

*На правах рукописи*

**Катасонова**

**Анна Александровна**

**ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ  
РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ  
В КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

03.00.23 – «Биотехнология»

03.00.12 – «Физиология и биохимия растений»

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Уфа – 2007

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Башкирский государственный университет» (кафедра биохимии и биотехнологии биологического факультета) и в ГУ «Институт биологии Уфимского научного центра РАН» (лаборатория генетики и цитологии растений).

Научный руководитель: доктор биологических наук, проф.  
Шаяхметов Изгам Фазлиахметович

Научный консультант: доктор биологических наук, проф.  
Круглова Наталья Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, проф.  
Чемерис Алексей Викторович

доктор биологических наук, проф.  
Хайруллин Рамиль Магзинурович

Ведущая организация: ГНЦ РФ «Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства имени Н.И. Вавилова» РАСХН  
(г. Санкт-Петербург)

Защита диссертации состоится «\_\_17\_\_» \_\_мая\_\_ 2007 г. в 14<sup>00</sup> ч. на заседании Регионального диссертационного совета КМ 002.136.01 при Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054 г. Уфа, пр. Октября, д. 69. Тел./факс (347)-235-53-62, e-mail: [ib@anrb.ru](mailto:ib@anrb.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии Уфимского научного центра РАН и на официальном сайте:

<http://www.anrb.ru/inbio/dissovet/index.htm>

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2007 г.

Ученый секретарь  
Регионального диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Р.В. Уразгильдин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Получение морфогенного каллуса и последующая регенерация растений – неотъемлемая часть многих растительных биотехнологий. Трудности, зачастую возникающие при прохождении этих этапов, особенно характерны для культуры *in vitro* клеток, тканей и органов злаков. Несмотря на то, что регенерация целого растения из культивируемых каллусных клеток описана для многих представителей этого семейства (пшеницы [Копертех, Бутенко, 1995; Игнатова, 2004; Круглова с соавт., 2005], кукурузы [Сатарова, 2002], риса [Кучеренко, 1993], ячменя [Ryschka et al. 1991; Дунаева с соавт., 2000], сорго [Hagio, 2002], овса [Nuutila et al., 2002]), усовершенствование системы культивирования *in vitro* и повышение выхода растений-регенерантов злаков остаются актуальными.

Поскольку у злаков в качестве экспланта для получения *in vitro* каллусов с высокой регенерационной способностью предпочтительным является использование незрелых зародышей, успех в применении новых биотехнологий во многом связан с изучением эмбриогенеза представителей семейства Poaceae.

Отдельная проблема в этой области – выявление цитофизиологических условий формирования морфогенных каллусов зародышевого происхождения, тотипотентные клетки которых в условиях *in vitro* способны развиваться по различным путям морфогенеза. Имеющиеся в литературе данные сводятся, как правило, к сведениям о составе и pH питательной среды, освещенности, температуре, использование которых способствовало формированию морфогенного каллуса [Суханов, Папазян, 1983; Гапоненко, 1987, 1994; Сайб, Карабаев, 1992; Шаяхметов, 1999; Huang, Wei, 2004; Pellegrineschi et al., 2004; и мн.др.]. Недостаточно полно изучены стадии развития зародыша, давшего начало морфогенному каллусу. Остается открытым вопрос о путях морфогенеза зародышевых каллусов *in vitro*. Недостаточно выявлены и цитофизиологические особенности путей морфогенеза *in vitro*, ведущие к формированию фертильных растений-регенерантов в каллусе.

В то же время, именно от полноты комплексных знаний об эмбриологических и цитофизиологических особенностях этих процессов во многом зависит эффективность биотехнологий, связанных с массовым получением фертильных растений-регенерантов из каллусов зародышевого происхождения. Важно и то, что цитофизиологическое изучение развития незрелых зародышей в строго контролируемых условиях *in vitro* способствует решению важнейшей фундаментальной проблемы биологии – морфогенеза. Более того, именно зародыш, обладающий всеми потенциями особи [Батыгина, 2000], наиболее перспективен в качестве модельной системы при изучении различных аспектов реализации морфогенетических программ растения.

Все эти проблемы особенно необходимо разрабатывать по отношению к яровой мягкой пшенице – основному хлебному злаку.

В связи с этим, **цель исследований** состояла в оптимизации технологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы в каллусной культуре *in vitro* на основе эмбриологических и цитофизиологических данных.

Для достижения цели были поставлены **задачи**:

1. Изучить развитие зародыша от зиготы до зрелой структуры на основе данных цито-гистологического анализа.
2. Разработать периодизацию эмбриогенеза, удобную в биотехнологической практике.
3. Разработать критерии оценки стадий эмбриогенеза, сопряженных со способностью зародыша формировать морфогенный каллус.
4. Выявить условия максимальной пролиферации морфогенных каллусов (стадия развития инокулируемого зародыша, состав культуральной среды).
5. Исследовать цитофизиологические особенности путей морфогенеза в культуре *in vitro* каллусов зародышевого происхождения и выявить оптимальные пути получения фертильных растений-регенерантов.
6. Разработать оптимизированный регламент биотехнологии получения фертильных растений-регенерантов в культуре *in vitro* каллусов зародышевого происхождения.

### Основные положения, выносимые на защиту

1. Способность к формированию морфогенного каллуса определяется оптимальной стадией развития инокулируемого зародыша, характеризующегося определенным цито-гистологическим статусом.
2. Зависимость регенерационной способности каллусов от продолжительности культивирования *in vitro* на индукционной питательной среде обусловлена особенностями прохождения путей морфогенеза, ведущих к формированию растений-регенерантов.
3. Регенерация фертильных растений из каллусов происходит по таким путям морфогенеза *in vitro*, как гемморизогенез и соматический эмбриогенез (эмбриоидогенез).
4. Увеличения количества растений-регенерантов можно добиться отбором экспланта с высокой морфофизиологической активностью, а также оптимальной продолжительностью культивирования *in vitro* морфогенных каллусов.

**Научная новизна.** На основании комплексных эмбриологических и детальных цитофизиологических исследований установлено, что основным условием формирования морфогенных каллусов является инокуляция незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы на подстадии три стадии органогенеза (согласно авторской периодизации), которая характеризуется определенным цито-гистологическим статусом зародыша. Выявлены и исследованы пути морфогенеза в каллусной культуре *in vitro* незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы. Продемонстрирована универсальность начального этапа всех путей морфогенеза *in vitro*, состоящая в формировании в каллусе морфогенетического очага, представленного главным образом меристематическими клетками. Охарактеризованы цитофизиологические особенности развития морфогенетического очага по каждому из выявленных путей морфогенеза *in vitro*. Показано, что регенерация фертильных растений проходит по таким путям морфогенеза *in vitro*, как гемморизогенез и соматический эмбриогенез, при этом биотехнологически оптимален соматический эмбриогенез.

**Практическая значимость работы.** Периодизация эмбриогенеза яровой мягкой пшеницы может быть использована для подбора эксплантов с высоким морфогенетическим потенциалом в биотехнологических работах, связанных с массовым получением регенерантов. Оптимизированный регламент получения фертильных растений-регенерантов пшеницы в каллусной культуре *in vitro* может быть использован при клеточной селекции, соматической гибридизации и генно-инженерных экспериментах. Результаты исследования могут быть использованы в учебном процессе на биологических факультетах ВУЗов.

**Связь работы с научными программами.** Исследования поддержаны РФФИ (грант 05-04-97911, 2005-2007 гг.), а также выполнены в рамках программы «Ведущие научные школы РФ» (грант НШ 4834.2006.4, 2006-2007 гг.) и ГНТП Академии наук РБ на 2005-2007 гг.

**Личный вклад автора** состоит в разработке программы исследования, получении и анализе экспериментального материала, описании результатов исследования, формировании выводов.

**Обоснованность выводов и достоверность результатов** работы обеспечены значительным объемом экспериментального материала, обработанного с применением современных математических методов.

**Реализация результатов.** Полученные результаты используются при чтении спецкурса по биотехнологии растений на кафедре биохимии и биотехнологии Башкирского государственного университета.

**Апробация работы.** Результаты исследования были представлены на II научной конференции МОГиС «Актуальные проблемы генетики» (Москва, 2003); VIII международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2004); II (Москва, 2004), III (Москва, 2005) и IV (Пушино, 2006) съездах Общества биотехнологов России; I международной школе молодых ученых «Эмбриология и биотехнология» (Санкт-Петербург, 2005); I (IX) международной конференции молодых ботаников в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2006); XIII международной конференции молодых ученых «Ломоносов-2006» (Москва, 2006);

международной конференции «Генетика в России и мире» (Москва, 2006); X международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2006); Всероссийском симпозиуме «Биология клетки в культуре» (Санкт-Петербург, 2006); международной научно-практической конференции «Молодые ученые – возрождению агропромышленного комплекса России» (Брянск, 2006); XIV международной конференции молодых ученых «Ломоносов-2007» (Москва, 2007).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 17 работ, в том числе статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения и выводов. Список литературы включает 203 работы, в том числе 122 работы зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 83 рисунками и 4 таблицами.

### **ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Объектом исследования послужили 7 сортов и гибридная линия яровой мягкой пшеницы, используемые в селекционно-генетических программах Башкирского НИИ СХ РАСХН. Детальные цито-гистологические исследования выполнены на растениях сорта Симбирка.

Использованы метод культуры *in vitro* незрелых зародышей пшеницы [Суханов, Папазян, 1983; Копертех, Бутенко, 1995] в модификации [Шаяхметов, 1999]; цито-гистологические методы исследования [Паушева, 1988; Барыкина с соавт., 2004] в модификации [Круглова с соавт., 2007]; методы фенологических наблюдений за развитием пшеницы [Куперман, 1977]. Препараты просматривали с применением светового микроскопа Jenamed-2 (Carl Zeiss, Jena), фотографировали при помощи цифровой камеры «Canon» с программным управлением (Canon Inc., China). Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Microsoft Office Excel 2003, учитывая основные статистические параметры.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Периодизация эмбриогенеза *in vivo* яровой мягкой пшеницы

Основным условием формирования *in vitro* каллусов с высокой регенерационной способностью является инокуляция экспланта (у злаков, как правило, зародыша) на оптимальной стадии развития. Для выявления такой стадии было проведено цито-гистологическое исследование эмбриогенеза *in vivo* яровой мягкой пшеницы через каждые 0.5 сут после опыления (на примере растений сорта Симбирка). На основании результатов цито-гистологических исследований зародыша разработана периодизация эмбриогенеза пшеницы.

**I. Этап недифференцированного зародыша.** Включает стадии: **зигота** – первая клетка зародыша (рис. 1а), происходит становление полярности зародыша; **двуклеточный зародыш** – состоит из апикальной и базальной клеток как результата асимметричного деления зиготы (рис. 1б), происходит становление клеточной специализации зародыша; **четырёхклеточный зародыш** – состоит из 2-х клеток апикального полюса и 2-х клеток базального полюса (рис. 1в), происходит становление дорсовентральности зародыша; **многоклеточный зародыш** – как результат делений клеток четырехклеточного зародыша (рис. 1г), происходит накапливание массы клеток, необходимой для дифференциации зародыша.

**II. Этап дифференциации зародыша.** Включает стадию органогенеза, которая подразделяется на три подстадии. В течение **подстадии один** происходят интенсивные клеточные деления в апикальной части зародыша, формируется первый орган – щиток (единственная семядоля), закладывается точка роста (рис. 1д). В течение **подстадии два** клеточные деления замедляются, формируется coleoptиль (рис. 1е). В течение **подстадии три** клеточные деления также замедлены, зародыш растёт за счёт растяжения клеток; постепенно формируются апекс побега, зародышевый корень, coleориза, эпибласт, лигула, 1-й лист (рис. 1ж,з). К концу этапа завершаются процессы морфологической дифференциации зародыша и органогенеза (рис. 1и).

**III. Этап дифференцированного зародыша.** Включает стадии: *сформированный зародыш*, в котором наличествуют все органы, характерные для зародыша злаков; происходит незначительный рост органов зародыша (за счет растяжения клеток), формируется 1-й лист, начинается интенсивное накопление запасных веществ (рис. 1к), зародыш готовится к вступлению в период покоя. В начале стадии *зрелого зародыша* формируются 2-й и 3-й листья и корневой чехлик (рис. 1л); зародыш вступает в период покоя.

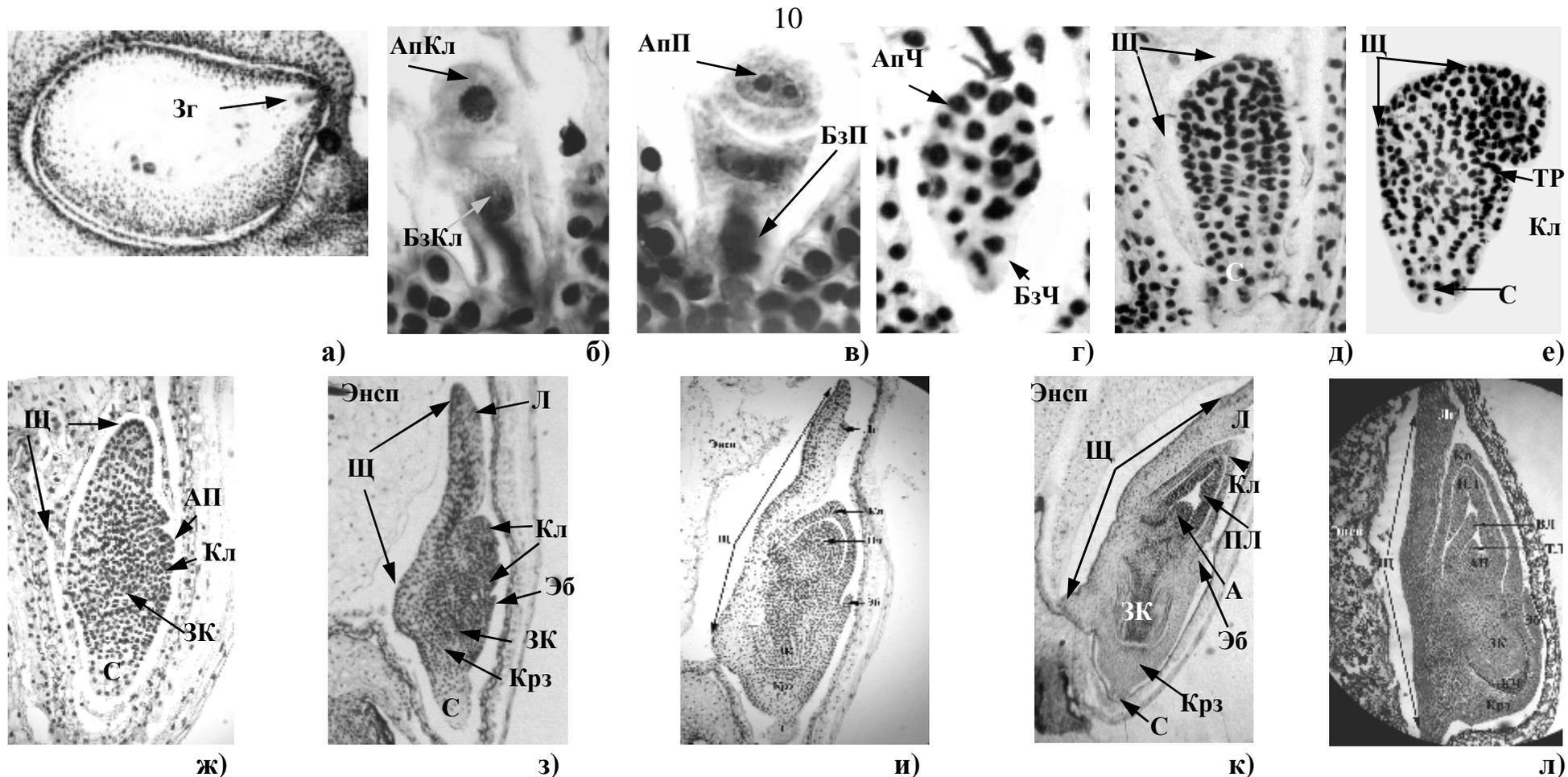
В таблице № 1 выделенные стадии эмбриогенеза для удобства практиков (биотехнологов, селекционеров) совмещены с морфологическим критерием – длиной зародыша (в миллиметрах) и временным критерием – временем от искусственного опыления (в сутках).

### **Отзывчивость разновозрастных зародышей на условия культуры *in vitro***

Установлено, что отзывчивость зародышей на условия культивирования *in vitro* на среде I (по [Murashige, Skoog, 1962] с добавлением 0.2 мг/л кинетина и 2,4-Д) зависела от стадии эмбриогенеза\* и концентрации 2,4-Д в этой среде (табл. 2). Так, при культивировании *четырёхклеточного и многоклеточного зародыша*, а также зародышей на *подстадии один стадии органогенеза* при всех концентрациях 2,4-Д и в контроле (без 2,4-Д) отмечена их постепенная дегенерация. При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на *подстадии два стадии органогенеза* при концентрациях 2,4-Д в 1.0-8.0 мг/л через 5-7 сут наблюдали формирование рыхлых обводненных каллусов желтоватого цвета, неопределенной формы, представленных рыхло расположенными клетками с большими межклетниками, ядра в которых отсутствуют. Такой каллус отнесен к неморфогенному (рис. 2). В контрольном варианте экспланты постепенно дегенерировали. Культивирование зародышей, инокулированных на *подстадии три стадии органогенеза*, на среде при концентрации 2,4-Д в 1.0-4.0 мг/л вело к формированию на 5-7 сут каллусов компактной консистенции, матового желтоватого цвета, узловой формы.

---

\*Зародыши на стадии зиготы и двухклеточного зародыша в эксперименты не вводили в силу их чрезвычайно мелких размеров



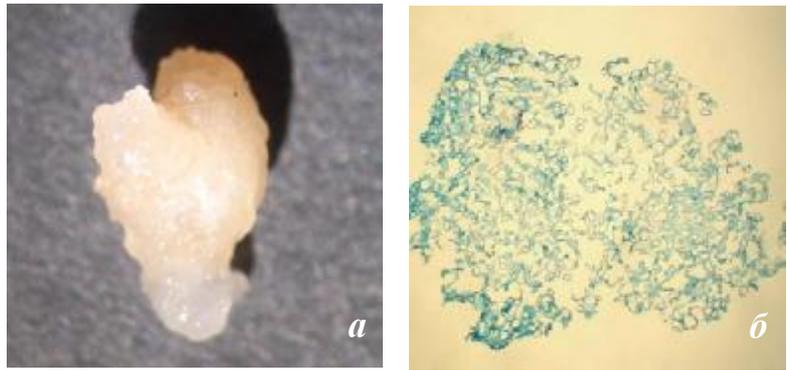
**Рис. 1. Эмбриогенез *in vivo* яровой мягкой пшеницы:**

а) зигота в семязачатке, 0,5 сут. СМ. х150; б) двухклеточный зародыш, 1,5 сут. СМ. х900; в) четырехклеточный зародыш, 2,5 сут. СМ. х900; г) многоклеточный зародыш, 3,0 сут. СМ. х750; д) зародыш на подстадии один стадии органогенеза, 7,0 сут. СМ. х550; е) зародыш на подстадии два стадии органогенеза, 10,0 сут. СМ. х550; ж) зародыш на подстадии три стадии органогенеза, 13,0 сут. СМ. х350; з) зародыш на подстадии три стадии органогенеза, 15,0 сут. СМ. х150; и) зародыш на подстадии три стадии органогенеза, 17,0 сут. СМ. х150; к) сформированный зародыш, 20,0 сут. СМ. х150; л) зрелый зародыш, 25 сут после опыления. СМ. х70.

Условные обозначения (здесь и далее): АпКл – апикальная клетка, Ап – апекс побега, АпП – апикальный полюс, АпЧ – апикальная часть, БзКл – базальная клетка, БзП – базальный полюс, БзЧ – базальная часть, ВЛ – второй лист, Зг – зигота, ЗК – зародышевый корень, Кл – колеоптиль, Крз – колеориза, КЧ – корневой чехлик, Лг – лигула, ПЛ – первый лист, С – суспензор, СМ – световая микроскопия, сут – сутки от искусственного опыления, ТЛ – третий лист, Щ – щиток, Эб – эпибласт, Энсп – эндосперм

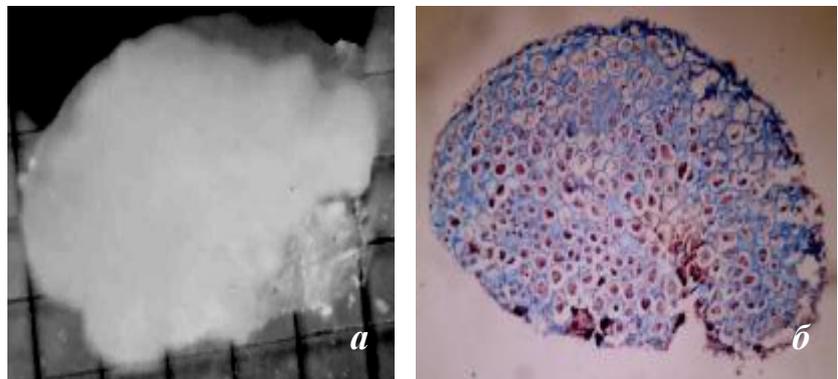


**Рис. 2.**  
**Неморфогенный каллус,**  
**полученный из зародыша,**  
**инокулированного на**  
**подстадии два стадии**  
**органогенеза (20 сут после**  
**опыления, длина 2,2 мм)**  
**(среда I, 7 сут культивирования**  
***in vitro*):**  
 а) x20; б) СМ. x150



Цито-гистологический анализ продемонстрировал, что клетки такого каллуса в целом меристематичны. По морфологическим признакам их можно объединить в отдельные группы (рис. 3). В ходе последующих экспериментов было установлено, что именно в таких каллусах отмечаются процессы морфогенеза, поэтому каллусы обозначены нами как морфогенные. Максимальный показатель пролиферации каллусов (в мг сырой массы), напрямую влияющий на морфогенез, отмечен при концентрации 2,4-Д в 2.0 мг/л при культивировании *in vitro* зародыша, инокулированного на 15 сут после опыления (подстадия три стадии органогенеза, длина 1,7 мм) (табл. 2).

**Рис. 3.**  
**Морфогенный каллус,**  
**полученный из зародыша,**  
**инокулированного на**  
**подстадии три стадии**  
**органогенеза (15 сут после**  
**опыления, длина 1,7 мм)**  
**(среда I, 7 сут**  
**культивирования *in vitro*):**  
 а) x30; б) СМ. x150

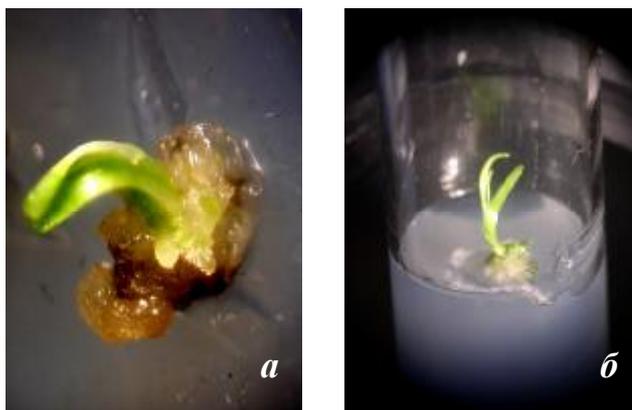


Культивирование *in vitro* зародышей, инокулированных на подстадии 3 стадии органогенеза, при концентрации 2,4-Д в 5.0-8.0 мг/л к 5-7 сут вело к формированию неморфогенных каллусов. В контрольном варианте зародыши дегенерировали к 10-12 сут культивирования.

**Сформированные зародыши** через 10-12 сут культивирования *in vitro* на среде без 2,4-Д (контроль) давали начало проросткам (рис. 4а), в остальных случаях – неморфогенному каллусу.

**Зрелые зародыши** через 7-9 сут культивирования *in vitro* формировали проростки (рис. 4б) при всех использованных концентрациях 2,4-Д и в контроле.

**Рис. 4.**  
Проростки, полученные из сформированного (20.0 сут после опыления, длина 2,1 мм) (а) и зрелого (25.0 сут после опыления, длина 2,6 мм) (б) зародышей (среда I, 9 сут культивирования *in vitro*): а) x10; б) x1,5



### Пути морфогенеза в каллусной культуре *in vitro* зародышевого происхождения на среде I

На 5-10 сут культивирования *in vitro* на среде I в каллусах отмечены следующие пути морфогенеза: органогенез по типу геммогенеза (формирование почки), по типу ризогенеза (формирование корня), по типу гемморизогенеза (формирование почки и корня); соматический эмбриогенез – формирование соматических зародышей. На основе данных цито-гистологического анализа установлено, что начало реализации каждого пути морфогенеза связано с формированием в морфогенном каллусе морфогенетического очага, представленного главным образом меристематическими клетками. В составе очага можно выделить 3 зоны, клетки которых отчетливо различаются по морфологии (рис. 5а).

**Рис. 5.**  
а) морфогенетический очаг в каллусе (среда I, 10 сут культивирования *in vitro*). СМ. x500;  
б) морфогенетические очаги в каллусе (среда I, 15 сут культивирования *in vitro*). СМ. x75



Выявлено, что по мере культивирования *in vitro* каллусов количество морфогенетических очагов сначала увеличивается, достигая максимума на 15 сут (рис. 5б), затем резко снижается к 20 сут.

Таблица 2

Влияние стадии эмбриогенеза и концентрации 2,4-Д в среде I на отзывчивость зародышей в культуре *in vitro*

Стадия эмбриогенеза; длина зародыша	Время после опыления, сут	Отзывчивость эксплантов на концентрацию 2,4-Д в среде культивирования <i>in vitro</i>								
		0.0 мг/л (контроль)	1.0 мг/л	2.0 мг/л	3.0 мг/л	4.0 мг/л	5.0 мг/л	6.0 мг/л	7.0 мг/л	8.0 мг/л
Четырехклеточный зародыш; 0,12-0,14 мм	2.5	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
Многоклеточный зародыш; 0,15-0,2 мм	3.0	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
	4.0	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
Подстадия один органогенеза; 0,4-0,6 мм	5.0	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
	6.5	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
Подстадия два органогенеза; 0,8-1,3 мм	8.5	Д	НМК –							
	10.0	Д	НМК –							
Подстадия три органогенеза; 1,5-2,0 мм	12.5	Д	НМК –	НМК+						
	14.0	Д	НМК+							
	15.0	Д	МК+	МК++	МК+	МК+	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+
	16.0	Д	МК+	МК+	МК+	МК+	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+
	17.0	Д	МК-	МК+	МК+	МК+	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+
Сформированный зародыш; 2,1-2,2 мм	20.0	П	НМК+							
Зрелый зародыш; 2,3-2,6 мм	22.0	П	П	П	П	П	П	П	П	П
	25.0	П	П	П	П	П	П	П	П	П

Условные обозначения:

Д – дегенерация экспланта;

П – формирование проростка;

НМК – формирование неморфогенного каллуса;

МК – формирование морфогенного каллуса;

++интенсивная пролиферация каллуса (сырая масса 111.0-136.0 мг)\*;

+умеренная пролиферация каллуса (сырая масса 45.0-110.9 мг);

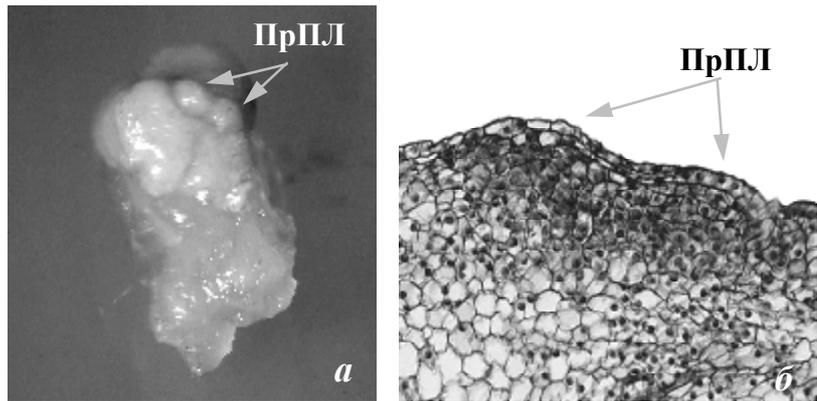
–скудная пролиферация каллуса (сырая масса 15.0-44.9 мг)

\* Сырую массу каллуса измеряли в мг на 15 сут культивирования

### *Геммогенез in vitro в морфогенном каллусе*

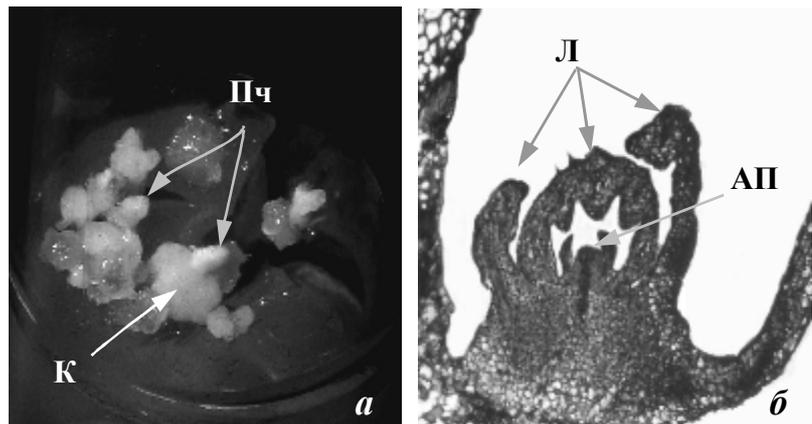
По мере разрастания морфогенетического очага клетки каллуса, окружающие очаг, постепенно дегенерируют, и очаг оказывается на поверхности каллуса; таким образом, почки формируются экзогенно. Собственно геммогенез начинается с периклиналильных и антиклиналильных делений клеток субэпидермальных слоев очага, что приводит к образованию примордиев первых листьев (рис. 6), развивающихся в листья.

**Рис. 6. Формирование примордиев первых листьев в морфогенетическом очаге (среда I, 15 сут культивирования *in vitro*):**  
 а) x40;  
 б) СМ. x300. Продольный срез.  
 Условное обозначение:  
 ПрПЛ – примордий первого листа



Далее закладываются примордии листьев второго порядка. По мере развития почек наблюдается установление связи между ними и массой каллуса посредством формирования элементов сосудистой системы (рис. 7).

**Рис. 7. Развитие почки в морфогенном каллусе (среда I, 20 сут культивирования *in vitro*):**  
 а) x20;  
 б) СМ. x150. Продольный срез.  
 Условные обозначения:  
 АП – апекс побега, К – каллус,  
 Л – лист, Пч – почка



В ходе дальнейшего развития на 28 сут культивирования *in vitro* на среде I из почек развиваются побеги. При дальнейшем культивировании на среде для регенерации II побеги постепенно дегенерируют.

### *Ризогенез in vitro в морфогенном каллусе*

В отличие от почек, корни в морфогенном каллусе закладываются эндогенно (в толще каллуса). Развитие корня происходит путем клеточных делений, происходящих параллельно продольной оси морфогенетического очага, за счет чего формируются периблема и плерома в виде несколько concentрических слоев клеток. Формируются корневой чехлик и колеориза. По мере развития корней наблюдается установление связи между ними и массой каллуса посредством формирования элементов сосудистой системы (рис. 8б).

**Рис. 8. Развитие корней в морфогенном каллусе (среда I, 25 сут культивирования *in vitro*):**

**а) x20;**

**б) СМ. x150. Продольный срез.**

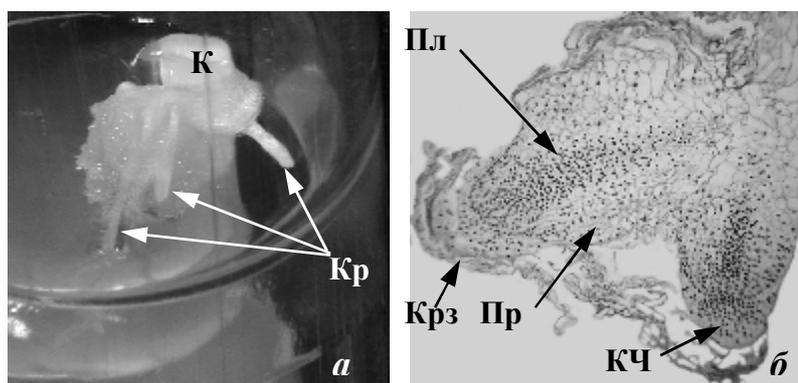
*Условные обозначения:*

*К – каллус, Кр – корень,*

*Крз – колеориза, КЧ – корневой*

*чехлик, Пл – плерома,*

*Пр – периблема*



Далее корень вытягивается в длину (рис. 8а) главным образом за счет растяжения клеток. На среде II для регенерации корень постепенно дегенерирует.

### *Гемморизогенез in vitro в морфогенном каллусе*

Цито-гистологически установлено, что гемморизогенез состоит из двух этапов: сначала в морфогенном каллусе на поверхности морфогенетических очагов экзогенно формируется почка, затем, в толще каллуса, эндогенно формируется корень. Через 15 сут культивирования *in vitro* почки достаточно развиты. Отмечено заложение корневых меристем в каллусе на различном расстоянии от поверхности морфогенетического очага и в различной локализации относительно почки. По мере развития почек и корней между ними постепенно устанавливается связь путем формирования в каллусе элементов сосудистой системы (рис. 9).

Через 25 сут культивирования *in vitro* наблюдаются хорошо развитые почки, объединенные с корнем в единую систему (рис. 10).

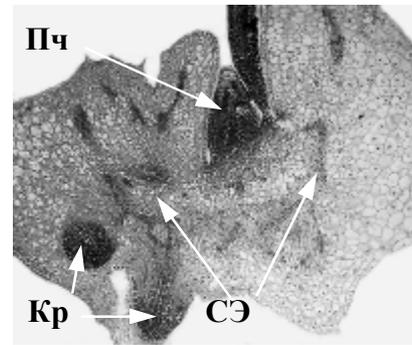
**Рис. 9. Установление связи между почками и корнями посредством формирования сосудистой системы (среда I, 15 сут культивирования *in vitro*). СМ. x100.**

Продольный срез.

Условные обозначения:

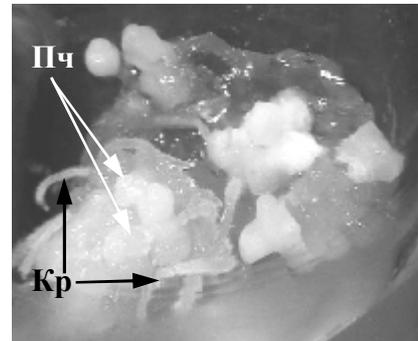
Кр – корень, Пч – почка,

СЭ – элементы сосудистой системы



**Рис. 10. Почка с корнями в морфогенном каллусе (среда I, 25 сут культивирования *in vitro*). x20.**

Условные обозначения: Кр – корень, Пч – почка



На среде II для регенерации почки с корнями формируют растения.

### ***Соматический эмбриогенез *in vitro* в морфогенном каллусе***

На 10 сут культивирования *in vitro* на питательной среде I в каллусах из морфогенетических очагов формируются эмбриогенные клеточные комплексы (ЭКК). К 15 сут культивирования ЭКК обособляются от клеток остального каллуса. Согласно цито-гистологическим исследованиям, формирование соматических зародышей со всеми органами, присущими зародышу злаков, происходит путем реорганизации всего ЭКК, начиная с 10 сут культивирования. К 20 сут в зародыше закладываются апекс корня и апекс побега. Соматические зародыши, заложившиеся внутри морфогенного каллуса как единая система, в процессе роста и развития появляются на поверхности каллуса. На 28 сут в них имеются хорошо развитые главный зародышевый корень, адвентивные корни и примордии первого листа (рис. 11).

**Рис. 11. Соматические зародыши в морфогенном каллусе (среда I, 28 сут культивирования *in vitro*): а) СМ. x52.5. Продольный срез; б) x30.**

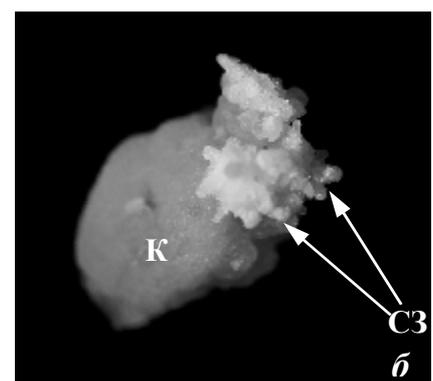
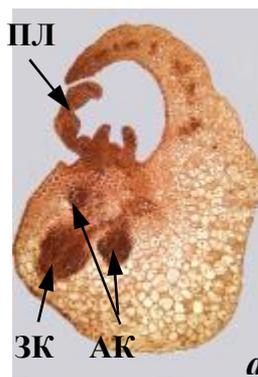
Условные обозначения:

СЗ – соматический зародыш,

ЗК – зародышевый корень,

АК – адвентивный корень,

ПЛ – первый лист, К – каллус



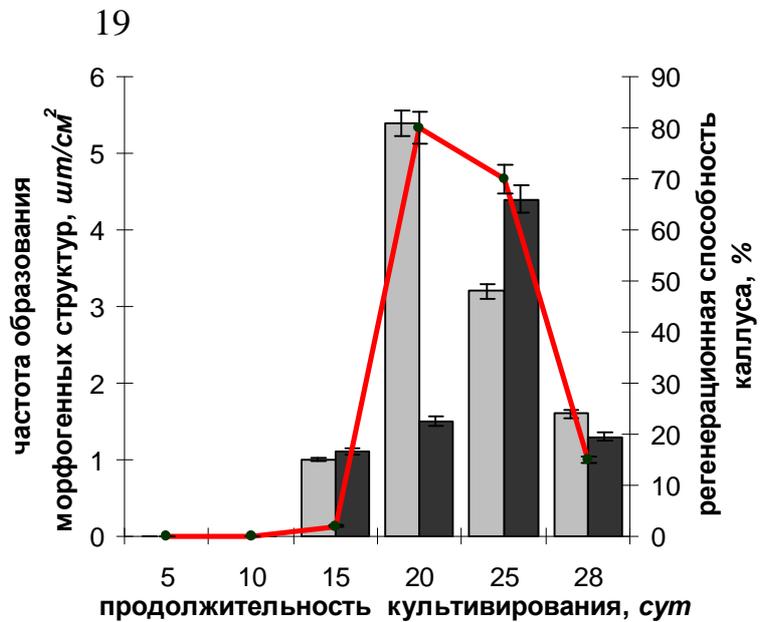
Далее на среде II для регенерации соматические зародыши дают начало растениям-регенерантам. Важно подчеркнуть, что единицей репродукции в данном случае является зародыш со всеми сформированными органами.

**Влияние продолжительности культивирования *in vitro* на среде I  
на частоту образования морфогенных структур  
и регенерационную способность каллусов**

В течение 28 сут культивирования *in vitro* каллусов на среде I через каждые 5 сут часть каллусов переносили на среду II (по [Murashige, Skoog, 1962] с добавлением 0.2 мг/л кинетина без 2,4-Д) для изучения регенерационной способности, часть – фиксировали для цито-гистологического анализа, а часть оставляли на среде I. На постоянных препаратах подсчитывали количество корней, почек, корней и почек, соединенных проводящими элементами, а также соматических зародышей, т.е. морфогенных структур, образовавшихся в результате соответствующих путей морфогенеза *in vitro*.

Анализ данных, полученных к 28 сут, показал зависимость частоты образования морфогенных структур от продолжительности культивирования *in vitro* каллусов на среде I (рис. 12). Так, по мере культивирования частота образования корней увеличивается до 6,3 шт./см<sup>2</sup> (на 28 сут), почек – до 6,4 шт./см<sup>2</sup> (на 10 сут) и уменьшается до 0,4 шт./см<sup>2</sup> (на 28 сут). Максимальная частота образования соматических зародышей (5,4 шт./см<sup>2</sup>) отмечена на 20 сут, гемморизогенных структур (4,4 шт./см<sup>2</sup>) – на 25 сут. К 28 сут культивирования оба показателя значительно уменьшаются. Эти данные согласуются с результатами исследования регенерационной способности каллусов на среде II: выявлено, что максимальное количество растений-регенерантов (80% от количества высаженных каллусов при соматическом эмбриогенезе и 70% - при гемморизогенезе) образуется при переносе каллусов на среду II для регенерации соответственно после 20 и 25 сут культивирования на среде I.

На рис. 12 частота образования морфогенных структур соотнесена с регенерационной способностью каллуса.



**Рис. 12.**  
**Влияние продолжительности культивирования *in vitro* на частоту образования морфогенных структур и регенерационную способность каллуса:**

Условные обозначения:

- соматические зародыши;
- гемморизогенные структуры;
- регенерационная способность каллусов

### Развитие растений-регенерантов в условиях *in vitro* и *ex vitro*

Через каждые 5 сут культивирования *in vitro* на среде I часть каллусов переносили на среду II для регенерации растений, составленную по [Murashige, Skoog, 1962], с добавлением 0.2 мг/л кинетина. Формирование *in vitro* растений-регенерантов из почек с корнями и соматических зародышей на среде II протекало сходным образом, различаясь только продолжительностью. Так, в первом случае растения в фазе кущения отмечались на 25 сут культивирования, во втором – на 21 сут. В обоих случаях развитие растений-регенерантов шло сходно с развитием донорных растений пшеницы в естественных условиях *in vivo*. Отмечались типичные фенофазы всходов, третьего листа, кущения, продолжительность которых практически совпадала с аналогичными показателями донорного растения.

Растения-регенеранты в фенофазе кущения извлекали из пробирок и переносили в условия *ex vitro* в вегетационные сосуды со специально подобранной почвенной смесью, где они развивались до фенофазы полной спелости зерна. Лабораторная и полевая оценка показала высокую всхожесть полученных семян регенерантов. Качество семян подтверждено данными эмбриологического анализа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные биотехнологические методы – соматическая гибридизация, клеточная селекция, генно-инженерные эксперименты – кардинально меняют процесс селекционной работы по выведению новых высокопродуктивных сортов культурных растений. Перспективный в этом отношении биотехнологический метод культуры *in vitro* каллусов зародышевого происхождения привлекает внимание исследователей, начиная с 60-х гг. прошлого века. К настоящему времени накоплен достаточно большой объем экспериментальных данных по различным аспектам культивирования *in vitro* таких каллусов, в том числе пшеницы. Абсолютное большинство исследований в этой области посвящено оценке физиологических условий культивирования, таких как состав и рН питательной среды, освещенность, температура [Суханов, Папазян, 1983; Гапоненко, 1987, 1994; Oldach et al., 2001; Huang, Wei, 2004; Pellegrineschi et al., 2004; и мн.др.].

В то же время успех данной биотехнологии, состоящий в массовом и стабильном получении полноценных фертильных растений-регенерантов, во многом зависит от совершенствования и оптимизации каждого ее этапа на основе комплексных эмбриологических и цитофизиологических данных.

Проведенное нами культивирование *in vitro* разновозрастных зародышей пшеницы выявило, что стадия развития инокулируемого зародыша – важнейший фактор формирования морфогенного каллуса. В условиях выполненных экспериментов к формированию морфогенного каллуса (табл. 2) вела инокуляция только зародышей в подстадии три стадии органогенеза (табл. 1). Для такого зародыша характерен определенный цито-гистологический статус: наличие органов на ранней стадии развития, имеющих значительное количество меристематических клеток, способных к морфогенезу (рис. 1з).

Цито-гистологические исследования показали, что морфогенный каллус пшеницы зародышевого происхождения изначально представлен различными группами клеток (рис. 3б), что подтверждает мнение Т.Б.Батыгиной [2000] о гетерогенности структуры каллуса любого происхождения.

Цитофизиологическими исследованиями установлено, что в условиях культуры *in vitro* различные группы клеток каллуса пшеницы реализуют морфогенетические программы различными путями (геммогенез, ризогенез, гемморизогенез, соматический эмбриогенез) (рис. 6-11).

Важно подчеркнуть универсальность начального этапа всех путей морфогенеза *in vitro*: в каллусе формируется морфогенетический очаг, представленный главным образом меристематическими клетками, способными к морфогенезу (рис. 5). Повышения количества очагов можно добиться оптимальной продолжительностью культивирования каллуса на индукционной среде.

Выявленные пути морфогенеза *in vitro* известны по литературным данным (обзоры [Батыгина, 1987; Бутенко, 1999; Лутова, 2003]), в то же время детальный цито-гистологический анализ всех путей морфогенеза в зародышевом каллусе яровой мягкой пшеницы проведен нами впервые. Кроме того, впервые продемонстрирована возможность реализации различных путей морфогенеза *in vitro* клеток каллуса на питательной среде при различных концентрациях 2,4-Д и различной продолжительности культивирования, но без процедуры многократных пересадок, что, несомненно, влияет на ускорение и оптимизацию биотехнологии получения растений-регенерантов пшеницы.

Полученные данные позволяют дать рекомендации по управлению морфогенезом каллуса *in vitro* в нужных биотехнологу направлениях, ведущих к формированию и развитию полноценных фертильных растений-регенерантов (гемморизогенез, соматический эмбриогенез). Важно подчеркнуть, что соматический эмбриогенез биотехнологически оптимален, поскольку в данном случае в растение прорастает зародыш со всеми сформированными органами.

Анализ полученных комплексных эмбриологических и цитофизиологических данных позволил разработать оптимизированный биотехнологический регламент получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы в каллусной культуре *in vitro* зародышевого происхождения и их развития в условиях *ex vitro* (рис. 13).

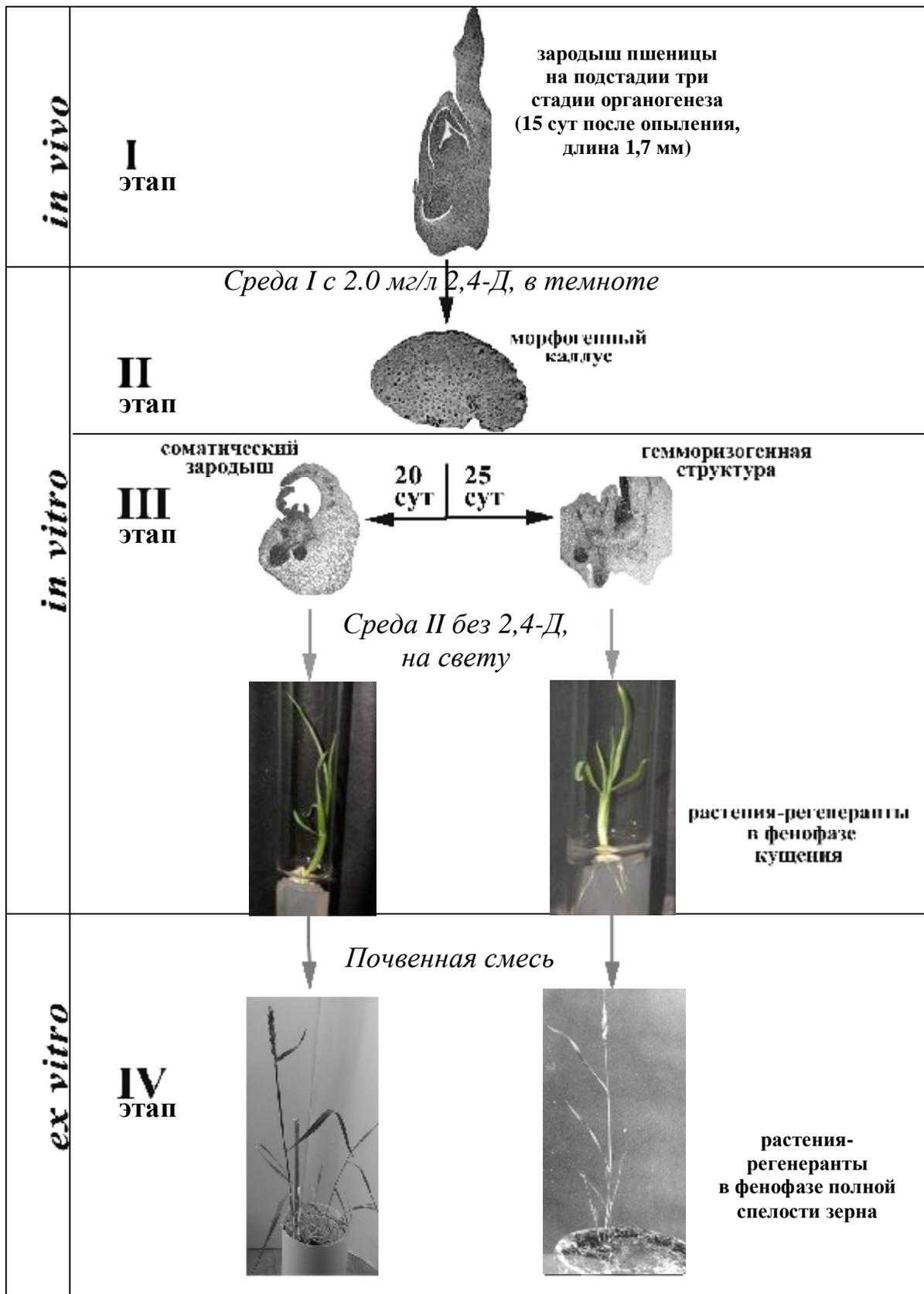


Рис. 13. Оптимизированный регламент технологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы в условиях *in vitro* и *ex vitro*

## ВЫВОДЫ

1. Разработана периодизация эмбриогенеза пшеницы, удобная в биотехнологической практике тем, что выделенные стадии эмбриогенеза совмещены с морфологическим критерием – длиной зародыша (в миллиметрах) и временным критерием – временем от искусственного опыления (в сутках).

2. Основным условием формирования *in vitro* морфогенных каллусов является инокуляция зародышей пшеницы на подстадии три стадии органогенеза, которая характеризуется определенным цито-гистологическим статусом зародыша (наличие органов на ранней стадии развития, характеризующихся большим количеством меристематических клеток).

3. Максимальный показатель пролиферации *in vitro* морфогенных каллусов (в мг сырой массы) отмечен при концентрации 2,4-Д в индукционной среде в 2.0 мг/л при культивировании зародыша, введенного в культуру *in vitro* на 15 сут после опыления (на подстадии три стадии органогенеза, длина 1,7 мм).

4. Показано, что обязательным этапом всех путей морфогенеза *in vitro* является формирование в каллусе морфогенетического очага, состоящего главным образом из меристематических клеток.

5. Исследованы пути морфогенеза в культуре *in vitro* каллусов зародышевого происхождения: геммогенез, ризогенез, гемморизогенез, соматический эмбриогенез. Выявлено, что к формированию фертильных растений-регенерантов ведут гемморизогенез и соматический эмбриогенез.

6. Выявлена зависимость регенерационной способности морфогенных каллусов на среде для регенерации от продолжительности их культивирования *in vitro* на индукционной среде, что обусловлено цито-гистологическими особенностями гемморизогенеза и соматического эмбриогенеза. При этом на среде для регенерации путем соматического эмбриогенеза формируется большее количество растений (80% от количества морфогенных каллусов) при меньшей продолжительности (20 сут) культивирования каллусов на

индукционной среде, по сравнению с гемморизогенезом (70% и 25 сут, соответственно).

7. Разработан оптимизированный регламент технологии получения фертильных растений-регенерантов из каллуса зародышевого происхождения в условиях *in vitro* и *ex vitro*. Для получения максимального количества регенерантов за сравнительно короткие сроки рекомендуется использовать соматический эмбриогенез как биотехнологически оптимальный путь морфогенеза каллуса *in vitro*.

### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Зайнутдинова Э.М., Катасонова А.А., Сулейманов Ф.А., Шаяхметов И.Ф. Особенности регенерации растений из каллусной ткани пшеницы в присутствии абсцизовой кислоты // Тез. докл. II науч. конф. МОГиС «Актуальные проблемы генетики». М., 2003. С. 127-128.
2. Зайнутдинова Э.М., Катасонова А.А. Особенности формирования морфогенетических очагов в каллусной ткани пшеницы *in vitro* // Тез. докл. VIII междунар. Пущинской школы-конф. молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино, 2004. С. 47.
3. Шаяхметов И.Ф., Катасонова А.А. Количественная характеристика морфогенетических очагов в каллусной ткани пшеницы по данным цитогистологического анализа // Материалы II съезда Общества биотехнологов России. М., 2005. С. 85.
4. Зайнутдинова Э.М., Катасонова А.А. Цито-гистологическое изучение особенностей формирования морфогенетических очагов в каллусной ткани пшеницы // Вестник Башкирского государственного университета. 2004. № 2. С. 64-66.
5. Катасонова А.А. Эмбриоидогенез яровой пшеницы в культуре *in vitro* // Материалы III съезда Общества биотехнологов России. М., 2005. С. 114-115.
6. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А., Зайцев Д.Ю., Катасонова А.А. Биотехнологическая оценка экспланта для получения растений-регенерантов яровой пшеницы в культуре *in vitro* // Известия Челябинского НЦ УрО РАН. 2006. Вып. 2 (32). С. 94-98.
7. Катасонова А.А., Круглова Н.Н., Шаяхметов И.Ф. Этапы биотехнологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы путем эмбриоидогенеза в каллусной культуре *in vitro* // Известия Челябинского НЦ УрО РАН. 2006. Вып. 2 (32). С. 78-82.
8. Катасонова А.А. Органогенез в каллусной культуре пшеницы *Triticum aestivum* L. *in vitro* // Материалы I (IX) междунар. конф. молодых ботаников в Санкт-Петербурге. СПб., 2006. С. 155.

9. Катасонова А.А. Индукция органогенеза в каллусной культуре яровой мягкой пшеницы *in vitro* // Тез. докл. XIII междунар. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006». М., 2006. С. 110-111.
10. Катасонова А.А. Биотехнологическая оценка коллекции сортов и гибридных линий яровой пшеницы для использования в генетико-селекционных исследованиях // Материалы междунар. конф. «Генетика в России и мире». М., 2006. С. 85.
11. Катасонова А.А. Пути морфогенеза в каллусной культуре пшеницы *in vitro* // Тез. докл. X междунар. Пущинской школы-конф. молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино, 2006. С. 376.
12. Катасонова А.А., Шаяхметов И.Ф. Типы органогенеза в культуре *in vitro* зародышевого каллуса яровой мягкой пшеницы // Цитология. 2006. Т.48. № 9. С. 767.
13. Сельдимирова О.А., Катасонова А.А. Цито-гистологический статус незрелого зародыша яровой мягкой пшеницы в фазе развития, оптимальной для формирования морфогенного каллуса *in vitro* // Цитология. 2006. Т.48. № 9. С. 797.
14. Катасонова А.А. Морфогенетические очаги в каллусной культуре *in vitro* зародышей пшеницы // Современные микроскопические исследования в биологии и медицине. М.: Лабора, 2006. С. 28-29.
15. Катасонова А.А. Оценка коллекции сортов яровой пшеницы для использования в экологической селекции методами биотехнологии // Тез. докл. междунар. научно-практ. конф. «Молодые ученые – возрождению агропромышленного комплекса России». Брянск, 2006. С. 32-34.
16. Катасонова А.А. Цитофизиологические особенности регенерации растений в каллусной культуре *in vitro* // Материалы IV съезда Общества биотехнологов России. Пущино, 2006. С. 96-98.
17. Катасонова А.А. Цито-гистологическое изучение особенностей органогенеза в каллусной культуре мягкой пшеницы // Тез. докл. XIV междунар. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2007». М.: Макс Пресс, 2007. С. 167.

Автор выражает искреннюю благодарность д.б.н., проф. И.Ф. Шаяхметову за руководство при выполнении работы; д.б.н., проф. Н.Н. Кругловой за неоценимую помощь и поддержку при выполнении работы, сотрудникам лаборатории генетики и цитологии растений Института биологии УНЦ РАН к.б.н. О.А. Сельдимировой и Д.Ю. Зайцеву за постоянную помощь и соучастие.