

мерзім өсірілген кезде ұлпалар метаморфозға ұшырайды, борпылдақ гетерогенді ұлпа 3-4 рет 1,0 мг/л БАП қосылған МС коректік ортаға көшірігенде эмбриогендіге айналып кетеді. Эмбриогенді каллус үлкен эмбриогенді клеткалық жиынтықтан тұрады, жиынтықтың ортасында деградацияға ұшыраған клеткалар мен бетжағында бөлек жатқан эмбриондардан құрылатыны гистологиялық зерттеулер көрсетті.

Кілт сөздер: сорго, каллусогенез, морфогенез, эмбриоидогенез.

Bishimbayeva N.K., Amirova A.K., Kapasuly T., Omarova A.Sh.

CALLUSOGENESIS, MORPHOGENESIS AND HISTOLOGICAL STUDY OF CALLUS TISSUES STRUCTURE OF SORGHUM (*SORGHUM BICOLOR*)

Annotation

The influence of different concentration of 2, 4-D (1,0 mg/l; 2,5 mg/l; 5,0 mg/l; 7,5 mg/l и 10,0 mg/l) on callusogenesis and morphological heterogeneity of 7 genotypes of sorghum calli have been studied. Two main types of calli, friable heterogeneity and embryogenic, have been identified in tissue culture of 7 genotypes of sorghum. It was observed that the long-term subculture occurs the metamorphosis of calli. Friable heterogeneity calli was transformed to embryogenic by 3-4 passages of subculture on MS medium with 2,5 mg/l. Histological study has been shown that the embryogenic calli consist from a large embryogenic cell complex with degrading cells in the central part of the complex and separable embryoids on the surface of calli.

Key words: sorghum, callusogenesis, morphogenesis, embryoidogenesis.

УДК 581.14; 576.32/36

**Бишимбаева Н.К., Капасулы Т., Амирова А.К., Парменова А.,
Нургазина А.С., Омарова А.Ш.**

*РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» г. Алматы,
ТОО «КазНИИ земледелия и растениеводства»*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТИПОВ И ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ КУКУРУЗЫ

Аннотация

Данное исследование посвящено изучению процессов каллусогенеза, морфогенеза и идентификации типов каллусов из различных эксплантов (незрелые зародыши, незрелые соцветия, междоузлия) 14 генотипов кукурузы. Отобраны наиболее стабильные в процессе субкультивирования два типа тканей: плотный нодулярный каллус и эмбриогенный каллус. Описаны гистологическое строение и моменты метаморфоза каллусов кукурузы.

Ключевые слова: кукуруза, каллусогенез, морфогенез, метаморфоз.

Введение

Производство кукурузы становится популярным из-за увеличения ее использования в качестве продовольственной и кормовой культуры. Существующие сорта кукурузы, в основном, получены на основе традиционной селекции. Разработка эффективных систем регенерации растений *in vitro* позволила бы получить новые линии и сорта кукурузы (толерантные к засолению, засухе, болезням) с помощью методов биотехнологии. Идеальной системой для регенерации растений *in vitro* является соматический эмбриогенез. Регенерация растений кукурузы через соматический эмбриогенез получена

из культуры незрелых зародышей, незрелых соцветий [1], включая апексы побегов [2], листья [3], изолированные микроспоры [4], зрелых зародышей [5]. Однако, регенерация растений для этой культуры все еще имеет трудности. Большинство успешных работ и протоколов были разработаны с использованием модельных генотипов кукурузы А188, В73 и/или их гибрида Нi-II [6], а также на генотипах Н99 [7] и Мо17 [8], обладающих высоким регенерационным потенциалом, но низкой коммерческой значимостью. В связи с этим, детальное изучение процессов морфогенеза в культуре тканей кукурузы актуально с точки зрения разработки универсальных для различных генотипов и воспроизводимых систем регенерации растений *in vitro*.

Материалы и методы

Объектами исследования служили – 14 сортов и гибридных линий кукурузы (Мерейтой, Крахмалис, Торгайская 5/87, 05438, Казахстанская 420 СВ, Туран 559 СВ, Казахстанская 587, Целинный 160, СМ 7 з/с, Туран 480, ВИР 157, Дружба С, ВИР-158, С-103).

В экспериментах с культурой тканей по изучению морфогенеза в культуре соматических и половых клеток использованы общепринятые методы биотехнологии растений [9]. В качестве эксплантов служили незрелые зародыши, незрелые соцветия и междоузлия, изолированные из донорных растений кукурузы и сорго, выращенных в теплице КазНИИ ЗиР. Для каллусогенеза экспланты высажены на агаризованную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) [10], дополненную различными концентрациями 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) – 1,0 мг/л; 2,5 мг/л; 5,0 мг/л; 7,5 мг/л и 10,0 мг/л). На каждый вариант среды высажены от 30 до 60 эксплантов. Каллусы инкубировали на свету при 16-часовом фотопериоде и температуре 24±2С°. Полученные каллусы субкультивированы через каждые 30 дней на свежие питательные среды того же состава. Для гистологического изучения каллусные ткани фиксированы в фиксаторе Чемберлена, постоянные препараты приготовлены по З.П. Паушевой [11]. Срезы окрашены реактивом Шиффа, гематоксилином и алциановым синим [12]. Статистическую обработку данных проводили по общепринятым методам [13].

Результаты и их обсуждение

Установлено, что частота каллусогенеза из незрелых зародышей колеблется от 34,0% до 100,0% и не зависит от концентрации 2,4-Д (Таблица 1).

Таблица 1 – Влияние 2,4-Д на каллусогенез и морфологическую гетерогенность в культуре тканей незрелых зародышей кукурузы.

Концентрация 2,4-Д, мг/л	генотипы	Каллусогенез, %	Морфогенез каллусов, %				
			ЭК	РГ	ПН	Пл.	НМ
1,0	Туран -480	75,0	33,3	-	66,7	-	-
	ВИР -158	67,0	100,0	-	-	-	-
	ВИР -157	66,7	75,0	-	25,0	-	-
	С-103	34,0	100,0	-	-	-	-
	СМ-7 зс	84,0	13,1	6,7	63,6	8,3	8,3
	Дружба С	34,0	33,3	-	66,7	-	-
	Казахстанская-587	16,67	-	-	100,0	-	-
	Целинный-160	33,3	-	-	100,0	-	-
	Крахмалис	75,0	100,0	-	-	-	-
2,5	ВИР -158	50,0	-	-	100,0	-	-
	ВИР -157	75,0	100,0	-	100,0	-	-
	СМ-7 зс	68,5	34,7	-	65,3	-	-
	Тургайская 5//87	100,0	-	-	100,0	-	-
	Казахстанская-587	60,0	-	-	100,0	-	-
	Целинный-160	70,0	-	-	100,0	-	-

	Казахстанская-420 СВ	80,0	-	-	100,0	-	-
	05438	33,3	-	-	100,0	-	-
5,0	ВИР-157	62,5	100,0	-	100,0	-	-
	СМ-7 зс	78,0	55,23	-	44,77	-	-
	Дружба С	58,0	85,7	-	14,3	-	-
	Тургайская 5/87	100,0	33,3	-	66,7	-	-
	Мерейтой	74,4			100,0		
	Туран 559 СВ	44,4			100,0		
7,5	ВИР 157	62,5	100,0	-	-	-	-
	СМ-7 зс	93,7	13,6	35,8	36,3	-	14,3
	Дружба С	100,0	25,0	-	75,0	-	-
	Тургайская 5/87	50,0	-	-	100,0	-	-
10,0	ВИР-157	87,5	100,0	-	100,0	-	-
	СМ-7 зс	89,0	39,86	-	42,86	-	17,28
	Дружба С	83,5	87,5	-	12,5	-	-
	Тургайская 5/87	67,0	-	-	100,0	-	-

Частота каллусогенеза из незрелых соцветий кукурузы колеблется от 25% до 60%, из междоузлий – от 25% до 100%. В культуре незрелых соцветий кукурузы формируются один тип ткани – эмбриогенный каллус (100%), из междоузлий – рыхлый гетерогенный каллус (100%).

В культуре тканей 14 линий кукурузы выделено 5 типов тканей: рыхлый гетерогенный (РГ), пленчатый (Пл), плотный нодулярный каллус (ПН), неморфогенный бурый (НМ) и эмбриогенный каллус (ЭК). В основном, преобладают два типа тканей: эмбриогенный каллус (13,1-100%) и плотный каллус (12,5-100%). Другие типы тканей встречаются реже, и частота их достигает 8,3-35,8% (Таблица 1).

Отмечено, что в процессе субкультивирования среде МС с 5,0 мг/л в течение 2-х пассажей происходит метаморфоз РГ и Пл каллусов с образованием плотного нодулярного каллуса, который в 3 и 4 пассажах образует ЭК. НМ каллус оказался тупиковым, не образующим перспективные с точки зрения морфогенеза ткани. Таким образом, все типы тканей способны к трансформации в плотный нодулярный и эмбриогенный каллусы, характерные для различных генотипов и преобладающие в культуре *in vitro* кукурузы. Поэтому для гистологического исследования каллусов кукурузы были взяты два основных типа тканей: плотный нодулярный и эмбриогенный (Рисунок 1).

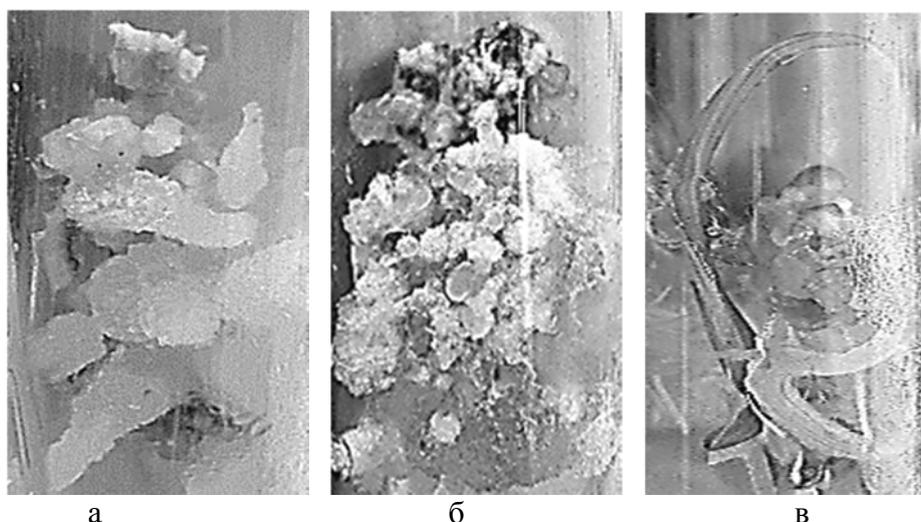


Рисунок 1 – Морфология каллусных тканей кукурузы: а – плотный нодулярный каллус, б – эмбриогенный каллус, в – спонтанная регенерация побегов из ПЭ каллуса.

Плотный нодулярный каллус кукурузы имеет серовато-желтую окраску и представляет собой узловатый каллус сходный по морфологии с глобулярным каллусом пшеницы. Однако, в отличие от каллусов пшеницы, глобулы нодулярного каллуса не округлые, а удлиненные (Рисунок 1).

Гистологическое изучение показало, что плотный нодулярный каллус состоит из структур шарообразной и удлиненной формы, окруженные обособляющимися клетками. Оба типа структур имеют разное строение: одни виды характеризуются наличием крупных паренхимных клеток в середине комплекса, а по краям из мелких меристематических клеток, а другие – наоборот (Рисунок 2). Общим для обоих типов структур является наличие мелких и крупных щелей ближе к краю ткани, разрыхление ткани и обособление клеток друг от друга. Эмбриониды в этом типе тканей отсутствуют. На поверхности каллуса – густая сеть экстрацеллюлярных полисахаридов.

Эмбриогенный каллус кукурузы имеет беловато-желтую окраску с четко различимыми визуальными эмбриондами на поверхности каллуса (Рисунок 1). Строение эмбриогенного каллуса отличается от плотного нодулярного каллуса тем, что ЭК состоит из эмбрионидов, эмбриогенных клеточных комплексов (ЭКК) и свободнолежащих каллусных клеток; внеклеточные полисахариды располагаются не только на поверхности каллуса как в ПН тканях, но во внутреннем межклеточном пространстве каллусов и окружают эмбриониды и ЭКК (Рисунок 3).

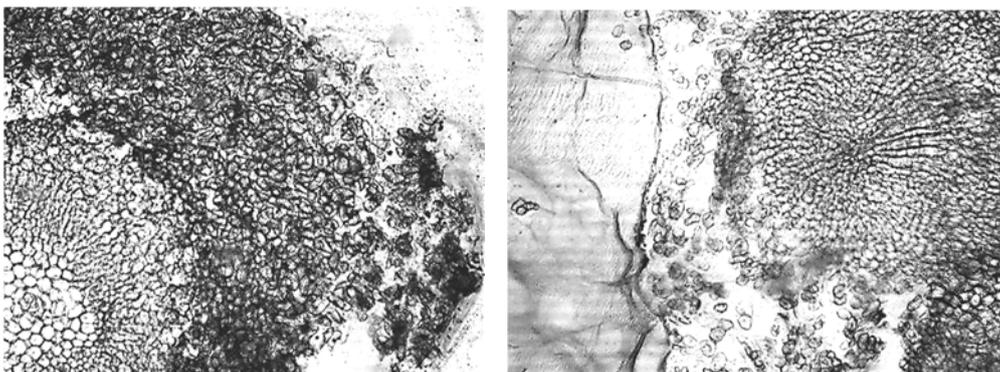


Рисунок 2 – Строение плотного нодулярного каллуса кукурузы.



Рисунок 3 – Строение эмбриогенного каллуса кукурузы.

Глобулярные эмбриониды окрашиваются в светло-голубой цвет, а более дифференцированные – в темно-фиолетовые тона.

Выявлено, что при субкультивировании каллусов происходит метаморфоз каллусов. Так, плотный нодулярный каллус в 3 пассаже на среде МС с 5,0 мг/л 2,4-Д

трансформируется в эмбрионный каллус. На рисунке 3 показан момент метаморфоза ткани: на поверхности и в толще шарообразных и удлинённых структур появляются меристематические очаги, которые разрастаются и обособляются как отдельные зародышеподобные структуры; происходит индукция эмбриоидов и органогенных структур (Рисунок 4).

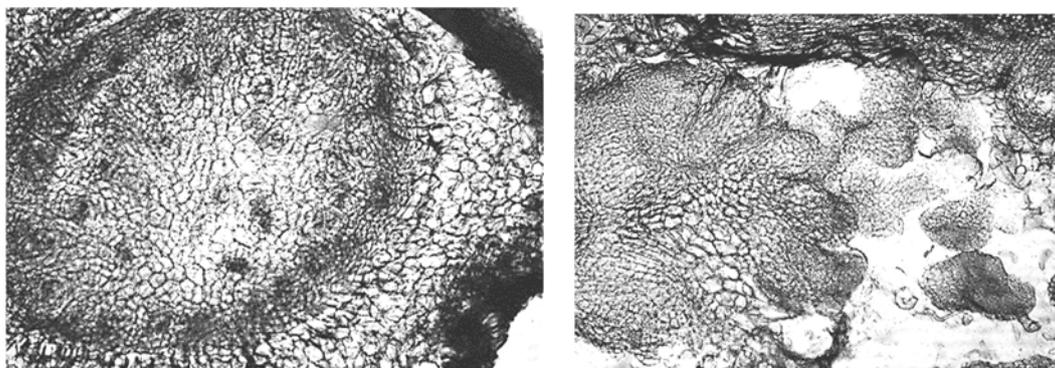


Рисунок 4 – Момент метаморфоза ПН каллусов кукурузы в ПЭ.

Известно, что инициация и поддержание эмбрионного каллуса с последующей регенерацией растений зависит от генотипа, типа экспланта, состава среды и т. д. В отличие от большинства успешных работ и протоколов, где регенерация растений для этой культуры были достигнуты с использованием модельных генотипов кукурузы [6, 7, 8] с высокой регенерационной способностью, но всегда коммерчески незначимых. В данном исследовании нами проведено изучение влияния различных концентрации 2,4-Д на морфогенез и метаморфоз тканей с использованием разных типов эксплантов и широкого круга генотипов кукурузы. В результате исследования морфологической гетерогенности каллусных тканей в культуре тканей кукурузы идентифицировано 5 типов тканей, однако в процессе субкультивирования происходит метаморфоз каллусов с формированием двух основных типов тканей: плотного нодулярного (неэмбрионного) и эмбрионного каллусов. Выявлено, что существуют стабильные при субкультивировании и универсальные для любых генотипов типы тканей, из которых можно инициировать эмбриоидогенез. Отмечено, что в присутствии высоких концентрации 2,4-Д (5,0 мг/л) плотные нодулярные ткани в процессе многократного субкультивирования претерпевают метаморфоз с образованием эмбрионного каллуса. Следовательно, все типы тканей кукурузы имеют склонность к трансформации в эмбрионный каллус, а среда МС с 5,0 мг/л 2,4-Д наиболее является оптимальной для соматического эмбриогенеза. Спонтанная регенерация зеленых побегов из эмбрионных каллусов указывает на их способность к регенерации. Морфологический подход, разработанный нами [14], представляет интерес с точки зрения получения длительно культивируемых эмбрионных тканей способных к регенерации растений и использования в биотехнологии гибридных линий кукурузы.

Литература

1. *Grando M.F., Varnier M.L., Silva M.R., Emydio B.M., Pereira L.R., Suzin M.* Immature tassels as alternative explants in somatic embryogenesis and plant regeneration in south Brazilian maize genotypes // *Acta Scientiarum. Agronomy.* – 2013. – V. 35. – №1. – P. 39-47.
2. *Muoma J., Muluvi G., Machuka J.* In vitro regeneration by indirect organogenesis of selected Kenyan maize genotypes using shoot apices // *Biotechnology.* – 2008. – V. 7 (4). – P. 732-738.
3. *Ahmadabadi M., Ruf S., Bock R.* A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.) // *Transgenic Research.* – 2007. – V. 16. – №4. – P. 437-448.

4. *Nägeli M., Schmid J., Stamp P., Büter B.* Improved formation of regenerable callus in isolated microspore culture of maize: Impact of carbohydrates, plating density and time of transfer // *Plant Cell Reports*. – 1999. – V. 19. – №2. – P. 177-184.
5. *Matazu N.U., Shaharuddin N.A., Ismail M.R., Matazu I.K., Mahmood M.* Indirect Organogenesis and Multiple Shoots Formation from (*Zea mays* L.) Mature Embryo // *International Conference on Food, Biological and Medical Sciences*. – Bangkok (Tailand). – 2014. – P.23-27.
6. *Che P., Love T.M., Frame B.R., Wang K., Carriquiry A.L., Howell S.H.* Gene expression patterns during somatic embryo development and germination in maize hi II callus cultures // *Plant Molecular Biology*. – 2006. – V. 62. – №1-2. – P. 1-14.
7. *Ishida Y., Saito H., Hiei Y., Komari T.* Improved protocol for transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *agrobacterium tumefaciens* // *Plant Biotechnology*. – 2003. – V. 20. – №1. – P. 57-66.
8. *Frame B.R., McMurray J., Fonger T.M., Main M.L., Taylor K.W., Torney F.J., Wang K.* Improved *agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts // *Plant Cell Reports*. – 2006. – V. 25. – №10. – P. 1024-1034.
9. *Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е.* Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев, 1980. – 407 с.
10. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. – 1962. – V. 15. – 473-497.
11. *Паушева З.П.* Практикум по цитологии растений. – Москва: Агропромиздат, 1988. – 272 с.
12. *Камелина О.П., Проскурина О.Б., Жинкина Н.А.* К методике окраски эмбриологических препаратов // *Бот. Журн.* – 1992. – Т. 77. – 44. – С. 93-96.
13. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
14. *Бишимбаева Н.К.* Цитофизиологические основы биотехнологии длительной регенерации растений в культуре тканей зерновых злаков / Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. – Алматы, 2007. – 38 с.

Bishimbayeva N.K., Kapassuly T., Amirova A.K., Nurgazina A.S., Omarova A.Sh.

IDENTIFICATION OF TYPES AND HISTOLOGICAL STUDY OF MAIZE CALLI TISSUES

Annotation

The present investigation was designed to study the processes of callusogenesis, morphogenesis and to identify of calli types from different explants (immature embryos, immature inflorescence, nodes of stem) of 14 maize genotypes. Most stable two types of tissues in the process of subculturing are embryogenic and dense nodular calli have been select. Histological structure of both types of maize calli and moment of metamorphosis have been describe.

Key words: maize, callusogenesis, morphogenesis, metamorphosis.

Бишимбаева Н.К., Капасұлы Т., Амирова А.К., Нургазина А.С., Омарова А.Ш.

ЖҮГЕРІ КАЛЛУС ҰЛПАЛАРЫНЫҢ ТИПТЕРІН АНЫҚТАУ ЖӘНЕ ГИСТОЛОГИЯЛЫҚ ТАЛДАУ

Аңдатпа

Бұл зерттеу жүгерінің 14 генотиптерінен алынған әр түрлі эксплантарынан (жетілмеген дән, жетілмеген гүл шоғы және буын) алынған ұлпаларының типтерін

анықтау және каллусогенез, морфогенез процестерін зерттеуге арналған. Көректік ортаға бірнеше рет көшірген кезде өте тұрақты екі ұлпа типтері (тығыз нодулярлы және эмбриогенді) таңдалып алынды.

Жүгері ұлпасының гистологиялық құрылымы және метаморфоз кезеңдері сипатталған.

Кілт сөздер: жүгері, каллусогенез, морфогенез, метаморфоз.

УДК 631.413.3

Жусупова Л.К., Мустафаев Ж.С., Козыкева А.Т., Умирзаков С.И.

*Казахский национальный аграрный университет,
Казахский научно-исследовательский институт рисоводства им. Ы. Жахаева,
Кызылординский государственный университет им. Коркыт-Ата*

ЭКОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ОСВОЕНИЯ ЗАСОЛЕННЫХ ЗЕМЕЛЬ

Аннотация

Разработан способ освоения засоленных земель для возделывания сельскохозяйственных культур во временном масштабе в годовых интервалах с рассолением засоленных почв до определенного допустимого уровня с подачей промывной нормы, с учетом экологических требований природообустройства с использованием классификации засоленных почв и солеустойчивости растений.

Ключевые слова: способ, промывка, освоение, засоление, почва, рассоление, солеустойчивость, растение, экология, требование, норма.

Введение

Важным направлением в повышении продуктивности засоленных земель является разработка системы оперативного управления гидрогеохимическими параметрами почвы с помощью гидротехнических и агротехнических приемов, которые выполняются в процессе их освоения для возделывания сельскохозяйственных культур в соответствии с их биологическими особенностями.

При экологическом обосновании приемов освоения засоленных земель особое внимание уделяется оперативным агромероприятиям, направленным на оптимизацию условий произрастания сельскохозяйственных культур, где управление параметрами засоленных почв осуществляется на основе естественной закономерности рассоления-засоления почвы и формирования видового сообщества растительного покрова в условиях ритмического колебания природного процесса во временных и пространственных масштабах.

Освоение засоленных земель для возделывания сельскохозяйственных культур можно рассматривать, как целую фабрику производства, связанную с землей и водной средой. При этом основным объектом воздействия и основным средством производства здесь являются засоленные почвы, которые в любом ранге ландшафта выступают в качестве основного связующего и стабилизирующего компонента экосистемы. Поэтому главным объектом при освоении засоленных земель всегда является почва, которая служит одновременно ведущим фактором переноса вещества и энергии, а также источников для получения оперативной информации по количественным связям почвенного и растительного покрова, в том числе и относительно трансформации почв, выступает водная среда [1-2].

Цель исследования

Разработка технологии экологически чистого способа освоения засоленных земель для возделывания сельскохозяйственных культур, который позволит уменьшить