

УДК 57.085.23

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ
ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА
(*HELIANTHUS ANNUUS L.*)

НГУЕН ТХАНЬ ХАЙ, асп.*

(Кафедра сельскохозяйственной биотехнологии)

Изучен морфогенетический потенциал изолированных тканей (семядольные и гипокотильные сегменты, изолированные с 5-дневных стерильных проростков, изолированные зародыши) подсолнечника в условиях *in vitro*. Установлена зависимость каллусогенеза от гормонального состава питательной среды, изучаемого генотипа и типа первичного экспланта. Оптимальной питательной средой для получения хорошо пролиферирующей каллусной ткани, способной впоследствии к морфогенезу, является среда, содержащая НУК 1,0 мг/л и кинетин 2 мг/л. Исследованы морфофизиологические характеристики каллусных культур, культивируемые на питательных средах, содержащих различные регуляторы роста.

Клеточная биотехнология базируется на способности клеток к существованию и размножению *in vitro*, их типотентности и регенерации. Метод культивирования изолированных тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях (*in vitro*) применяют в растениеводстве: для сохранения и размножения ценных генотипов, в эмбриогенезе, оздоровлении посадочного материала, для получения продуктов вторичного метаболизма, в создании форм растений, устойчивых к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды и т. д. [2, 8].

Процесс морфогенеза *in vitro* зависит от ряда факторов, главные из которых следующие: физиологические, минеральный состав питательной среды, баланс экзогенных и нативных гормонов, физические, а также присутствие сигнальных белков и белков-акцепторов, т. е. условия, обязательные для получения клеток, способных к морфогенезу.

Исследования различных авторов

показали, что для повышения морфогенетического потенциала каллусной ткани или регенерации растений непосредственно из первичного экспланта необходимо подбирать индивидуальные условия культивирования для каждого исследуемого генотипа, учитывая при этом их генотипические особенности [1, 7, 9, 11].

Подсолнечник (*Helianthus annuus L.*) — является одной из ценных с.-х. культур, которая служит источником как пищевого, так и технического масла; является ценной кормовой культурой, содержащей большое количество легкоусвояемых белков. Значение этой культуры постоянно требует создание новых сортов, устойчивых к действию различных биотических факторов и особенно фитопатогенов.

Одной из вредоносных болезней, широко распространенной на подсолнечнике, является белая гниль, или склеротиния, вызываемая фитопатогенным грибом *Sclerotinia sclerotiorum* [4]. В практике селекционера существует недостаточное количество сор-

* Научный руководитель — д. б. н. Е.А. Калашникова.

тов, обладающих устойчивостью к данной болезни. Поэтому поиск новых подходов в решении данной проблемы является весьма актуальным. Одним из таких подходов является клеточная селекция.

Однако для того, чтобы говорить о технологии клеточной селекции необходимо оптимизировать условия культивирования *in vitro* изолированных эксплантов и изучить их морфогенетический потенциал [2].

Исходя из выше изложенного, целью настоящего исследования является всестороннее изучение морфогенеза изолированных клеток и тканей подсолнечника *in vitro*.

Материал и методы исследований

Объектом исследования служили семена подсолнечника трех генотипов (ВК 580, ВК 653, Кубанский 93), обладающие различной устойчивостью к склеротинии (семена любезно предоставлены сотрудниками ВНИИ масличных культур).

Работу проводили на сегментах гипокотилей и семядольных листьев, изолированных с 5-дневных проростков подсолнечника, а также на зрелых зародышах. Все экспланты поверхностно стерилизовали 0,1%-м раствором сулемы в течение 8 мин, после чего их промывали стерильной дистиллированной водой. Экспланты культивировали на модифицированной питательной среде Мурасига и Скуга, содержащей ауксины и цитокинины в различных концентрациях и соотношениях. В качестве ауксинов применяли нафтилуксусную кислоту (НУК), а в качестве цитокинина — кинетин в концентрациях 0,5-3,0 мг/л.

В работе придерживались правил работы со стерильной культурой, разработанных на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева [3].

Экспланты и пролиферирующую каллусную ткань культивировали в чашках Петри в световой комнате, где поддерживали температуру 25°C,

16-часовой фотопериод, освещение белыми люминесцентными лампами интенсивностью 3 тыс. лк, относительную влажность воздуха 70%.

Морфофизиологические исследования проводили на давленных препаратах каллусной ткани, которые фиксировали в конце пассажа. Жизнеспособность клеток определяли окрашиванием их метиленовым синим. Просмотр препаратов проводили с применением светового микроскопа МБС-10 при увеличении X80.

Опыт проводили в 3 аналитических и 5 биологических повторностях. Результаты экспериментов статистически обработаны с использованием программы Straz и Excel. Проведен дисперсионный анализ и определена наименьшая существенная разница (HCP_{05}), а также найдена стандартная ошибка, или ошибка выборочной средней.

Результаты и их обсуждение

Стерилизация растительного материала

В первой серии эксперимента необходимо оптимизировать условия стерилизации семян с целью получения хорошо растущих стерильных проростков.

В качестве стерилизующих препаратов использовали сулему (хлорид ртути) в концентрации 0,1% и гипохлорит натрия в концентрации 1%. Время воздействия стерилизующих веществ составляло от 4 до 16 мин. Учет инфицированных и стерильных эксплантов (проростков) проводили на 4-й день с начала культивирования семян на питательной среде. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Из табл. 1 следует, что применение в качестве стерилизующего вещества гипохлорита натрия для стерилизации семян подсолнечника не является оптимальным, так как в этом случае получение хорошо растущей стерильной культуры составляет всего 9,8-30,6% и этот показатель не зависит от времени стерилизации. При-

**Влияние стерилизующего вещества и его временной экспозиции
на получение хорошо растущей стерильной культуры**

Генотип	Стерилизующее вещество					
	сулема 0,1%			гипохлорит натрия 1%		
	время стерилизации, мин			время стерилизации, мин		
	4	8	16	4	8	16
Кубанский 93	41,67±7,12	83,33±5,38	12,50±4,77	12,24±4,67	20,41± 5,76	30,61± 6,58
ВК 580	35,19±6,50	79,62±5,48	9,26± 3,94	9,80 ± 4,16	21,56± 5,77	27,45± 6,25
ВК 653	42,59±6,73	87,03±4,58	16,67±5,07	13,46±4,73	17,31± 5,25	25,00± 6,00

чем при 16-минутном выдерживании семян в гипохлорите натрия степень инфицированных проростков была максимальной и составила 70-75%.

При использовании в качестве стерилизующего вещества сулемы было получено от 9,23 до 87% стерильных проростков, и этот показатель зависел от времени воздействия стерилизующего агента на семена. Так, выдерживание семян подсолнечника в растворе сулемы в течение 4 мин приводило к поражению эксплантов инфекцией в пределах 35-42%, а при воздействии сулемы в течение 16 мин была получена 100% стерильная культура. Однако в этом варианте хорошо развивающихся проростков из семян было получено лишь в 9,3-16,7% случаев. Это, прежде всего, связано с перестерилизацией растительного материала, которое проявлялось на ранних этапах культивирования семян *in vitro*. При выдерживании семян в растворе сулемы в течение 8 мин было получено максимальное количество хорошо растущих стерильных проростков (79,6—83,0%), которые характеризовались интенсивным ростом. Существенных различий между изучаемыми образцами подсолнечника выявлено не было.

*Зависимость каллусогенеза
и морфогенеза от первичного
экспланта*

В качестве первичного экспланта использовали сегменты гипокотилей и семядольных листьев, изолированные

с 5-дневных проростков подсолнечника, а также зрелые зародыши. Все исследуемые экспланты культивировали на питательной среде Мурасига и Скуга, содержащей НУК в концентрации 2,0 мг/л и кинетин 1,5 мг/л. Данные концентрации были выбраны нами исходя из литературных источников. Установлено, что через 3—5 дней с момента культивирования эксплантов в данных условиях происходило увеличение размера эксплантов по длине и ширине, а затем на 10-й день начинался процесс каллусогенеза. Причем каллусная ткань образовывалась по всей поверхности первичного экспланта, интенсивность которой находилась в четкой зависимости от исследуемого первичного экспланта. Так, наибольшей способностью к каллусогенезу обладали гипокотильные сегменты, а наименьшей — семядольные листья. Изолированные зародыши занимали промежуточное положение (рис. 1). Данная ответная реакция различных эксплантов была характерна для всех исследуемых генотипов.

*Зависимость каллусогенеза
и морфогенеза от исследуемого
генотипа*

Необходимым условием использования каллусных клеток с целью повышения генетического разнообразия и улучшения с.-х. культур является их способность к регенерации растений. Поэтому особое внимание следует уделять изучению процессов образования каллусной ткани и зависимости его от ге-

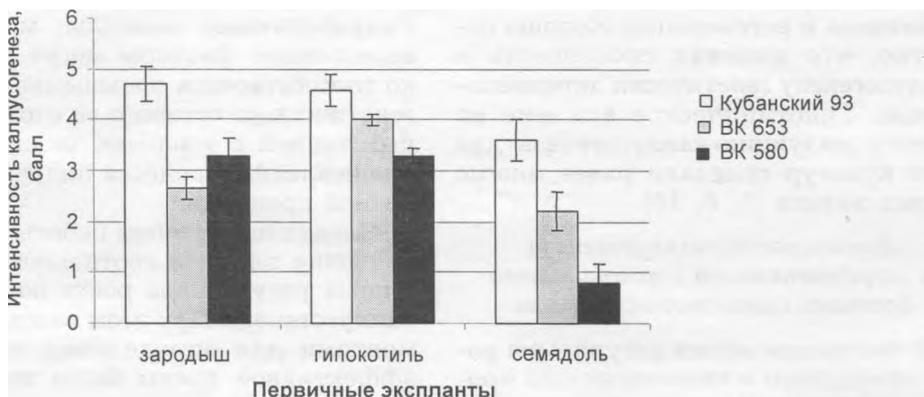


Рис. 1. Зависимость процесса каллусогенеза от первичного экспланта

нетических и физиологических факторов.

Каллусную ткань получали из всех перечисленных в методике первичных эксплантов. Культивирование проводили на стандартной среде, содержащей макро- и микроэлементы, витамины, сахарозу по прописи Мурасига и Скуга, а также НУК (2,0 мг/л) и кинетин (1,5 мг/л). Все экспланты располагали на питательной среде горизонтально и культивировали на свету. Экспериментально установлено, что экспланты всех изучаемых сортообразцов были способны формировать каллусную ткань. Как правило, этот процесс начинался с дедифференцировки клеток, находящихся в местах среза (в случае семядолей и гипокотилей) или в

нижних клеточных слоях изолированных зародышей, которые находились в непосредственном контакте с питательной средой. Спустя 10-14 дней клетки полностью дедифференцировались и во всех исследуемых вариантах образовывалась каллусная ткань. Следует отметить, что способность первичных эксплантов к каллусогенезу была различной и находилась в зависимости от исследуемого генотипа. Наибольшей пролиферативной способностью обладали экспланты сорта Кубанский 93, а наименьшей — ВК 580. Сортообразец ВК 653 занимал промежуточное положение (рис. 2).

Полученные результаты дают возможность сделать вывод относительно влияния генотипа на процессы кал-

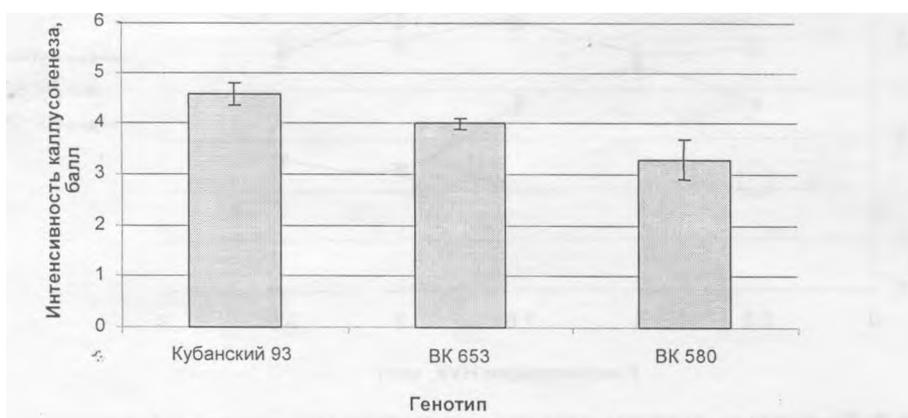


Рис. 2. Зависимость процесса каллусогенеза от исследуемого генотипа

лусогенеза и регенерации. Хорошо известно, что высокая способность к каллусогенезу генетически детерминирована. Генотипическое влияние на частоту индукции каллусогенеза для ряда культур отмечали ранее многие исследователи [5, 6, 10].

Зависимость каллусогенеза и морфогенеза от гормонального состава питательной среды

В настоящее время регуляторы роста природного и синтетического происхождения находят широкое применение в растениеводстве, фитопатологии, селекции и в других областях науки и отраслях производства. Насчитывается более 5 тыс. соединений, полученных из растений и микроорганизмов, обладающих регуляторным действием, из которых лишь 1% используется в мировой практике [8]. Выявление новых факторов, повышающих морфогенез каллусной ткани; устойчивость клеток в стрессовых условиях; коэффициент размножения растений и укоренение микропобегов при клональном микроразмножении растений является актуальной проблемой.

Разработанные подходы, методики, выявленные факторы могут не только способствовать повышению морфогенетического потенциала изолированных тканей в условиях *in vitro*, но и удешевлению процесса получения конечной продукции.

Следующим этапом работы явилось изучение влияния соотношения экзогенных регуляторов роста на процесс каллусогенеза. При этом важными моментами для определения наиболее эффективной среды были не только интенсивность каллусогенеза, но и достаточная выравненность этого процесса. Учитывали процент каллусогенеза и морфофизиологические особенности полученной каллусной ткани.

Первоначально изучали влияние различных концентраций НУК (0,5—3,0 мг/л) на процесс каллусогенеза на фоне постоянной концентрации кинетина (0,5 мг/л). Основные результаты представлены на рис. 3-5.

Как видно из рис. 3-5, каллусогенез — сложный процесс, который находится в непосредственной зависимости от применяемых гормонов, их концентрации, исследуемого генотипа и

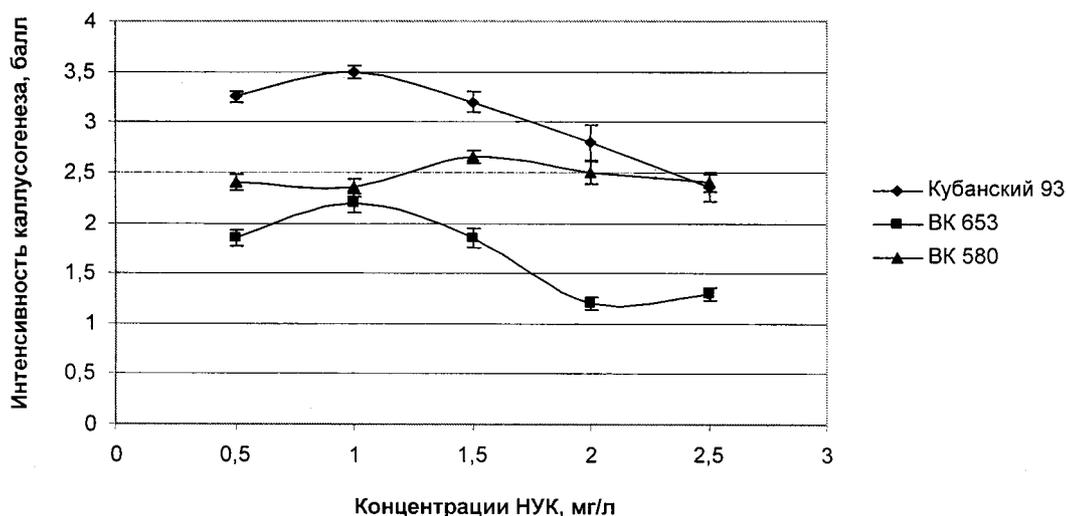


Рис. 3. Зависимость каллусогенеза от концентрации НУК в среде МС (изолированные зародыши)

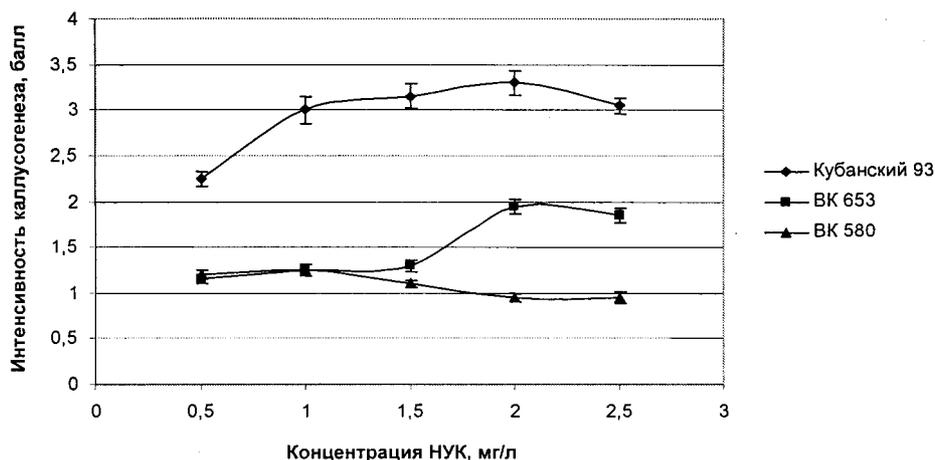


Рис. 4. Зависимость каллусогенеза от концентрации НУК в среде МС (изолированные семядольные экспланты)

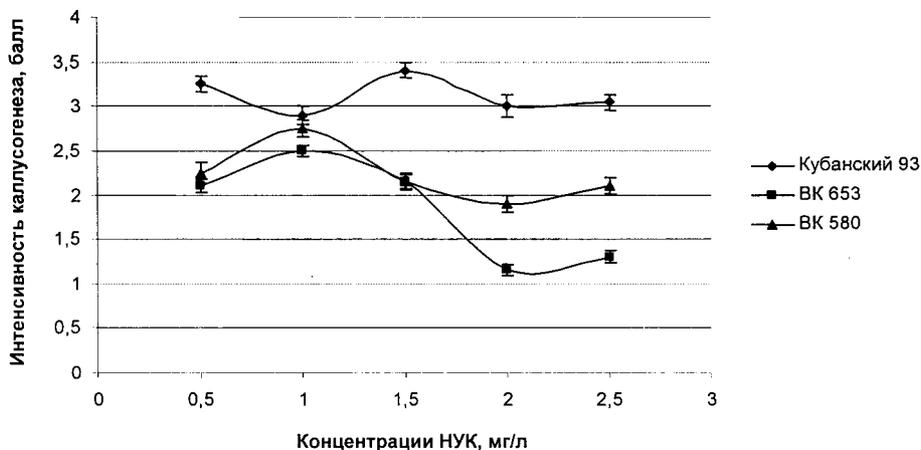


Рис. 5. Зависимость каллусогенеза от концентрации НУК в среде МС (изолированные гипокотильные сегменты)

типа первичного экспланта. Так, при использовании в качестве первичного экспланта изолированных зародышей наблюдается обратно пропорциональная зависимость между интенсивностью каллусогенеза и концентрации ауксина в питательной среде, при использовании сегментов семядольных листьев — прямая зависимость, а при использовании в качестве первичного экспланта гипокотильных сегментов интенсивность каллусогенеза не зави-

сит от концентрации НУК. Данная ответная реакция наиболее четко проявляется для сорта Кубанский 93 и линии БК 653, в то время как для линии БК 580 независимо от типа первичного экспланта изучаемый процесс имеет в пределах ошибки константную величину.

Определив экспериментально оптимальную концентрацию НУК (2 мг/л), при которой наблюдается максимальная пролиферативная активность кле-

ток, нами была проведена следующая серия экспериментов. Изучали влияние различных концентраций кинетина (0,5—3,0 мг/л) на процесс каллусогенеза на фоне постоянной концентрации НУК (2 мг/л). Основные результаты представлены на рис. 6-8.

Исследования показали, что увеличение концентрации кинетина в питательной среде приводит к значительному усилению пролиферативной активности каллусной ткани, которая проявлялась в увеличении интенсивности каллусогенеза. Причем максимальный прирост каллусной ткани отмечался для всех изучаемых генотипов и типов первичных эксплантов в варианте, где кинетин присутствовал в питательной среде в концентрации

1,0-1,5 мг/л. Увеличение его концентрации до 3,0 мг/л приводило к ингибированию процессов каллусогенеза. Это проявлялось, прежде всего, в неполной дедифференцировке клеток первичного экспланта.

Исследование морфофизиологических характеристик каллусных культур различных генотипов подсолнечника показало, что они состоят из гетерогенных по форме и размерам клеток. Преимущественно это крупные клетки, овальной или сильно вытянутой формы, с большой вакуолью и маленьким ядром, как это характерно для большинства клеточных суспензионных, но не каллусных культур растений. В большей степени эти изменения проявлялись на каллусной куль-

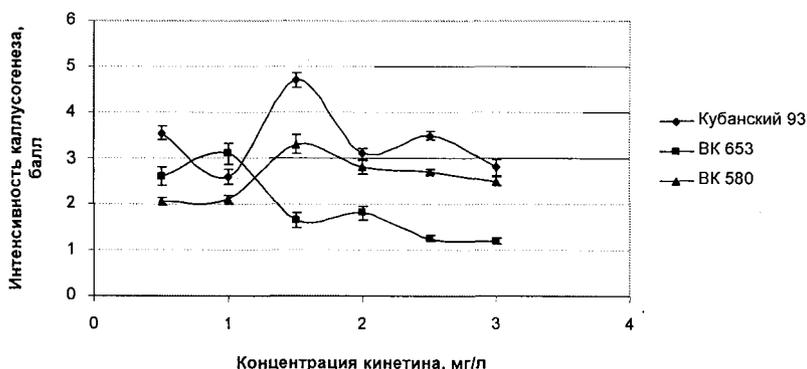


Рис. 6. Зависимость каллусогенеза от концентрации кинетина в среде МС (изолированные зародыши)



Рис. 7. Зависимость каллусогенеза от концентрации кинетина в среде МС (изолированные семядольные эксплянты)



Рис. 8. Зависимость каллусогенеза от концентрации кинетина в среде МС (изолированные гипокотильные сегменты)

туре, полученной из различных первичных эксплантов и культивируемой на питательной среде, содержащей различные соотношения гормонов. Установлено, что увеличение как концентрации ауксина (НУК 3,0 мг/л), так и цитокинина (кинетин 3,0 мг/л) в среде приводило к изменению морфобиологии каллусных клеток. Как правило, ткань в этих вариантах состояла из сильно вакуолизированных и вытянутых по форме клеток, и эти характеристики не зависели от исследуемого генотипа и типа первичного

экспланта (рис. 9А). Было сделано предположение, что такая вытянутая форма клеток связана с повышенным содержанием эндогенных гормонов, в частности, ауксинов в клетках первичного экспланта, а также в первичной и пересадочной каллусной ткани подсолнечника. Уменьшение концентрации гормонов в питательной среде, особенно ауксинов, приводило к формированию каллусной ткани, которая в основном состояла из мелких клеток округлой формы, способных в дальнейшем к морфогенезу (рис. 9Б).



Рис. 9. Морфобиологические характеристики каллусных клеток: А — среда, содержащая НУК 3,0 мг/л и кинетин 3,0 мг/л; Б — среда, содержащая НУК 1,0 мг/л и кинетин 1,0 мг/л

Таким образом, в результате многоплановых экспериментов установлено, что наиболее оптимальной питательной средой для получения хорошо пролиферирующей каллусной ткани, способной впоследствии к морфогенезу, является среда, содержащая НУК 1,0 мг/л и кинетин 2,0 мг/л. Оптимизированные условия культивирования каллусной культуры были нами применены в последующих экспериментах по клеточной селекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зезуль Т.Г., Горбатенко Э.В., Ралдугина Г.Н. Регенерация *in vitro* растений подсолнечника (*Helianthus annuus L.*) через соматический эмбриогенез // Генетика, 1995. Т. 31. № 2. С. 228-233. — 2. Калашиникова Е.А. Клеточная селекция растений на устойчивость к грибным болезням. Автореф. докт. дисс. М.: МСХА, 2003. — 3. Калашиникова Е.А., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. Практикум по с.-х. биотехнологии. М.: КолосС, 2006. — 4. Нгуен Т.Х. Ответная реакция различных генотипов подсолнечника на действие экзометаболитов *Sclerotinia sclerotiorum* / Тез. докл. междунар. конф. молодых уче-

ных. Приоритетный проект «Развитие АПК» — новые возможности для молодых ученых. М., 2006. С. 371—375. — 5. Нгуен Т.Т.А. Повышение устойчивости яровой пшеницы к абиотическим стрессам методами биотехнологии. Автореф. канд. дисс. М.: МСХА, 1995. — 6. Сидоров Н.В., Моргунов В.В., Логвиненко В.Ф. Особенности каллусо- и морфогенеза в культуре незрелых зародышей разных генотипов мягкой озимой пшеницы // Физиология и биохимия культурных растений, 1988. № 4. С. 349 — 353. — 7. Уцаповский И.В., Виноградова Е.Г., Нгуен Т.Х. Изучение генотипической реакции льна на хлорид натрия в культуре *in vitro* / Тез. докл. междунар. симп. «Современное состояние и перспективы развития селекции и семеноводства овощных культур». М., 2005. С. 434-441. — 8. Шевелуха В.С., Калашиникова Е.А., Воронин Е.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология: Учебник, 2-е изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа, 2003. — 9. Krauter R., Friedt W. // *Helia*, 1991; Т. 14. N 14. P. 117-121. — 10. Schmitz P., Schnabl H. // *J. Plant Physiol*, 1989. Т. 135. N 2. P. 223-227. — 11. Zambila N. // *Probleme Genet, theoret. appl. Fundulea*, 1989. Т. 21. N 1. P. 37-43.

SUMMARY

The morphogenetic potential of isolated tissue (cotyledonous and hypocotyls segments isolated on 5th day of the sterile sprouts, isolated germs) of sunflower in conditions *in vitro* was investigated. Callusogenesis depends on hormonal structure of the nutrient medium, genotype and the type of primary explants. An optimum nutrient medium containing NAA 1, 0 mg/l and Kinetin of 2 mg/l is good for reception of proliferation callus tissue, which enables the consequence of morphogenesis. Research into characteristics of merphophysiology callus tissues, was done and into the nutrient mediums containing various regulators of growth.