luna A.A., Davies Jr F.T., Egilla J.N. Physiological changes and growth of micropropagated chille ancho pepper plantlets during acclimatization and post-acclimatization // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2001. V. 66. P. 17-24.
13. Brutti C.B., Rubio E.J., Lorente B.E., Apostolo N.M. Artichoke leaf morphology and surface features in different micropropagation stages // Biologia Plantarum. 2002. V. 45. № 2. P. 197-204.
14. Jo E.-A., Tewari R.K., Hahn E.-J., Paek K.-Y. In vitro sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2009. V. 96. P. 307-315.

#### ADAPTATION OF WHEAT PLANT-REGENERANTS TO *EX VITRO* CONDITIONS: STOMATA FUNCTIONING

© 2011 E.V. Martynenko<sup>1</sup>, N.N. Kruglova<sup>1</sup>, O.V. Dubrovnaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

<sup>2</sup>Institute of Plant Physiology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

The investigation of leaves stomatal apparatus of wheat regenerants, obtained under conditions of high humidity and low illumination *in vitro* was carried out during their gradual (15 days period) adaptations to conditions of the lowered air humidity and high illumination *ex vitro*. It was established, that at the end of experiment regenerants *ex vitro* and intact plants had similar values of stomatal conductivity. The comparative cytological analysis of stomata of adapted *ex vitro* regenerants and intact plants *in vivo* showed their morphological similarity, although the regenerants had smaller sizes of stomata. The offered method of gradual adaptation to *ex vitro* conditions allows achieving high survival rate of regenerants.

**Key words:** survival rate of regenerants, stomatal conductivity, spring wheat, *Triticum aestivum* L., adaptation.

Martynenko Elena Viktorovna, Candidate of Biology, e-mail: evmart08@mail.ru; Kruglova Natalia Nikolaevna, Doctor of Biology, e-mail: kruglova@anrb.ru; Dubrovnaya Oksana Vasilievna, Doctor of Biology, e-mail: dubrovny@ukr.net