

ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА СТРУКТУРНЫХ
ЭЛЕМЕНТОВ НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ,
КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO*

**В. А. Спивак, К. И. Минликаева, Н. В. Евсева*,
О. В. Ткаченко**, Ю. В. Лобачев****

*Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского,
410012, Саратов, Астраханская, 83
E-mail: spivak_va@mail.ru*

**Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
410049, Саратов, пр. Энтузиастов, 13
E-mail: nina@ibppm.sgu.ru*

***Саратовский государственный аграрный университет
им. Н. И. Вавилова,
410600, Саратов, Театральная пл., 1*

В работе представлены результаты изучения морфогенеза структурных элементов незрелых зародышей двух сестринских линий пшеницы, культивированных *in vitro* на агаризованной питательной среде, содержащей липополисахарид.

Ключевые слова: незрелые зародыши, эмбриониды, меристематическая активность, липополисахарид (ЛПС), сестринские линии пшеницы.

FEATURES OF MORPHOGENY OF STRUCTURAL ELEMENTS
OF IMMATURE EMBRYOS OF LINES WHEAT,
CULTIVATED *IN VITRO*

**V. A. Spivak, K. I. Minlikayeva, N. V. Evseeva,
O. V. Tkachenko, Yu. V. Lobachev**

The paper presents the results of a study of the structural elements of morphogenesis of immature embryos of two nursing wheat lines cultured *in vitro* on agar medium containing lipopolysaccharide.

Key words: immature embryos, embryos, meristematic activity, lipopolysaccharide (LPS), wheat sister lines.

Успех культивирования растительных объектов *in vitro* определяется созданием условий для реализации эксплантами их морфогенетического

потенциала. Повышение эффективности культивирования растений, как правило, достигается с помощью различных физических и химических факторов. Введение в технологический процесс ассоциативных бактерий, миксотрофных и рода *Azospirillum*, способствовало активации роста и развития растений *in vitro*, более того, повышало адаптацию культуральных регенерантов к условиям *in vivo* (Каляева и др., 2001; Каляева и др., 2003; Волкогон и др., 2006).

Однако инокуляция растений целыми бактериальными клетками в условиях *in vitro* связана с методическими сложностями (Ильчуков, 2012). В связи с этим представляется целесообразным оценить реакцию эксплантов на отдельные компоненты бактериальной клетки, участвующие во взаимодействиях растений и бактерий. Ранее установили, что липополисахарид (ЛПС) наружной мембраны ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* является одним из активных компонентов бактериальной клетки, определяющим контактные взаимодействия с корнями растений (Федоненко и др., 2001), принимающим участие в процессах, индуцирующих ответные реакции растений (Matora, 1995; Evseeva et al., 2011).

Целью данной работы являлось изучение морфогенеза структурных элементов незрелых зародышей двух сестринских линий пшеницы, культивируемых *in vitro* на питательной среде, содержащей ЛПС.

Материал и методика

Исследования проводили в 2010–2012 гг. на базе кафедры микробиологии и физиологии растений СГУ, лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН и кафедры растениеводства, селекции и генетики СГАУ.

Объектом исследования являлись незрелые зародыши генетической модели, представленной двумя почти изогенными линиями сорта яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) Саратовская 29. Линии различались по высоте растений. Одна из них обладает аллелью гена редукции высоты побега (RhtB1c) и является высокоэмбриогенной, а другая – слабоэмбриогенный высокорослый сиб (аллель RhtB1a). Данные изогенные линии получены Ю. В. Лобачевым методом возвратных скрещиваний (Лобачев, 2000).

Работа проводилась по классическому варианту клеточных превращений в культуре *in vitro* незрелых (14-суточных) зародышей пшеницы

путем непрямого соматического эмбриогенеза, когда регенерант возникает из каллуса (Тиссера, 1989). В чашки Петри на поверхность питательной среды помещали по 15 зародышей щитком вверх на агаризованную среду Линсмаэра и Скуга (ЛС), содержащей 2 мг/л 2,4-Д и 30 г/л сахарозы (контрольный вариант) для получения эмбриогенного каллуса. Культивирование осуществляли в факторостатных условиях при температуре 25–28 °С и отсутствии света. Опытные трансплантаты культивировали при тех же условиях, но с добавлением в среду ЛС, помимо прочего, препарат ЛПС бактерий *A. brasilense* Sp245 в концентрациях 1, 10 и 100 мг/л, который был выделен из наружной мембраны бактерий и любезно предоставлен нам старшим научным сотрудником лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН Г. Л. Бурьгиным. Через 30 суток культивирования методом визуального контроля оценивали количество всех образовавшихся каллусов и каллусов с очагами меристематической активности, а также определяли сырую массу разных типов каллусов в контрольных и опытных вариантах. Далее морфогенные каллусы переносили на ту же среду, но без 2,4-Д, а с 0,5 мг/л индолил-3-уксусной кислоты и 0,5 мг/л кинетина для регенерации органов растений, содержащей различные концентрации ЛПС. Морфологические параметры регенерантов определяли через 20 суток.

Результаты и их обсуждение

Первое анатомо-морфологическое описание культивируемых незрелых зародышей обеих линий и отбор объектов для гистологических исследований проводили на 7-е сутки культивирования. Анатомический анализ эксплантов показал, что важной особенностью состояния структурных элементов зародыша исследуемых линий в контрольном варианте являлось увеличение пролиферативной активности клеток и тканей узловой зоны первого листа, а также зоны перехода побег–корень, что хорошо просматривается на срезах регенерантов обеих линий (рис. 1). В основном каллусогенную активность проявляли клетки формирующихся проводящих пучков. Ткани верхней части колеоптиля и первого листового примордия в виду дифференциации клеточных структур не проявляли меристематическую активность. Исследование фиксированных зародышей, помещённых в раствор глицерина (рис. 2), позволило установить местоположение зон меристематической активности в средней части жилки колеоптиля и первого листа. Это объясняется тем, что клетки прово-

дующих пучков сохраняют меристематическую активность в зонах расположения интеркалярной меристемы, обеспечивая, таким образом, рост и развитие зародышевых структур. Не менее активны и клетки щитка.

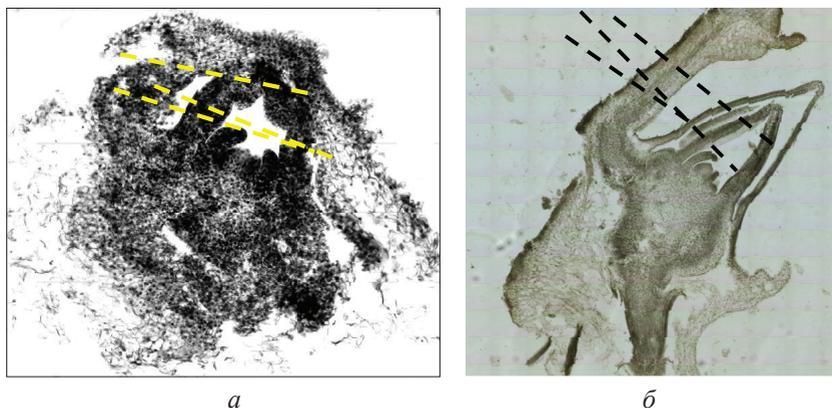


Рис. 1. Меристематическая активность тканей зародышей обеих линии пшеницы на 7-е сутки культивирования, контроль: *a* – низкорослая линия; *б* – высокорослая линия; - - - границы зон

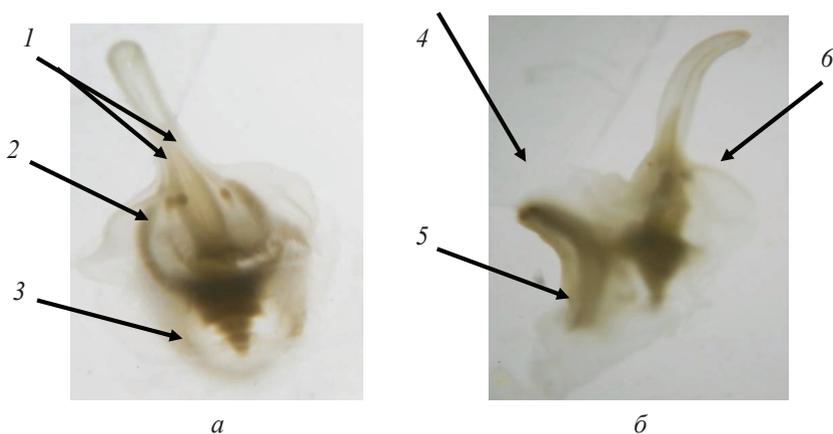


Рис. 2. Морфологическое состояние структурных компонентов зародыша низкорослой линии на 7-е сутки культивирования, контроль: 1 – промежуточные и 2 – большой проводящий пучок колеоптиля; 3 – колеориза; 4 – верхняя и 5 – нижняя часть щитка; 6 – эпибласт

Реакция parenхимных тканей изолированных зародышей исследуемой линии, находящихся в области узловой зоны перехода стебля в корень, колеоризы и эпибласта, заключалась в гипертрофии клеток, что указывало на отсутствия меристематической активности. Факт растяжения клеточных стенок свидетельствовал о ауксиновой зависимости этого процесса. Причем данная ответная реакция типична для полиплоидных и дифференцированных клеток. Аналогичная реакция тканей наблюдалась и у высокорослой линии с аллелью гена *RhtB1*.

Введение в питательную среду ЛПС оказывало положительное влияние на меристематическую активность клеток в узловой зоне первого листа, а также в зоне перехода побег-корень культивируемых в течение недели зародышей. Это обусловлено увеличением очагов или локусов меристематической активности в тех же самых зонах, что ранее наблюдались в контрольных вариантах исследуемых генотипов (рис. 3).

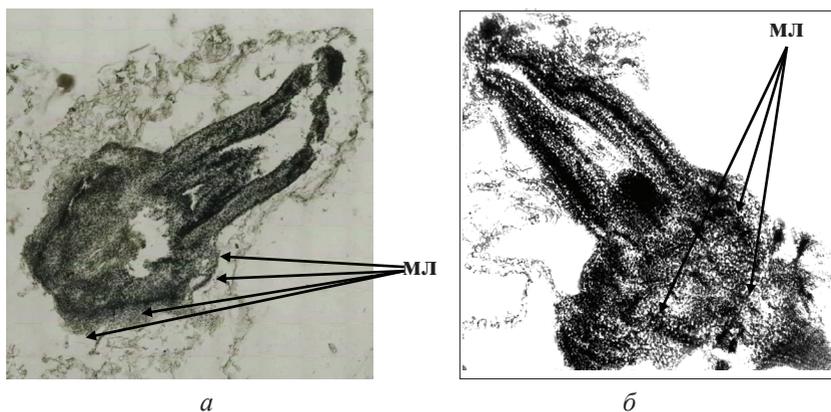


Рис. 3. Меристематическая активность недельных эксплантов опытных зародышей исследуемых линий пшеницы: *а* – низкорослая линия; *б* – высокорослая линия; мл – меристематический локус

Пролиферация клеток в периферической части щитка зародышей продолжалась и на 15-е сутки культивирования, что обусловлено наличием в проводящих тканях меристематически активных клеток. При этом на основании анализа плотности клеточных структур четко выделяются зоны с неравномерной пролиферацией. Так, на периферийных участках формировалась каллусная ткань, состоящая из конгломерата гипертрофи-

рованных клеток с большими межклеточными пространствами. Максимальной меристематической активностью обладали клетки, расположенные в зоне проводящих пучков. В результате неравномерного развития наружные клеточные структуры растягивались, а внутренние быстро переходили к дифференциации, что приводило к закручиванию тканей щитка (рис. 4, *а*).

Подобный эффект был установлен и в контрольном варианте себринского высокорослого сибя. Отличие состояло лишь в том, что у высокорослой линии было больше рыхлых каллусных клеток в области колеоризы (рис. 4, *б*).

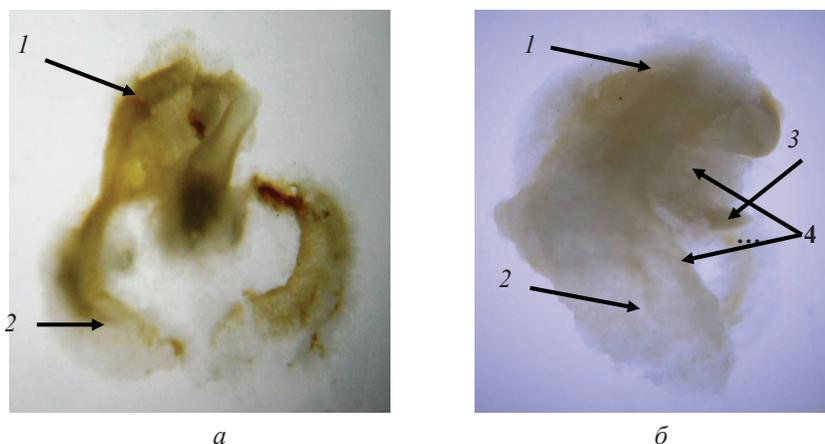


Рис. 4. Морфологическое состояние структурных компонентов целых зародышей исследуемых линий пшеницы на 15-е сутки культивирования, контроль: *а* – низкорослая линия; *б* – высокорослый сиб; 1 – верхняя часть щитка; 2 – нижняя часть щитка; 3 – главный корень; 4 – колеориза

Добавление ЛПС в питательную среду приводило к удлинению колеоптиля и первого листа изолированных зародышей, независимо от генотипа. Причем у низкорослой линии колеоптиль увеличивался в размере, но при этом утрачивал пространственную ориентацию, выражавшуюся в его закручивании. Потеря пространственной ориентации колеоптилем линии высокорослой пшеницы была менее заметна, хотя и в этом случае не наблюдалось сохранения абсолютной ориентации полярности. В зоне щитка происходило уплотнение клеток, однако четких различий в закладке эмбрионных структур не обнаруживалось (рис. 5).

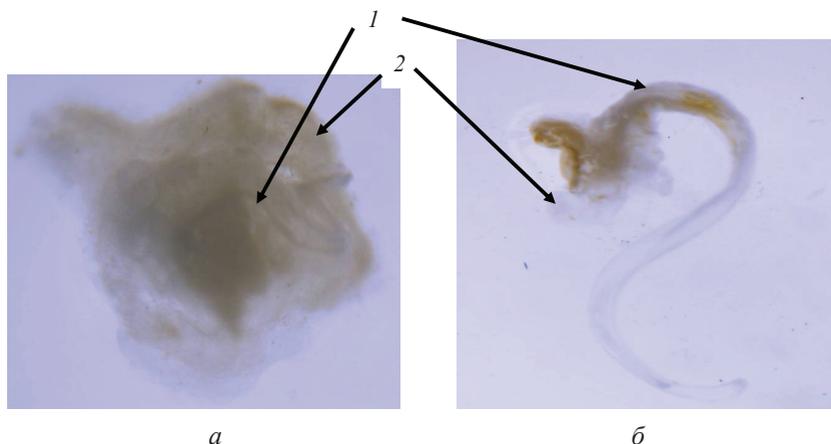


Рис. 5. Морфологическое состояние структурных компонентов зародышей обеих линий пшеницы на 15-е сутки культивирования, опыт: *а* – низкорослая линия; *б* – высокорослый сиб; 1 – coleoptиль; 2 – щиток

На 21-е сутки культивирования изолированных зародышей в области щитка и отходящих от него тяжей в контрольном варианте обеих линий наблюдался соматический эмбриогенез, в результате которого образовались зародышеподобные структуры, напоминающие аналогичные структуры, сформированные при нормальном зиготическом эмбриогенезе. Единственным отличием их являлось то, что образовавшиеся эмбриоиды имели почечную организацию, т.е. не формировали корней (рис. 6).

В вариантах с добавлением в питательную среду ЛПС также не происходил ризогенез. Однако зародышеподобных структур в опытном варианте было много, но они имели меньшие размеры. При этом четко выделялись две области их массового возникновения – зона щитка и сближенных узлов.

Выход регенерантов от количества высаженных эксплантов на питательной среде с ЛПС по сравнению с контролем достоверно увеличивался. В варианте с высокорослой линией – начиная с концентрации 1 мг/л, в то время как у низкорослой линии при концентрациях 1 и 10 мг/л наблюдалось снижение, и только при 100 мг/л этот показатель приближался к контролю (таблица).

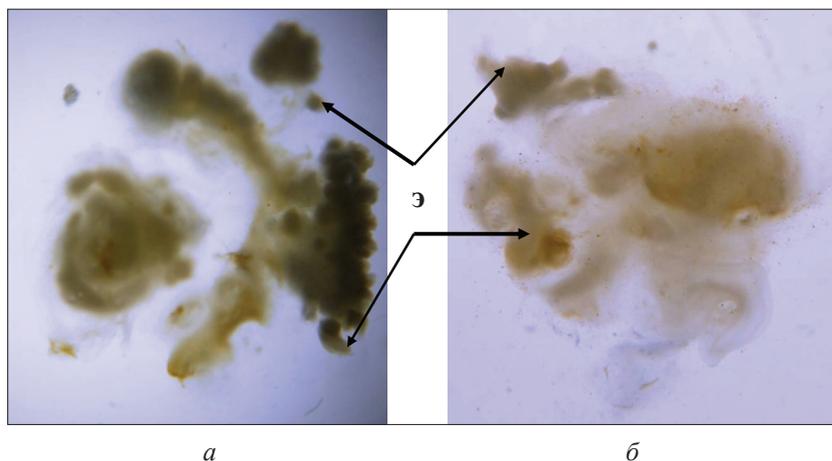


Рис. 6. Морфологическое состояние структурных компонентов целых зародышей исследуемых линий пшеницы на 21 день культивирования, контроль: *а* – низкорослая линия; *б* – высокорослый сиб; *э* – эмбриониды

Влияние ЛПС на морфогенез в культуре соматических тканей

Вариант среды	Генотип	Общий выход каллусов, % от эксплантов	Выход морфогенных каллусов, % от эксплантов	Выход регенерантов, % от эксплантов
Контроль	JRht-B1c	94,9	17,1	10,93
	JRht-B1a	97,5	14,1	2,17
ЛПС, 1 мкг/мл	JRht-B1c	98,0	26,5	6,60
	JRht-B1a	94,1	26,7	4,00
ЛПС, 10 мкг/мл	JRht-B1c	100,0	29,7	8,40
	JRht-B1a	100,0	24,63	4,05
ЛПС, 100 мкг/мл	JRht-B1c	95,4	26,10	10,77
	JRht-B1a	100,0	20,3	7,53
F _{факт.}		0,539	3,838*	5,185*
НСР ₀₅ по вариантам		0,000	8,643	4,297

Примечание. Приведены средние значения анализируемых показателей и наименьшая существенная разница при уровне значимости $\leq 0,05$. Достоверность различий по критерию Фишера обозначено знаком «*».

Таким образом, было установлено, что концентрация ЛПС 10 мг/л являлась наиболее оптимальной, так как ЛПС в этом случае оказывает положительное влияние не только на количество морфогенных каллусов, но и на выход регенерантов, прежде всего высокорослой слабоэмбрионной линии пшеницы.

Выводы

Наличие ЛПС в питательной среде приводило к заметному повышению морфогенного потенциала соматических клеток на 21-е сутки культивирования двухнедельных зародышей.

ЛПС *A. brasilense* Sp245 стимулировал увеличение очагов меристематической активности в узловой зоне первого листа, а также в зоне перехода побег–корень зародышей исследуемых генотипов.

Наибольшей физиологической активностью в отношении каллусных клеток высокорослой слабоэмбрионной линии пшеницы обладал ЛПС в концентрации 10 мг/л.

Список литературы

Каляева М. А. и др. Стимуляция роста и морфогенеза растений *in vitro* ассоциативными метилотрофными бактериями // Физиология растений. 2001. Т. 48, № 1. С. 596–599.

Каляева М. А. и др. Влияние аэробных метилотрофных бактерий на морфогенез пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* // Физиология растений. 2003. Т. 48, № 4. С. 595–599.

Волкогон В. В., Димова С. Б., Мамчур А. Е. Особенности взаимоотношений бактерий рода *Azospirillum* с растениями картофеля, культивируемыми *in vitro* // Сельскохозяйственная микробиология. 2006. № 3. С. 19–25.

Ильчуков В. В. Культивирование каллусной ткани пшеницы с азотфиксирующими бактериями рода *Azospirillum* // Вестн. СГАУ. 2012. № 6, С. 28–29.

Федоненко Ю. П. и др. Участие липополисахаридов азоспирилл во взаимодействии с поверхностью корней пшеницы // Микробиология. 2001. Т. 70, № 3. С. 384–390.

Matora L. Yu. Immunological properties of *Azospirillum* cell surface : the structure of carbohydrate antigens and evaluation of their involvement in bacteria-plant contact interaction // *Azospirillum* VI and Related Microorganisms : Genetics, Physiology, Ecology / eds. I. Fendrik, M. del Gallo, M. De Zamaroczy, J. Vanderleyden. Berlin : Springer, 1995. P. 377–382.

Evseeva N. V. et al. Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharide on the functional activity of wheat root meristematic cells // Plant and Soil. 2011. Vol. 346. P. 181–188.

Лобачев Ю. В. Проявление генов низкорослости у яровых пшениц в Нижнем Поволжье. Саратов : Изд-во СГАУ, 2000. 264 с.

Тиссера Б. Эмбриогенез, органогенез и регенерация растений // Биотехнология растений : культура клеток / пер. с англ. В. И. Негрука ; предисл. Р. Г. Бутенко. М. : Агропромиздат, 1989. 280 с.