
В данной работе приведены результаты выделения и идентифицирования по морфолого-культуральным особенностям 4 видов цианобактерий, выделенных из сточных вод вахтового района Каламкас.

Results of isolation and identification by studying the morphological and cultural characteristics of four species of cyanobacteria wastewater of the vakhty area Kalamkas are given in this work.

О.А. Авксентьева, В.В. Жмурко

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПУТЕЙ МОРФОГЕНЕЗА *IN VITRO* ИЗОГЕННЫХ ПО ГЕНАМ *PPD* ЛИНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM L.*

(Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина)

Исследованы особенности различных путей морфогенеза in vitro (каллусогенез, прямой и непрямой морфогенез) изогенных по генам PPD линий озимой пшеницы сорта Мироновская 808. Определены оптимальные условия для изучаемых процессов, показана их зависимость от типа выбранного экспланта, состава среды и условий культивирования. Выявлены различия среди изогенных линий в размерах клеток каллусных тканей, скорости их формирования, проявлении морфогенетического потенциала. Показана способность генетической системы контроля фотопериодической чувствительности пшеницы in vivo детерминировать различные пути морфогенеза in vitro.

Культура растительных клеток *in vitro* является уникальным инструментом для изучения фундаментальных проблем биологии. Морфогенетический потенциал растительной клетки в системах *in vitro* проявляется в более широком диапазоне, чем в природных условиях, благодаря эволюционно обусловленной у высших растений способности к тотипотентности [5,7,9]. Злаки, являясь важнейшими сельскохозяйственными культурами, представляют труднейший объект с точки зрения экспериментальной биотехнологии. Одной из причин, обуславливающих сложность получения каллусной ткани, как одного из путей морфогенеза *in vitro*, у злаков по сравнению с двудольными, является их неспособность к раневой реакции (образование раневого каллуса) [13]. У однодольных не описано образование каллуса в естественных условиях, что давало основание для заключения о невозможности получения тотипотентной каллусной ткани злаков на первых этапах развития метода культуры ткани *in vitro* [8]. В настоящее время успешно культивируются *in vitro* каллусы пшеницы, ячменя, кукурузы, риса и других представителей злаков [3,6,10,19]. Несмотря на большое количество исследований по морфогенезу злаков *in vitro* [16,17,19] многие вопросы этого уникального пути развития растений остаются нерешенными. В частности, малочисленны сведения о влиянии индивидуальных генов на проявление тотипотентности клеток *in vitro* на объектах с трудной регенерацией, к которым относятся злаки [4]. В связи с этим актуальной задачей является выявление роли конкретных генетических систем на способность растительных эксплантов к реализации различных морфогенетических программ при культивировании *in vitro*.

На генетической модели, включающей сорт мягкой озимой пшеницы Мироновская 808 и его почти изогенные линии (near isogenic lines) по генам *PPD* (photoperiod), контролирующим степень фотопериодической чувствительности [11,12,20], ранее была показана детерминация ряда физиолого-биохимических процессов: углеводного обмена, ростовой реакция и общей продуктивности [1,2,14,18]. Высказано предположение, что данная генетическая система также участвует в контроле процессов морфогенеза при культивировании изогенных линий *in vitro* [1]. Целью данной работы было исследование особенностей процессов каллусогенеза и морфогенеза *in vitro* набора почти изогенных по генам *PPD* линий и установление зависимости их индукции и динамики формирования от генотипа изолинии, модификаций состава среды культивирования и типа выбранного экспланта.

Материалом исследований служили четыре генотипа озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum L.*) – почти изогенные моногеннодоминантные линии по системе генов контроля фотопериодической чувствительности - *PPD D1a*, *PPD B1a*, *PPD A1a* и сорт Мироновская 808, рецессивный по всем трём генам [15,20]. Почти изогенные линии были получены бекроссированием на основе сорта Мироновская 808 в Селекционно-генетическом институте УААН [18] и любезно предоставленные нам для исследований.

Для получения соматического каллуса в качестве эксплантов использовали зрелые зародыши, апикальные участки асептических корней и листовые экспланты. При использовании в качестве эксплантов зрелых зародышей семена стерилизовали 3% раствором NaOCl на протяжении 15 минут, затем трижды промывали стерильной дистиллированной водой, оставляли на сутки для проклеивания, после чего вычленили зародыши и переносили их в чашки Петри на питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) с полным набором макро- и микросолей, содержащую 0,7 % агара, 2,4–

Д – 2мг/л, 0,1 мг/л глицина и 10 мг/л AgNO₃ [3,8]. Для использования апикальных участков корней и листовых эксплантов предварительно выращивали 4-5 дневные асептические проростки пшеницы на безгормональной среде МС в темноте при 25 °С. Затем в асептических условиях вычленили апикальные сегменты корней длиной 1-1,5 см, из колеоптеля вычленили первичный лист, используя для культивирования его базальную часть размером 1-1,5 см и переносили их на среду МС для индукции первичного каллусогенеза. Экспланты культивировали при 26°С в термостате в течение 14 дней. После образования первичного каллуса чашки Петри переносили в условия культивирования при освещенности 2 кЛк и 16-часовом фотопериоде. При исследовании процессов прямого морфогенеза *in vitro* использовали два типа эксплантов - зрелые зародыши и апикальные меристемы. Культивирование предварительно простерилизованного растительного материала проводили на безгормональной среде МС с полным набором макро- и микросолей с течение 5-7 суток при освещенности 2 Кл и 16-часовом фотопериоде. При изучении процессов непрямого морфогенеза *in vitro* соматический эмбрионный каллус, полученный из зрелых зародышей, переносили на регенерационную среду, используя две модификации стандартной среды МС: 1) МС + 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетина; 2) МС + 0,5 мг/л ИУК + 0,5 мг/л кинетина. Морфогенный каллус культивировали при 26°С, освещенности 2 кЛк, 16-часовом фотопериоде в течение 1-1,5 месяца. Эффективность процессов морфогенеза *in vitro*: индукции каллусогенеза, прямого и непрямого морфогенеза (в процентах) определяли как отношение числа эксплантов, образовавших морфогенные структуры к исходному количеству культивируемых эксплантов. Приведенные результаты получены в 3-5 независимых сериях экспериментов, представленных не менее чем пятью чашками Петри или колбами (по 5-7 эксплантов в каждой). В таблицах приведены средние значения и их стандартные отклонения.

Изучение эффективности индукции первичного каллусогенеза изогенных по генам контроля фотопериодической чувствительности линий пшеницы показало, что все исследуемые генотипы способны формировать каллус при использовании различных эксплантов: зрелых зародышей, апексов корней и листовых эксплантов (таблица 1).

Таблица 1 - Частота каллусогенеза изогенных по генам PPD линий озимой пшеницы сорта Мироновская 808 при использовании разных типов экспланта, %

Генотип изолинии*	Частота каллусогенеза, %		
	Зрелые зародыши	Апикальные корни	Листовые экспланты
<i>PPD D1a</i>	74,0 ± 24,2	40,8±2,6	45,7±2,5
<i>PPD B1a</i>	98,5 ± 51,2	48,9±3,1	52,6±3,1
<i>PPD A1a</i>	62,9 ± 12,1	44,3±3,2	44,9±3,0
<i>сорт М-808</i>	90,3 ± 31,1	47,7±2,8	50,2±2,7

Пр и м е ч а н и е: * - указаны только доминантные гены

Однако тип выбранного экспланта оказывает влияние на эффективность данного процесса. Зрелые зародыши являлись более эффективными эксплантами для получения первичного каллуса по сравнению с апикальными участками корней и листовыми эксплантами. Эффективность индукции каллусообразования при использовании апексов корней была минимальной и составляла 40,8 – 48,9 %, при использовании листовых эксплантов – 44,9 – 52,6 % и максимальной при использовании в качестве эксплантов зрелых зародышей – 62,9 – 98,5 %. Генотип изолинии также оказывал влияние на эффективность каллусогенеза. Независимо от типа выбранного экспланта самым высоким потенциалом каллусообразования характеризовалась изолиния *PPD B1a* и сорт, который полностью рецессивен по генам *ppd*, минимальными показателями характеризовались изолинии *PPD A1a* и *PPD D1a*. Изолиния *PPD B1a* проявляет максимальную степень фотопериодической чувствительности, что выражается в торможении темпов развития данной линии по сравнению с другими изолиниями [11,12]. Следовательно, тип экспланта определяет максимальные и минимальные показатели эффективности каллусогенеза и, возможно, оказывает влияние на генотипическую детерминацию данного процесса.

При использовании различных эксплантов, нами установлены различия в типах и скорости формирования образовавшегося каллуса. Начало каллусогенеза при формировании каллусных тканей из асептических корней происходило быстрее всего - на 2-5 сутки со дня перенесения на среду культивирования. При использовании зрелых зародышей – на 7-10 сутки, дольше всех формировался каллус из листовых эксплантов – на 30-35 сутки. Различия зафиксированы также по степени

оводненности, плотности, цвету, наличию элементов дифференцировки и проявлению морфогенетического потенциала. Из асептических корней формировался сильно оводненный, рыхлый, почти прозрачный, слегка беловатый каллус. Из зрелых зародышей – плотный, менее оводненный, желтоватый каллус, характеризующийся наличием элементов дифференциации, что подтвердили микроскопические исследования. Такого же типа каллусная ткань - плотная и желтоватая формировалась при использовании в качестве эксплантов первичных листьев. При микроскопировании каллусной ткани различных изолиний нами были обнаружены типичные для злаков каллусные клетки – вытянутые, с закругленными концами, не плотно прилегающие друг к другу. Однако клетки различных изолиний имели свои морфологические особенности и различия по размерам.

Под морфогенезом понимают образование и дифференциацию тканей и органов многоклеточными организмами [5]. Выделяют прямой и непрямой пути морфогенеза *in vitro*. Прямой соматический морфогенез представляет собой процесс формирования биполярной структуры с осью корень/стебель с закрытой независимой сосудистой системой из клеток экспланта без предварительной дедифференциации и стадии образования каллуса. Непрямой морфогенез включает обязательный этап формирования дедифференцированной каллусной ткани с последующей индукцией образования соматических зародышей (предзародышей) и их развитием в биполярные структуры с осью корень/стебель [7,9]. В наших дальнейших исследованиях мы изучали эффективность различных путей морфогенеза *in vitro* в зависимости от генотипа исходной изолинии и типа выбранного экспланта. Изучение прямого морфогенеза *in vitro* показало, что выбор экспланта существенно влияет на эффективность процесса (табл.2). При использовании в качестве эксплантов зрелых зародышей показатели частоты морфогенеза в 3-5 раз выше, чем при использовании апексов стеблей. Однако влияние генотипа, независимо от абсолютных показателей морфогенеза, проявляется однотипно в случае использования и апексов, и зрелых зародышей в качестве эксплантов. Максимально эффективен процесс у изолиний *PPD D1a* и *PPD A1a*, минимален – у растений изолинии *PPD B1a* и сорта. В дальнейших исследованиях при изучении непрямого пути морфогенеза *in vitro* после образования каллусных тканей, сформированных из различных эксплантов и перенесения их на среду для индукции морфогенеза, нами показаны различия в морфогенетическом потенциале в зависимости от типов каллуса и генотипа исходной изолинии. Плотный, желтоватый морфогенный каллус, сформированный из зрелых зародышей, проявлял регенерационную способность. На 10-15 сутки культивирования на среде для регенерации были отмечены геммогенез – формирование колеоптелей и ризогенез – формирование корней. Морфогенез прозрачного, гомогенного, рыхлого каллуса, сформированного из асептических корней, проходил только по пути интенсивного ризогенеза – формирования корней. Многими исследователями отмечено, что такой тип морфогенеза не является регенерационно способным, т.е. в дальнейшем при культивировании невозможно формирование полноценных фертильных растений-регенерантов [3,6,13].

Исследование морфогенетического потенциала проводилось нами с использованием двух модификаций состава регенерационной среды. Наиболее оптимальной оказалась среда следующего состава: МС + 0,5 мг/л ИУК + 0,5 мг/л кинетина – показатели эффективности процесса были в среднем 1,5 раза выше, чем на регенерационной среде МС + 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетина. Влияние генотипа исследуемых изолиний на непрямой морфогенез проявлялось однотипно также, как и в случае прямого морфогенеза. Эффективнее всего морфогенез отмечен у изолиний *PPD A1a*, минимален – у растений изолинии *PPD B1a*.

Таблица 2 - Эффективность морфогенеза изогенных по генам PPD линий озимой пшеницы сорта Мироновская 808 при использовании разных типов экспланта и модификаций регенерационной среды культивирования, %

Генотип изолинии *	Морфогенез, %			
	прямой		непрямой	
	апексы	зародыши	МС + ИУК	МС + 2,4 D
<i>PPD D1a</i>	32,5 ± 2,3	77,78 ± 1,1	35,9 ± 0,7	22,0 ± 0,9
<i>PPD B1a</i>	12,5 ± 1,1	70,83 ± 1,5	26,2 ± 0,4	18,3 ± 0,5
<i>PPD A1a</i>	25,6 ± 1,9	75,00 ± 1,8	48,5 ± 0,9	30,0 ± 0,7
<i>сорт М-808</i>	18,75 ± 1,3	72,22 ± 1,3	33,1 ± 1,1	21,6 ± 0,8

Примечание: * - указаны только доминантные гены

Таким образом, независимо от пути морфогенеза (прямой или непрямой), независимо от типа выбранного экспланта, состава регенерационной среды влияние генотипа исследуемых изолиний

проявляется сходным образом. Следует отметить, что генотипическая детерминация процессов каллусогенеза и морфогенеза проявляется противоположно: максимальное стимулирование каллусогенеза у изолинии *PPD B1a* сопровождается минимальными показателями морфогенеза и наоборот. Исследуемые изолинии генетической системы *PPD* - контроля фотопериодической чувствительности пшеницы, определяющей разные темпы развития опытных растений в условиях *in vivo*, различаются по эффективности различных путей морфогенеза в условиях *in vitro*. Показано, что изолиния *PPD B1a*, характеризующаяся медленным развитием *in vivo*, в условиях *in vitro* проявляет максимальную способность к каллусогенезу. Изолинии *PPD D1a* и *PPD A1a*, которые обладают минимальной чувствительностью к фотопериоду и максимально быстрыми темпами развития *in vivo*, максимально эффективно проявляют морфогенетический потенциал и наиболее интенсивно развиваются и в условиях *in vitro*. Т.е. генетическая система контроля фотопериодической чувствительности пшеницы способна детерминировать различные пути морфогенеза опытных растений *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке Фонда фундаментальных, прикладных и поисковых исследований Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина: грант № 6-07, 8-09.

1. Авксентьева О.А., Жмурко В.В., Петренко В.А., Тищенко А.А. Эффекты генов *VRN* и *PPD* на процессы каллусогенеза и морфогенеза в культуре *in vitro* // Геном рослин: Збірник наукових статей V Міжнародної конференції, 13-16 жовтня 2008 р. (Україна). – Одеса, 2008. – С.39-42.
2. Авксентьева О.А., Зубрич А.И., Жмурко В.В. Эффекты генов *PPD* на рост, развитие и обмен углеводов у изогенных линий пшеницы в условиях разной длины дня // Там же. – Одеса, 2008. – С.42-45.
3. Бавол А.В., Дубровная О.В., Лялько И.И. Регенерация растений из различных типов эксплантов мягкой пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. – 2008. – Т.40, №2. – С.150-156.
4. Евсеева Н.В., Ткаченко О.В., Лобачев Ю.В. Биохимическая оценка морфогенетического потенциала каллусных клеток пшеницы *in vitro* // Физиология растений. – 2007. – Т.54, №2. – С.306-311.
5. Журавлев Ю.Н., Омелько А.М. Морфогенез у растений *in vitro* // Физиология растений. – 2008. – Т.55, №5. – С.643-664.
6. Круглова Н.Н., Зайнутдинова Э.М. Андроклиний каллус пшеницы в динамике развития: цитолого-гистологический анализ // Вестник Башкирского университета. – 2001. - №2 (1). – С.137-141.
7. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
8. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
9. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. – СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2003. – 228 с.
10. Сидор Л.С., Орлов П.А. Регенерационный потенциал различных видов пшеницы, ржи и ячменя в культуре листовых эксплантов // Цитология и генетика. – 2005. – Т.40, №5. – С.28-34.
11. Стельмах А.Ф., Файт В.И., Мартынюк В.Р. Генетические системы типа и контроля скорости развития пшеницы // Там же. – 2000. – Т.34, №2. – С.39-45.
12. Файт В.И., Стельмах А.Ф., Федорова В.Р. Начало включения и продолжительность экспрессии генов фотопериодической реакции у озимой пшеницы // Там же. – 2006. – Т.40, №2. – С.12-19.
13. Чеченева Т.Н. Изменчивость злаков в культуре *in vitro* и в процессе регенерации растений // Физиология и биохимия культ. растений. – 2006. – Т.38, №2. – С.163-175.
14. Avksentyeva O.A., Petrenko V.A., Tichenko A.A. and Zhmurko V.V. Callus initiation and morphogenesis in *in vitro* culture of isogenic on gene type and zate of development in winter wheat lines // Annual Wheat Newsletter. –August 2008. – Vol.54. – P.150-152.
15. Mashashhiko T., Kenji K., Yasuki T. etc Genetic analysis of photoperiod response in wheat and its relation with the earliness of heading in southwestern part of Japan // Breeding Science. – 2005, 55. – P.327-334.
16. Machii H., Mizuno H., Hirabayashi T., Li H., Hagio T. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. -1998. – V.53, №1.- P.67-74.
17. Tyankova N.D., Zagorska N.A. Genetic control *in vitro* response in wheat (*Triticum aestivum* L.) // In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant.–2001.–37, № 5 –P.524-530.
18. Stelmakh A.F. Genetic systems regulating flowering in wheat // Wheat: Prospects for Global Improvement. – 1998. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. – P.491-501.
19. Wang C., Wei Z. Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum* L.) leafbase // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. - 2004. – V.77, №2. - P.149-153.
20. White W., Herndil M., Hunt L., Payne T. and Hoogenboom G. Simulation-Based analysis of effects of *Vrn* and *Ppd* loci on flowering in wheat // Crop Science. - 2008. – Vol.48. - P.678-687.

The features of the different ways of morphogenesis *in vitro* (callus formation, direct and indirect morphogenesis) isogenic lines for genes *PPD* winter wheat varieties Mironovskaya 808. The optimal conditions for the studied processes, showing their dependence on the type of explant, media composition and cultivation conditions. The differences among isogenic lines in the size of the cells of callus tissue, the rate of their formation, the manifestation of morphogenetic potential. It is shown that the ability of the genetic control of photoperiodic sensitivity of wheat *in vivo* determine the various ways of morphogenesis *in vitro*.