

УДК 573.086.581.085

Б.Е. Ертаева*, А.К. Амирова, Н.К. Бишимбаева
Институт биологии и биотехнологии растений НЦБ РК, МОН РК г. Алматы, Казахстан
*e-mail: bahyt.ertaeva@mail.ru

Морфогенез в культуре тканей отечественных сортов хлопчатника

Показана зависимость процесса каллусогенеза от типа, размера экспланта и состава питательной среды. Выявлены оптимальные питательные среды для каллусогенеза и соматического эмбриогенеза хлопчатника.

Ключевые слова: каллусные ткани, соматический эмбриогенез, морфогенез хлопчатника.

Б.Е. Ертаева, А.К. Амирова, Н.К. Бишимбаева

Отандық мақта сорттарының ұлпа культурасындағы морфогенез процесі

Каллусогенез процесінің экспланттың түріне, өлшеміне, және қоректік ортаның құрамына тәуелділігі көрсетілді. Мақта өсімдігінің соматикалық эмбриогенезі және каллусогенезі үшін оңтайлы қоректік орталар анықталды.

Түйін сөздер: каллус ұлпалары, соматикалық эмбриогенез, мақта морфогенезі.

B.E. Yertaeva, A.K. Amirova, N.K. Bishimbaeva

Morphogenesis in tissue culture of kazakh cotton varieties

Its presented the dependence of callus formation process on the type, size and composition of the explant culture medium. The optimal culture media are revealed for callus formation and somatic embryogenesis in cotton.

Keywords: callus tissue, somatic embryogenesis, morphogenesis of cotton.

Хлопчатник (*Gossypium hirsutum* L.) относится к группе волокнистых растений, по количеству и ценности получаемых продуктов занимает первое место среди сельскохозяйственных технических культур: он дает 70-75% прядильного сырья [1].

Развитие клеточной и генетической инженерии позволяет значительно расширить генетическое разнообразие и ускорить селекционный процесс. Разработка клеточных технологий генетического улучшения хлопчатника сдерживается существенной зависимостью процесса морфогенеза и регенерации растений от исходного генотипа. Все существующие биотехнологии хлопчатника, в основном, ограничиваются двумя-тремя сортами разновидности Сокер (*Gossypium hirsutum* L.) с высокой регенерационной способностью [2, 3].

Материалы и методы

Объектами исследования служили районированные сорта хлопчатника казахстанской селекции - Мактаарал-4003, Мактаарал-4005, Мактаарал-4006, Мактаарал-4007, Мактаарал-4011, Мактаарал-4019, Пахтаарал-3044.

При проведении экспериментов с культурой тканей руководствовались общими

методическими приемами, описанными Ф.Л. Калининым с соавторами [4].

В качестве эксплантов для каллусогенеза использовали гипокотили и семядоли, извлеченные из 5-7 дневных стерильных проростков хлопчатника. Экспланты различной длины – 0,5-3,0 см семядоли, 0,5-1,0 см гипокотили – высаживали на агаризованную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) [5], дополненную различными концентрациями 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-Д) – 0,1; 0,5; 1,0 мг/л и соотношением (0,1мг/л) 2,4-Д и кинетина (0,5 мг/л). Экспланты инкубировали на свету при 16-часовом фотопериоде и температуре 28±2°C. Частоту каллусогенеза оценивали через 30-40 дней после инкубирования и выражали в процентах от количества высаженных эксплантов. Для индукции соматического эмбриогенеза первичные каллусные ткани высаживали на различные питательные среды Мурасиге и Скуга: 1) МС, содержащая двойную концентрацию KNO₃ и 3% мальтозы; 2) МС с 1/5 состава минеральных солей и 1% мальтозы; 3) МС (полный состав), содержащая 3% мальтозы; 4) МС с 1,0 мг/л 2,4-Д и 1000 мг/л гидролизатом казеина (ГК). Все эксперименты проводились в 3-х повторностях.

Для получения постоянных препаратов каллусы фиксировали в фиксаторе Чемберлена (70% раствор этилового спирта – 90 частей; формалин – 5 частей; ледяная уксусная кислота – 5 частей). Постоянные гистологические препараты готовили по З.П. Паушевой [6]. Препараты изучали и фотографировали на микроскопе «Leika» (Австрия). Статистическую обработку результатов исследований проводили по общепринятым методикам [7]. Построение диаграммы проводили с использованием программы «Microsoft Excel».

Результаты и их обсуждение

Известно, что концентрация 2,4-Д играет важную роль в процессе каллусогенеза и инициации эмбрионных компетентных клеток. Так, в результате скрининга различных концентраций 2,4-Д была достигнута индукция соматического эмбриогенеза на средах с высокими концентрациями 2,4-Д [8, 9]. В связи с этим, для индукции каллусных тканей хлопчатника также использовали различные концентрации 2,4-Д. Из 5-7 дневных стерильных проростков хлопчатника сорта Мактаарал-4005 извлекали экспланты (гипокотили и семядоли) и высаживали на питательную среду МС с различными концентрациями 2,4-Д.

- 1) среда МС, дополненная 0,1 мг/л 2,4-Д
- 2) среда МС, дополненная 0,5 мг/мл 2,4-Д
- 3) среда МС, дополненная 1,0 мг/л 2,4-Д

4) среда МС, дополненная 0,5 мг/л кинетина и 0,1 мг/л 2,4-Д;

Через 2 недели под микроскопом наблюдали появление первичных каллусов каллусов. Предварительный анализ различных питательных сред относительно индукции каллусных тканей показал, что для обоих типов эксплантов наиболее оптимальными являются среды МС с 1,0 мг/л 2,4Д и МС с 0,5 мг/л кинетина и 0,1 мг/л 2,4Д. На среде МС с 1,0 мг/л 2,4 Д, частота каллусогенеза для семядольных листьев составила $80,0 \pm 7,4\%$, для гипокотилей – $66,0 \pm 8,7\%$. На среде МС с 0,5 мг/л кинетином и 0,1 мг/л 2,4-Д частота каллусогенеза для семядольных листьев составила $66,0 \pm 8,7\%$, для гипокотилей – $76,0 \pm 7,5\%$ (табл 1).

Изучение индукции каллусных тканей в зависимости от размера эксплантов показало, что семядольные листья и гипокотили размером 0,5 см не пригодны в качестве экспланта, так как они обладают низкой способностью к каллусогенезу (табл. 2). Самый высокий уровень каллусогенеза наблюдается в отрезках семядольных листьев размером 1,5-2,0 см и гипокотилей – 0,5-0,7 см. Более крупные экспланты семядоли 2,0-2,5 см и гипокотили 0,7-1,0 см, показывают худшие результаты. Следовательно, для индукции каллусов желательнее использовать в качестве эксплантов семядольные листья 1,5-2,0 см, и гипокотили 0,5-0,7 см, из которых достигнут самый высокий процент каллусогенеза.

Таблица 1 – Каллусообразующая способность хлопчатника сорта Мактаарал-4005 в зависимости от состава питательной среды

Тип экспланта	Размер экспланта, см	Процент каллусогенеза (%)			
		0,1 мг/л 2,4 Д	0,5 мг/л 2,4 Д	1,0 мг/л 2,4 Д	0,5 мг/л кинетина и 0,1 мг/л 2,4 Д
семядоля	1,5-2,0	$33,0 \pm 8,9$	$46,0 \pm 5,3$	$66,0 \pm 8,7$	$64,0 \pm 9,5$
гипокотиль	0,5-0,7	$54,0 \pm 6,7$	$61,0 \pm 5,1$	$80,0 \pm 7,4$	$76,0 \pm 7,5$

Таблица 2 – Каллусообразующая способность хлопчатника сорта Мактаарал-4005 в зависимости от размера эксплантов

Тип экспланта	Размер экспланта, см	% каллусогенеза
Семядольные листья	0,5	$29,0 \pm 1,0$
	0,5-1,5	$42,0 \pm 3,9$
	1,5-2,0	$81,8 \pm 2,0$
	2,0-3,0	$61,1 \pm 2,5$
Гипокотили	0,5	$14,2 \pm 2,2$
	0,5-0,7	$96,0 \pm 1,5$
	0,7-1,0	$54,5 \pm 2,2$

В первичной культуре каллусов, полученных из семян и гипокотилей семи отечественных сортов хлопчатника, идентифицировано 3 типа тканей: I – серовато-белый рыхлый морфогенный; II – белый матовый плотный неморфогенный; III – бурый неморфогенный. Серовато-белый рыхлый морфогенный каллус (I тип) отобран нами для исследований, другие два типа первичных каллусов II и III типы оказались морфологически не перспективными (быстро чернели и плохо росли).

Результаты по оптимизации условий каллусогенеза эксплантов сорта Мактаарал-4005 использованы для получения каллусов у остальных шести сортов хлопчатника. Для индукции каллусных тканей гипокотили и семядоли хлопчатника сортов Мактаарал-4003, Мактаарал-4006, Мактаарал-4007, Мактаарал-4011, Мактаарал-4019, Пахтаарал-3044 высажены на выявленные нами выше оптимальные варианты сред: 1) МС с 1,0 мг/л 2,4-Д; 2) МС с 0,5 мг/л кинетина и 0,1 мг/л 2,4-Д. Обе питательные среды оказались приемлемыми для получения каллусов и показали хорошие результаты. На рисунке 1 приведены результаты анализа каллусогенеза для семи сортов хлопчатника на среде МС с 0,5 мг/л кинетина и 0,1 мг/л 2,4-Д.

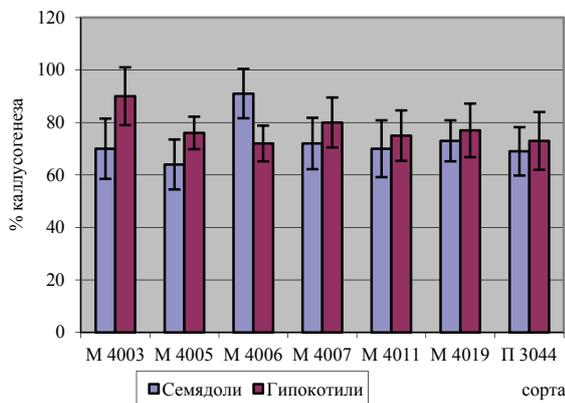


Рисунок 1 – Каллусообразующая способность эксплантов различных сортов хлопчатника на среде МС с 0,5 мг/л кинетина и 0,1 мг/л 2,4-Д

Показано, что частота каллусогенеза различных сортов хлопчатника варьирует от 64% до 91% для семядолей, от 72% до 90% – для гипокотилей.

Для инициации соматических эмбрионидов первичные каллусные ткани хлопчатника сорта Мактаарал-4005 были высажены на четыре варианта сред:

- 1) МС, содержащая двойную концентрацию KNO_3 и 3% мальтозы;
- 2) МС с 1/5 состава минеральных солей 1% мальтозы;
- 3) МС (полный состав), содержащая 3% мальтозы;
- 4) МС с 1,0 мг/л 2,4-Д и 1000 мг/л гидролизата казеина (ГК).

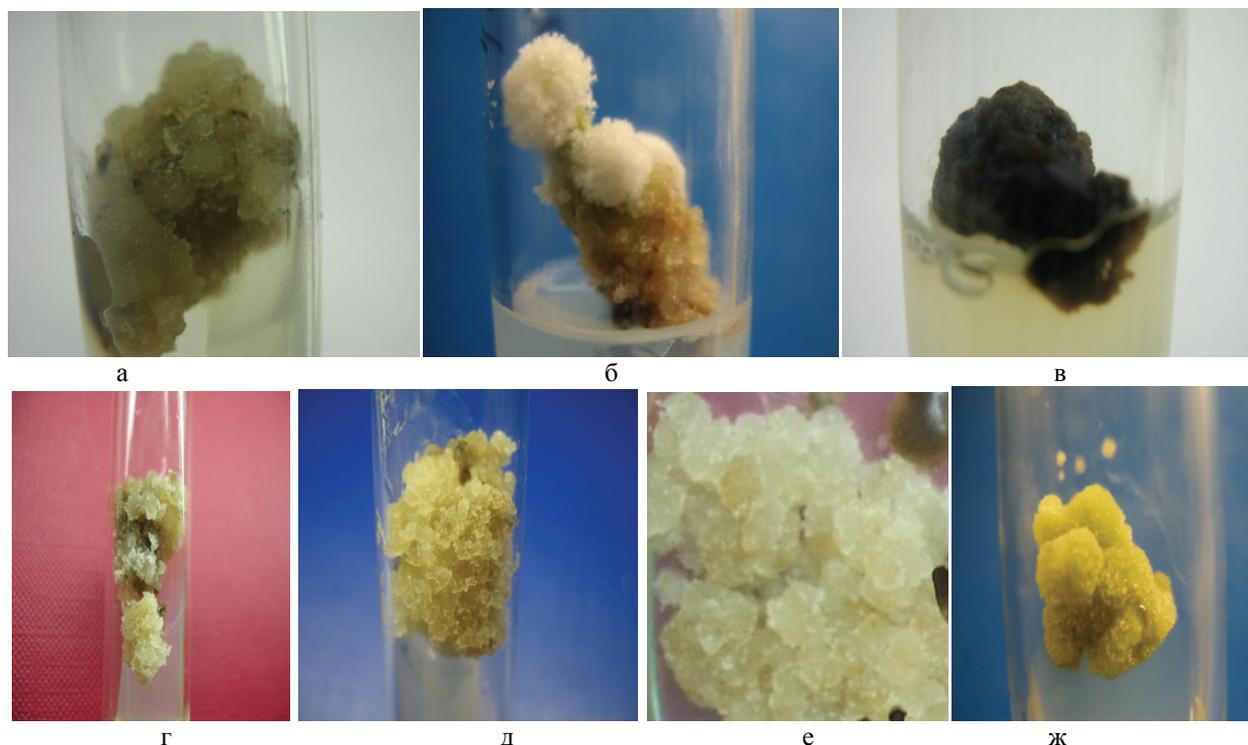
В процессе субкультивирования I типа ткани происходит метаморфоз первичного каллуса с образованием серовато-белого глобулярно-морфогенного каллуса (IV тип) и полупрозрачного желтоватого рыхлого эмбриогенного каллуса (V тип). IV тип ткани получен при субкультивировании серовато-белых рыхлых каллусов I типа в течение двух пассажей (60-70 дней) на среде МС с 1,0 мг/л 2,4-Д и 1000 мг/л гидролизата казеина (ГК). Полупрозрачный желтоватый рыхлый эмбриогенный каллус (V тип) образуется при субкультивировании I типа ткани в течение 2-х последовательных пассажей (60-70 дней) на среде МС с удвоенной концентрацией KNO_3 и 3% мальтозы.

В последующем из IV типа ткани получен матовый белый каллус (VI тип) и зеленый плотный эмбриогенный каллус (VII тип) (рисунок 2).

Все четыре варианта среды для образования эмбриогенного каллуса были взяты нами неслучайно. Первый вариант среды МС с двойной концентрации KNO_3 и 3% мальтозой был использован в работе Kumria R. и др. [10] для дифференциации соматических эмбрионидов. Второй и третий варианты сред (полный состав МС и 1/5 МС) также были использованы в работе Kumria R. и др. и Trolinder N.L., Goodin J.R. [10, 11] для стимуляции различных этапов соматического эмбриогенеза хлопчатника, и четвертый вариант – среда МС с 1,0 мг/л 2,4-Д и 1000 мг/л ГК ранее был использован в опытах для получения эмбриогенных каллусов пшеницы [8, 9]. Из таблицы видно, что среда МС с двойной концентрацией KNO_3 и 3% мальтозой стимулирует формирование эмбриогенного каллуса. На средах с обычной концентрацией KNO_3 (1/5 МС и полный состав МС с 3% мальтозой) наблюдается очень низкий

выход эмбрионных каллусов. На четвертом варианте среды (МС с 1,0 мг/л 2,4-Д и 1000 мг/л

ГК) процент образования эмбрионных каллусов составил 18%.



(а) – серовато-белый рыхлый морфогенный (I тип); (б) — белый матовый плотный неморфогенный (II тип); (в) – бурый неморфогенный (III тип); (г) – серовато-белый глобулярный морфогенный (IV тип); (д) – рыхлый эмбрионный полупрозрачный желтоватый (V тип), (е) – матовый белый рыхлый эмбрионный (VI тип), (ж) – зеленый плотный эмбрионный (VII тип) каллусы

Рисунок 2 – Морфология различных типов каллусных тканей хлопчатника

Таблица 3 – Индукция эмбрионного каллуса сорта Мактаарал-4005 на разных вариантах сред

№	Состав среды	Количество посаженных каллусов	Количество образовавшихся эмбрионных каллусов, %
1	МС, содержащая двойную концентрацию KNO_3 и 3% мальтозы	68	20,54±7,1
2	МС, с 1/5 состава минеральных солей 1% мальтозы	31	6,45±2,1
3	МС (полный состав), содержащая 3% мальтозы	22	4,55± 2,0
4	МС с 1,0 мг/л 2,4 Д и 1000мг/мл ГК	22	18,0±4,4

Выявлено, что оптимальными условиями для каллусогеза семи изученных отечественных сортов являются среды МС с 1,0 мг/л 2,4-Д и МС, содержащая 0,5 мг/л кинетина и 0,1 мг/л 2,4-Д. В культуре тканей хлопчатника идентифицировано три типа первичных каллусов. Все типы морфогенных каллусов получены из обоих типов эксплантов (гипокотили и семядоли). Выделен морфогенетически перспективный и универсальный для семи изученных генотипов

хлопчатника тип ткани – серовато-белый рыхлый каллус (I тип), из которого индуцированы различные типы эмбрионных тканей, отличающихся стадией развития соматических эмбрионов. Отобраны питательные среды для индукции соматического эмбриогенеза: среда МС, содержащая двойную концентрацию KNO_3 и 3% мальтозы и среда МС с 1,0 мг/л 2,4-Д и 1000мг/л ГК.

Литература

- 1 Умбетаев И.И. Технология возделывания отечественных сортов хлопчатника – Алматы, 2005. – 235 с.
- 2 Smith R.H., Smith J.W., Park S.H. Cotton Transformation: Successes and Challenges / Liang G.H., Skinner D.Z. Genetically modified crops. Their development, uses and risks // Food Products Press, New York. – 2004. – P. 247-257.
- 3 Zapata C., Park S.H., El-Zik K.M., Smith R.H. Transformation of a Texas cotton cultivar by using Agrobacterium and the shoot apex // Theoretical and Applied Genetics. – 1999. – V. 98. – P. 252-256.
- 4 Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Науково думка, 1980. – 407с.
- 5 Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
- 6 Паушева З.П. Практикум по цитологии растений – М.: «Агропромиздат», 1988. – 272 с.
- 7 Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
- 8 Vasil I.K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops // J. Plant Physiol. – 1987. – V. 128. – P. 193-218.
- 9 Амирова А.К., Бишимбаева Н.К. Влияние 2,4-Д на процесс соматического эмбриогенеза в длительно культивируемых каллусных тканях пшеницы // Биотехнология. Теория и практика. – 2004. – № 3. – С. 42-47.
- 10 Kumria R., Sunnichan V.G., Das D.K., Gupta S.K., Reddy V.S., Bhatnagar R.K., Leelavathi S. High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 21. – P. 635-639.
- 11 Trolinder N.L., Goodin J.R. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium L*). Effects of source of explant and hormone regime // Plant Cell Tissue Organ Culture. – 1988. – V. 12. – P. 178 -181.