

ТЕХНОЛОГІЇ *IN VITRO*: ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

АЛАТОРЦЕВА Т.А., ТЫРНОВ В.С.

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Россия
Россия, 410012, Саратов, ул. Астраханская., 83, e-mail: AlatortsevaTA@info.sgu.ru;
Tyrnovvs@info.sgu.ru

НОВООБРАЗОВАНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИЯ В КУЛЬТУРЕ ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ КУКУРУЗЫ

Одним из путей воспроизводства растений злаков *in vitro* является их регенерация через соматический эмбриогенез. Длительно культивируемые, интенсивно растущие эмбриогенные ткани служат удобным материалом «конвейерного» производства клонированных растений. Чаще всего для этих целей используют в качестве эксплантов незрелые зародыши. Меньшей популярностью у исследователей пользуются дифференцированные зародыши из сухих зерновок. (Долгих, Пустовойтова, Жданова. 1999), хотя именно подобные работы можно было бы проводить практически круглогодично.

Материал и методы

В данном эксперименте изучались морфогенетические процессы, включая регенерацию растений, в культуре зрелых зародышей партеногенетической линии кукурузы АТ-1. Модифицированная питательная среда Мурасиге и Скуга (МС) содержала сахарозу (2,0 %) и 2,4-Д, а также те же ингредиенты, но без регуляторов роста. Уровень рН до автоклавирования составлял 5,8 -6,1.

Результаты и обсуждение

В ходе культивирования была установлено, что морфогенетические процессы, обычно характерные для молодых зародышей и включающие два этапа – индукцию эмбриогенного каллуса и регенерацию растений (Диас, Долгих, 1977), могут иметь место и при инокуляции зрелых зиготических зародышей, хотя имеются и некоторые особенности в локализации эмбриогенных структур. В частности, известно, что у кукурузы эмбриониды могут возникать либо из клеток каллуса, производного от поверхностных тканей зародыша (Kuo, Lu, 1984; Lupotto, 1986; Vasil, Vasil, 1986; Van Lammeren, 1988), либо непосредственно из эпидермальных и субэпидермальных клеток щитка (McCain, Hodges, 1986).

В наших экспериментах со зрелыми зародышами было установлено, что спустя трое суток после инокуляции зародышей из зерновок начинается их прорастание. На безгормональной среде оно идет по обычной схеме: развиваются корешок и колеоптиль, затем появляются настоящие листья. Одновременно с прорастанием зародышей на всех средах в области щитка образуется раневой каллус, масса которого со временем увеличивается, и дальнейшая пролиферация может лишь сопровождаться иногда слабым ризогенезом. В присутствии 2,4-Д происходит ингибирование процессов корнеобразования, и растения формируются без корней (рис. 1).

Спустя семь суток культивирования на среде с 2,4-Д на внешней поверхности утолщающегося колеоптиле появляются отдельные глобулярные образования диаметром приблизительно 1 мм, далее его трубка разрывается и с внутренней стороны становятся хорошо видимыми «грозди» глобул. Подобные глобулярные структуры возникают и на листьях молодых проростков. Впоследствии глобулы формируют либо исключительно ризогенный каллус серого цвета, либо желтый морфогенный (эмбриогенный), который продуцирует большое количество эмбрионидов, начинающих прорасти в каллусе через 3-4 недели после пересадки его на свежую среду с 2,0 мг/л 2,4-Д (рис. 2-3).



Рисунок 1. Образование каллуса в период прорастания зародыша: а-каллус в основании проросшего зародыша; б - аномальное прорастание зародыша на фоне каллусогенеза.



Рисунок 2. Спектр новообразований на средах с 2,4-Д: а - начало прорастания и образование раневого каллуса; б, в - образование на coleoptile глобул; г - формирование эмбриогенного и ризогенного каллусов; д - прорастание эмбриоидов.

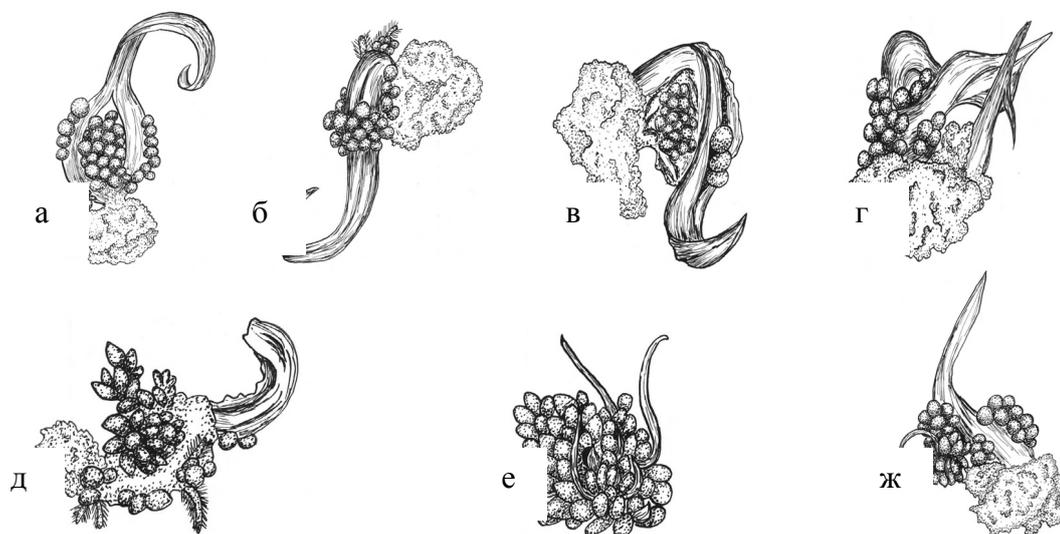


Рисунок 3. Морфогенез в культуре зародышей: а, б – появление глобул на coleoptile; в, д – одновременное развитие морфо- и ризогенного каллусов; е, ж – регенерация в эмбриогенном каллусе.

При пересадке каллус распадается на отдельные фрагменты, представляющие собой комплексы эмбриоидов. Некоторые из них проявляют тенденцию к прорастанию уже в исходном пассаже на средах с 2,4-Д, хотя развитие растений при этом заторможено. Для регенерации более благоприятной оказалась среда без 2,4-Д, но с ИУК и кинетином (по 1мг/л). Процесс формирования растений из эмбриоидов происходит не всегда единообразно (рис. 4).

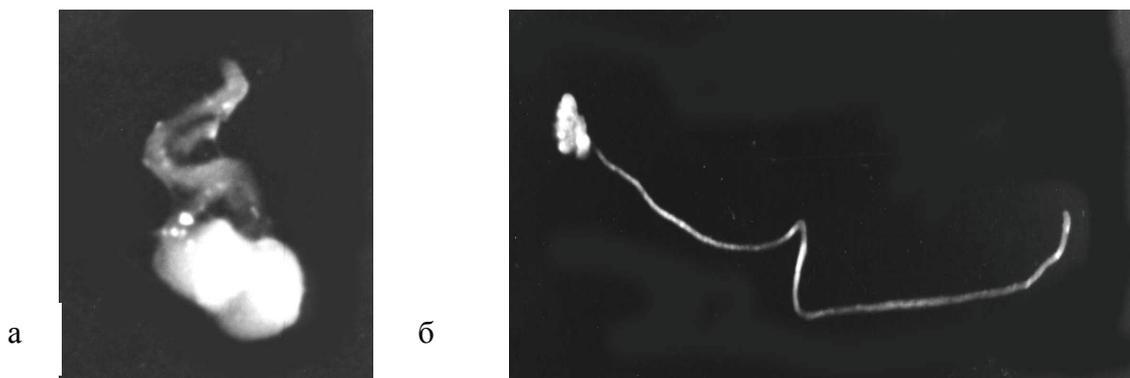


Рисунок 4. Процесс прорастания отдельных эмбрионов: а) развитие стелевого апекса; б – преобладающий ризогенез.

В одних случаях (рис. 4а) сначала появляется листовая пластинка (иногда вначале гофрированная, неправильной формы), которая постепенно вытягивается в длину, приобретая вид типичного листа злаков. Позднее, когда побег уже достаточно хорошо выражен, появляются корни. В других случаях развиваются только корни, а стеблевая часть растения совсем не развивается (рис. 4б). И, наконец, отмечается третий, классический вариант прорастания эмбрионов, когда одновременно, практически синхронно, на одном конце эмбриона развивается стеблевая часть зеленого цвета, а на другом - миниатюрный корешок, то есть происходит сопряженное развитие стелевого и корневого апексов и в итоге формируются растения - регенеранты. Следует отметить, что продуцирующая эмбрионы каллусная ткань очень быстро нарастает в объеме, за счет формирования всё новых эмбрионов. Их асинхронное развитие ведет к тому, что можно одновременно наблюдать в каллусе, в одной пробирке и молодые, и дифференцированные, прорастающие эмбрионы. Своевременная пересадка морфогенного каллуса на свежую среду с 2,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 % сахарозой позволяет не только периодически наращивать и обновлять и каллусные штаммы, но иметь хороший материал для производства большого количества клонированных растений данного генотипа.

Литература

1. Долгих Ю.И., Пустовойтова Т.Н., Жданова Н.Е. Соотношение эндогенных фитогормонов в незрелых зародышах компетентных и некомпетентных к соматическому эмбриогенезу линий кукурузы // Физиология растений. – 1999. – Т.45, №6. – С.861- 864.
2. Дуас С., Долгих Ю.И. Роль физиологических факторов в повышении эффективности регенерации растений из культивируемых тканей кукурузы // Биотехнология. – 1977. – № 11-12. – С.32-36.
3. Кuo С.-S., Lu W.-I. Изучение морфологии и цитологии эмбрионов, полученных в культуре каллуса кукурузы // Чжиу сюэбао, Acta. Bot. Sin. – 1984. – vol. 26, №1. – P.19-23.
4. Lupotto E. *In vitro* culture of isolated somatic embryos of maize (*Zea mays* L.) // Maydica. – 1986. – vol. 31, №2. – P.193-201.
5. Vasil V., Vasil I.K. Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays* L.// J. Plant.Physiol. – 1986. – vol. 124, №5. – P. 399-408.
6. Van Lammeren A.A.M. Observations on the structural development of immature maize embryos (*Zea mays* L.) during *in vitro* culture in the presence or absence of 2,4-D // Acta bot. neerl.- 1988. – vol. 37, №1. – P.49-61.
7. McCain J.W., Hodges T.K. Anatomy of somatic embryos from maize embryo cultures // Bot. Gaz. – 1986. – vol. 147, №4. – P. 453-456.

Резюме

Представлено результати культивування зрілих зародків кукурудзи парthenогенетичної лінії АТ-1. На живильне середовище MS з 2,4-Д обмежено формування неморфогенного і морфогенного калусу. У морфогенном калусу визембріоїдів розвивались рослини. Шляхом пересаджування на вежею середовище піддержували калусные штами і одержані регенеранти.

Представлены результаты культивирования зрелых зародышей линии АТ-1. На питательной среде отмечено формирование неморфогенного и морфогенного каллусов. Растения развивались из эмбриоидов в морфогенном каллусе. Путем пересадки на свежую среду поддерживали каллус и получали регенеранты.

The results of the cultivation of mature embryos in maize parthenogenetic line АТ-1 are discussed. Formation of unmorphogenic and morphogenic callus on nutrient medium MS with 2,4-D was observed. Plants have developed from embryoids in the morphogenic callus. By transplant on fresh medium supported callus and received regenerants.

БАВОЛ А.В., ДУБРОВНА О.В., ЛЯЛЬКО І.І.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська 31/17, e-mail: ksana1@zeos.net

ВПЛИВ ХІТОЗАНУ НА РІСТ І РОЗВИТОК КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

Хітин – природний полісахарид, що складається з N-ацетил-D-глюкозаміну й залишків D-глюкозаміну, з'єднаних – β 1,4 глікозидними ланками. Він наявний у різноманітних видів: у раковинах ракоподібних, у кутикулах комах, в клітинних стінках грибів та деяких морських водоростей. Деацетилювання хітина дозволяє одержати розчинний полімер D-глюкозаміна - хітозан, найважливішою характеристикою якого є ступінь деацетилювання, обумовлена відношенням кількості ланок D-глюкозаміна до N-ацетил-D-глюкозаміна. Таким чином, хітозан являє собою полімер D-глюкозаміна з різною молекулярною масою, що містить 5 - 15% ацетамідних груп, а також до 1 % груп, з'єднаних з амінокислотами й пептидами.

Хітозан широко застосовується у целюлозно-паперовій промисловості, виробництві медичних і косметичних препаратів та продуктів харчування, а також при очищенні стічних вод [1]. У сільському господарстві він використовується для передпосівної обробки насіння для стимулювання росту рослин і збільшення їх продуктивності [2], як добриво [3], ефективний комплексоутворюючий сорбент для іонів важких металів, зокрема міді, завдяки наявності в його структурі гідрокси- і аміногруп [4]. Позитивний вплив хітозану був виявлений на ріст коренів й пагонів різних видів рослин, включаючи і декілька хлібних злаків [5]. Він зміцнює стебло рослин за рахунок потовщення, перешкоджає виляганню, сприяє збільшенню кореневої системи. Крім того, хітозан має еліситорні властивості - підвищує стійкість рослин до фітопатогенів [6-8]. З даних літератури відомо, що взаємодія хітозана з клітинами рослин залежить від його молекулярної маси й хімічної структури, що суттєво впливає на обмін речовин рослин [9]. Часткове N-ацетилювання або фрагментація змінюють його здатність індукувати захисну реакцію організму та впливають на рістрегулюючу активність.

Не дивлячись на те, що проводяться досить широкі дослідження хітозану в умовах *in vivo*, його вплив на біотехнологічні процеси, зокрема, калюсогенез, регенераційну здатність, ріст і розвиток рослин-регенерантів вивчено недостатньо. У