

# ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ЗАРОДЫША ПШЕНИЦЫ *IN PLANTA* В СТАДИИ РАЗВИТИЯ, ОПТИМИЛЬНОЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КАЛЛУСА В ЦЕЛЯХ ИЗУЧЕНИЯ В МОДЕЛЬНЫХ СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Н.Н. Круглова, О.А. Сельдимирова, А.Е. Зинатуллина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Уфимский Институт биологии Российской академии наук, Уфа, Россия, [kruglova@anrb.ru](mailto:kruglova@anrb.ru)

**Аннотация.** Установлено, что начало морфогенному каллусу пшеницы *in vitro* дают зародыши, инокулированные на подстадии 3 стадии органогенеза (согласно периодизации: Круглова, 2012). Выявлен гистологический статус таких зародышей: обособление зачатков органов и их тканевая дифференциация, все органы представлены активно развивающимися меристематическими клетками, не покрытыми плотной клеточной стенкой. Показано, что каллус формируется из эпидермальных клеток щитка, находящихся в контакте с питательной средой.

**Ключевые слова:** зародыш *in planta*, морфогенный каллус *in vitro*, пшеница *Triticum aestivum L.*

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-1290-1294

Толерантность к абиотическим стрессам – сложный признак в силу взаимодействий между стрессором и различными молекулярными, биохимическими и физиологическими событиями, влияющими на рост растений на разных стадиях развития, поэтому неспецифические реакции растений на абиотические стрессы трудно контролировать и тем более управлять ими [Шакирова, 2001; Терлецкая, 2012; Yadav, Sharma, 2016; Терлецкая и др., 2017]. Модельными системами для изучения клеточных и тканевых механизмов реакции растений на стресс-факторы могут служить каллусные культуры *in vitro* (обзор [Круглова и др., 2018]). Основанием для использования таких моделей являются как важная роль клетки во всех морфогенетических событиях растительного организма [Бутенко, 1999; Носов, 1999; Журавлев, Омелько, 2008; Plant propagation ..., 2008; Иванов, 2011; Hand et al., 2016], так и универсальность путей морфогенеза растений *in planta* и *in vitro* [Батыгина, 2014; Батыгина, Осадчий, 2015].

Отдельная проблема в этой области – выявление особенностей экспланта, в условиях *in vitro* дающего начало морфогенному каллусу, тотипотентные клетки которого в ходе дальнейшего культивирования в модельных стрессовых условиях способны развиваться по различным путям морфогенеза, включая регенерацию стресс-устойчивого растения. В качестве экспланта для получения *in vitro* морфогенного каллуса у злаков перспективно использование незрелого зародыша [Круглова, Катасонова, 2009; Митич и др., 2009; Plant Embryo Culture ..., 2011; Сельдимирова и др., 2011, 2017; Сельдимирова, Круглова, 2013; Thi-Bich, Duc-Thanh, 2014; Seldimirova et al., 2016]. При описании инокулируемого незрелого зародыша исследователи обычно указывают либо длину зародыша, либо сутки после опыления, на которые незрелый зародыш извлекался из зерновки (обзор [Круглова и др., 2018]); при этом, как правило, не указывается стадия развития зародыша, отсутствует его гистологическое описание. В связи с этим нами проведено гистологическое исследование инокулируемых *in vitro* незрелых зародышей пшеницы на разных стадиях развития с целью выявления особенностей зародыша в стадии, оптимальной для получения морфогенного каллуса.

Материалом для исследований послужила яровая мягкая пшеница сорта Жница. Растения выращивали на экспериментальных участках научного стационара Уфимского Института биологии УФИЦ РАН (Уфимский район) и срезали на 2.5–20.0 сут после искусственного опыления. Использовали метод эмбриокультуры *in vitro*

яровой мягкой пшеницы с учетом оригинальных методических эмбриологических нюансов [Круглова, Сельдимирова, 2011]. Зародыши инокулировали на последовательных стадиях развития согласно авторской периодизации [Круглова, 2012]: четырехклеточный зародыш (2.5 сут после искусственного опыления); многоклеточный зародыш (4.0 сут после искусственного опыления); органогенез в трех подстадиях: подстадия 1 (8.0 сут после искусственного опыления), подстадия 2 (12.0 сут после искусственного опыления), подстадия 3 (17.0 сут после искусственного опыления); сформированный зародыш (20.0 сут после искусственного опыления).

Для индукции каллусообразования использовали среду, составленную по полной прописи Мурасиге-Скуга [Murashige, Skoog, 1962], pH 5.8, с введением 0.2 мг/л кинетина и 2,4-Д в следующих концентрациях: 0.0 (контроль), 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 мг/л. Зародыши инкубировали в темноте при 27 °С. Постоянные препараты зародышей, подготовленные по [Круглова и др., 2013], анализировали с использованием микроскопа проходящего света Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Germany). Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Microsoft Office Excel 2010. В таблице приведены средние значения.

Согласно полученным данным, формирование морфогенного каллуса отмечено только при культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на подстадии 3 стадии органогенеза (17 сут после опыления), при концентрации 2,4-Д в 1.0–4.0 мг/л (таблица).

**Таблица.**

**Влияние стадии эмбриогенеза и концентрации 2,4-Д в среде на отзывчивость незрелых зародышей пшеницы сорта Жница в культуре *in vitro***

Стадия эмбриогенеза	Сутки после опыления	Отзывчивость незрелых зародышей 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	2.5	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
Многоклеточный зародыш	4.0	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
Подстадия 1 стадии органогенеза	8.0	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
Подстадия 2 стадии органогенеза	12.0	Д	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК
Подстадия 3 стадии органогенеза	17.0	НМК	МК	МК	МК	МК	НМК	НМК	НМК	НМК
Сформированный зародыш	20.0	П	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК	НМК

**Условные обозначения:** МК – морфогенный каллус, НМК – неморфогенный каллус, П – проросток, Д – дегенерация зародыша

Гистологическое исследование показало, что на подстадии 3 стадии органогенеза происходит обособление зачатков органов зародыша и их тканевая дифференциация; все органы такого зародыша находятся на ранней стадии развития и представлены активно развивающимися меристематическими клетками, не покрытыми плотной клеточной стенкой. Эту подстадию развития зародыша *in planta* можно считать

оптимальной для получения морфогенных каллусов *in vitro* пшеницы данного сорта в условиях выполненных экспериментов.

Концентрация 2,4-Д также играет определенную роль в индукции формирования морфогенного каллуса, однако, на нашем мнении, не главенствующую, поскольку использование одной и той же концентрации этого синтетического ауксина вело к различной реакции разновозрастных зародышей пшеницы. Более того, в ряде вариантов отзывчивость экспланта не зависела от наличия 2,4-Д в среде.

В целом, полученные данные свидетельствуют, что при прочих равных условиях компетентность клеток зародыша пшеницы к формированию морфогенного каллуса в условиях *in vitro* зависит не столько от внешних стимулов, сколько от статуса клеток зародыша *in planta* в момент инокуляции, а именно – их меристематичности. Полученные результаты подтверждают высказанное мнение, что для злаков именно природа экспланта является основным фактором, определяющим морфогенетическую способность клеток зародыша к формированию каллуса и дальнейшую регенерацию растений из клеток каллуса в условиях культуры *in vitro* [Дунаева и др., 2000; Круглова, Катасонова, 2009; Круглова, Сельдиминова, 2011; Slesak et al., 2013; Круглова и др., 2018]. По нашему мнению, клетки такого зародыша не только морфогенетически компетентны, но и являются исходными для меристематических клеток морфогенного каллуса, имеющих все морфогенетические возможности, присущие данной особи и реализующиеся различными путями морфогенеза *in vitro*, т.е. тотипотентных. Более того, клетки зародыша, дающие начало полноценным (фертильным) растениям-регенерантам через этап формирования *in vitro* морфогенного каллуса, по-видимому, можно расценивать в определенном смысле и как стволовые клетки, в понимании Т.Б. Батыгиной [Батыгина и др., 2010; Батыгина, 2014].

*В работе использовано оборудование ЦКП «Агидель» УФИЦ РАН.*

#### Литература

Батыгина Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни. – СПб.: ДЕАН, 2014. – 764 с.

Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдиминова О.А. От микропоры – к сорту. – М.: Наука, 2010 – 174 с.

Батыгина Т.Б., Осадчий Я.В. Выявление гомологии клеточных элементов репродуктивных и формообразовательных структур // Успехи соврем. биол. – 2015. – Т. 135, № 4. – С. 337–345.

Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

Журавлев Ю.Н., Омелько А.М. Морфогенез у растений *in vitro* // Физиол. раст. – 2008. – Т. 55, № 5. – С. 643–664.

Иванов В.Б. Клеточные механизмы роста растений. – М.: Наука, 2011. – 104 с.

Круглова Н.Н. Периодизация эмбриогенеза пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // Изв. Уфимского науч. центра РАН. – 2012. – № 2. – С. 21–24.

Круглова Н.Н., Егорова О.В., Сельдиминова О.А., Зайцев Д.Ю., Зинатуллина А.Е. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений. – Уфа: Гилем, 2013. – 128 с.

Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплант // Физиол. и биохим. культ. раст. – 2009. – Т. 41, № 2. – С. 124–131.

Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цитогистологические аспекты. – Уфа: Гилем, 2011. – 124 с.

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Каллус *in vitro* как модельная система для исследования стресс-устойчивости растений к абиотическим факторам (на примере злаков) // Успехи соврем. биол. – 2018. – Т. 138, № 2. – В печати.

Митич Н., Додиг Д., Николич Р. и др. Влияние условий выращивания донорных растений на культуру незрелых зародышей, выделенных из широко распространённых генотипов пшеницы // Физиол. раст. – 2009. – Т. 56, № 4. – С. 596–602.

Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиол. раст. – 1999. – Т. 46, № 6. – С. 837–844.

Сельдимирова О.А., Безрукова М.В., Галин И.Р., Лубянова А.Р., Шакирова Ф.М., Круглова Н.Н. Влияние 24-эпибрасинолида на формирование, ростовые показатели и регенерационную способность каллусов *in vitro* контрастных по засухоустойчивости сортов пшеницы // Физиол. раст. – 2017. – Т. 64, № 6. – С. 461–472.

Сельдимирова О.А., Катасонова А.А., Круглова Н.Н. Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллусах различного происхождения у пшеницы // Физиол. биохим. культ. раст. – 2011. – Т. 43, № 4. – С. 297–306.

Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Особенности начальных этапов эмбриоидогенеза *in vitro* в каллусах пшеницы различного происхождения // Изв. РАН. Серия биол. – 2013. – № 5. – С. 565–573.

Терлецкая Н.В. Неспецифические реакции зерновых злаков на абиотические стрессы *in vivo* и *in vitro*. – Алматы, 2012. – 208 с.

Терлецкая Н.В., Зобова Н.В., Ступко В.Ю. и др. Изучение устойчивости фотосинтетического аппарата мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.) и ее диких сородичей к абиотическим стрессорам *in vivo* и *in vitro*. – Алматы, 2017. – 172 с.

Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.

Hand M.L., de Vries S., Koltunow A.M. A comparison of *in vitro* and *in vivo* asexual embryogenesis // Methods Mol. Biol. – 2016. – V. 1359. – P. 3–23.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, No. 3. – P. 473–497.

Plant Embryo Culture: Methods and Protocols // Methods in Molecular Biology, Vol. 710. – Springer New York London Dordrecht Heidelberg, 2011 – 377 p.

Plant Propagation by Tissue Culture / Eds. George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J. – Dordrecht: Springer, 2008. – 502 p.

Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Zaitsev D.Yu., Veselov S.Yu. Changes in distribution of zeatin and indolil-3-acetic acid in cells during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat // *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant.* – 2016. – V. 52, No. 3. – P. 251–264.

Slesak H., Goralski G., Pawłowska H. et al. The effect of genotype on a barley scutella culture. Histological aspects // Cent. Eur. J. Biol. – 2013. – V. 8, No. 1. – P. 30–37.

Thi-Bich H.V., Duc-Thanh N. High plant regeneration frequency from the immature embryo culture of inbred maize (*Zea mays* L.) lines // Plant Cell Biotechn. Molec. Biol. – 2014. – V. 15, No. 1-2. – P. 11–18.

Yadav S., Sharma K.D. Molecular and morphophysiological analysis of drought stress in plants // Plant growth. Chapter 10 (ed. Rigobelo E.C.) – 2016. – DOI: 10.5772/65246.

**THE HISTOLOGICAL STATUS OF THE WHEAT EMBRYO *IN PLANTA*  
AT THE DEVELOPMENTAL STAGE OPTIMAL FOR OBTAINING CALLUS  
IN ORDER TO STUDY IN MODEL STRESS CONDITIONS *IN VITRO***

N.N. Kruglova, O.A. Seldimirova, A.E. Zinatullina

Ufa Institute of Biology of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia,  
*kruglova@anrb.ru*

**Abstract.** It is established that the beginning of the wheat morphogenic callus in vitro give embryos, inoculated at substage 3 of organogenesis stage (according to the periodization: Круглова, 2012). The histological status of such embryos is revealed: isolation of organ germs and their tissue differentiation, all organs are represented by actively developing meristematic cells not covered by a dense cell wall. It is shown that callus is formed from epidermal cells of the scutellum which are in contact with the nutrient medium.

**Keywords:** *embryo in planta, morphogenic callus in vitro, wheat Triticum aestivum L.*