

УДК 633.11:581.143.5

КАЛЛУС КАК МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФОРМИРОВАНИЯ МОДУЛЕЙ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Н.Н. Круглова

Институт биологии Уфимского НЦ РАН, Уфа

На примере морфогенного каллуса, полученного в культуре in vitro незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы, продемонстрирован гемморизогенез как путь морфогенеза in vitro. Показано, что процесс состоит в последовательном формировании почки и корня. Полученные экспериментальные данные дают возможность использовать морфогенный каллус в качестве модельной системы для изучения формирования модулей растений в строго контролируемых условиях in vitro.

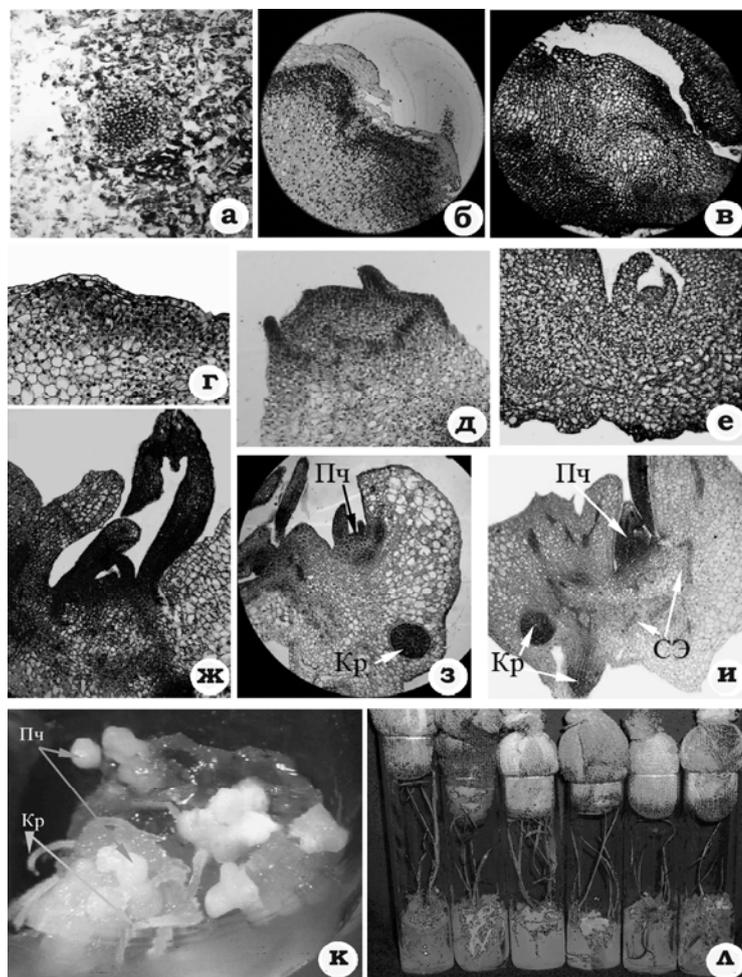
Интерес к модульным существам, в том числе высшим растениям, всё возрастает ([8 – 12] и мн. др.). Накопленные экспериментальные данные и высказанные теоретические обобщения в области культуры *in vitro* растений позволяют предложить модельный подход к исследованию формирования сложной модульной организации растений. Удобной моделью в этом отношении может служить морфогенный каллус, полученный в строго контролируемых условиях *in vitro* при культивировании различных органов, тканей и клеток растений.

По мнению Т.Б. Батыгиной [1], каллус – гетерогенная интегрированная структура (система), образующаяся в результате пролиферации клеток на поверхности отдельных структур растительного организма. Каллус формируется, как правило, из исходно разных клеток генеративных или вегетативных органов, состоит из групп неоднородных клеток, имеющих морфогенетические потенции, которые реализуются различными путями морфогенеза (эмбриоидогенез, органогенез, гистогенез). Как полагает автор, морфогенетические потенции клеток каллуса видоспецифичны и могут меняться в процессе развития, что в определенной степени зависит как от различных факторов (температура, влажность, сроки культивирования), так и от характера связей между группами клеток в каллусе, что обусловлено их формой и размером (критической массой).

Особый интерес вызывает такой путь морфогенеза *in vitro* каллуса, как гемморизогенез – тип органогенеза, состоящий в формировании почки (*gemma*) и корня (*rhizos*) [1], которые можно расценивать как модули организма-растения. Этот тип органогенеза ранее детально изучен в лаборатории экспериментальной эмбриологии растений Института биологии Уфимского НЦ РАН в сотрудничестве с лабораторией эмбриологии и репродуктивной биологии Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (зав. лабораторией – член-корр. РАН Т.Б. Батыгина) на примере андроклиных морфогенных каллусов, полученных в культуре *in vitro* изолированных пыльников яровой мягкой пшеницы. При этом на модельном объекте – гибридной линии Фотос – выявлены цитогистологические и цитофизиологические особенности формирования как морфогенных каллусов, так и почек и корней в них [3; 5; 7].

Цель данной работы – проанализировать этапы гемморизогенеза в динамике культивирования *in vitro* морфогенных каллусов иного – зародышевого – происхождения. Исследования проведены на том же объекте – гибридной линии Фотос. Для получения морфогенных каллусов использовали метод культуры *in vitro* изолированных незрелых зародышей пшеницы [14] в модификации [15] и в собственной модификации. Цито-гистологический анализ вели с применением методов световой микроскопии, модифицированных к культивируемым *in vitro* растительным эксплантам.

Установлено, что гемморизогенез *in vitro* складывается из двух этапов: сначала в морфогенном каллусе экзогенно формируется почка, затем эндогенно формируется корень. Первоочередное формирование почки по сравнению с корнем при гемморизогенезе *in vitro* отмечено многими авторами при анализе развивающихся каллусов различного происхождения, например, у злаков (обзор [6]).



Гемморизогенез *in vitro* в морфогенном каллусе

а – формирование морфогенетического очага, x250; **б** – **в** – формирование почки (**б** – x150; **в** – x150; **г** – x400; **д** – x150; **е** – x100); **ж** – формирование в почке листьев 2-го порядка, x90; **з** – формирование корня, x60; **и** – формирование сосудистых элементов, x60; **к** – сформированные почки с корнями, x10; **л** – растения-регенеранты, x0,3.

а – **и** – постоянные препараты, продольные срезы, **к** – **л** – макросъемка.

Условные обозначения: Кр – корень, Пч – почка, СЭ – сосудистые элементы.

Цитогистологическими исследованиями выявлено, что начальным этапом гемморизогенеза (как и всех других выявленных путей морфогенеза *in vitro* в каллусной культуре незрелых зародышей у объекта исследований) является формирование в морфогенном каллусе групп меристематических клеток – морфогенетических очагов (рисунок, а). Морфогенетический очаг постепенно

разрастается; клетки каллуса, окружающие очаг, постепенно дегенерируют. Под разрушающимися клетками каллуса наблюдается оформление эпидермального слоя морфогенетического очага, параллельно поверхности которого начинается дифференциация меристематической зоны. Разросшийся морфогенетический очаг постепенно оказывается на поверхности каллуса (рисунок, б). Интенсивные деления клеток меристематической зоны ведут как к нарастанию массы каллуса, так и к многочисленным инвагинациям его поверхности (рисунок, в). Заложение примордиев первых листьев происходит экзогенно на поверхности морфогенетических очагов. При этом к образованию примордиев ведут активные периклиальные деления клеток субэпидермальных слоев меристематической зоны (рисунок, г). Примордии первых листьев постепенно развиваются в первые листья, и формируется почка (рисунок, д, е), сходная с почкой в естественных условиях [2; 4; 13; 16]. Постепенно формируются листья второго порядка (рисунок, ж). Далее при достаточной степени развитости почки в толще морфогенного каллуса на различном расстоянии и в различной локализации относительно почки наблюдается эндогенное заложение корней (рисунок, з, и), сходных с корнями в естественных условиях [4]. По мере развития почек и корней между ними постепенно устанавливается связь путем формирования в толще каллуса элементов сосудистой системы (рисунок, и). Такие почки, объединенные с корнем в единую систему (рисунок, к), переносили на питательную среду для регенерации и получали растения-регенеранты (рисунок, л).

Таким образом, на основании детального цито-гистологического мониторинга формирования почек и корней в морфогенных каллусах зародышевого происхождения в динамике культивирования *in vitro* показано принципиальное сходство полученных органов с аналогичными органами в естественных условиях. Полученные данные сходны с ранее исследованным процессом гемморизогенеза *in vitro*, также состоящим в последовательном экзогенном формировании почки и эндогенном формировании корня, в андроклиных морфогенных каллусах, полученных в культуре *in vitro* изолированных пыльников пшеницы из одной клетки – микроспоры.

В целом морфогенные каллусы (полученные в культуре *in vitro* как изолированных пыльников, так и изолированных зародышей), в которых экспериментально индуцируется гемморизогенез и развиваются почки и корни, могут быть рекомендованы в качестве модельных систем для изучения формирования в строго контролируемых условиях культуры *in vitro* органов растений как модулей.

Исследования поддержаны РФФИ-Поволжье (грант 08-04-97405) и программой «Ведущие научные школы РФ» (гранты НШ 4834.2006.4 и НШ 2096.2008.4, лидер школы – Т.Б. Батыгина).

Экспериментальные данные получены совместно с сотрудниками лаборатории экспериментальной эмбриологии растений Института биологии Уфимского НЦ РАН к.б.н. А.А. Катасоновой и к.б.н. О.А. Сельдмировой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батыгина Т.Б. Хлебное зерно. Л., 1987.
2. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. СПб., 2002.
3. Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдмирова О.А. От микроспоры к сорту. М., 2008. (в печати).
4. Васильев А.Е., Воронин Н.С., Еленевский А.Г., Серебрякова Т.И., Шорина Н.И. Ботаника: Морфология и анатомия растений. М., 1988.
5. Круглова Н.Н. Морфогенез в культуре пыльников пшеницы: эмбриологический подход. Уфа, 2001.

6. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю. Морфогенез в каллусах злаков: цитогистологические особенности // Успехи современной биологии. 2008. (в печати).
7. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. М., 2005.
8. Марфенин Н.Н. Концепция модульной организации в развитии // Журн. общ. биологии. 1999. Т. 60, № 1. С. 6 – 17.
9. Нотов А.А. О специфике функциональной организации и индивидуального развития модульных объектов // Журн. общ. биологии. 1999. Т. 60, № 1. С. 60 – 79.
10. Нотов А.А. Концепция модульной организации и проблема организационного полиморфизма на разных уровнях структурной иерархии живых организмов // Ресурсы Internet, сайт <http://herba.msu.ru/russian/symposium/2001/morpho/notov.rtf>
11. Нотов А.А. Модульные организмы как объекты исследования в систематике и морфологии // Ресурсы Internet, сайт <http://ideashistory.org.ru/pdfs/a33-19notov.pdf>.
12. Серавин Л.Н., Гудков А.В. Амебоидные свойства клеток в процессе раннего морфогенеза и природа возможного протозойного предка *Metazoa* // Журн. общ. биологии. 2005. Т. 66, № 3. С. 212 – 237.
13. Серебрякова Т.И., Воронин Н.С., Еленевский А.Г., Батыгина Т.Б., Шорина Н.И., Савиных Н.П. Ботаника с основами фитоценологии: анатомия и морфология растений. М., 2006.
14. Суханов В.М., Папазян Н.Д. Условия получения каллуса и регенерантов в культуре незрелых зародышей пшеницы // Апомиксис и цитоэмбриология растений. 1983. № 5. С. 124 – 128.
15. Шаяхметов И.Ф. Основы биотехнологии растений. Уфа, 2007.
16. Шорина Н.И., Михалевская О.Б. Почка // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3. Системы репродукции. СПб., 2000. С. 310 – 315.

CALLUS AS A MODEL SYSTEM FOR THE INVESTIGATION OF PLANT MODUL FORMATION IN *IN VITRO* CONDITIONS

N.N.Kruglova

Institute of Biology of Scientific Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa

Gemmorhizogenesis as the pathway of morphogenesis in vitro was demonstrated on the example of the morphogenic callus obtained in in vitro culture of immature embryos of spring soft wheat. It was showed that the process consist in the successive formation of bud and root. The experimental data enable chance to use the morphogenic callus as a model system for the investigation of plant modul formation in strongly controlled in vitro conditions.