

УДК 581.14, 576.32/36

Бишимбаева Н.К., Қапасұлы Т., Амирова А.К., Бегзат А.Н.

РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК
г. Алматы, ул. Тимирязева, 45, e-mail: gen_jan@mail.ru

КАЛЛУСОГЕНЕЗ, СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ И РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ ОВСА (*Avena sativa* L.)

Аннотация

Проведено изучение влияния различных концентрации 2,4-Д на каллусогенез, соматический эмбриогенез и регенерацию растений овса. Установлено, что 2,5 мг/л 2,4-Д стимулирует соматический эмбриогенез и регенерацию растений. Проведено гистологическое изучение момента индукции каллусных тканей овса.

Ключевые слова: овес, каллусогенез, соматический эмбриогенез, регенерация растений.

Введение

Эффективное использование биотехнологических методов в селекции сельскохозяйственных культур зависит от разработки способов индукции каллусных тканей, соматического эмбриогенеза и регенерации растений. Овес известен как один из самых «трудных» зерновых культур, характеризующейся низкой частотой индукции эмбриодогенных структур и регенерации растений. Для каллусогенеза в основном использовали в качестве экспланта незрелые и зрелые [1, 2] зародыши, листовые диски, пыльцу [3, 4, 5]. В результате было установлено, что у овса наилучшим эксплантом для каллусогенеза являются незрелые зародыши. Целью данной работы является получение каллусных тканей овса, изучение морфологической гетерогенности и гистологического строения первичных каллусов, индукция соматического эмбриогенеза и регенерации растений.

Материалы и методы

В экспериментах с культурой тканей использовали общепринятые методы [6]. В качестве эксплантов для каллусогенеза служили незрелые зародыши длиной 1,8-2,0 мм трех генотипов овса (Құлан, Жорға, Құлагер). Экспланты высаживали на агаризованную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) [7], дополненную различными концентрациями 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) - 1,0 мг/л, 2,5 мг/л и 5,0 мг/л. На каждый вариант среды высаживали от 30 до 70 эксплантов. Экспланты и индуцированные каллусные ткани инкубировали при температуре 24±2С°. Каллусы субкультивировали через каждые 20-30 дней на свежие питательные среды того же состава. Индуцированные побеги растений-регенерантов длиной 0,5-1,0 см пересаживали на среду для укоренения МС без гормонов. Для гистологического исследования каллусные ткани с различной морфологией фиксировали в фиксаторе Чемберлена [8]. После фиксатора каллусы заключали в парафиновые блоки и готовили срезы для получения препаратов согласно З.П. Паушевой [8]. Срезы окрашивали реактивом Шиффа, гематоксилином и алциановым синим [9]. Полученные препараты исследовали на микроскопе Micros MC 300 (Австрия) с цифровой камерой MA 88 900 Premiere.

Результаты исследований и их обсуждение

Изучение влияния различных концентрации 2,4-Д (1,0 мг/л, 2,5 мг/л, 5,0 мг/л) на индукцию каллусов овса показало, что низкие концентрации 2,4-Д стимулируют каллусогенез по сравнению с высокой концентрацией 5,0 мг/л 2,4-Д. Наиболее оптимальным для различных генотипов является среда МС с 2,5 мг/л 2,4-Д, где процент каллусогенеза достигает до 46,8-60,7% (Таблица 1). Индукция каллусов происходит через 3-4 дня после помещения эксплантов на питательную среду, морфология появляющихся первичных каллусов одного типа и представляет собой рыхлый гетерогенный (РГ) каллус прозрачно-белого цвета (Рисунок 1 а).

Таблица 1 – Каллусогенез, морфогенез и регенерация растений в культуре тканей овса

Концентрации 2,4-Д	Генотипы	Каллусогенез , %	Типы каллусных тканей, %		Кол-во растений- регенерантов, шт.
			РГ	ЭК	
1,0 мг/л	Құлан	16,6±2,55	93,75	6,25	3
	Жорға	57,5±4,24	77,8	22,2	6
	Құлагер	55,6±2,91	80,0	20,0	-
2,5 мг/л	Құлан	46,8±8,20	63,16	36,84	13
	Жорға	60,7±2,93	41,2	58,8	8
	Құлагер	60,0±2,88	76,47	23,53	3
5,0 мг/л	Құлан	33,3±4,03	100,0	-	-
	Жорға	22,2±2,80	100,0	-	-
	Құлагер	33,3±2,74	100,0	-	-

В процессе культивирования тканей на исходной среде через 15-20 дней происходит их метаморфоз, часть РГ тканей трансформируются в эмбриогенные каллусы (ЭК) (Таблица 1). Концентрация 2,4-Д 2,5 мг/л также оказалась благоприятной для морфогенеза овса. Отмечено, что на этой среде происходит стимулирование индукции соматических эмбриоидов, так формирование ЭК колеблется от 23,53% до 58,8% (Таблица 1). Эмбриогенные каллусы овса состоят из глобулярных структур желтовато-белого цвета, на поверхности которых формируются сверкающие в виде иголок мелкие прозрачно-белые эмбриоиды на ранней стадии развития (Рисунок 1 б) или более крупные белые матовые эмбриоиды на поздней продвинутой стадии развития (Рисунок 1 в).



а



б



в

а – рыхлый гетерогенный каллус, б – эмбриогенный каллус с игольчатыми сверкающими мелкими эмбриоидами, в – ЭК с более крупными эмбриоидами

Рисунок 1 – Морфология различных типов тканей овса

Через 20-30 дней первичные каллусы овса пересаживали на свежие питательные среды того же состава. Во втором пассаже на 10-12 сутки происходит спонтанная регенерация побегов у части ЭК каллусов (Рисунок 2).

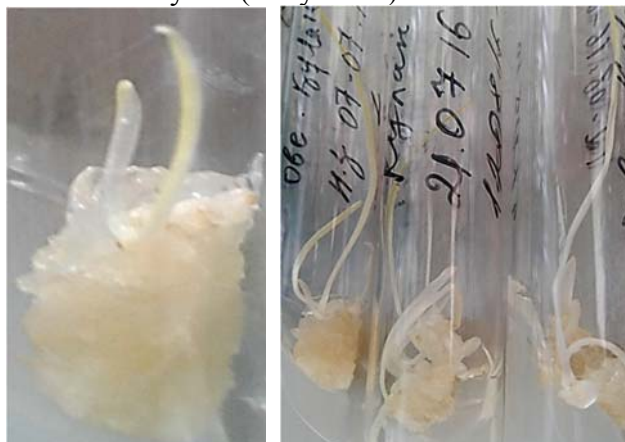


Рисунок 2 – Регенерация растений из каллусных тканей овса

Регенерация растений из ЭК происходит в основном на средах с низкими концентрациями 2,4-Д, количество растений-регенерантов колеблется от 3 до 13 (Таблица 1). Когда побеги достигают 3-5 см растения-регенеранты переносили для укоренения на питательные среды МС без фитогормонов и выращивали при 16-часовом фотопериоде и температуре $24 \pm 2^\circ\text{C}$ (Рисунок 3). В течение 10-15 дней на среде для укоренения побеги начинают укореняться.



Рисунок 3 – Выращивание растений-регенерантов овса
на среде для укоренения МС без фитогормонов

Гистологическое изучение момента индукции каллусов овса показало, что при помещении незрелых зародышей на питательные среды происходит разрыхление ткани с обособлением клеток друг от друга, в корневой части экспланта в области корневого чехлика происходит образование экстрацеллюлярных веществ, окрашенных алциановым синим в голубой цвет (полисахаридной природы), а выше корневого чехлика, где наблюдается индукция каллусной ткани, наблюдается накопление веществ красноватого оттенка (Рисунок 4 а).

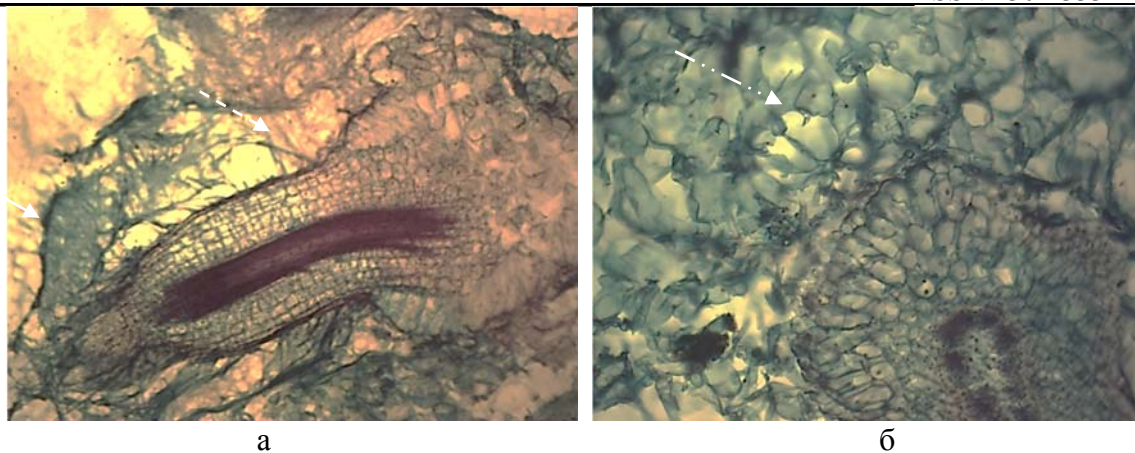


Рисунок 4 – Индукция каллусной ткани из незрелых зародышей овса

Наблюдаемая в культуре тканей овса ускоренное развитие морфогенетических реакций (каллусогенез – соматический эмбриогенез – регенерация растений) во многом определяется внутренними и внешними факторами, такими как физиологический статус экспланта (стадия развития незрелых зародышей), состав питательной среды и условия освещения при каллусогенезе, эмбриоидогенезе и регенерации растений.

Показано, что наиболее оптимальным размером экспланта для каллусогенеза являются незрелые зародыши овса длиной 1,8-2,0 мм. Установлено, что на процессы морфогенеза влияет концентрация фитогормона в питательной среде, так 2,5 мг/л 2,4-Д стимулирует соматический эмбриогенез и регенерацию растений. Отмечено, что немаловажную роль в быстром развитии событий каллусогенеза, эмбриоидогенеза и регенерации растений овса играют освещение и температура. Регулирование процессов морфогенеза при помощи освещения и температуры заключается в использовании для роста растений-регенерантов искусственного освещения с 16-часовым фотопериодом при температуре $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

Разработанные нами биотехнологические способы индукции каллусов, соматического эмбриогенеза и регенерации растений овса позволят использовать эти результаты в практике для генной инженерии овса для получения трансгенных растений, а также представляет большой научный интерес как объект для исследования тотипотентности растительных клеток и тканей.

Литература

1. Lamb C.R.C., Milach S.C.K., Pasquali G., Barro R.S. Somatic embryogenesis and plant regeneration derived from mature embryos of oat // Pesq. Agropec. Bras., Brasilia. – 2002. – V. 37. (2). P. 123-130.
2. Birsin M.A., Onde S., Ozgen M. Callus Induction and Plant Regeneration from mature embryos of oat (*Avena sativa* L.) // Turk J. Biol., 2001. – V. 25. – P. 427-434.
3. Slusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A. The effect of physical medium state on anther culture response in polish cultivated oat (*Avena sativa* L.) // Acta Biologica Cracovien Series Botanica – 2007. – V. 49/2. – P. 27-31.
4. Ponitka A., Slusarkiewicz-Jarzina A. Regeneratin of oat androgenic plants in relation to induction media and culture conditions of embryo-like structures // Acta Societatis Botanicorum poloniae – 2009. – V. 78. (3). – P. 209-213.

5. Warchol M., Skrzypek E., Nowakowska A., Marcinska I., Czyczylo-Mysza I., Dziurka K., Juzon K., Cyganek K. The effect of auxin and genotype on the production of *Avena sativa* L. doubled haploid lines // Plant Growth Regul., 2015. – DOI 10.1007/s10725-015-0082-6.

6. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев, 1980. – 407 с.

7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Phisiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – 473-497.

8. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – Москва: Агропромиздат, 1988. – 272 с.

9. Камелина О.П., Проскурина О.Б., Жинкина Н.А. К методике окраски эмбриологических препаратов // Бот. Журн. – 1992. – Том. 77. – 44. – С. 93-96.

Bishimbayeva N.K., Kapasuly T., Amirova A.K., Begzat A.N.

CALLUSOGENESIS, SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION IN TISSUE CULTURE OF OAT (*AVENA SATIVA* L.)

Annotation

The effect of different concentration of 2,4-D on callusogenesis, somatic embryogenesis and plant regeneration of oat have been studied. It is found that 2.5 mg/l 2,4-D stimulate the somatic embryogenesis and plant regeneration. The moment of induction of oat callus tissues have been study by histology.

Key words: oats, callusogenesis, somatic embryogenesis, plant regeneration.

Бишимбаева Н.К., Қапасұлы Т., Амирова А.К., Бегзат А.Н.

СҰЛЫ (*AVENA SATIVA* L.) ҰЛПА КУЛЬТУРАСЫНДАҒЫ КАЛЛУСОГЕНЕЗ, СОМАЛЫҚ ЭМБРИОГЕНЕЗ ЖӘНЕ ӨСІМДІК РЕГЕНЕРАЦИЯСЫ

Аңдатпа

2,4-D әр түлі концентрациясының сұлы каллусогенезіне, сомалық эмбриогенезіне және өсімдіктер регенерациясына әсері зерттелді. 2,5 мг/л 2,4-D сомалық эмбриогенезін және өсімдік регенерациясын ынталандырады деп табылды. Сұлы каллус ұлпаларының индукция сәтіне гистологиялық зерттеу жүргізілді.

Кілт сөздер: сұлы, каллус, соматикалық эмбриогенездің, өсімдік регенерация.