

Бишимбаева Н.К., Амирова А.К., Капасулы Т., Демесинова С.Д., Омарова А.Ш.

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

## КАЛЛУСОГЕНЕЗ, МОРФОГЕНЕЗ И ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ СОРГО (*SORGHUM BICOLOR*)

### Аннотация

Проведено изучение влияния различных концентраций 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 каллусогенез и морфологическую гетерогенность каллусов 7 генотипов сорго. В культуре ткани 7 сортов сорго выделено два основных типа каллусов: рыхлый гетерогенный и эмбриогенный. Отмечено, что в процессе многократного субкультивирования происходит метаморфоз каллусов: рыхлый гетерогенный каллус при субкультивировании в течение 3-4-х пассажей на среде МС с 2,5 мг/л трансформируется в эмбриогенный. Эмбриогенный каллус состоит из больших эмбриогенных клеточных комплексов с деградирующими клетками в центральной части и обособляющимися эмбриоидами на поверхности каллуса.

**Ключевые слова:** сорго, каллусогенез, морфогенез, эмбриогенез.

### Введение

Сорго считается одной из самых важных культур после риса, пшеницы, кукурузы и ячменя. Разработка эффективных клеточных систем соматического эмбриогенеза и регенерации сорго способствовало бы улучшению этой культуры с помощью биотехнологических методов. Известно, что на процессы морфогенеза и регенерации растений *in vitro* влияют разнообразные факторы, начиная от генотипа, происхождения экспланта, условий культивирования и типа фитогормона [1]. Во многих исследованиях достигнута индукция соматического эмбриогенеза и регенерации растений для многих видов зерновых злаков, однако у сорго регенерация растений достигается очень сложно и процессы морфогенеза *in vitro* трудно поддаются регуляции [2, 3, 4].

Несмотря на имеющиеся успешные работы, регенерация растений сорго *in vitro* одного из важнейших зерновых культур оставляет желать лучшего. Возможно, это связано с тем, что при культивировании тканей сорго в питательную среду выделяются вещества фенольной и терпеноидной природы, что может ингибировать процесс морфогенеза.

В связи с этим выяснение процессов морфогенеза *in vitro*, и характеристика гистологического строения каллусов сорго для создания высокоэффективных и надежных систем регенерации является весьма актуальной. Данное исследование посвящено изучению каллусогенеза, морфогенеза и идентификации типов каллусов в культуре тканей сорго.

### Материалы и методы

Объектами исследования служили 7 сортов и гибридных линий сорго (КИЗ-8, Пищевая-61, Казахстанская-3, Казахстанская-20, Казахстанская-16, Пищевая-5, КИЗ-7).

В экспериментах с культурой тканей по изучению морфогенеза в культуре соматических и половых клеток использованы общепринятые методы биотехнологии растений [5]. 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) [6], 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 [7]. Срезы окрашены реактивом Шиффа, гематоксилином и алциановым синим [8]. Статистическую обработку данных проводили по общепринятым методам [9].

### Результаты и их обсуждение

Изучали влияние различных концентраций 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 каллусогенез и морфологическую гетерогенность первичных каллусов в культуре тканей сорго.

Частота каллусогенеза в культуре междоузлий сорго при концентрации 2,4-Д от 1,0 мг/л до 5,0 мг/л варьирует от 31% до 100% (Таблица 1). С повышением концентрации 2,4-Д частота индукции каллусов возрастает: при 7,5 мг/л 2,4-Д – 92,1-100%, при 10,0 мг/л 2,4-Д – 56-100%. В культуре незрелых зародышей и незрелых соцветий сорго частота каллусогенеза колеблется от 50% до 100%.

Таблица 1 – Влияние 2,4-Д на каллусогенез и морфологическую гетерогенность в культуре тканей сорго, полученных из междоузлий.

Концен-трация 2,4-Д, мг/л	Генотип	Каллусо- генез, %	Морфогенез, %	
			Эмбриогенный	Рыхлый гетерогенный
1,0	Казахстанская-20	37,5	25,0	75,0
	Казахстанская -3	100,0	-	100,0
	Пищевая-61	71,43	100,0	-
2.5	Казахстанская -20	38,5	50,0	75,0
	Казахстанская -16	80,0	100,0	100,0
	Пищевая-61	57,9	100,0	-
	Пищевая-5	85,3 7	100,0	-
5,0	КИЗ-8	62,5	14,4	85,6
	Казахстанская -20	31,0	-	100,0
	Казахстанская -16	68,75	7,1	92,9
	Пищевая-61	75,0	100,0	-
7,5	Казахстанская -20	100,0	-	100,0
	Казахстанская -16	92,1	6,25	93,75
10,0	КИЗ -7	100,0	-	100,0
	Казахстанская -16	56,0	-	100,0
	Казахстанская -3	100,0	-	100,0

В культуре первичных каллусов, полученных из междоузлий сорго, выделены 2 типа тканей: эмбриогенный каллус и рыхлый гетерогенный каллус (Таблица 1). Из междоузлий сорго в основном формируется рыхлый гетерогенный каллус (75-100%). Выявлено, что частота формирования эмбриогенного каллуса из междоузлий сорго зависит от концентрации 2,4-Д. Отмечено, что с увеличением концентрации 2,4-Д выход ЭК уменьшается: 1,0 мг/л и 2,5 мг/л 2,4-Д – 25-100%, 5,0 мг/л 2,4-Д – 7,1-14,4%, 7,5 мг/л 2,4-Д – 6,25% и 10,0 мг/л 2,4-Д – 0%.

Из незрелых зародышей и незрелых соцветий, в основном, формируются эмбрионные каллусы. Так, в культуре незрелых зародышей выделено 2 типа первичных каллусов: эмбрионный каллус (73,3-100%) и рыхлый гетерогенный каллус (26,7%). У незрелых соцветий – 2 типа тканей: эмбрионный каллус (82,6-100%) и плотный бурый каллус (17,4%).

В ходе изучения морфологической гетерогенности и метаморфоза каллусов в культуре ткани 7 сортов сорго выделено два основных типа каллусов: рыхлый гетерогенный (РГ) и эмбрионный (ЭК) (Рисунок 1). Рыхлый гетерогенный каллус – ткань серовато-бурого цвета, рыхлой морфологии. Эмбрионный каллус сорго представляет собой ткань серовато-желтого цвета с белыми и желтоватыми эмбриоидами на поверхности ткани.

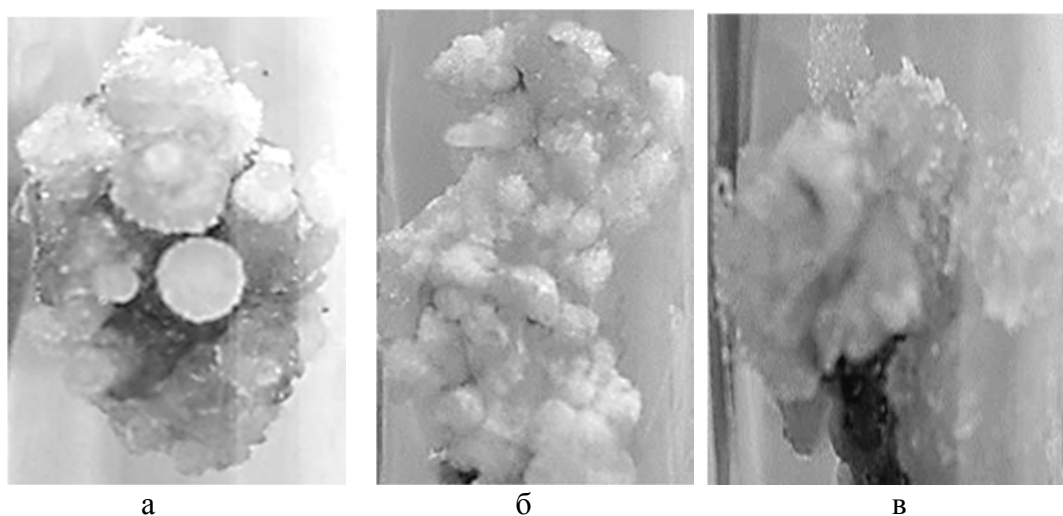


Рисунок 1 – Морфология каллусных тканей сорго: а – ПЭ каллус (2 пассаж), б – ПЭ каллус (3 пассаж), в – рыхлый гетерогенный каллус.

Отмечено, что в процессе многократного субкультивирования происходит метаморфоз каллусов: рыхлый гетерогенный каллус в течение 3-4-х пассажей на среде МС с 2,5 мг/л трансформируется в эмбрионный. У эмбрионного каллуса в 3 пассаже дифференциация эмбриоидов усиливается, эмбриоиды увеличиваются в размерах, и в некоторых случаях происходит спонтанная регенерация побегов (Рисунок 2), что свидетельствует о способности эмбрионных каллусов к регенерации растений.

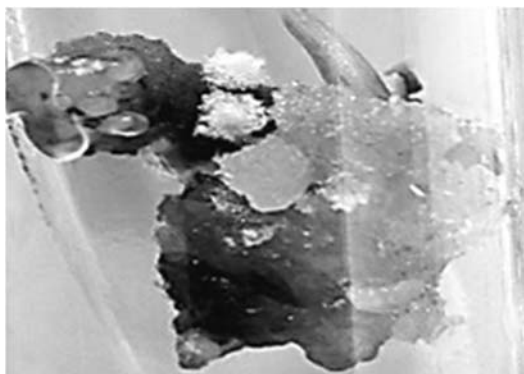


Рисунок 2 – Регенерация побегов.

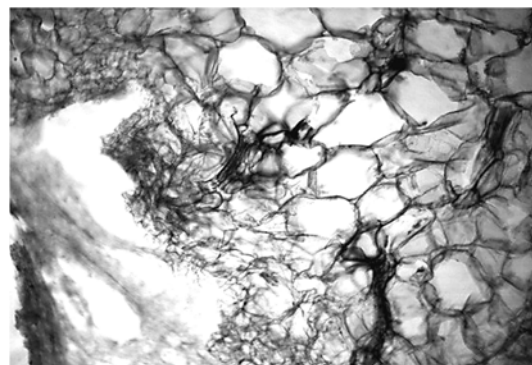


Рисунок 3 – Строение РГ каллуса сорго.

Для гистологического изучения строения каллусов сорго были использованы два основных типа тканей: рыхлый гетерогенный и эмбриогенный. Выявлено, что РГ каллус состоит из комплексов молодых паренхимных и сильно вакуолизированных клеток, тесно связанных между собой (Рисунок 3). Комплексы перемежаются с тяжами экстрацеллюлярных веществ и свободно лежащими каллусными клетками овальной и удлиненной формы. По краям клеточных комплексов и в толще ткани зарождаются меристематические очаги, состоящие из мелких клеток с хорошо видимым ядром. В толще ткани встречаются сосудистые элементы.

Гистологическое исследование показало, что эмбриогенный каллус состоит из крупных эмбриогенных клеточных комплексов (ЭКК) с деградирующими клетками в центральной части и отделяющимися эмбриоидами на поверхности (Рисунок 4).

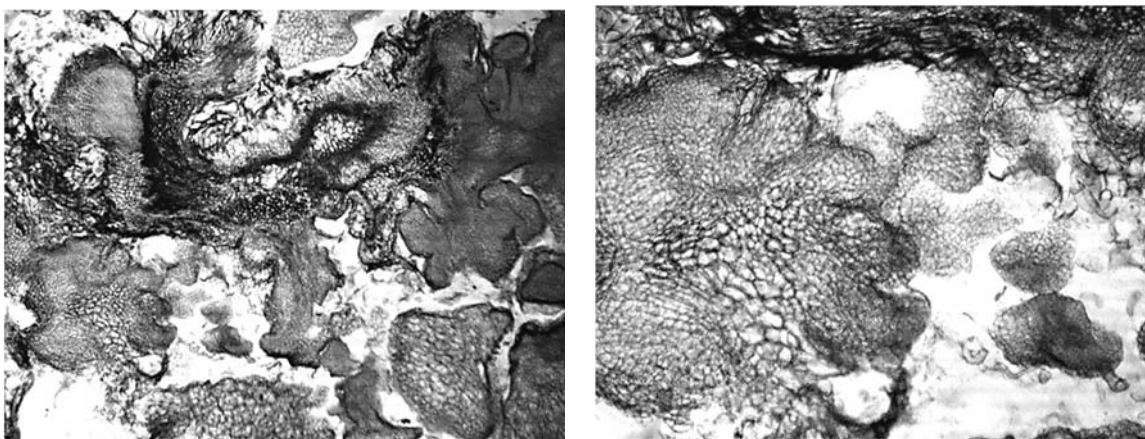


Рисунок 4 – Строение плотного эмбриогенного каллуса сорго.

ЭКК и эмбриоиды окружены тяжами внеклеточных веществ и обособленными каллусными клетками овальной и сферической формы.

В целом, в результате проведенных исследований выявлено, что в культуре тканей сорго каллусы представлены 2-3 типами: рыхлый гетерогенный (РГ), эмбриогенный каллус (ЭК) и плотный бурый каллус. Плотный бурый каллус формируется в первых двух пассажах вследствие интенсивного выделения веществ коричневого цвета в питательную среду, что приводит к некрозу каллуса. Отмечено, что с увеличением числа пассажей, в 3 и более пассажах каллусы постепенно перестают выделять эти вещества. Для этого при пересадке каллусов потребовалось удаление бурых частей ткани и частая пересадка через каждые 20-25 дней. Отобраны наиболее стабильные и универсальные для любых генотипов сорго два типа ткани: РГ и ЭК. В целом, изучение морфологических типов каллусов сорго, их метаморфоза и строения показало, что РГ каллусы в процессе субкультивирования в конечном счете превращаются в эмбриогенные ткани, способные к регенерации растений. Так, РГ каллус при субкультивировании в течение 3-4-х пассажей на среде МС с 2,5 мг/л трансформируется в эмбриогенный.

Выявлено, что для морфогенеза в культуре ткани сорго наиболее оптимальной считается концентрация 2,5 мг/л 2,4-Д, тогда как для культуры ткани кукурузы – более высокая концентрация 2,4-Д (5,0 мг/л), что указывает на различия в морфогенетическом ответе на данный фитогормон. Также установлено, что концентрация 2,4-Д играет важную роль в культуре ткани сорго, если для одних процессов нужны более высокие, то для других – низкие концентрации. Так, показано, что высокие концентрации стимулируют каллусогенез, с повышением концентрации 2,4-Д частота индукции каллусов возрастает:

при 7,5 мг/л 2,4-Д – 92,1-100%, при 10,0 мг/л 2,4-Д – 56-100%. Однако, для индукции соматического эмбриогенеза в культуре ткани сорго важно присутствие низких концентрации 2,4Д (2,5 мг/л).

В отличие от имеющихся в мировой литературе протоколов [1, 2, 3, 4], где в основном для экспериментов используют модельные генотипы, обладающие высокой регенерационной способностью, или для каждого генотипа отдельно подбирают условия для индукции соматического эмбриогенеза и регенераций растений, т.е. где преобладает генетический подход. Нами предложен морфологический подход, заключающийся в идентификации морфологических типов каллусов по морфологии и строению и отборе стабильных при многократном субкультивировании и универсальных для разных генотипов тканей, способных к регенерации растений. Описанный в данном разделе разработанный нами морфологический подход [10] открывает большие возможности разработки эффективных систем регенерации растений *Sorghum bicolor*, пригодных для биотехнологии.

### Литература

- 1 Reddy V.S.B., Ramesh S., Borikar S.T., Hussain S.K. ICRISAT-Indian NARS partnership in Sorghum improvement research: Strategies and impacts. Curr. Sci. – 2007. – Vol. 92. – P. 909-915.
- 2 Gao Z., Jayaraj J., Muthukrishnan S., Claflin L., Liang G.H. Efficient genetic transformation of Sorghum using a visual screening marker // Genome. – 2005. – P. 321-333.
- 3 Kishore S.N., Visarada K.B.R.S., Lakshmi A.Y., Pashupatinath E., Raa S.V., Seetharama N. In vitro culture methods in Sorghum with shoot tip as the explants material // Plant Cell Rep. – 2006. – Vol. 25. – P. 174-182.
- 4 Maheswari M., Jyothilakshmi M., Yadav S.K., Varalaxmi Y., Vijaya Lakshmi A., Vanaja M. Venkateswarlu B. Efficient plant regeneration from shoot apices of Sorghum // Biol. Plant. – 2006. – Vol. 50. – P. 741-744.
- 5 Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев, 1980. – 407 с.
- 6 Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Phisiol. Plant. – 1962. – V. 15. – 473-497.
- 7 Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – Москва: Агропромиздат, 1988. – 272 с.
- 8 Камелина О.П., Проскурина О.Б., Жинкина Н.А. К методике окраски эмбриологических препаратов // Бот. Журн. – 1992. – Т. 77. – 44. – С. 93-96.
- 9 Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
- 10 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.

Бишимбаева Н.К., Амирова А.К., Капасулы Т., Омарова А.Ш.

### ҚҰМАЙ КҮРІШ (*SORGHUM BICOLOR*) КАЛУСОГЕНЕЗІ, МОРФОГЕНЕЗІ ЖӘНЕ КАЛЛУС ҰЛПАЛАРЫНЫҢ ГИСТОЛОГИЯЛЫҚ ЗЕРТТЕУ

#### Аңдатпа

Құмай күріштің 7 генотиптерінің каллусогенез және ұлпаларының морфологиялық өзгерістеріне 2,4-Д әр түрлі концентрациясының (1,0 мг/л, 2,5 мг/л, 5,0 мг/л, 7,5 мг/л и 10,0 мг/л) әсері зерттелді. Сорғаның 7 генотипінен алынған ұлпа культурасында екі түрлі ұлпа типі, эмбриогеді және борпылдақ гетерогенды, қалыптасатыны белгілі болды. Ұзақ

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