

СЕЛДИМИРОВА О.А.

Институт биологии Уфимского НЦ РАН,
Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: seldimirova@anrb.ru

ПУТИ МОРФОГЕНЕЗА МИКРОСПОР В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ПЫЛЬНИКОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Культура *in vitro* изолированных пыльников – эффективный биотехнологический прием, активно используемый в современных селекционно-генетических программах по созданию новых форм и сортов сельскохозяйственных культур. В основе метода культуры *in vitro* изолированных пыльников лежит феномен андроклинии, суть которого состоит в переключении программы развития морфогенетически компетентной гаплоидной клетки-микроспоры с обычного гаметофитного пути (образование пыльцевого зерна) на иной путь – спорофитный (образование гаплоидного растения) в условиях культуры *in vitro*.

Основное преимущество использования гаплоидов состоит в возможности быстрого получения гомозиготных константных гибридных линий, что, в свою очередь, облегчает оценку фенотипов по качественным и количественным признакам и дает возможность ускорить оценку перспективности полученных гибридов. Это имеет большое значение в биотехнологических исследованиях растений, в том числе яровой мягкой пшеницы – основного хлебного злака.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили сорта (Жница, Московская 35, Экада 78), линии (Фотос, Л 42809, Л 42866, Л 42875, 76/98а) и гибридные комбинации (ГП 15 (Л 42809 x Л 42866), ГП 42 (Л 42875 x 76/98а), ГП 43 (Л 42875 x Экада 78)) яровой мягкой пшеницы. Семена были предоставлены Башкирским НИИСХ РАСХН (г. Уфа).

В работе использованы: метод культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы с учетом эмбриологических данных [Круглова, Батыгина, 2002], метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) [Миронов с соавт., 1996], метод приготовления постоянных препаратов растительных образцов, ранее исследованных методом СЭМ, разработанный совместно с лабораторией эмбриологии и репродуктивной биологии Ботанического института им. В.Л.Комарова РАН (г. Санкт-Петербург), метод твердофазного иммуноферментного анализа растительных образцов [Кудоярова с соавт., 1986]. Постоянные препараты просматривали и документировали с применением цифрового микроскопа проходящего света серии Микровизор μ Vizo-100. Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Excel, учитывая основные статистические параметры.

Результаты и обсуждение

Экспериментально установлено, что в условиях культуры *in vitro* пыльников морфогенез сильновакуолизированных микроспор проходит следующими путями:

1. Формирование эмбриоидов - эмбриоидогенез - состоит в формировании из сильновакуолизированных микроспор зародышеподобных структур. Детальный анализ микроспориальных эмбриоидов в динамике развития *in vitro* показал, что развитие эмбриоидов принципиально сходно с развитием зиготических зародышей донорных растений пшеницы в естественных условиях. Сформированные эмбриоиды имеют все характерные для зародышей пшеницы органы.

2. Формирование полиэмбриоидов – полимерных зародышеподобных структур. Детальный анализ формирования полиэмбриоидов свидетельствует о том, что структурный механизм их образования состоит в равномерном увеличении размеров апикальной части эмбриоида и возникновении на ней множественных, симметрично

расположенных и равноценных меристематических очагов (как правило, 3-5). Впоследствии каждый из меристематических очагов дает начало щитку и апикальной меристеме побега. Как правило, все щитки частично срастаются в основании, тогда как каждая апикальная меристема является самостоятельной и окружена собственным колеоптилем.

3. Формирование морфогенных каллусов, характеризующимися наличием в их составе так называемых меристематических очагов, состоящих из клеток, обладающих морфогенетическими потенциями. В ходе дальнейшего развития меристематические очаги преобразовываются в меристематические зоны, с деятельностью клеток которых связаны процессы эмбриогенеза и органогенеза (геммогенеза – формирования почек, ризогенеза – формирования корней и гемморизогенеза – сопряженного формирования почек и корней).

4. Формирование неморфогенных каллусов, не имеющих в своем составе меристематических клеток. Такие каллусы не способны к регенерации растений, при дальнейших пересадках на питательные среды различного состава, как правило, они некротизируют и поэтому отбраковываются.

В ходе исследований выявлена следующая закономерность: независимо от генотипа индукция путей морфогенеза *in vitro* сильновакуолизированных микроспор при постепенном повышении концентрации экзогенного ауксина 2,4-Д в индукционной питательной среде Potato II всегда характеризуется определенной последовательностью: формирование эмбриоидов – формирование полиэмбриоидов – формирование морфогенного каллуса – формирование неморфогенного каллуса. Установлено, что для индукции одного и того же пути морфогенеза *in vitro* сильновакуолизированных микроспор пыльникам разных генотипов требуются различные концентрации экзогенной 2,4-Д в индукционной питательной среде Potato II.

Согласно данным твердофазного иммуоферментного анализа пыльники разных генотипов различаются по содержанию в них эндогенной ИУК (табл. 1).

Таблица 1

Содержание эндогенной ИУК в пыльниках исследованных генотипов перед инокуляцией на индукционную среду Potato II

Генотип	Содержание эндогенной ИУК (нг/г сухой массы)
I	63.4±12.1
II	71.6±13.3
III	295.8±49.2
IV	395.6±57.2
V	45.4±5.2
VI	105.3±17.8
VII	92.4±15.6
VIII	349.5±43.2
IX	96.7±13.5
X	33.6±4.8
XI	179.8±24.3

Условные обозначения: I – Жница, II – Московская 35, III – Экада 78, IV – Фотос, V – Л 42809, VI – Л 42866, VII – Л 42875, VIII – 76/98а, IX – ГП 15, X – ГП 42, XI – ГП 43.

Согласно критериям, предложенным [Горбунова с соавт., 2001] генотипы можно условно разделить на высокоауксиновые (III, IV, VIII, XI) и низкоауксиновые (I, II, V, VI, VII, IX, X). Для индукции одного и того же пути морфогенеза *in vitro* высокоауксиновым генотипам требуется более низкая концентрация экзогенной 2,4-Д в индукционной питательной среде Potato II, по сравнению с низкоауксиновыми генотипами (табл. 2).

Таблица 2

Влияние концентрации 2,4-Д на частоту индукции путей морфогенеза *in vitro* сильновакуолизованных микроспор

Генотип		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	
Частота индукции путей морфогенеза <i>in vitro</i> при концентрации 2,4-Д (мг/л)	0.1	Э	0	0	12.6±2.8	42.2±7.5	0	0	0	35.9±6.3	0	0	52.3±9.6
		ПЭ	0	0	1.8±0.4	7.8±1.3	0	0	0	6.8±1.7	0	0	5.6±1.4
		МК	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		НМК	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.5	Э	18.4±3.5	6.1±0.5	3.2±0.6	5.5±0.9	4.5±1.2	14.5±2.9	10.0±0.9	10.2±2.5	35.3±3.2	4.6±0.4	6.9±0.6
		ПЭ	2.6±0.8	0.6±0.2	11.1±1.9	38.2±8.6	0	4.7±0.8	3.3±0.7	50.0±4.5	4.1±0.8	0.5±0.1	33.3±2.9
		МК	0	0	0	5.7±1.2	0	0	0	3.5±1.0	0	0	3.1±0.9
		НМК	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.0	Э	0.5±0.1	1.4±0.4	0.4±0.1	0	10.0±0.9	2.9±0.8	2.4±0.7	0	5.6±0.5	1.4±0.4	0
		ПЭ	23.3±4.8	14.1±2.9	2.7±0.3	1.6±0.5	2.1±0.6	25.1±4.3	33.5±8.5	10.7±1.5	30.6±6.1	4.1±0.4	2.4±0.7
		МК	2.1±0.4	5.7±1.4	3.2±0.5	57.4±9.5	0.3±0.1	6.8±1.3	1.9±0.6	36.4±6.3	2.1±0.6	0.7±0.1	42.7±8.3
		НМК	0	0	0	0.5±0.1	0	0	0	5.3±1.3	0	0	7.9±1.9
	1.5	Э	0	0	0	0	3.7±0.8	0	0	0	0.2±0.1	0	0
		ПЭ	2.7±0.7	3.4±0.9	3.9±0.8	0	13.5±7.2	5.6±0.9	9.4±1.6	2.5±0.7	1.3±0.4	0	0
		МК	12.3±2.1	12.7±2.3	19.5±2.7	13.0±1.6	2.6±0.7	42.1±6.2	29.5±2.7	26.1±2.3	17.4±2.9	5.4±1.4	5.8±0.5
		НМК	0.4±0.1	3.2±0.5	4.2±0.8	11.4±2.1	0	3.8±0.9	6.2±1.5	8.3±2.4	3.2±0.6	0.2±0.1	21.2±4.3
	2.0	Э	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		ПЭ	0	0	0	0	1.4±0.2	0.4±0.1	0.5±0.1	0	0	0	0
		МК	44.5±7.3	28.1±4.9	11.1±3.9	0.8±0.1	11.5±2.6	13.2±2.6	10.2±1.7	2.4±0.7	41.3±6.0	6.3±0.8	0
		НМК	7.1±1.1	5.7±1.0	5.6±1.6	24.5±4.4	6.1±1.0	19.4±3.7	13.4±2.7	15.8±3.1	5.7±1.0	1.5±0.4	13.2±2.2
	2.5	Э	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		ПЭ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		МК	8.6±1.5	2.8±0.5	2.3±0.3	0	5.2±1.3	9.6±1.6	1.1±0.3	0	12.5±2.5	1.8±0.3	0
		НМК	13.8±2.6	12.6±1.9	13.9±1.9	6.2±0.9	12.8±2.1	28.0±5.0	23.4±3.8	7.4±1.6	14.3±2.9	4.2±0.9	3.1±0.7
	3.0	Э	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		ПЭ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		МК	1.4±0.3	2.2±0.4	0	0	1.2±0.2	3.5±1.0	0.2±0.1	0	4.5±0.9	0	0
		НМК	29.1±5.8	17.3±2.6	2.1±0.5	0.3±0.1	8.6±1.5	14.3±2.4	6.0±0.5	0	19.3±3.7	0	0

Условные обозначения: Э – формирование эмбриоидов, ПЭ – формирование полиэмбриоидов, МК – формирование морфогенных каллусов, НМК – формирование неморфогенных каллусов. Обозначения генотипов как в табл. 1.

Примечание: частоту индукции путей морфогенеза *in vitro* определяли как количество сформировавшихся структур на 100 пыльников.

Таким образом, установлено, что индукция конкретного пути морфогенеза *in vitro* сильновакуолизованных микроспор определяется балансом эндогенного ауксина ИУК (в пыльниках перед инокуляцией) и экзогенного ауксина 2,4-Д (в индукционной питательной среде Potato II).

Очевидно, что в зависимости от целей конкретной технологии целесообразно индуцировать определенный путь морфогенеза *in vitro*. Так, одноклеточное происхождение эмбриоидов и полиэмбриоидов из микроспор делает возможным сохранение генетической однородности и является основой для биотехнологически оптимального способа клонирования полноценных плодоносящих гибридов яровой мягкой пшеницы с закрепленным гетерозисным эффектом. Кроме того, формирование у полиэмбриоидов множественных апикальных меристем побегов позволяет значительно увеличивать выход гаплоидных растений-регенерантов, что существенно при массовом характере селекционной работы. Получение растений-регенерантов через каллусную культуру (посредством гемморизогенеза, что позволяет избегать процедур многократных пересадок каллусов на среды разного состава) целесообразно при массовом тиражировании гаплоидов, а также для повышения соматоклональной изменчивости, которая является основой для получения новых признаков.

Предварительная оценка содержания эндогенной ИУК в пыльниках перед инокуляцией на индукционную питательную среду Potato II позволяет определить диапазон концентраций экзогенной 2,4-Д, необходимой для индукции желаемого пути морфогенеза *in vitro* сильновакуолизованных микроспор.

Выводы

Метод культуры *in vitro* изолированных пыльников – биотехнологический прием, перспективный в современных селекционно-генетических программах по созданию новых форм растений. Разработан методический подход, который на основании данных иммуноферментного анализа по содержанию эндогенной ИУК в пыльниках перед инокуляцией на индукционную питательную среду Potato II позволяет управлять путями морфогенеза *in vitro* сильновакуолизованных микроспор в нужном для исследователя направлении. Это, в свою очередь, оптимизировать биотехнологические исследования, связанные с массовым тиражированием гаплоидов.

Исследование поддержано РФФИ-Поволжье (грант № 08-04-97045), а также программой Президента РФ «Ведущие научные школы РФ» (грант № НШ 2096.2008.4, лидер Школы – чл.-корр. РАН Т.Б.Батыгина).

Литература

1. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. – Уфа. – 2002. – 22 с.
2. Миронов Н.В., Комиссарчик В.Л., Соколов А.Д. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. – М. – 1996. – 243 с.
3. Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И. Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител // Физиол. раст. – 1986. – Т. 33, № 6. – С.1221-1227.
4. Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н., Абрамов С.Н. Индукция андрогенеза *in vitro* у яровой мягкой пшеницы. Баланс эндогенных и экзогенных фитогормонов // Известия РАН. Серия биол. – 2001. – № 1. – С. 31-36.

Резюме

На основании данных твердофазного иммуноферментного анализа разработан методический подход, позволяющий управлять путями морфогенеза сильновакуолизованных микроспор в культуре *in vitro* изолированных пыльников яровой мягкой пшеницы.

Based on the immunoassay data the methodical approach has been developed. This approach allows operating the morphogenesis pathways *in vitro* of high vacuolated microspores in isolated anthers culture of spring soft wheat.

СТРАШНІЮК Н.М.¹, КРАВЕЦЬ Н.Б.¹, КОНВАЛЮК І.І.², МЕЛЬНИК В.М.²

¹Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Україна, 46027, Тернопіль, вул. М.Кривоноса, 2, e-mail: strashniuk@mail.ru

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, Київ, вул. Заболотного, 150, e-mail: v.m.melnyk@imbg.org.ua

ОРГАНОГЕНЕЗ У КУЛЬТУРІ ТКАНИН ВИДІВ РОДУ ТИРЛИЧ (*GENTIANA* L.).

Морфогенез рослин, що веде до регенерації шляхом органогенезу чи соматичного ембріогенезу, залежить від внутрішніх (видова приналежність та особливості генотипу вихідної рослини) та зовнішніх чинників. Фізіологічні, біохімічні, молекулярні процеси, які лежать в основі морфогенезу, вивчені недостатньо, що не дає можливості створити теорію морфогенезу. Детальних досліджень потребують і сигнальні системи, відповідальні за індукцію диференціації, органогенезу та їх зв'язок з регуляцією клітинного циклу. Вважається, що в ініціації органогенезу вирішальна роль належить балансу ендогенних фітогормонів, які кількісно змінюючись, можуть впливати на компетентність клітин до своєї дії, наслідками якої є індукція органогенезу [1, 2].

Зручною моделлю для дослідження фізіологічних, біохімічних та молекулярних особливостей процесів морфогенезу є культура *in vitro* рослин [1, 3]. Окрім фундаментального використання культури клітин, тканин, органів має важливе прикладне значення, особливо для збереження генофонду та відновлення популяцій цінних рідкісних та зникаючих видів. До таких рослин відносяться і досліджувані нами види роду *Gentiana* L., які є припадними об'єктами для введення в культуру *in vitro* та одержання клітинних ліній-продуцентів цінних біологічно активних речовин [4, 5]. У літературі також наявні повідомлення про вдалі спроби регенерації пагонів тирличів, які, проте, стосуються здебільшого азійських видів: *G. macrophylla*, *G. kurroo*, *G. crassicaulis*, *G. tibetica*, *G. scabra*, *G. triflora*, *G. dahurica* [6-12].

Завданням проведеного дослідження було підібрати умови органогенезу з отриманих нами раніше культур тканин кореневого походження деяких видів роду Тирлич (*Gentiana* L.) флори України.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом слугували калюсні культури кореневого походження, отримані від рослин з різних популяцій: *G. lutea* (полонина Рогнеска, хр. Чорногора – на 11 пасажі та г. Трояска, хр. Свидовець - на 10 пасажі), *G. pneumonanthe* (Корюківське лісництво, Чернігівська обл. – на 9 пасажі та с. Вигода, Івано-Франківська обл. – на 9 і 19 пасажах), *G. acaulis* (г. Туркул та г. Ребра, хр. Чорногора – на 8 і 9 пасажах відповідно), *G. cruciata* (с. Креничі, Київська обл. та природний заповідник «Медобори», Тернопільська обл. – на 10 пасажі) та *G. verna* (урочище Гереджівка, смт. Ясиня, Закарпатська обл. – на 10 пасажі), які вирощували на агаризованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга (МС) з половинним вмістом макро- та мікросолей, доповненому 0,1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) і 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти. Тривалість пасажу становила 4 тижні [13, 14].

З метою індукції регенерації як базове використовували середовище МС, доповнене комбінаціями різних концентрацій фітогормонів: 1) тїдіазурон (ТДЗ) (1, 5, 10, 20 мг/л) + 1-нафтилоцтова кислота (НОК) (0,01; 0,1; 0,2; 0,5; 1 мг/л); 2) БАП (0,1; 0,2; 0,5 мг/л) + НОК (1,0; 1,5; 2; 3; 4; 5,0 мг/л). Експеримент проводили у 3-х повторностях. Інокулюми кожної із досліджуваних калюсних тканин висаджували у