

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](mailto: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

культуры *in vitro* растений дает возможность предложить каллус в качестве удобной модели для исследования полиэмбриогенеза у растений [4].

Механизмы, контролирующие развитие клеток каллусов по конкретному пути морфогенеза *in vitro*, до настоящего времени окончательно не выяснены. В то же время установлено, что основными координаторами морфогенеза *in vitro* являются фитогормоны, в частности цитокинины и ауксины [5, 6]. Сформировалось представление о том, что характер деления и дифференцировки клеток, определяющий формирование органов растений в условиях *in vitro*, зависит от концентрации цитокининов и ауксинов в этих клетках [7]. Однако неизвестно, существуют ли какие-то особенности в распределении и накоплении фитогормонов, в том числе цитокининов, в тех клетках каллуса, из которых в дальнейшем сформируются полиэмбриониды и их органы. В связи с этим цель данной работы состояла в выявлении локализации эндогенных цитокининов в клетках каллусов пшеницы на начальных этапах полиэмбриогенеза *in vitro*.

### **Материал и методы**

Материалом для исследования послужил сорт яровой мягкой пшеницы Башкирская 26. Для получения каллусов из незрелых зародышей (15 сут после искусственного опыления) использовали полную среду Murashige, Skoog [8], в состав которой был введен синтетический ауксин 2,4-Д в концентрации 2.0 мг/л. Каллусы культивировали в темноте при 26° С [9].

Растительный материал для выявления локализации цитокининов готовили согласно методике Веселова с соавт. [10]: каллусы фиксировали в 4%-ном параформальдегиде и 0.1%-ном глютаровом альдегиде, отмывали в 0.1М фосфатном буфере (ФБ) (рН=7.3), обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации, заключали в метакрилатную смолу JB-4. Полутонкие срезы каллусов получали с помощью ротационного микротомы НМ-325 (Microm, Germany).

Для иммунного окрашивания срезы обрабатывали ФБ, содержащим 0.2% желатина и 0.05% Tween 20, затем антизеатинрибозидной сывороткой кролика; промывали ФБ, содержащим 0.05% Tween 20 (ФoT); наносили меченные коллоидным золотом иммуноглобулины козы против антител кролика; промывали ФoT; обрабатывали препаратом серебра для усиления окрашивания.

Для гистологического анализа срезы окрашивали 0.2%-ным раствором толуидинового синего в 2.5%-ном растворе карбоната натрия [11]. Постоянные препараты анализировали и

фотографировали с использованием микроскопа проходящего света Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

### Результаты и обсуждение

Формирование каллусов наблюдали на 5–7 сут культивирования эксплантов *in vitro*. На начальных этапах развития каллусов (1-10 сут) выявлено интенсивное иммунное окрашивание в группах клеток, которые, по данным параллельно проведённого цитогистологического анализа, представляли собой морфогенетические очаги. Клетки, составляющие морфогенетические очаги, характеризуются как меристематические [12]. Хорошо известно, что цитокинины контролируют деление клеток, а также повышают аттрагирующую способность, характерную, как правило, именно для меристематических клеток [5]. Таким образом, локализация цитокининов, обнаруживаемая в меристематических клетках морфогенетических очагов, вполне ожидаема.

К 14–15 сут развития, по цито-гистологическим данным, первоначально однородные морфогенетические очаги становились трехслойными и состояли из центральной зоны слабовакуолизованных клеток, промежуточной зоны меристематических клеток и периферической зоны сильновакуолизованных клеток. Иммунное окрашивание выявило локализацию цитокининов в центральной и промежуточной зонах, при этом окрашивание клеток центральной зоны было относительно слабым. Имеются данные о влиянии цитокининов на процессы дифференцировки клеток [13], поэтому низкая интенсивность иммунного окрашивания клеток центральной зоны морфогенетического очага, возможно, являлась индикатором их дифференцированного состояния как паренхиматозных клеток. В то же время интенсивное окрашивание клеток промежуточной зоны подтверждало их меристематический статус.

Результаты цито-гистологического анализа показали, что к 24–26 сут морфогенетические очаги преобразовывались в меристематическую зону. При этом морфогенетические очаги увеличивались в размерах за счет делений клеток промежуточной зоны; клетки периферической зоны подвергались постепенной деструкции, а под слоем дегенерирующих клеток оформлялась зона, ориентированная параллельно поверхности каллуса. Ранее нами было установлено, что с деятельностью клеток меристематической зоны связана реализация различных путей морфогенеза *in vitro* в каллусах пшеницы различного происхождения [12].

Локализация цитокининов была выявлена именно в меристематической зоне, при этом иммунное окрашивание было равномерным и интенсивным во всех клетках. Это еще раз

свидетельствует о потенциале клеток меристематической зоны к дальнейшему полиэмбриоидогенезу как пути морфогенеза *in vitro*. Кроме того, дальнейшему развитию каллусных клеток по пути полиэмбриоидогенеза *in vitro*, по-видимому, может способствовать свойство цитокининов повышать способность клеток аккумулировать питательные вещества за счет их транспорта из других тканей, как это было показано для естественных условий [5].

Постепенно в каллусе формировался полиэмбриоид, развивались его органы – апексы побегов и корня. Иммуноокрашивание наблюдалось как в клетках формирующихся апексов побегов (на 30–32 сут развития), так и в клетках формирующихся корней (на 35–38 сут развития).

Согласно многочисленным данным [5–7; 14–15 и мн. др.], ауксины необходимы для формирования корней, а цитокинины – побегов; цитокинины рассматриваются как положительный регулятор роста побега, но отрицательный регулятор роста корня [5]. Однако полученные нами данные позволяют предположить, что цитокинины необходимы и для развития корня. Это согласуется с результатами изучения роли цитокининов в развитии корня в естественных условиях [16–18].

В целом, полученные нами данные о иммунолокализации эндогенных цитокининов в клетках морфогенетических очагов и меристематических зон каллусов пшеницы, а также в примордиях апексов побегов и корней формирующихся полиэмбриоидов в условиях *in vitro* свидетельствуют об участии этих гормонов в индукции и регуляции формирования органов растений на различных стадиях их развития.

### Список литературы

1. **Батыгина Т.Б.** Эмбриоидогения – новый тип вегетативного размножения. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции. Ред. Т.Б. Батыгина. СПб.: Мир и семья, 2000: 334–349.
2. **Сельдимирова О.А., Титова Г.Е., Галин И.Р., Круглова Н.Н.** Структурные механизмы становления симметрии у микроспориальных эмбриоидов пшеницы: данные сканирующей электронной микроскопии. Известия Самарского научного центра РАН, 2013, 15 (3(5)): 1676–1679.
3. **Бутенко Р.Г.** Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999, 160 с.
4. **Круглова Н.Н.** Каллус как модель для изучения формирования структуры высшего растения. Известия Уфимского научного центра РАН, 2011, 2: 32–35.
5. **Медведев С.С., Шарова Е.И.** Биология развития растений. Т. 1. Начала биологии развития растений. Фитогормоны: Учебник. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2011, 253 с.
6. **Cheng Z.J.** Pattern of Auxin and Cytokinin Responses for Shoot Meristem Induction Results from the Regulation of Cytokinin Biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. Plant Physiol., 2013, 161 (1): 240–251.

7. **Kakani A., Li G., Peng Z.** Role of AUX1 in the control of organ identity during *in vitro* organogenesis and in mediating tissue specific auxin and cytokinin interaction in *Arabidopsis*. *Planta*, 2009, 229 (3): 645–657.
8. **Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, 15 (3): 473–497.
9. **Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А.** Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цитогистологические аспекты. Уфа: Гилем, 2011, 124 с.
10. **Веселов С.Ю., Вальке Р.С., ван Онкелен Х., Кудоярова Г.Р.** Содержание и локализация цитокининов в листьях исходных и трансгенных растений табака. *Физиология растений*, 1999, 46 (1): 34–40.
11. **Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений.** Н.Н. Круглова, О.В. Егорова, О.А. Сельдиминова, Д.Ю. Зайцев, А.Е. Зинатуллина. Уфа: Гилем, 2013, 128 с.
12. **Сельдиминова О.А., Катасонова А.А., Круглова Н.Н.** Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллюсах различного происхождения у пшеницы. *Физиология и биохимия культурных растений*, 2011, 43 (4): 297–306.
13. **Dello I.R.** Genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 2008, 322 (5906): 1380–1384.
14. **Brenner W.G., Schmulling T.** Transcript profiling of cytokinin action in *Arabidopsis* roots and shoots discovers largely similar but also organ-specific responses. *BMC Plant Biol.*, 2012, 12 (1): 112–142.
15. **Yoshida S., Saiga S., Weijers D.** Auxin regulation of embryonic root formation. *Plant Cell Physiol.*, 2013, 54 (3): 325–332.
16. **Высоцкая Л.Б.** Содержание цитокининов в клетках разных зон корней пшеницы. *Цитология*, 2011, 53 (11): 884–890.
17. **Gupta S., Rashotte A.M.** Down-stream components of cytokinin signaling and the role of cytokinin throughout the plant. *Plant Cell Rep.*, 2012, 31 (5): 801–812.
18. **Zhao Y.** The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2008, 11 (1): 16–22.

## ХАРАКТЕРИСТИКА КАРИОТИПА КЛЕТОК ЛИНИИ DXB-11, ДЕРИВАТА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА СНО-К1

**В.И. Турилова, Т.С. Горячая, Т.К. Яковлева**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [tyak@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:tyak@mail.cytspb.rssi.ru)

Линии клеток яичника китайского хомячка СНО (Chinese hamster ovary) являются основой биотехнологического производства широкого спектра белков, используемых в фармакологических целях. Многообразие клеточных линий СНО, их культивирование в разных условиях и разных лабораториях, определяет необходимость цитогенетического контроля. С использованием метода дифференциального окрашивания хромосом на G-диски выполнен анализ кариотипа клеток линии DXB-11 (дериват клеток СНО-К1), дефицитных по