

УДК 57.017.35:633.31/.37

Б.А. Жумабаева*, Э.Д. Джангалина, З.Г. Айташева
 Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
 *E-mail: Beibytgul.Zhumabaeva@kaznu.kz

Морфогенетические реакции в культуре тканей зерновых бобовых культур

Представлен краткий обзор литературных данных по морфогенезу зерновых бобовых культур в условиях *in vitro*. Проведенный анализ отечественных и зарубежных литературных источников показал, что морфогенетические реакции зерновых бобовых культур находятся под контролем гормональных факторов и зависят от состава питательных сред, условий культивирования и генетического происхождения исходного материала. Показано, что для зерновых бобовых культур разработка систем регенерации является особенно актуальным и перспективным направлением для изучения клеточных механизмов дифференцировки и морфогенеза в культуре *in vitro*.

Ключевые слова: культура тканей растений, морфогенез, бобовые.

B.A. Zhumabaeva, E.D. Dzhangalina, Z.G. Aitasheva
Morphogenetic reaction in tissue culture of leguminous plants

Brief overview of modern data on the morphogeny of leguminous plants *in vitro* conditions is presented. Considerable progress is shown for studies on morphogenic potential in tissue culture of leguminous plants.

Keywords: plants tissue culture, morphogenesis, legumes.

Б.А. Жумабаева, Э.Д. Джангалина, З.Г. Айташева
Дәнді-бұршақты дақылдардың ұлпа культурасында морфогенетикалық реакциялар

Бұршақ тұқымдастары өсімдіктерінің *in vitro* жағдайындағы морфогенез үдерісі бойынша қысқа әдебиеттік шолудан деректер ұсынылған. Бұршақ дақылдық өсімдіктерінің ұлпа дақылдарының морфогенетикалық қабілетін зерттеу саласындағы едәуір жетістіктер көрсетілген.

Түйін сөздер: өсімдік ұлпалар культурасы, морфогенез, бұршақ тұқымдастар.

Обеспечение населения полноценными продуктами питания зависит от решения актуальных проблем кормопроизводства, в частности проблемы кормового и продовольственного белка, имеющей глобальное значение. Для регионов зоны рискованного земледелия, куда входит Казахстан, решающая роль принадлежит селекции новых сортов зернобобовых культур (семейство *Leguminosae*), обеспечивающих высокие урожаи кормовой массы и стабильный семеноводческий процесс в жестких условиях резко континентального климата.

Зерновые бобовые культуры занимают особое место среди сельскохозяйственных растений как основные источники высококачественного

растительного белка, который является важным ресурсом незаменимых аминокислот для питания человека и животных. Одной из задач селекции сельскохозяйственных растений является получение новых сортов с высокой продуктивностью и содержанием белка, а также сбалансированным аминокислотным составом.

В качестве основного источника растительного белка в мировом сельском хозяйстве используется соя (*Glycine max L.*), благодаря сравнительно высокой урожайности и содержанию белка (до 50%), во многом аналогичного животному. Второе место после сои среди бобовых продовольственных культур сегодня во всём мире занимает фасоль (*Phaseolus*

vulgaris L.). **Интенсификация производства бобовых культур** ставит перед учеными сложные задачи по созданию новых сортов, отличающихся высокой урожайностью, устойчивостью к болезням и вредителям, стрессовым факторам внешней среды, высокой фенотипической пластичностью. Создание исходного материала для селекции требует расширения генетического разнообразия, что даст возможность повысить устойчивость новых сортов к биотическим стрессам и увеличить их адаптивность к меняющимся условиям среды. В последние десятилетия методы биотехнологии находят все большее применение в селекции, размножении редких и исчезающих видов, создании генетических коллекций растительных ресурсов [1].

Культивирование клеток и тканей растений открывает принципиально новые перспективы перед различными областями биологии. Из культивируемой растительной клетки можно получить целостное растение, что достигается, благодаря ее тотипотентности, т. е. уникальной способности не только дедифференцироваться и делиться, но и давать начало организованным структурам. Регенерацию растений из культуры тканей можно достичь, используя один из трех методов: культуру зародышей, соматический эмбриогенез и органогенез. Из эмбрионидных структур и почек обычно легко получить целостное растение, чем из зародышей [2, 3, 4].

В ходе морфогенеза возникают сформированные заново ткани и органы, и соответствующие этому процессы носят названия, отражающие существо морфогенеза – соматический эмбриогенез, гистогенез, ризогенез, гемморизогенез, флоральный геммогенез [5]. Однако клеточный и молекулярный механизм индукции морфогенеза в культуре клеток пока не ясен. Так, в литературе почти не встречается исследований процесса морфогенеза в культуре тканей и клеток зернобобовых культур, хотя они имеют большое народно-хозяйственное значение. Морфогенез возможно регулировать с помощью фитогормонов, изменением состава питательных сред, условий культивирования, а также используя виды и сорта, обладающие высоким регенерационным потенциалом в культуре *in vitro*. Последний фактор особенно важен при проведении работ по культивированию клеток и тканей представителей семейства бобовых,

у которых видовые и сортовые особенности проявляются на уровне морфогенетических процессов [6].

Из-за недостаточности знаний регуляторных механизмов клеточной дифференцировки исследователи еще не могут установить взаимосвязь явлений, происходящих на молекулярном уровне при переходе клетки к морфогенезу в культуре *in vitro*. Существуют большие различия в морфогенетическом потенциале растений, то есть их способности регенерировать *in vitro*. Известно, что двудольные растения регенерируют лучше однодольных. **Регенерационный потенциал** однолетних растений выше многолетних. Имеются различия между видами в пределах семейств, а также между сортами в пределах видов культурных растений. В ряде работ установлены тип наследования и локализация генов, ответственных за регенерацию генов *in vitro*, что позволяет использовать отдельные генотипы с высоким морфогенетическим потенциалом как доноры этого признака в селекции [7, 8]. При культивировании клеток и тканей гороха на искусственных средах имеются многочисленные доказательства проявления генетической изменчивости, как на клеточном уровне, так и у растений-регенерантов. О. И. Кузнецовым с соавт. получены две группы растений-регенерантов у разных генотипов гороха. К первой группе относились растения-регенеранты из каллусов, культивированных в течение 8 месяцев, ко второй - из длительно культивируемых (более 10 лет). Проведенное с помощью методов RAPD и ISSR сравнение степени генетических различий между регенерантами и исходными линиями показало, что растения-регенеранты обеих групп отличаются от исходных линий и между собой по полиморфизму ДНК, а уровень дивергенции зависит от исходного генотипа [9]. В длительно-пассируемых каллусных тканях гороха для обеспечения активных пролиферативных и регенерационных процессов, эффективно через 3-4 пассажа чередование циклов культивирования на средах с низким содержанием НУК и с более высоким. Соболевой Г.В. были проведены исследования по клеточной селекции гороха на устойчивость к засухе. Сравнительный анализ по основным хозяйственно-ценным признакам показал, что большинство регенерантных линий достоверно превысили исходный сорт по многим изученным признакам. Регенерантные линии

оказались более длинностебельными и более позднеспелыми [10].

Способность к морфогенезу вряд ли связана с принадлежностью растения к определенным таксонам, поскольку в одном и том же семействе встречаются виды с высоким и низким морфогенетическим потенциалом. Это можно сказать и о разных сортах одного и того же вида. На каллусных культурах дикорастущих видов люцерны установлена строгая корреляционная зависимость морфогенетической способности эксплантов от генетического происхождения образцов [11]. Проявление разного рода изменений у потенциально тотипотентных растительных клеток – это следствие дифференциальной экспрессии генов, регулируемой на разных уровнях клеточного метаболизма. Кроме того, в клетках в процессе эволюции сформировался согласованный ряд регуляторных механизмов, каждый из которых контролирует экспрессию генетической информации для различных специализированных клеток. Регуляторная система включает в себя факторы внешней среды, такие, как световые условия и градиенты распределения гормонов или других веществ [12]. Отмечаются также преимущества выбора факторов культивирования перед селекцией клеток с улучшенной продуктивностью. Однако не существует единых правил для определения внешних факторов культивирования, которые бы способствовали формированию и развитию специализированных систем клеток.

Удалось установить, что клетки представителей близких видов или одного вида растений различным образом реагируют на добавление к питательной среде стандартного набора гормональных индукторов (ауксины, цитокинины, гибберелловая кислота) [13]. Такая разная морфогенетическая реакция может определяться особенностями эндогенной гормональной регуляции, свойственной этим растениям. В данных случаях морфогенетически активными индукторами способны оказаться не гормоны, внесенные в питательную среду, а их антагонисты, которые при внесении в эту среду снижают содержание гормонов ткани. Поэтому одна из важных задач исследователей - поиск и испытание синтетических соединений гормонального и антигормонального действия, обладающих морфогенетической активностью [14].

Однако такой эмпирический подход не

уменьшает насущной необходимости глубоких исследований механизма морфогенеза. Морфогенетический потенциал растительной клетки проявляется в системах *in vitro* в более широком диапазоне, чем в природных условиях, благодаря эволюционно обусловленной у сосудистых растений способности к регенерации. В зависимости от сочетания внутренних и внешних факторов, определяющих начальные условия, возможны разные морфогенетические сценарии, что порождает трудности регуляции морфогенеза в системах *in vitro*. В работе Журавлева Ю.Н. и Омелько А.М. показано, что индукция морфогенеза может осуществляться с помощью экзогенных регуляторов и путем генетической трансформации генами *rol* [15]. К главным условиям, необходимым для индукции программ регенерации, относятся нарушение целостности и создание асимметрии. В опытах *in vitro* эти условия достигаются повреждением, экстрадигацией экспланта, разнообразными физическими, прежде всего, субоптимальными температурными воздействиями, изменением освещенности и добавлением в питательную среду физиологически активных соединений.

Особый интерес вызывает роль фитогормона абсцизовой кислоты (АБК) в этих процессах, поскольку хорошо установлена роль АБК как одного из ведущих фитогормонов-регуляторов процессов морфогенеза в культуре *in vitro* [16,17]. Так, например, установлено, что экзогенная АБК участвует в регуляции экспрессии генов, кодирующих специфические белки при эмбриоидогенезе и зиготическом эмбриогенезе яровой мягкой пшеницы [18]. На каллусных культурах люпина узколистного и фасоли обыкновенной изучено влияние БАП на процессы морфогенеза в культуре *in vitro*. Установлено, что диапазон оптимальных концентраций БАП для индукции прямого морфогенеза из тканей гипокотыля и семядольного узла люпина находится в пределах 2 - 4 мг/л, а фасоли - 5 мг/л, но в присутствии аденин сульфата. Повышение концентрации БАП до 6 мг/л приводит к увеличению морфогенетического потенциала люпина узколистного, но сопровождается развитием аномальных укороченных побегов [19, 20].

В работах Mohamed F. с соавторами на культуре тканей фасоли обыкновенной изучено влияние традиционных индукторов процессов каллусогенеза и органогенеза (БАП, ИУК), а

также синтетических аналогов фитогормонов: фенилметилпуринамина (N-(phenylmethyl)-1-pyrrol-6-amine) и фенилтиазол-мочевины (N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea) [21]. Одновременное добавление в питательную среду ИУК и фенилтиазол-мочевины индуцировало образование множественных побегов и розеток. Велтчевой М. Р. было показано, что предварительная культивация семян различных генотипов фасоли обыкновенной на средах с синтетическими аналогами фитогормонов стимулирует процессы соматического эмбриогенеза и регенерации [22].

В последнее время уделяется большое внимание по проведению исследований процесса морфогенеза и регенерации трансгенных растений. Для бобовых, которые считаются сложными объектами для трансформации, регенерация *in vitro* в высокой степени определяется генотипом, и сорта, способные к регенерации, встречаются не часто [15]. Регенерация побегов из семядольного узла или других меристематических эксплантов у многих видов бобовых представляется

сравнительно эффективным методом для трансформации бобовых культур. Перспективна интрогрессия ценных генов из других видов, а также диких аборигенных популяций. Имеются положительные опыты передачи полезных свойств в геном фасоли обыкновенной методами биотехнологии [23]. Например, разработаны методы генетической трансформации фасоли обыкновенной и клевера лугового [24, 25, 26], а также выделение протопластов из клеточной культуры гороха [27].

Таким образом, проведенный анализ литературных данных показывает, что у зернобобовых наблюдается зависимость процесса морфогенеза от трофических и гормональных факторов питательной среды, а также генетических особенностей культур. В то же время на сегодняшний день относительно мало известно о влиянии регуляторов роста на процессы дифференцировки и морфогенеза в культуре тканей зернобобовых, в частности о взаимосвязи активности ферментных систем с морфогенетическим потенциалом изолированных клеток растений.

Литература

- 1 Рожанская О.А. Создание исходного материала для селекции кормовых культур в условиях Сибири с помощью методов биотехнологии: дис. ... доктора биол. наук: 06.01.05 защищена 18.10. 2007 / Рожанская Ольга Александровна. – Санкт-Петербург, 2008. – 373 с. <http://www.famous-scientists.ru/list/649>.
- 2 Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 152 с.; – ISBN 5-89240-059-х.
- 3 Носов А.М. Культура клеток высших растений уникальная система, модель, инструмент // Физиология растений. – 1999. – Т.46, №6. – С.837-844.
- 4 Митрофанова И. В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* культурных растений // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т. 41, № 6. – С. 496-508.
- 5 Бибилова А.В., Горпенченко Т.Ю., Журавлёв Ю.Н. Растения как объект биотехнологии // Комаровские чтения. – 2007. – Вып. 55. – С. 184–211.
- 6 Zgagacz E.S., Rybczynski J.J. Difference *in vitro* responses of three species of lupin / J. Appl. Genet. – 1996. – 37A. – P. 133-135.
- 7 Андреев И.О., Спиридонова Е.В., Майданюк Д.Н., Кунах В.А. Генетические эффекты культивирования *in vitro* тканей кукурузы // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 6. – С. 487-495.
- 8 Жумабаева Б.А. Каллусогенез и регенерация растений сорта пшеницы Казахстанская -126 // Вестник КазНУ, серия биологическая. – 2008. – №1(36). – С. 98.
- 9 Кузнецова О.И., Аш О.А., Гостимский С.А. Изучение влияния продолжительности культивирования каллусов на накопление генетических изменений у регенерантов гороха (*Pisum sativum* L.) // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 5. – С. 684-692.
- 10 Соболева Г. В. Клеточная селекция гороха (*Pisum sativum*) на устойчивость к засухе // Материалы IX Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». – М., 2008. – С. 354-355.
- 11 Джангалина Э.Д., Сванбаев Е.С., Таукелева Ш.Н., Утеулин К.Р. Эмбрионные каллусные культуры люцерны // Известия НАН РК, серия биологическая и медицинская. – 2002. – № 1. – С. 65-69.
- 12 Юсуфов А.Г., Алиева З.М. Начальные этапы морфогенетических изменений у изолированных семядолей, гипокотилей и листьев фасоли и баклажана в условиях солевого стресса // Физиология растений. – 2002. – Т.49, №6. – С.886-889.
- 13 Магомедова М.А., Юсуфов А.Г. Специфика дифференциации и потенции морфогенезе у структур растений // Труды VII Международной конференции по морфологии растений, посвященной памяти Серебряковых. – М., 2004. – С.273.
- 14 Джангалина Э.Д., Хожамуратов С.Ш., Кукишева А.А. Влияние синтетических регуляторов роста на морфогенетические

реакции в каллусных культурах люцерны // Вестник КазНУ, серия биологическая. – 2010. – № 3(45). – С. 39-42.

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

16 Manoj K. R., Shekhawat N. S., Harish, Amit K. Gupta, M. Phulwaria, Kheta Ram and U. Jaiswal The role of abscisic acid in plant tissue culture. – Plant cell, tissue and organ culture. – 2011. – Vol.106, № 2. – P. 179-190.

17 Зайнутдинова Э. М. Н. Н. Круглова, И. Ф. Шаяхметов. Роль АБК в соматическом эмбриогенезе растений в культуре *in vitro* / Физиология и биохимия культ. Растений. – 2005. – Т. 37, № 3. – С. 208-219.

18 Катасонова А.А., Шаяхметов И.Ф., Круглова Н.Н. Этапы биотехнологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы путем эмбриоидогенеза в каллусной культуре *in vitro* / Известия Челябинского научного центра. – 2006. – Вып. 2 (32), – С.78-82.

19 Фоменко Т.И., Малюш М.К. Особенности морфогенеза и регенерации растений в культуре *in vitro* люпина узколистного / Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. – Т. 42, № 4. – С. 306-314.

20 Gatica A. M., Jenny M. V., Pilar R. F. Marta V. M. *In vitro* plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate / Electronic Journal of Biotechnology. – 2010. – Vol. 13, №.1. – P. 2-8

21 Mohamed F., Mohamed E., Dermot P., Paul E. Shoot organogenesis in callus induced from pedicel explants of Common Bean (*Phaseolus vilgaris. L.*) / J. Amer. Soc. Hort. Sci. – 1993. – Vol.118 (1). – P. 158-162.

22 Veltcheva M. R., Svetleva D. L. *In vitro* regeneration of *Phaseolus vulgaris L.* via organogenesis from petioles explants / Journal Central European Agriculture. – 2005. – Vol. 6, №1. – P.53-58.

23 Clemente A., Mackenzie D., Johnson I.T., Domoney C. Investigation of legume seed protease inhibitors as potential anti-carcinogenic proteins /5th Europ. Conf. on Grain Legumes. Dijon -France. – 2004. – P.51-52.

24 Chandra A., Pental D. Regeneration and genetic transformation of grain legumes: An overview / Current Science. – 2003. – Vol. 84, №3. – P. 381 – 387.

25 Янчевская Т. Г. Динамика роста трансформированных растений клевера лугового (*Trifolium pratense*) в различных условиях минерального питания / Известия Национальной академии наук Беларуси. – 2012. – № 1. – С. 31-35.

26 Mohamed F., Mohamed Jun Cao and Ehizabeth D. Eale Toward production of genetically modified common bean via agrobacterium-mediated transformation / International Journal of Food Science & Technology. – 2008. – № 12. – P.147-148.

27 Amugune N.O., Anyango B., Mukiyama T.K. Agrobacterium-mediated transformation of common bean /African Crop Science Journal. –2011. –Vol.19, № 3. – P. 137-147.

28 Ochatt S., Durieu P., Jacas L., Pontécaille C. Protoplast, cell and tissue cultures for the biotechnological breeding of grass pea (*Lathyrus sativus L.*) / Lathyrus Lathyrism Newsletter 2. – 2001. – P. 34-38.