

14. Domínguez D., Montserrat-Sentís B., Virgós-Soler A., Guaita S., Grueso J., Porta M., Puig I., Baulida J., Francí C., García de Herreros A. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol. Cell Biol.*, 2003, 23: 5078–5089.

ВЫЯВЛЕНИЕ КРИТИЧЕСКОЙ СТАДИИ АВТОНОМНОСТИ ЗАРОДЫША ПШЕНИЦЫ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ *IN VITRO*

Н.Н. Круглова, А.Е. Зинатуллина

Уфимский Институт биологии Российской академии наук, Уфа, Kruglova@anrb.ru

В экспериментальных условиях эмбриокультуры *in vitro* с использованием безгормональной питательной среды выявлено, что сформированный зародыш пшеницы (17.5–20 сут после опыления, длина 2,1–2,2 мм), характеризующийся наличием всех типичных для зародышей злаков органов, соответствует стадии автономности.

Ключевые слова: эмбриокультура *in vitro*, автономность зародыша, яровая мягкая пшеница.

В многочисленных исследованиях эмбриогенеза растений установлено, что развитие зародыша растений представляет собой единый процесс, в результате которого из одной исходной клетки – зиготы – формируется зрелый зародыш, обладающий всеми морфогенетическими потенциями взрослого растения. Вместе с тем в своем развитии зародыш проходит через ряд дискретных стадий (или, в терминологии различных авторов – периодов, фаз, этапов), различающихся по морфофизиологическим процессам, функциональной нагрузке, продолжительности, значению для дальнейшего развития растения. Каждая из стадий эмбриогенеза, несмотря на все разнообразие происходящих в это время процессов, направлена на реализацию как морфогенетического потенциала зародыша, так и онтогенетической программы особи в целом [1].

Системный подход к дифференциации зародыша с учетом морфогенетических и морфофизиологических корреляций позволил выявить ряд критических стадий эмбриогенеза растений, во время которых закрепляется жесткая детерминация пути развития зародыша. Последовательные стадии развития зародыша рассматриваются как процесс, при котором в различные критические точки времени и пространства происходит переключение на

альтернативные пути, а те или иные части организма становятся «детерминированными» в отношении их дальнейшей дифференциации. В целом зародыш демонстрирует свойства динамичной системы с пульсирующим характером функционирования своих элементов [2].

Одна из критических стадий эмбриогенеза растений – автономность зародыша как особое структурно-функциональное состояние развивающегося организма, отражающее его способность к саморегуляции, независимость от окружающих тканей и проявляющееся в его способности завершить нормальный эмбриогенез вне материнского организма. Автономность зародыша может рассматриваться как один из этапов автономизации онтогенеза, с которого зародыш (новый спорофит) переходит на относительно самостоятельный путь развития [3].

Высказано мнение, что стадия автономности зародыша для цветковых растений разных таксонов будет совершенно различна, поскольку определяется в основном специфичной генетикой, т.е. разнообразием структур материнского организма, которые окружают зародыш и обуславливают как специфику его строения и развития, так и особенности формирования проростка и растения в целом [2]. Предложен экспериментальный способ выявления стадии автономности зародыша с помощью метода эмбриокультуры *in vitro* разновозрастных зародышей по способности изолированного зародыша завершить нормальный эмбриогенез и дать в условиях *in vitro* нормальный проросток на простой безгормональной среде [3]. Такой подход вполне оправдан. Действительно, с одной стороны, именно культура *in vitro* позволяет создать условия для наиболее полной реализации всех (в том числе потенциальных) онтогенетических программ развития зародыша, а значит, и особи в целом, поскольку зародыш обладает всеми морфогенетическими потенциями взрослого организма. С другой стороны, именно в культуре *in vitro* экспериментатор может моделировать условия материнского организма и выявить ту стадию эмбриогенеза, когда зародыш способен к дальнейшей дифференциации и прорастанию во взрослое нормальное растение независимо от экзогенных гормонов питательной среды. В то же время, по нашему мнению, следует дать оценку автономности зародыша не только по признаку формирования нормального проростка на безгормональной среде *in vitro*, но и по формированию из такого проростка полноценного фертильного растения далее, в условиях развития *ex vitro*.

Цель исследования состояла в выявлении стадии автономности зародыша яровой мягкой пшеницы с помощью метода эмбриокультуры *in vitro* и определении цито-гистологического статуса автономного зародыша.

Материал и методы

В качестве объекта исследования использовали сорт яровой мягкой пшеницы Симбирка, перспективный для климатической зоны Южного Урала и районированный в Республике Башкортостан в 1988 г. Сорт выведен на Ульяновской государственной сельскохозяйственной опытной станции с помощью метода индивидуального отбора из гибридной комбинации (Минская х Безостая) х Саратовская 36 [4]. Ранее нами [5] для растений этого сорта в условиях культуры *in vitro* отмечены как сохранение жизнеспособности зародышей, так и способность их к дальнейшему развитию. Семена были любезно предоставлены лабораторией селекции яровой пшеницы Башкирского НИИ СХ РАСХН (заведующий лабораторией – к. с.-х.н. В.И. Никонов) согласно Договору о творческом сотрудничестве на 2011-2015 гг.

Растения выращивали в полевых условиях согласно рекомендациям Доспехова Б.А. [6] на экспериментальных участках научного стационара Уфимского Института биологии РАН (Уфимский район). Ввели фенологические наблюдения за их сезонным ритмом роста и развития по методике Челак В.Р. [7].

Использовали метод эмбриокультуры *in vitro* яровой мягкой пшеницы с учетом оригинальных методических нюансов [8]. При этом для культивирования использовали незрелые зародыши, изолированные после искусственного опыления на следующих стадиях эмбриогенеза согласно авторской периодизации [9]: четырехклеточный зародыш (2.5 сут после опыления, длина зародыша 0,12–0,14 мм); многоклеточный зародыш (3.0–4.0 сут после опыления, длина зародыша 0,15–0,2 мм); органогенез в трех подстадиях: подстадия 1 (4.5–8.0 сут после опыления, длина зародыша 0,4–0,6 мм), подстадия 2 (8.5–12.0 сут после опыления, длина зародыша 0,8–1,3 мм), подстадия 3 (12.5–17.0 сут после опыления, длина зародыша 1,5–2,0 мм); сформированный зародыш (17.5–20.0 сут после опыления, длина зародыша 2,1–2,2 мм). Незрелые зародыши на стадии зиготы и стадии двуклеточного зародыша в экспериментах не использовали: миниатюрность зародышей на этих стадиях эмбриогенеза представляет значительную методическую трудность.

Часть зародышей на всех выделенных этапах эмбриогенеза изучали с применением цитогистологических методов, модифицированных применительно к биотехнологическим исследованиям [10]. Для этого зародыши фиксировали в реактиве Чемберлена (этиловый спирт 70%-ный – 90 частей, формалин 40%-ный – 5 частей, уксусная кислота ледяная – 5 частей) и готовили постоянные препараты, которые окрашивали 2%-ным ацетокармином и

0.1%-ным алциановым синим. Препараты просматривали и фотографировали при помощи микровизора проходящего света μ VIZO–103 (ОАО «ЛОМО», г. Санкт-Петербург).

Инокулируемые зародыши размещали щитком вниз на индукционную питательную среду, составленную по полной прописи Murashige, Skoog [11], с добавлением в качестве гормонального компонента синтетического аналога ауксина 2,4-Д в различной концентрации: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 мг/л. Культивирование проводили в темноте, при температуре +26°C. В контроле гормональный компонент не добавлялся.

Проводили морфологический анализ сформировавшихся каллусов, отмечая их цвет, форму, плотность. Образовавшиеся проростки в фенофазе 3-го листа переносили на среду для регенерации, составленную по традиционной прописи Blaydes [12], с добавлением в качестве гормонального компонента 0.2 мг/л кинетина. Растения-регенеранты в фенофазе кущения переносили в почвенные условия вегетационного сосуда и вели наблюдения за их дальнейшим развитием.

Результаты

Анализ полученных экспериментальных данных свидетельствует о следующем:

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на стадиях четырехклеточного и многоклеточного зародыша, на подстадии 1 стадии органогенеза при всех концентрациях 2,4-Д в питательной среде и в контроле ответной реакции зародышей не наблюдали. Такие зародыши постепенно дегенерировали.

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на подстадии 2 стадии органогенеза на всех вариантах сред с 2,4-Д через 5–7 сут культивирования наблюдали формирование неморфогенных обводненных каллусов желтоватого цвета, неопределенной формы, рыхлой мягкой консистенции. Пролиферация каллусов была скудной, и в ходе дальнейшего культивирования такие каллусы постепенно дегенерировали. В контрольном варианте каллусообразования не наблюдали, экспланты постепенно дегенерировали.

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на подстадии 3 стадии органогенеза, через 5–7 суток культивирования при концентрации 2,4-Д в питательной среде 1.0–3.0 мг/л наблюдали формирование морфогенных каллусов плотной компактной консистенции, матового желтовато-белого цвета, узловой формы. В остальных случаях, в том числе в контрольном варианте, формировались неморфогенные каллусы.

Сформированные зародыши после 10–12 сут культивирования *in vitro* на безгормональной питательной среде без 2,4-Д (контроль) давали начало проросткам и далее, после переноса

на среду для регенерации и в почвенные условия *ex vitro*, – нормальные фертильные растения. При культивировании сформированных зародышей на питательной среде с добавлением 2,4-Д (все концентрации) через 5–7 сут наблюдали образование неморфогенного водянистого каллуса.

Обсуждение

Автономным следует считать сформированный зародыш, имеющий определенный уровень эндогенных регуляторов роста, обеспечивающих в сочетании с другими веществами его дальнейшее нормальное прорастание. Согласно полученным цито-гистологическим данным, такой зародыш характеризуется наличием всех типичных для зародышей злаков органов: щиток (семядоля), лигула, coleoptиль, coleориза, эпибласт, дифференцированная почечка, состоящая из апекса побега и зачатков первого, второго и третьего листьев, зародышевый корень с корневым чехликом. Со стороны щитка зародыш окружен эндоспермом.

Полученные результаты подтвердили высказанное нами предположение о том, что оценку автономности зародыша следует давать не только по признаку формирования нормального проростка на безгормональной среде *in vitro*, но и по формированию из такого проростка полноценного фертильного растения в условиях *ex vitro*.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта по программе «Ведущие научные школы РФ» № НШ-5282.2014.4 (лидер школы – член-корр. РАН Т.Б. Батыгина).

Список литературы

1. **Батыгина Т.Б.** Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей. Физиология растений, 1999, 46 (6): 884–898.
2. **Батыгина Т.Б., Васильева В.Е.** Целесообразность системного подхода к проблеме дифференциации зародыша покрытосеменных растений. Онтогенез, 1983, 14 (3): 304–311.
3. **Батыгина Т.Б.** Хлебное зерно. Л.: Наука, 1987. 103 с.
4. Характеристика сортов сельскохозяйственных культур, включенных в Госреестр по Республике Башкортостан. Под ред. Д.Б. Гареева. Уфа, 1997. 96 с.
5. **Круглова Н.Н., Катасонова А.А.** Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплантат. Физиология и биохимия культурных растений, 2009, 41 (2): 121–131.
6. **Доспехов Б.А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
7. **Челак В.Р.** Система размножения пшеницы *Triticum* L. Кишинев: Штиинца, 1991. 320 с.
8. **Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А.** Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.
9. **Круглова Н.Н.** Периодизация развития зародыша пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок. Известия Уфимского научного центра Российской академии наук, 2012, 2: 21–24.
10. **Круглова Н.Н., Егорова О.В., Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю., Зинатуллина А.Е.** Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений. Уфа: Гилем, 2013. 128 с.

11. **Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, 15 (3): 473–497.
12. **Blaydes D.F.** Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean. *Physiol. Plant.*, 1966, 19 (3): 748–753.

ИММУНОЛОКАЛИЗАЦИЯ ЦИТОКИНИНОВ НА НАЧАЛЬНОМ ЭТАПЕ ПОЛИЭМБРИОИДОГЕНЕЗА *IN VITRO* ПШЕНИЦЫ

О.А. Сельдимирова, Д.Ю. Зайцев, Н.Н. Круглова

Уфимский Институт биологии Российской академии наук, Уфа, Kruglova@anrb.ru

В экспериментальных условиях культуры *in vitro* выявлена иммунолокализация эндогенных цитокининов в клетках морфогенетических очагов и меристематических зон каллусов, а также в клетках формирующихся апексов побегов и корней развивающихся полиэмбрионидов пшеницы. Это свидетельствует об участии цитокининов в начальных этапах полиэмбрионидогенеза пшеницы *in vitro*.

Ключевые слова: культура *in vitro*, каллус, полиэмбрионид, яровая мягкая пшеница.

Использование нетрадиционных систем размножения в культуре *in vitro* – важное направление современных исследований в области биологии развития растений. Одна из таких систем размножения – эмбрионидогения, состоящая в формировании и развитии эмбриоида – зародышеподобной структуры – и дальнейшем развитии эмбриоида до полноценного растения [1], в том числе в каллусах *in vitro*. На примере пшеницы нами установлено образование в культуре *in vitro* особого типа эмбрионидов – полиэмбрионидов, для которых характерно формирование в их апикальной части множественных точек роста; выявлены основные этапы полиэмбрионидогенеза [2].

Полиэмбрионидогенез оценивается как частный случай морфогенеза – совокупности протекающих в развивающемся организме процессов дифференцировки клеток с образованием специализированных тканей и органов [3]. Важнейшая задача в области изучения этого пути морфогенеза состоит в выявлении связей между процессами, контролирующими развитие органов полиэмбриоида на клеточном и тканевом уровнях. Анализ экспериментальных данных и теоретических обобщений в области клеточной