

was observed on different variants CLF depending on the genotype of an investigated material of wheat was noticed.

КРУГЛОВА Н.Н.

Институт биологии Уфимского НЦ РАН,

Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: Kruglova@anrb.ru

К ПРОБЛЕМЕ УНИФИКАЦИИ ТЕРМИНОЛОГИИ ПРИ РАЗРАБОТКЕ БИОТЕХНОЛОГИИ АНДРОКЛИННОЙ ГАПЛОИДИИ *IN VITRO*

Современные инновационные биотехнологии растений во многом базируются на данных клеточной биологии и клеточной инженерии *in vitro*. Приоритетное направление в этой области – метод культуры *in vitro* пыльников, приводящий к формированию гаплоидных растений-регенерантов из микроспор/клеток пыльцевого зерна. К настоящему времени в этой области накоплен значительный фактический материал (например, по хозяйственно ценным злакам [Сатарова, 2002; Игнатова, 2004; Белинская, 2007; Бишимбаева, 2007]). Необходима, тем не менее, дальнейшая разработка методологических основ изучения культуры *in vitro* пыльников. Одна из самых важных проблем в этой области – унификация используемой терминологии.

Материал и методы

Цель данной работы – проанализировать терминологию, используемую при культивировании пыльников *in vitro*, на примере яровой мягкой пшеницы. Метод культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы разработан в лаборатории экспериментальной эмбриологии растений Института биологии Уфимского НЦ РАН в творческом содружестве с лабораторией эмбриологии и репродуктивной биологии Ботанического института им. В.Л.Комарова РАН (г. Санкт-Петербург, зав. лабораторией – член-корр. РАН Т.Б.Батыгина) и с лабораторией селекции яровой пшеницы Селекционного центра по растениеводству Башкирского НИИ СХ РАСХН (г. Уфа, зав.лабораторией – к. с.-х. н. В.И.Никонов) [Круглова, Батыгина, 2002; Круглова с соавт., 2005; Круглова, Сельдиминова, 2008]. За основу был взят метод культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы в разработке кафедры генетики Саратовского государственного университета (зав. кафедрой – проф. В.С.Тырнов) [Суханов, Тырнов, 1976; Суханов, 1983].

Результаты и обсуждение

Рассмотрим используемую терминологию с позиции эмбриологии растений.

Для обозначения самого феномена образования гаплоидного растения-регенеранта в культуре *in vitro* пыльников используются различные термины: «пыльцевой эмбриогенез», «пыльцевой андрогенез», «микроспориальный эмбриогенез», «андрогенный эмбриогенез», «экспериментальный андрогенез», «гаплоидный андрогенез», «экспериментальная гаплоидия», «экспериментальная андроклиния» и наиболее часто, особенно в западной литературе, – «андрогенез *in vitro*» («androgenesis *in vitro*»). Мы предлагаем активно использовать предложенный С.С.Хохловым [1976] термин «андроклиния» (от греч. *ανδρος* – мужской, *κλίνας* – имеющий склонность) как наиболее верно отражающий суть явления. Применять же распространенный термин «андрогенез *in vitro*» некорректно. Нельзя не согласиться с мнением В.С.Тырнова [1998, 2005] о том, что, согласно существующей терминологии, биолог (как ботаник, так и зоолог) подразумевает под «андрогенезом» («мужским партеногенезом») развитие нового организма из гаметы – спермия. Немаловажно и то, что андрогенез в его классическом значении связан с аллоплазматическим состоянием организма (особь имеет материнскую цитоплазму и отцовское ядро), тогда как при так

называемом андрогенезе *in vitro* новый организм имеет ядро и цитоплазму только одной особи.

Важнейшая проблема в изучаемой области связана с понятием «инициальная клетка андроклинии» – той клетки пыльника, которая в условиях культуры *in vitro* дает начало растению-регенеранту. Это производная клетки спорогенной ткани пыльника, гаплоидной природы (после мейотического деления), находящаяся в критической фазе развития, во время которой клетка морфогенетически компетентна к смене программы развития. Так, оптимальная для индукции андроклинии спорогенная клетка яровой мягкой пшеницы находится в фазе сильновакуолизированной микроспоры [Круглова, 2002; Круглова с соавт., 2005] (согласно периодизации [Круглова, 1999]). В то же время в литературе приводятся данные и о других фазах развития микроспор злаков (в том числе пшеницы), а также клетках пыльцевых зерен злаков, проявивших свойства инициальных клеток андроклинии.

Во многом реализация потенциала инициальных клеток андроклинии определяется их тотипотентностью (термин предложен G. Haberlandt [1909]; понятие разработано в цикле работ Р.Г.Бутенко ([1994 и др.] и Т.Б.Батыгиной [1986 и др.]). Инициальные клетки андроклинии предложено рассматривать и в аспекте проблемы стволовых клеток, поскольку для них характерны свойства стволовости (определенная степень тотипотентности, длительное пребывание в покое (интерфазе) перед переходом к пролиферации и способность к переключению программы развития с гаметофитной на спорофитную, т.е. переключению способа репродукции с полового на бесполой) [Батыгина, Рудский, 2006].

В процессе культивирования реализуются два пути морфогенеза инициальных клеток андроклинии – эмбриоидогенез и каллусогенез, через этап образования эмбриоида и каллуса, соответственно [Круглова с соавт., 2005; и др.]. Следует отметить, что нет единого мнения и в отношении термина, общего для эмбриоидов и каллусов. Например, зачастую их объединяют термином «новообразования», по-видимому, неточным, так как этот термин уже «занят» в медицине. Мы предлагаем использовать объединяющий термин «андроклинные структуры».

Проблема образования эмбриоидов и каллусов в культивируемых пыльниках связана с переключением развития инициальных клеток с обычного для них гаметофитного пути на спорофитный путь развития. Для обозначения клеток пыльника, морфогенетически компетентных к такому переключению, используются такие термины, как «спорофитная пыльца» («sporophytic pollen»), «андрогенная пыльца» («androgenic pollen»), S-пыльца (от англ. small – мелкий), P-пыльца (от англ. premeiotic – премейотический), «андрогенная микроспора» («androgenic microspore»). По-видимому, все эти термины имеют право на существование (в редакции, например, «андроклинная пыльца», «андроклинная микроспора»). Мы предлагаем пользоваться термином «морфогенная микроспора (пыльца)».

У пшеницы именно морфогенная микроспора на начальных этапах культуры *in vitro*, как правило, под действием стрессовых факторов претерпевает равное митотическое деление, аномальное по отношению к неравному делению при формировании пыльцевого зерна. Аномальное равное деление как принципиальный начальный этап морфогенеза микроспоры по спорофитному пути ведет к формированию двуклеточной структуры. В результате многократных митотических делений каждой из клеток образовавшейся двуклеточной структуры формируется многоклеточная структура – группа клеток, располагающихся в пределах одной неповрежденной оболочки инициальной клетки андроклинии. Для обозначения этой группы клеток предложено немало терминов: «эмбриоподобная микроскопическая структура», «индуцированная микроструктура», «многоклеточная пыльцевая единица», «многоклеточная масса», «микроструктура-синцитий», «потенциальная эмбриогенная клеточная масса», «многоклеточный агрегат», «эмбриогенная клеточная масса»,

«многоклеточная андрогенная масса» и, наконец, наиболее употребимый термин - «многоклеточное пыльцевое зерно». На наш взгляд, корректно называть данную группу клеток «многоклеточной структурой». Многоклеточная структура – обязательный этап формирования и эмбриоидов и каллусов при культивировании пыльников *in vitro*.

Эмбриоид (embryoid) – зародышеподобная биполярная структура, образующаяся асексуально; зачаток нового растительного организма [Батыгина, 2000]. Термин предложен I.Vasil, A.C.Hildebrandt [1966] для обозначения зародышеподобных структур, возникающих как *in vivo* («нуцеллярные» и «фолиарные» зародыши), так и *in vitro*. Термин «эмбриоидогенез» соответствует термину «соматический эмбриогенез», предложенному рядом авторов (например, Б.П.Токиным [1969]) для обозначения развития целых организмов из соматических клеток. При исследовании эмбриоидов, образовавшихся в процессе культивирования изолированных пыльников, употребляются термины «андрогенный зародыш» («androgenic embryo»), «глобулярный пыльцевой зародыш» («globular pollen embryo»). На наш взгляд, эти термины неприемлемы. Применяемый же термин «пыльцевой эмбриоид» («pollen embryoid») корректнее. Термин «эмбриоподобная структура» («embryo-like structure») удачен, но не отражает происхождения этой структуры. Мы предлагаем использовать термин «микроспориальный эмбриоид» («microsporial embryoid») по аналогии с понятием «зиготический зародыш».

При каллусогенезе инициальная клетка андроклинии сначала формирует недифференцированный каллус. После переноса на питательную среду, индуцирующую органогенез, в каллусе отмечаются процессы ризогенеза, геммогенеза, гемморизогенеза и эмбриоидогенеза. В культуре *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы только два процесса ведут к желаемому результату – образованию растений-регенерантов – гемморизогенез и эмбриоидогенез [Круглова с соавт., 2005].

Несмотря на достаточную длительную историю изучения каллусогенеза как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro*, однозначного определения каллуса не предложено. Так, Т.Б.Батыгина [1986] под каллусом понимает гетерогенную интегрированную структуру (систему), образующуюся в результате пролиферации клеток на поверхности отдельных структур растительного организма; как правило, каллус формируется из исходно разных клеток генеративных и вегетативных органов; состоит из групп неоднородных клеток, имеющих различные морфогенетические потенции, которые реализуются различными путями (эмбриоидогенез, органогенез, гистогенез). Для характеристики каллуса, возникшего в культуре изолированных пыльников, по-видимому, имеет смысл согласиться с терминами «микроспориальный каллус» («microsporial callus»), «пыльцевой каллус» («pollen callus») в редакции «андроклиный каллус» («androclinic callus»). На наш взгляд, термин «андрогенный каллус» («androgenic callus») не вполне допустим, поскольку, как указывалось выше, необходимо различать понятия «андрогенез *in vitro*» и собственно «андрогенез».

Выводы

Важность унификации терминологии, используемой в любой отрасли науки, очевидна. Безусловно прав L. van der Pijl [1969], полагая, что дифференциация терминов – это не просто игра словами, но совершенно необходимое условие, чтобы разобраться в природе вещей. Перспективный подход, позволяющий решить ряд остродискуссионных терминологических вопросов при разработке биотехнологии андроклиной гаплоидии, - применение данных эмбриологии растений.

Исследования выполнены при поддержке РФФИ (гранты 05-04-97911, 08-04-97045), а также по программе «Ведущие научные школы РФ» (гранты НШ 4834.2006.4, НШ 2096.2008.4, лидер Школы – чл.-корр. РАН Т.Б.Батыгина).

Литература

1. Батыгина Т.Б. Хлебное зерно.– Л. – 1986. – 103 с.
2. Батыгина Т.Б. Воспроизведение, размножение и возобновление растений //

- Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции. – СПб. – 2000. – С. 35-39.
3. Батыгина Т.Б., Рудский И.В. Роль ствольных клеток в морфогенезе растений // Доклады Академии наук. – 2006. – Т. 410, № 5. – С. 1-3.
 4. Белинская Е.В. Создание признаковой коллекции ячменя по способности к андрогенезу *in vitro* и ее использование в генетических и биотехнологических исследованиях // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2007. – Т. 5, № 1,2. – С. 11-20.
 5. Бишимбаева Н.К. Цитофизиологические основы биотехнологии длительной регенерации растений в культуре тканей зерновых злаков: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Алматы. – 2007. – 37 с.
 6. Бутенко Р.Г. Клеточные и молекулярные аспекты морфогенеза растений *in vitro* // I Чайлахяновские чтения. – Пушкино. – 1994. – С. 7-26.
 7. Игнатова С.А. Биотехнологические основы получения гаплоидов, отдаленных гибридов и соматических регенерантов зерновых и бобовых культур в различных системах *in vitro*: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Одесса. – 2004. – 48 с.
 8. Круглова Н.Н. Периодизация развития пыльника злаков как методологический аспект изучения андрогенеза *in vitro* // Известия РАН. Серия биол. – 1999. – № 3. – С.275-281.
 9. Круглова Н.Н. Морфогенез в культуре пыльников пшеницы: эмбриологический подход. – Уфа: Гилем, 2001. – 175с.
 10. Круглова Н.Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – СПб. – 2002. – 48 с.
 11. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. – Уфа. – 2002. – 22 с.
 12. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. – М. – 2005. – 99 с.
 13. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*. – Уфа. – 2008. – 139 с.
 14. Сатарова Т.Н. Андрогенез и эмбриокультура у кукурузы *in vitro*: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Киев. – 2002. – 41 с.
 15. Суханов В.М. Андроклиния и ее особенности у пшеницы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 1983. – 24 с.
 16. Суханов В.М., Тырнов В.С. Получение гаплоидов *in vitro* из гаметических клеток // Гаплоидия и селекция. – М.: Наука, 1976. – С. 99-110.
 17. Токин Б.П. Бесполое размножение, соматический эмбриогенез и регенерация // Журн. общ. биол. – 1969. – Т. 30, № 1. – С. 15-21.
 18. Тырнов В.С. Гаплоидия у растений: Научное и прикладное значение. – М. – 1998. – 53 с.
 19. Тырнов В.С. Гаплоидия у растений: терминология и классификация. – Саратов. – 2005. – 41 с.
 20. Хохлов С.С. Общие вопросы гаплоидии // Гаплоидия и селекция. – М. – 1976. – С. 5-14.
 21. Haberlandt G. Physiologische Pflanzenanatomie. – Leipzig. – 1909. – 650 S.
 22. Pijl L. van der. Principles of dispersal in higher plants. – Berlin. – 1969. – 169 p.
 23. Vasil I., Hildebrandt A.C. Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures. I. *Cichorium endivia* // Amer. J. Bot. – 1966. – V. 53, № 9. – P. 869-874.

Резюме

С позиции эмбриологии растений проанализирована используемая терминология как методологическая сторона разработки инновационной биотехнологии

андроклинной гаплоидии яровой мягкой пшеницы. Предложены некоторые термины.

By the position of plant embryology the using terminology as the methodological base of elaboration of innovation biotechnology of spring soft wheat androclinal haploidy has been analyzed. The some terms have been proposed.

ЛЬОШИНА Л.Г., БУЛКО О.В., ГАЛКІН А.П.

*Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,
Україна, 02660, Київ, вул. Мурманська, 1, e-mail: llioshiba@ukr.net*

ОТРИМАННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛУСНОЇ І СУСПЕНЗІЙНОЇ КУЛЬТУРИ БАРВІНКА МАЛОГО *VINCA MINOR L.*

Для лікування багатьох хвороб споконвіку використовуються активні компоненти лікарських рослин. При нестачі лікарської сировини створюють їх синтетичні аналоги. Недоліком синтетичних препаратів порівняно з натуральними є те, що вони можуть викликати небажані побічні ефекти і гірше переносяться організмом. Тому виділення активних компонентів з лікарських рослин є достатньо актуальним завданням. Окрім нативних рослин, для цього можливе використання культури клітин *in vitro*. Перевагою речовин, виділених із культури клітин, є те, що вони екологічно чисті і вирощування їх біомаси не залежить від умов навколишнього середовища.

Для роботи нами обрана лікарська рослина - барвінок малий (*Vinca minor L.*), що є лікарською рослиною, яка продукує ряд речовин, важливих для фармакологічної промисловості. В траві виявлено близько 30 алкалоїдів індолюного ряду (вінін, вінкамін, пубесцин, мінорин і ін.), а також кислоти (урсолова і аскорбінова), вініцилін, кемпферол, дубильні і гіркі речовини, флавоноїди, сапоніни, рутини, каротин, вітамін С, цукор і т.д. Одним з найважливіших алкалоїдів є вінкамін, який первинно знайдено в листях [1]. Вінкамін і його похідні виробляються деякими фармацевтичними компаніями в Європі і Японії у складі препаратів, що поліпшують мозковий кровообіг, мають заспокійливу, гіпотензивну, судинорозширювальну, кровоспинну, протимікробну і в'язучу властивості. Але *V. minor* - багаторічна рослина, яка повільно росте, окрім того, рослина зазвичай розмножується живцями, а не насінням, тому кількість рослин, які можуть бути отримані одночасно, обмежена. Внаслідок цього інтерес до отримання культури клітин досить обґрунтований. Були спроби культивування калусу, який би продукував вінкамін у помітних кількостях [2,3], проте однозначного збільшення виходу вінкаміну в недиференційованій культурі досягнуто не було. Тому подальші експерименти по підвищенню продуктивності клітинних культур барвінку малого актуальні й на сьогоднішній день.

Матеріали і методи

Для введення в культуру *in vitro* фрагменти стебла й листа нарізали шматочками по 1 см, промивали в проточній воді 30 хв, обполіскували 70% етиловим спиртом і занурювали на 5 хв. в 0,1% HgCl₂. Потім відмивали стерильною дистильованою водою й поміщали на безгормональне середовище MS у світловий блок при T 27±2°C і 16-годинному фотоперіоді (2000-2500 люкс). Калусогенез був ініційований з листових експлантів, отриманих з асептичних рослин, на середовищі з додаванням 1мг/л 2,4-Д + 1мг/л кінетину при інкубації в темряві при T26±2°C.

Поверхневе культивування проводили на середовищі Мурасіге-Скуга (MS) [4] з додаванням 2,4-Д 2,0 мг/л, НОК-0,45 мг/л, ІОК-0,55 мг/л, кінетин – 0,18 мг/л, при 26±1°C і вологості 80%, у темряві.