



## УЧАСТИЕ ЦИТОКИНИНОВ В НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ ЭМБРИОИДОГЕНЕЗА *IN VITRO* В ЗАРОДЫШЕВЫХ КАЛЛУСАХ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Галин И.Р., Зайцев Д.Ю., Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н.

Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, 450054, г. Уфа, пр. Октября, 69, Россия

E-mail: [o\\_seldimirova@mail.ru](mailto:o_seldimirova@mail.ru)

### Резюме

Изучали иммунолокализацию цитокининов на начальных этапах эмбриоидогенеза *in vitro* в зародышевых каллусах пшеницы сорта Башкирская 26. Установлено, что на стадии индукции эмбриоидогенеза цитокинины локализовались преимущественно в морфогенетических очагах и меристематической зоне, клетки которой представляют собой инициалы эмбриоидов. В фазе бластомеризации цитокинины равномерно распределялись в клетках апикальной части раннеглобулярного собственно эмбриоида, а также обнаруживались в гипофизе. В позднеглобулярном эмбриоиде цитокинины определялись в клетках собственно эмбриоида, преимущественно в его апикальной части. Обсуждается роль цитокининов в создании позиционной информации, необходимой для дифференциации клеток эмбриоида и инициации в нем органов.

**Ключевые слова:** яровая мягкая пшеница, *Triticum aestivum* L., каллус, эмбриоидогенез *in vitro*, цитокинины, иммунолокализация

**Цитирование** - Галин И.Р., Зайцев Д.Ю., Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Участие цитокининов в начальных этапах эмбриоидогенеза *in vitro* в зародышевых каллусах яровой мягкой пшеницы. *Биомика*. 2018. 10(2). С. 141-146. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-17

## PARTICIPATION OF CYTOKININS AT THE EARLY STAGES OF EMBRYOIDOGENESIS *IN VITRO* IN SPRING BREAD WHEAT EMBRYO CALLI

Galina I.R., Zaytsev D.Yu., Seldimirova O.A., Kruglova N.N.

Ufa Institute of Biology UFRS RAS, 450054, Ufa, pr. Otyabrya, 69, Russia

E-mail: [o\\_seldimirova@mail.ru](mailto:o_seldimirova@mail.ru)

### Resume

The immunolocalization of cytokinins at the early stages of embryoidogenesis *in vitro* in the wheat embryo calli (cv. Bashkirskaia 26) was studied. It was established that at the stage of embryoidogenesis induction cytokinins were localized mainly in morphogenetic centers and in the meristematic zone, the cells of which are the initials of embryoids. In the blastomerization phase, cytokinins were evenly distributed in the cells of the apical part of the early globular embryoid proper, and also were found in the hypophysis. In the late globular embryoid, cytokinins were determined in the cells of the embryoid proper, mainly in its apical part. The role of cytokinins in the creation of positional information necessary for the differentiation of embryoid cells and the initiation of its organs is discussed.

**Keywords:** spring bread wheat, *Triticum aestivum* L., callus, embryoidogenesis *in vitro*, cytokinins, immunolocalization

**Citation** - Galina I.R., Zaytsev D.Yu., Seldimirova O.A., Kruglova N.N. Participation of cytokinins at the early stages of embryoidogenesis *in vitro* in spring bread wheat embryo calli. *Biomics*. 2018. 10(2). P.141-146. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-17 [In Russian]

## Введение

Эмбриогенез как совокупность протекающих в развивающемся организме сопряженных процессов образования специализированных тканей и органов, ведущих к формированию целого организма, остается одной из сложнейших проблем биологии развития растений. Определяющая роль в регуляции эмбриогенеза отводится фитогормонам. Роль гормонов в эмбриогенезе изучается с середины прошлого века, и публикации на эту тему не иссякают до сих пор, при этом доминируют исследования роли ауксинов, особенно на ранних этапах эмбриогенеза [Hamann, 2001; Chen et al, 2010; De Smet et al., 2010; Robert et al., 2015], которые рассматриваются как критические [Батыгина (Batygina), 2014]. В то же время, данные о роли цитокининов в эмбриогенезе малочисленны и ограничиваются, как правило, сведениями о роли этих гормонов в развитии апикальной меристемы побега [Shani et al., 2006; De Smet et al., 2010; Su et al., 2011].

Следует отметить, что исследование эмбриогенеза растений *in vivo* затруднены интегральным характером морфогенетических процессов, зависимостью их от многих внутренних и внешних факторов и их взаимодействий. Удобной моделью для изучения различных аспектов эмбриогенеза *in vivo*, в том числе и гормональных, может служить эмбриоидогенез (соматический эмбриогенез) *in vitro* – формирование и развитие зародышеподобных структур (эмбриоидов) из соматических клеток/групп клеток, осуществляемое в строго контролируемых экспериментальных условиях *in vitro*, в том числе в каллусных культурах [Zimmerman, 1993; Носов (Nosov), 1999; Somatic Embryogenesis ..., 2016; Winkelmann, 2016].

Цель работы состояла в изучении иммунолокализации цитокининов на ранних этапах эмбриоидогенеза *in vitro* в зародышевых каллусах яровой мягкой пшеницы.

## Материал и методы исследования

Объектом исследования послужили зародышевые эмбриоидогенные каллусы яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Башкирская 26. Донорные растения выращивали в полевых условиях научного стационара Уфимского Института биологии УФИЦ РАН (Уфимский район). В качестве эксплантов для индукции каллуса использовали незрелые зародыши на 13-15 сутки после массового цветения. Получение зародышевых эмбриоидогенных каллусов и индукцию в них эмбриоидогенеза проводили согласно [Круглова, Сельдиминова (Kruglova, Seldimirova), 2011]. Экспланты высаживали на

среду, содержащую макро-, и микросоли и витамины по прописи Мурасиге-Скуга [Murashige, Skoog, 1962] и дополненную 2.0 мг/л 2,4-Д и 0.2 мг/л кинетина, и культивировали в темноте при 26°C в течение 4 недель. Для индукции эмбриоидогенеза полученные каллусы пересаживали на безгормональную среду Мурасиге-Скуга и культивировали при 26°C, 16-часовом фотопериоде, освещении 16000 люкс.

Иммунолокализацию цитокининов проводили, как описано в работе [Seldimirova et al., 2016]. Образцы фиксировали в 2 мл раствора 4% параформальдегида и 0.1 % глутарового альдегида под вакуумом в течение 3.5 часов, отмывали в 0.1 М фосфатном буфере (pH=7.3), обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации, заключали в метакрилатную смолу JB-4 (Electron Microscopy Sciences, США). Полутонкие срезы готовили при помощи микротомы HM 325 (Microm, Германия). Для выявления цитокининов на срезы наносили анти-ZR сыворотку кролика в рабочем разведении, инкубировали во влажной камере 2 часа, промывали фосфатным буфером, содержащим Tween 20. Затем срезы обрабатывали мечеными коллоидным золотом иммуноглобулинами козы против антител кролика (BioCell, Великобритания), инкубировали во влажной камере 1 час, промывали фосфатным буфером, содержащим Tween 20 и обрабатывали препаратом серебра для усиления окрашивания (BioCell, Великобритания).

Препараты просматривали с применением микроскопа проходящего света Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

## Результаты и обсуждение

Ранее нами [Сельдиминова и др. (Seldimirova et al.), 2011; Seldimirova, Kruglova, 2013] при анализе данных детального цито-гистологического анализа путей морфогенеза *in vitro* зародышевых и пыльниковых каллусов пшеницы различных сортов было установлено, что начальный этап всех путей универсален и состоит в обособлении в каллусе зоны меристематических клеток с плотной цитоплазмой и центральным расположением ядра, характеризующихся интенсивными делениями. Эти клетки четко отличаются от остальных клеток каллуса, которые приобретают паренхиматозные признаки – увеличиваются в размерах и становятся сильновакуолизированными. Зона меристематических клеток была обозначена нами как морфогенетический очаг.

В настоящей работе такие морфогенетические очаги также выявлены в зародышевых каллусах изучаемого сорта пшеницы. Методом иммунолокализации установлено, что цитокинины

локализуются преимущественно в клетках такого очага, отличающихся от других клеток каллуса интенсивным иммуногистохимическим окрашиванием (рис. 1а).

В ходе дальнейшего развития морфогенетические очаги преобразовываются в поверхностную меристематическую зону, клетки которой являются инициальными клетками

эмбриоидов. Установлено, что цитокинины преимущественно локализуются именно в клетках меристематической зоны, тогда как паренхиматозные клетки периферической и внутренних зон каллуса не демонстрируют специфическую окраску на цитокинины (рис. 1б).

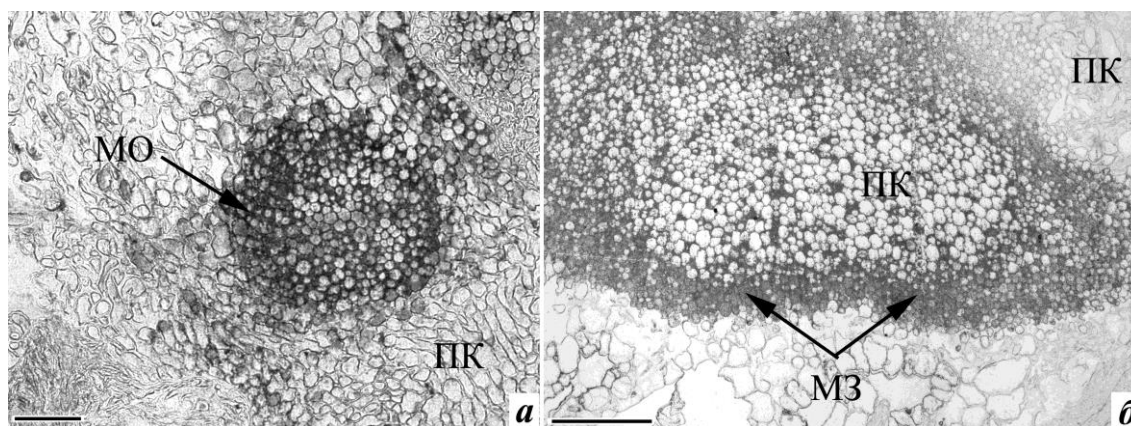


Рис. 1. Иммунолокализация цитокининов в клетках морфогенетического очага (а) и меристематической зоны (б) зародышевого каллуса пшеницы. Масштаб: (а) – 100 мкм, (б) – 200 мкм. Условные обозначения: МЗ – меристематическая зона, МО – морфогенетический очаг, ПК – паренхиматозные клетки.

Fig. 1. Immunocalization of cytokinins in the cells of the morphogenetic center (a) and the meristematic zone (b) of the wheat embryo callus of. Scale: (a) - 100  $\mu$ m, (b) - 200  $\mu$ m. Legend: МЗ – meristematic zone, МО – morphogenetic center, ПК – parenchymatous cells.

Инициальные клетки делятся с формированием эмбриоидов. Следует отметить, что плоскости деления могут ориентироваться случайным образом, как это было показано нами ранее [Seldimirova, Kruglova, 2013], что ведет к образованию различно ориентированных blastomerov (рис. 2а). В фазе blastomerizatsii на стадии раннеглобулярного эмбриоида иммуногистохимическое окрашивание на цитокинины наблюдается как в апикальной части эмбриоида, так и в клетке, которую можно рассматривать как гипофизу. В клетках суспензора окрашивания на цитокинины не наблюдается (рис. 2а).

В фазе blastomerizatsii на стадии позднеглобулярного эмбриоида (перед переходом к органогенезу) цитокинины локализуются в клетках собственно эмбриоида, преимущественно в его апикальной части. В клетках суспензора окрашивания по-прежнему не наблюдается (рис. 2б).

Несмотря на то, что к настоящему времени накоплен значительный фактический материал, касающийся различных аспектов исследования эмбриогенеза *in vitro* в каллусах злаков (в том

числе, пшеницы) различного происхождения [Круглова, Сельдимирова (Kruglova, Seldimirova), 2010; 2011; Seldimirova, Kruglova, 2013; Seldimirova et al., 2016; Somatic Embryogenesis ..., 2016], многие вопросы остаются открытыми. Так, до сих пор не выявлены факторы, стимулирующие индукцию различных путей морфогенеза *in vitro* в инициальных клетках меристематической зоны каллусов.

Известно, что один из важнейших эффектов цитокининов – стимуляция клеточных делений. Кроме того, цитокинины повышают аттрагирующую способность клеток, то есть способность аккумулировать питательные вещества за счет их транспорта из других тканей. Причем аттрагирующая способность, как правило, характерна именно для меристематических клеток [Медведев, Шарова (Medvedev, Sharova), 2011]. Можно предположить, что цитокинины, накапливаясь в клетках морфогенетических центров и меристематической зоны каллусов, участвуют в создании позиционных сигналов (в виде притока определенных веществ – “морфогенов”), необходимых для появления инициальных клеток эмбриоидов в определенных клеточных “нишах” каллусов.

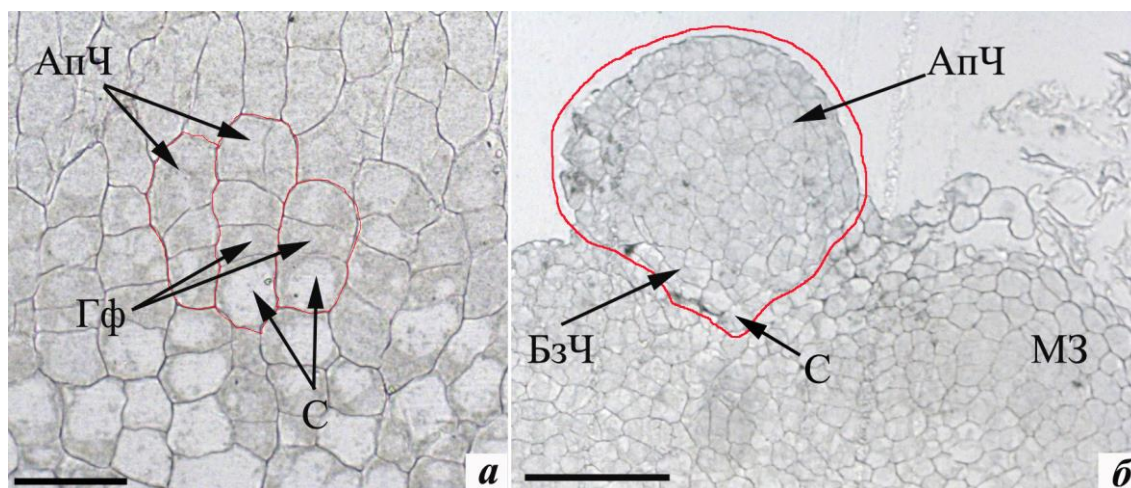


Рис. 2. Иммулокализация цитокининов в клетках раннеглобулярного (а) и позднеглобулярного (б) эмбриоидов. Масштаб: (а) – 25 мкм, (б) – 100 мкм. Условные обозначения: АпЧ – апикальная часть, БзЧ – базальная часть, Гф – гипофиза, МЗ – меристематическая, С – суспензор.

Красной линией обозначены контуры отдельных эмбриоидов.

Fig. 2. Immunolocalization of cytokinins in cells of early globular (a) and late globular (b) embryoids. Scale: (a) - 25  $\mu$ m, (b) - 100  $\mu$ m. Legend: АпЧ – apical part, БзЧ – basal part, Гф – hypophysis, МЗ – meristematic zone, С – suspensor. The red line indicates the contours of individual embryoids.

Накопление цитокининов в клетках ранних глобулярных эмбриоидов, по-видимому, служит сигналом для индукции интенсивных клеточных делений, необходимых для создания так называемой “критической массы” эмбриоида – определенного количества клеток, необходимого для дальнейшей дифференциации эмбриоидов.

Кроме того, вызывает интерес присутствие цитокининов в гипофизе – клетке, из которой в будущем будет формироваться корень и корневой чехлик. Известно, что формирование продольной оси будущего растения обуславливается функционированием апикальных меристем побега и корня и находится под контролем цитокининов совместно с ауксинами. При этом считается, что цитокинины стимулируют развитие апикальной меристемы побега и подавляют развитие апикальной меристемы корня (см. обзор [Romanov, 2009]). Однако имеются данные, подтверждающие участие цитокининов в развитии корня, по крайней мере, у пшеницы [Высоцкая и др. (Vysotskaya et al.), 2011; Seldimirova et al., 2016]. Полученные нами данные о локализации цитокининов в гипофизе, а также данные об экспрессии генов ARR7 и ARR15 гипофизе зародыша арабидопсиса [De Smet et al., 2010], поддерживают мнение об участии цитокининов (наряду с ауксинами) в развитии корня, в частности, в формировании ниши стволовых клеток корня (покоящегося центра) [De Smet et al., 2010].

Позднеглобулярная стадия развития зародыша/эмбриоида (перед переходом от фазы

бластомеризации к фазе органогенеза) рассматривается многими исследователями как критическая, поскольку именно на этой стадии клетки зародыша/эмбриоида характеризуются более высокой степенью компетенции к различным воздействиям (внешним и внутренним), по сравнению с предыдущими и последующими стадиями развития. Поэтому локализация цитокининов преимущественно в клетках апикальной части эмбриоида на позднеглобулярной стадии развития также может рассматриваться как проявление позиционной информации для инициирования образования органов эмбриоида.

Таким образом, можно сделать вывод, что накопление цитокининов в определенных группах клеток как каллуса, так и эмбриоидов, является одним из основных факторов, влияющих на активность митотических делений и дальнейшую дифференциацию клеток меристематической зоны каллуса, а впоследствии и эмбриоида. Полученные данные еще раз подтверждают важную (и, по-видимому, определяющую) роль цитокининов в индукции митотической активности и дифференциации клеток как *in vivo*, так и в условиях культуры *in vitro*.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания № АААА-А18-118022190099-6.

В работе использовано оборудование ЦКП “Агидель” УФИЦ РАН.

### Литература

1. Батыгина Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: ДЕАН, 2014. 764 с.
2. Высоцкая Л.Б., Ахиярова Г.Р., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р. Содержание цитокининов в клетках разных зон корней пшеницы. *Цитология*. 2011. Т.53. С.884-890.
3. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цито-гистологические аспекты. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.
4. Медведев С.С., Шарова Е.И. Биология развития растений. Т. 1. Начала биологии развития растений. Фитогормоны. СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2011. 253 с.
5. Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент. *Физиология растений*. 1999. Т. 46. С. 837–844.
6. Сельдимирова О.А., Катасонова А.А., Круглова Н.Н. Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза в каллюсах различного происхождения у пшеницы. *Физиология и биохимия культ. растений*. 2011. Т. 43. С. 297–306.
7. Chen D., Ren Y., Deng Y., Zhao J. Auxin polar transport is essential for the development of zygote and embryo in *Nicotiana tabacum* L. and correlated with ABP1 and PM H<sup>+</sup>-ATPase activities. *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. P. 1853–1867. DOI: 10.1093/jxb/erq056
8. De Smet I., Lau S., Mayer U., Jürgens G. Embryogenesis – the humble beginnings of plant life. *Plant J.* 2010. V. 61. P. 959–970. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04143.x
9. Hamann T. The role of auxin in apical-basal pattern formation during *Arabidopsis* embryogenesis. *J. Plant Growth Regul.* 2001. V. 20. P. 292–299. DOI: 10.1007/s003440010029
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant.* 1962. V. 15. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
11. Robert H.S., Khaitova L.C., Mroue S., Benková E. The importance of localized auxin production for morphogenesis of reproductive organs and embryos in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 5029–5042. DOI: 10.1093/jxb/erv256
12. Romanov G.A. How do cytokinins affect the cell? *Russ. J. Plant Physiol.* 2009. V. 56. P. 268–290. DOI: 10.1134/S1021443709020174
13. Seldimirova O.A., Kруглова N.N. Properties of the initial stages of embryoidogenesis *in vitro* in wheat calli of various origin. *Biol. Bull.* 2013 V. 40. P. 447–454. DOI: 10.1134/S1062359013050154
14. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kруглова N.N., Zaytsev D.Yu., Veselov S.Yu. Changes in distribution of cytokinins and auxins in cell during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2016. V. 52. P. 251–264. DOI: 10.1007/s11627-016-9767-4
15. Shani E., Yanai O., Ori N. The role of hormones in shoot apical meristem function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006. V. 9. P. 484–489. DOI: 10.1016/j.pbi.2006.07.008
16. Somatic embryogenesis: Fundamental aspects and applications / Eds Loyola-Vargas V.M., Ochoa-Alejo N. Springer, Cham, 2016. 506 p. DOI: 10.1007/978-3-319-33705-0
17. Su Y.-H., Liu Y.-B., Zhang X.-S. Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant.* 2011. V. 4. P. 616–625. DOI: 10.1093/mp/ssr007
18. Winkelmann T. Somatic versus zygotic embryogenesis: Learning from seeds. *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology*, V. 1359 / Eds Germana M., Lambardi M. Humana Press, New York, 2016. P. 25–46. DOI: 10.1007/978-1-4939-3061-6\_2
19. Zimmerman J.L. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell.* V. 5. P. 1411–1423. DOI: 10.1105/tpc.5.10.1411

### References

1. Batygina T.B. Biologiya razvitiya rastenii. Simfoniya zhizni. SPb.: DEAN, 2014. 764 s. [Plant development biology] (In Russian)
2. Chen D., Ren Y., Deng Y., Zhao J. Auxin polar transport is essential for the development of zygote and embryo in *Nicotiana tabacum* L. and correlated with ABP1 and PM H<sup>+</sup>-ATPase activities. *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. P. 1853–1867. DOI: 10.1093/jxb/erq056
3. De Smet I., Lau S., Mayer U., Jürgens G. Embryogenesis – the humble beginnings of plant life. *Plant J.* 2010. V. 61. P. 959–970. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04143.x
4. Hamann T. The role of auxin in apical-basal pattern formation during *Arabidopsis* embryogenesis. *J. Plant Growth Regul.* 2001. V. 20. P. 292–299. DOI: 10.1007/s003440010029
5. Kруглова N.N., Seldimirova O.A. Regeneraciya pshenicy *in vitro* i *ex vitro*: cito-gistologicheskie aspekty. Ufa: Gilem, 2011. 124 s. [Wheat regeneration in vitro and ex vitro: cyto-histological aspects] (In Russian)
6. Medvedev S.S., Sharova E.I. Biologiya razvitiya rasteniy. T. 1. Nachala biologii razvitiya rasteniy. Fитогормоны. СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2011. 253 с. [Biology of plant development. Vol.1. The beginning of the biology of plant development. Phytohormones.] (In Russian)
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant.* 1962. V. 15. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
8. Nosov A.M. Kul'tura kletok vysshih rasteniy – unikal'naya sistema, model', instrument. *Fiziologiya*

- rasteniy*. 1999. T. 46. S. 837–844. [Cell culture of higher plants-a unique system, model, tool] (In Russian)
9. Robert H.S., Khaitova L.C., Mroue S., Benková E. The importance of localized auxin production for morphogenesis of reproductive organs and embryos in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 5029–5042. DOI: 10.1093/jxb/erv256
  10. Romanov G.A. How do cytokinins affect the cell? *Russ. J. Plant Physiol.* 2009. V. 56. P. 268–290. DOI: 10.1134/S1021443709020174
  11. Seldimirova O.A., Katasonova A.A., Kruglova N.N. Formirovanie morfogeneticheskogo ochaga kak nachal'nyy etap morfogeneza v kallyusah razlichnogo proishozhdeniya u pshenicy. *Fiziologiya i biohimiya kul't. rastenii*. 2011. T. 43. S. 297–306. [Formation of morphogenetic hotbed as the initial stage of morphogenesis in callus of different origin in wheat] (In Russian).
  12. Seldimirova O.A., Kruglova N.N. Properties of the initial stages of embryoidogenesis *in vitro* in wheat calli of various origin. *Biol. Bull.* 2013 V. 40. P. 447–454. DOI: 10.1134/S1062359013050154
  13. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Zaytsev D.Yu., Veselov S.Yu. Changes in distribution of cytokinins and auxins in cell during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2016. V. 52. P. 251–264. DOI: 10.1007/s11627-016-9767-4
  14. Shani E., Yanai O., Ori N. The role of hormones in shoot apical meristem function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006. V. 9. P. 484–489. DOI: 10.1016/j.pbi.2006.07.008
  15. Somatic embryogenesis: Fundamental aspects and applications / Eds Loyola-Vargas V.M., Ochoa-Alejo N. Springer, Cham, 2016. 506 p. DOI: 10.1007/978-3-319-33705-0
  16. Su Y.-H., Liu Y.-B., Zhang X.-S. Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant.* 2011. V. 4. P. 616–625. DOI: 10.1093/mp/ssr007
  17. Vysotskaya L.B., Akhiyarova G.R., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R. Soderzhanie citokininov v kletkah raznykh zon korney pshenicy. *Tsitologiya*. 2011. T. 53. S. 884–890. [The content of cytokinins in the cells of different zones of wheat roots] (In Russian)
  18. Winkelmann T. Somatic versus zygotic embryogenesis: Learning from seeds. *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology*, V. 1359 / Eds Germana M., Lambardi M. Humana Press, New York, 2016. P. 25–46. DOI: 10.1007/978-1-4939-3061-6\_2
  19. Zimmerman J.L. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell*. V. 5. P. 1411–1423. DOI: 10.1105/tpc.5.10.1411