

Бабикова Анастасия Валентиновна

В 2005 г. с отличием окончила Приморскую государственную сельскохозяйственную академию и была принята в Биолого-почвенный институт ДВО РАН для выполнения работ по теме «Изучение процессов соматического эмбриогенеза в культуре клеток сои (*Glycine max* (L.) Merr.)» под руководством академика Ю.Н. Журавлева. Участвовала в научно-исследовательских проектах: интеграционный грант ДВО РАН–РАСХН «Методы биотехнологии в селекции сои и риса» (2005–2009); молодежный грант ДВО РАН «Соматический эмбриогенез как способ увеличения генетического разнообразия дальневосточных сортов сои *Glycine max* (L.) Merr.» (2012). С 2013 г. Анастасия Валентиновна руководит научно-техническим проектом «Разработка технологии получения растений-регенерантов декоративноцветущих видов древесных растений методом микроклонирования». Является соавтором 10 научных публикаций, принимала участие в работе всероссийских (Москва, Донецк, Улан-Удэ) и региональных (Владивосток, Благовещенск, Хабаровск) научных конференций.

УДК 851.3:582.739 (571.63)

А.В. БАБИКОВА

Соматический эмбриогенез дальневосточных сортов сои

Проведен анализ эмбриогенного потенциала четырех дальневосточных сортов сои культурной (Glycine max (L.) Merr.) на основе цитоэмбриологического метода. Определены эффективные концентрации ауксинов для индукции соматического эмбриогенеза. Установлено, что наиболее перспективными для дальнейшей селекции являются сорта Иван Караманов (ДальНИИСХ, Хабаровск) и Приморская 28 (ПримНИИСХ, пос. Тимирязевский).

Ключевые слова: культура клеток, тотипотентность, соматический эмбриогенез.

Somatic embryogenesis of the Far Eastern soybean varieties. A.V. BABIKOVA (Institute of Biology and Soil Science, FEB RAS, Vladivostok).

Based on cytoembryological method, the analysis of embryogenic potential in several Far Eastern varieties of soybean (Glycine max (L.) Merr.) is made. The effective concentrations of auxin for the induction of somatic embryogenesis are determined. The most perspective for further breeding are the following cultivars: Ivan Karamanov (Far East Agricultural Research Institute, Khabarovsk) and Primorskaya 28 (Primorsky Agricultural Research Institute, Timiryazevskiy village, Primorsky Territory).

Key words: cell culture, totipotency, somatic embryogenesis.

БАБИКОВА Анастасия Валентиновна – младший научный сотрудник (Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток). E-mail: BabikovaAV@rambler.ru

Методы культивирования изолированных клеток, тканей и органов растений, разработанные для изучения фундаментальных проблем физиологии растений, нашли широкое применение в клеточной селекции [1]. Основой этих методов является свойство тотипотентности растительной клетки – способность соматической клетки давать начало целому организму [2]. Одним из таких методов является индукция соматического эмбриогенеза, т.е. образование в клеточной культуре зародышеподобных структур (эмбриоидов, соматических зародышей) из отдельных или групп соматических клеток.

Эмбриоид является изначально целым организмом, имеет побег и корень, развивается под действием своей собственной гормональной регуляторной системы и проходит основные стадии формирования, соответствующие стадиям развития зиготических зародышей (глобулярной, сердечковидной, торпедовидной). Растения-регенеранты, полученные в результате соматического эмбриогенеза, в подавляющем большинстве случаев отличаются от родительских растений по одному или нескольким признакам и могут быть использованы для дальнейшей селекции. Основным препятствием к широкому использованию культур клеток в селекции является низкая регенерационная способность многих исходных линий и сортов. Установлено, что морфогенетический потенциал культивируемых тканей определяется многими факторами: генотипом; органом, из которого выделен эксплант; условиями выращивания донорных растений; условиями культивирования; составом питательной среды. Трудность состоит в том, что каждый вид и даже сорт требуют своих условий для регенерации растений.

Соя культурная *Glycine max* (L.) Merr. как альтернативный источник белка служит основной продовольственной культурой для 30% населения земного шара. Это самоопыляемый вид с низкой генетической изменчивостью, поэтому применение методов классической селекции в данном случае высокозатратно и требует длительной экспериментальной работы. Для ускорения получения новых сортов сои необходимо расширение диапазона генетической изменчивости уже имеющихся сортов. В настоящее время в России и за рубежом ведется интенсивное изучение закономерностей соматического эмбриогенеза сои и установление основных факторов, влияющих на его индукцию [3, 6, 9, 10]. Однако результаты этих исследований часто противоречивы, так как индукция соматического эмбриогенеза сои зависит от многих факторов, наиболее важным из которых является подбор исходного генотипа.

Задача настоящей работы – оценить вклад генотипа и влияние экзогенной физиологической регуляции на эмбриогенный потенциал культивируемых тканей четырех дальневосточных сортов сои (Ходсон, Приморская 81, Приморская 28 и Иван Караманов).

Семена предоставлены сотрудниками лаборатории биотехнологии ПримНИИСХ (пос. Тимирязевский, Уссурийский район Приморского края). Растения выращивали на экспериментально-опытном участке Биолого-почвенного института ДВО РАН.

В качестве первичных эксплантов для индукции соматического эмбриогенеза использовали незрелые семядоли, изолированные согласно методике Лаззари [7] из незрелых бобов на 7–14-й день после цветения, без зародышевой почечки (рис. 1а, см. вклейку). Эксплант длиной до 5 мм помещали на питательную среду Мурасиге и Скуга [8]. В качестве изменяемого компонента и индуктора соматического эмбриогенеза использовали ауксин – 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) в концентрации 10, 20, 40 мг/л. Оценку эмбриогенного потенциала полученного материала проводили путем подсчета количества эмбриоглобул, которые формировались на каждом экспланте через 45–60 дней после начала культивирования (рис. 1б, см. вклейку).

Для анализа стадий развития и аномалий соматического эмбриогенеза с помощью цитоэмбриологического метода эмбриоиды на разных стадиях развития фиксировали в смеси формалин–спирт–уксусная кислота (100 : 7 : 7, соответственно). Постоянные препараты готовили по общепринятой методике [5]. Окраску срезов проводили по методике Жинкиной и Вороновой [4]. Срезы изучали при помощи микроскопа Leica DMLS при увеличении объектива 5×, 10×, 20×, 40×.

Установлено, что все исследуемые сорта при низкой концентрации 2,4-Д (10 мг/л) образуют единичные соматические зародыши и обладают высокой (до 95%) способностью к формированию каллуса (рис. 2а, см. вклейку).

При прямом (без образования первичного каллуса) соматическом эмбриогенезе индукция морфогенеза начинается с асимметричного деления эпидермальных клеток экспланта (рис. 2б, см. вклейку). При непрямом (с образованием каллуса) соматическом эмбриогенезе первоначально образуется каллус, в котором формируются эмбриогенные клеточные комплексы из нескольких крупных сильно вакуолизированных клеток путем серии последовательных их делений. В этом комплексе происходит развитие проэмбриональных структур, состоящих из мелких клеток, из которых впоследствии формируются соматические зародыши (рис. 2г, см. вклейку). На эксплантах одновременно отмечены эмбриоиды на разных стадиях развития. Среди анализируемых сортов сои наблюдалась широкая вариабельность по числу образовавшихся эмбриоидов (2–15 шт.) на один эксплант (рис. 2в, д, ж, см. вклейку).

При добавлении в питательную среду 10 мг/л 2,4-Д наблюдали образование каллуса и единичных соматических зародышей, полученных непрямым путем у сортов Приморская 81 и Приморская 28. Увеличение концентрации 2,4-Д (20 и 40 мг/л) привело к стабильному образованию эмбриоидов при слабом образовании каллуса у сортов Иван Караманов (25 и 12 шт., соответственно) и Приморская 28 (53 и 33 шт., соответственно).

Эмбриоиды всех четырех сортов, находящиеся на торпедовидной и семядольной стадиях, даже при наличии каких-либо аномалий имели хорошо оформленный корневой и верхушечный апексы с большим количеством мелких меристематических клеток, что доказывает образование этих структур путем соматического эмбриогенеза. Несмотря на это дальнейшее развитие соматических зародышей наблюдалось крайне редко и практически всегда проходило с аномалиями (рис. 3, см. вклейку).

Таким образом, в результате исследований подтверждена важная роль генотипа в обеспечении способности растений к соматическому эмбриогенезу. Установлено, что наиболее перспективными для дальнейшей селекции являются сорта Иван Караманов и Приморская 28. Наибольшее количество эмбриоидов получено при культивировании эксплантов на среде с 2,4-Д в концентрации 20 мг/л.

Автор выражает искреннюю благодарность Т.Ю. Горпенченко за помощь в освоении цитологических методик и приготовлении препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко Р.Г. Клеточные технологии в сельскохозяйственной науке и практике // Муромцев Г.С.,. Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Прокофьев М.И. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Агропромиздат, 1990. С. 154–235.

2. Бутенко Р.Г. Тотипотентность растительной клетки и культура тканей // Культура изолированных органов, тканей и клеток растений. М.: Наука, 1970. С. 84–92.

3. Ефремова О.С., Фисенко П.П. Методы культуры ткани в селекции сои // Молодые ученые – агропромышленному производству Дальнего Востока: сб. науч. тр. молодых ученых / Россельхозакадемия, ДВ НМЦ, Примор. НИИСХ. Владивосток: Дальнаука, 2006. С. 11–17.

4. Жинкина Н.А., Воронова О.Н. К методике окраски эмбриологических препаратов // Ботан. журн. 2000. Т. 85, № 6. С. 165–168.

5. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988. 267 с.

6. Пахомов А.В., Емец А.И., Блюм Я.Б. Сравнительный анализ эмбриогенного потенциала сортов сои, районированных в различных эколого-географических зонах мира // Цитология и генетика. 2005. Т. 39, № 5. С. 20–27.

7. Lazzeri P.A., Hildebrand D.F., Collins G.B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean // Plant Mol. Biol. Rep. 1985. Vol. 3, iss. 4. P. 160–167.

8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobaco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. P. 473–497.

9. Teixeira L.R., Braccini A. de Lucca e, Churata B.G.M. et al. Evaluation of soybean cultivars on the embryogenic and organogenic potential // Acta Sci., Agron. 2011. Vol. 33, N 1. P. 67–74.

10. Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P. et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis // Plant Cell Tissue. Organ Cult. 2002. Vol. 69. P. 233–249.

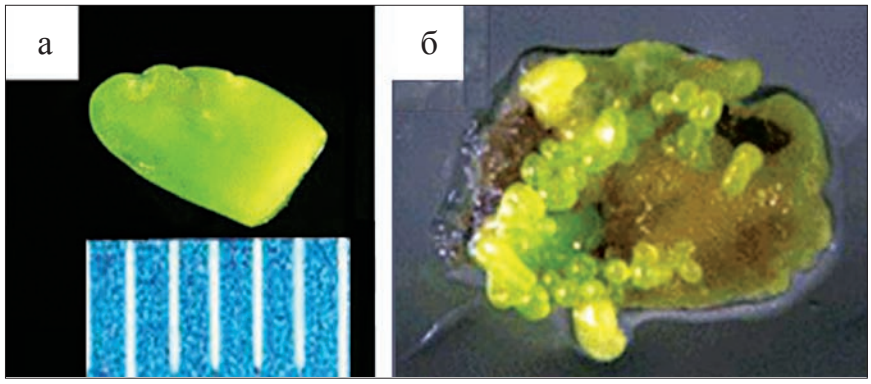


Рис. 1. Сорт Приморская 28: первичный эксплант (а) и эмбриоглобулы на первичном экспланте (б)

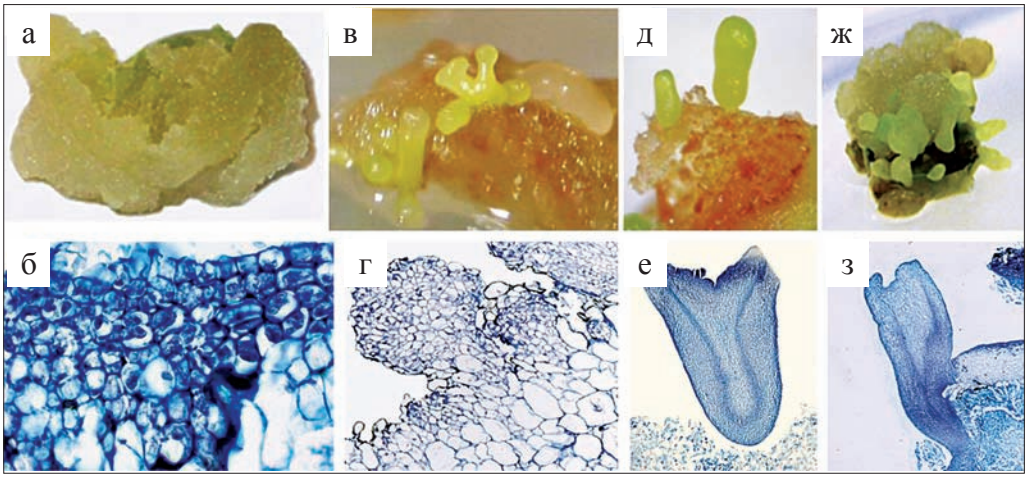


Рис. 2. Сорт Приморская 28: неэмбриогенный каллус (а); начальная стадия морфогенеза (б); глобулярная (в, г); торпедовидная (д); семядольная (е) стадии развития эмбриоида; эмбриоиды на разных стадиях развития на одном экспланте (ж); аномальный эмбриоид со сросшимися семядолями (з)

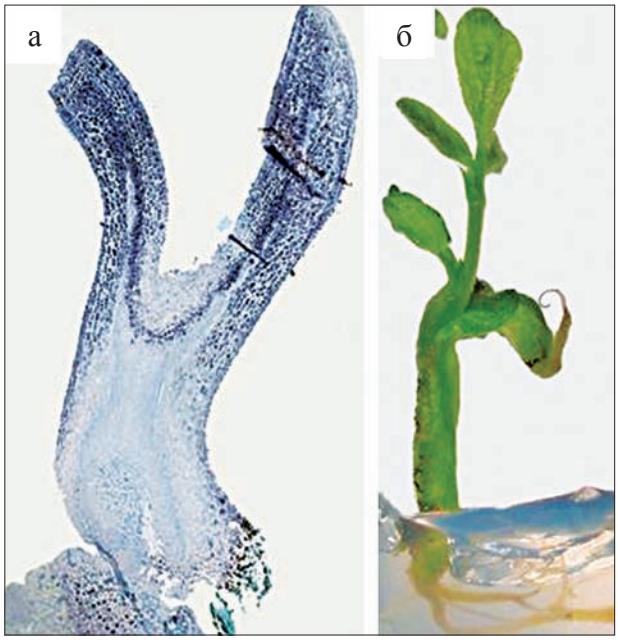


Рис. 3. Сорт Приморская 28: семядольная стадия развития эмбриоида (а); растение-регенерант, полученное методом соматического эмбриогенеза (б)