

А.В. ПАХОМОВ¹, А.И. ЕМЕЦ¹,
Ч.-Е. ХУ², Я.Б. БЛЮМ¹

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

²Университет Нью-Джерси им. Вильяма Патерсона,
Вэйн, Нью-Джерси, 07470, США

ОЦЕНКА ЭМБРИОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА СОРТОВ СОИ, РАЙОНИРОВАННЫХ В ЗОНЕ УКРАИНСКИХ ЛЕСОСТЕПИ И ПОЛЕСЬЯ КАК НЕОБХОДИМЫЙ ЭТАП ДЛЯ ИХ ДАЛЬНЕЙШЕЙ ТРАНСФОРМАЦИИ



С целью индукции соматического эмбриогенеза введены в культуру *in vitro* семь сортов сои [*Glycine max* (L.) Merr.] украинской селекции, районированных в зоне Лесостепи и Полесья: Чернятка, Васильковская, Киевская-27, Киевская-91, Марьяна, Чернобурая и Алтаир. При сравнительной оценке их эмбрионного потенциала установлено, что наивысшим эмбрионным потенциалом обладали сорта Васильковская (86 %) и Марьяна (88 %). При последующей регенерации растений из полученных эмбрионных каллусов было обнаружено, что наилучшими регенерационными способностями обладали сорта Марьяна и Киевская-91, хотя у сорта Киевская-91 эмбрионный потенциал составлял всего 71 %. В соответствии с полученными результатами эти три генотипа были отобраны для последующего использования в опытах по разработке эффективных методов библистической трансформации сортов сои украинской селекции.

© А.В. ПАХОМОВ, А.И. ЕМЕЦ, Ч.-Е. ХУ, Я.Б. БЛЮМ, 2004

Введение. Развитие и усовершенствование методов генетической инженерии является одним из важнейших путей улучшения агрономических характеристик такой важной сельскохозяйственной культуры, как соя (*Glycine max* (L.) Merr.) [1], поскольку позволяет преодолевать некоторые ограничения, накладываемые традиционной селекцией, при получении новых сортов этого растения для производства высококачественного масла и белка. К настоящему времени разработаны методы введения в культуру *in vitro*, регенерации и генетической трансформации различных генотипов сои [1–4], однако следует отметить, что культура соматических эмбрионидов является одной из наиболее важных и удобных систем для генетической инженерии [1]. Поэтому в настоящее время ведутся интенсивные исследования закономерностей соматического эмбриогенеза сои, а также работы по установлению основных факторов, влияющих на индукцию и пролиферацию эмбрионных культур этого растения [3, 5, 6], и оценке их вклада в регуляцию процессов первичного и вторичного эмбриогенеза, а также последующей регенерации растений [4]. Следовательно, разработка технологии получения высокоэмбрионной пролиферирующей тканевой культуры сои является одним из основных лимитирующих факторов эффективной трансформации и последующей регенерации трансгенных линий сои [1].

Убедительно продемонстрировано, что значительное влияние на эффективность регенерации растений в процессе соматического эмбриогенеза оказывает исходный генотип. Так, эмбрионный потенциал при оценке 26 сортов сои японской селекции составил от 0 до 95 % [7], при оценке 20 канадских сортов — от 0 до 70 % [4], американских сортов [8] — от 46 до 94 %.

В связи с возрастающим интересом к возделыванию сои на территории Украины становится весьма актуальным применение современных генетических подходов по улучшению хозяйственно ценных признаков сои отечественной селекции. Поэтому целью настоящего исследования было введение в культуру *in vitro* сортов сои украинской селекции, районированных в зоне Лесостепи и Полесья, для проведения сравнительной оценки их эмбрионного потенциала как необходимого этапа при дальнейшей разработке эффективных методов трансформации.

Материалы и методы. В работе были использованы сорта сои (*Glycine max* (L.) Merr.) украинской селекции, районированные в зоне украинских Лесостепи и Полесья: Чернятка, Киевская-27, Киевская-91, Васильковская, Марьяна, Чернобурая и Альтаир. Семена сортов Чернятка, Киевская-27, Киевская-91 были любезно предоставлены Институтом земледелия УААН, а сортов Васильковская, Марьяна, Чернобурая и Альтаир — Институтом физиологии растений и генетики НАН Украины.

Растения сои выращивали в условиях открытого грунта в период с мая по сентябрь. Для экспериментов по индукции соматического эмбриогенеза использовали молодые бобы с незрелыми семядолями, образовавшиеся на 7–14-й день после цветения растений. Бобы стерилизовали в течение 5 мин в 70 %-ном растворе этанола, затем в течение 20 мин в 1 %-ном растворе гипохлорида с последующим трехкратным промыванием в дистиллированной воде.

Изолирование эксплантов из незрелых семядолей проводили согласно методике [9]. Инициацию и развитие соматического эмбриогенеза, а также регенерацию растений осуществляли в соответствии с методами, описанными ранее [10, 11]. Для индукции эмбриогенеза незрелые семядоли 3–5 мм длиной помещали внешней стороной на питательную среду МСД40 [8], содержащую полный набор солей среды Мурасиге-Скуга (МС) [12], набор витаминов среды Гамборга [13], а также 3 % сахарозы, 40 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и 0,2 %-ный Фитогель («Sigma», США), pH 5,8. Экспланты культивировали на рассеянном свете при соблюдении 16-часового фотопериода при комнатной температуре. Эмбриогенные ткани, содержащие пролиферирующие глобулы, отбирали для последующего развития вторичного эмбриогенного каллуса. Пассаж культур проводили каждые две недели. После 6 нед культивирования на среде МСД40 эмбриогенные ткани переносили на питательную среду МСД20, аналогичную среде МСД40, но содержащую сниженную в два раза концентрацию 2,4-Д (20 мг/л). Для последующей регенерации эмбриогенный каллус переносили на безгормональную среду МС0, содержащую набор солей МС, витаминов среды Гамборга, 3 % сахарозы и 0,2 %-ный Фитогель, pH 5,8.

Оценку эмбриогенного потенциала полученного материала проводили путем подсчета количества эмбриоглобул, которые формировались на каждом экспланте через 42–45 дней после начала культивирования (рис. 1). Подсчет осуществляли по трехбалльной системе из расчета на одну семядолю: 0 баллов — отсутствие образовавшихся эмбриоглобул, 1 балл — 1–5 эмбриоглобул, 2 балла — 6–10 эмбриоглобул и 3 балла — более 10 эмбриоглобул.

Статистическую обработку полученных данных проводили согласно методу Лакина [14].

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты анализа эмбриогенного потенциала сортов сои украинской селекции, районированных в зоне Лесостепи и Полесья, свидетельствуют об их различной способности к формированию соматических эмбрионидов. Первые соматические эмбриониды, в частности у сорта Васильковская, формировались уже спустя 3 нед после помещения эксплантов на питательную среду. На начальном этапе индукции структура эксплантов приобретала более плотный вид и темно-коричневый цвет; на их поверхности формировались первичные соматические эмбриониды. Размер глобул варьировал в пределах от 0,1 до 1 мм.

Следует также отметить, что каллусные ткани, образовавшиеся на поверхности эксплантов, зачастую проявляли значительную морфологическую гетерогенность в зависимости от сорта. Сравнительная ее оценка позволила выделить несколько типов формирования эмбриогенного каллуса у тестируемых сортов. У большинства из них, в частности, у сортов Марьяна, Киевская-27, Киевская-91 и Чернятка, характерным было образование на поверхности эксплантов массы недифференцированной ткани, а также формирование больших кластеров мелких эмбриоглобул светло-зеленого цвета (рис. 2). При этом соматические эмбриониды развивались как из ткани первичного экспланта, так и из сформировавшегося каллуса. К такому же типу можно отнести и сорт Альтаир, хотя в отличие от указанных сортов у него наблюдали формирование эмбриоглобул намного больших размеров.

Иные типы формирования эмбриокаллуса отмечены у сортов Васильковская и Чернобурая. Для сорта Васильковская характерно обра-

зование крупных эмбриоглобул насыщенного зеленого цвета прямо на поверхности эксплантов. Формирование глобул в этом случае происходит в виде как небольших кластеров, так и поодиночно. Экспланты данного вида практически не способны образовывать рыхлую недифференцированную ткань. У сорта Чернобурая наблюдается еще один тип формирования эмбриокаллуса. Для него характерно образование недифференцированной каллусной массы и очень малого количества эмбриоглобул. Очевидно, это связано с тем, что глобулы в процессе культивирования утрачивают эмбрионный потенциал, реализуя тенденцию к формированию неэмбрионной каллусной массы.

Частота морфогенетического ответа различных сортов сои на индукцию соматического эмбриогенеза при описанных условиях культивирования составляла от 60 до 90 % от общего числа эксплантов, за исключением сорта Чернобурая (рис. 1). При этом наиболее высоким эмбрионным потенциалом характеризовались два сорта — Марьяна (88 %) и Васильковская (86 %). Наиболее низкая частота индукции эмбрионного ответа проявлялась у сорта Чернобурая — 13 %.

Для изучения особенностей последующего пролиферативного роста эмбрионных каллусов и индукции вторичного эмбриогенеза экспланты всех исследуемых сортов сои переносили на среду со сниженной в два раза концентрацией 2,4-Д. Ранее было показано, что снижение содержания данного гормона в среде способствует дальнейшей гистодифференциации эмбриоидов сои [10, 14] и позволяет повысить эффективность эмбриогенеза из тканей экспланта, а также уровень регенерации растений. Результаты наших экспериментов полностью подтверждают правомочность этих выводов. Снижение концентрации 2,4-Д в среде до 20 мг/л стимулировало активное развитие вторичных эмбрионных структур у всех анализируемых генотипов сои. В результате длительного культивирования и селективного отбора жизнеспособных эмбриоидов при последовательных пассажах нами были получены жизнеспособные хорошо пролиферирующие эмбрионные ткани. Они отличались компактной морфологией, рыхлой и узловатой струк-

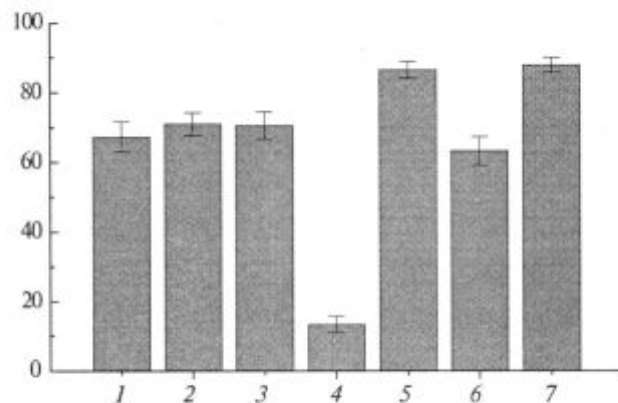


Рис. 1. Оценка пролиферативного эмбрионного потенциала (по вертикали, %) у сортов сои украинской селекции: 1 — Чернятка; 2 — Киевская-27; 3 — Киевская-91; 4 — Чернобурая; 5 — Васильковская; 6 — Альтаир; 7 — Марьяна

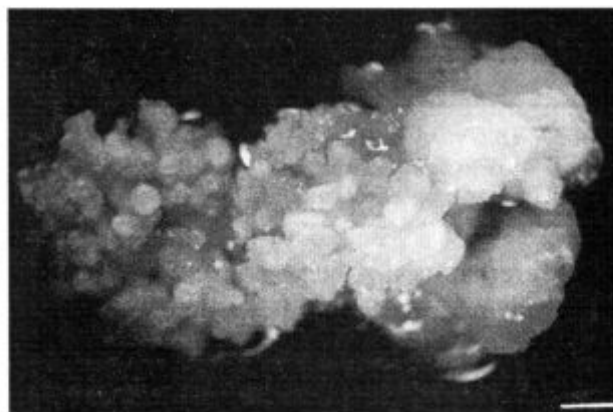


Рис. 2. Проллиферативный эмбрионный каллус сои (сорт Марьяна). Масштаб $\times 10$

турой и имели зеленый цвет. Сходные результаты были получены ранее при тестировании влияния различных генотипов сои на эффективность пролиферативного эмбриогенеза и регенерации растений [15].

Известно, что за инициацию вторичного соматического эмбриогенеза ответственны эпидермальные клетки глобулярных соматических эмбриоидов (рис. 3) [16]. Установлено также, что новые соматические эмбриоиды иницируются из морфологически отличимых (обладающих несколько большими размерами и более круглой формой) единичных эпидермальных клеток. Вместо типичного периклинального способа деления клеток для этих единичных клеток характерно антиклинальное деление.

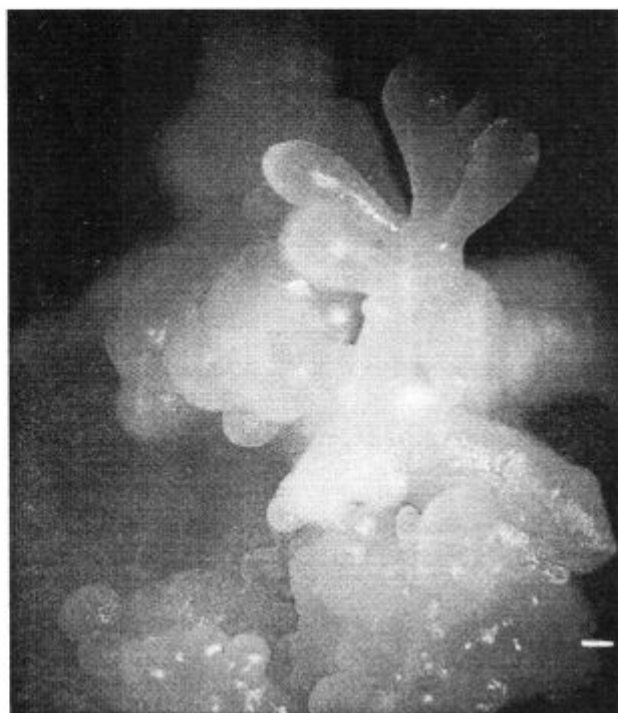


Рис. 3. Первичный соматический эмбрионид, образующий многочисленные вторичные соматические эмбриониды (сорт Васильковская). Масштаб $\times 40$

Соответственно их последовательные деления приводят к продукции новых глобулярных соматических эмбрионидов. Как было показано ранее, именно эпидермальная поверхность больших глобулярных эмбрионидов индуцирует новые деления клеток [16]. Согласно результатам наших экспериментов подобный путь развития может иметь место при культивировании эксплантов сорта Васильковская, так как они образовали наибольшие по размерам первичные эмбриониды, из которых впоследствии формировалось несколько генераций вторичных эмбриоглобул. Например, показано, что для некоторых сортов сои количество таких генераций может достигать пяти [10], что вполне сопоставимо с нашими наблюдениями в случае сорта Васильковская.

В целом же осуществление оценки эмбрионного потенциала сортов сои украинской селекции, районированных в зоне Лесостепи и Полесья, позволило нам прийти к нескольким закономерным обобщениям. Во-первых, было установлено, что для каждого из исследуемых сортов характерны как определенный тип фор-

мирования эмбрионной каллусной массы, так и различная скорость морфогенетического ответа на индукцию эмбриогенеза. Во-вторых, количественный показатель сформировавшихся соматических эмбрионидов, приходящихся на один эксплант, значительно варьировал в зависимости от изучаемого генотипа сои (таблица). Результаты количественного анализа специфики процесса формирования эмбрионидов у различных генотипов показывают, например, что у сорта Васильковская образование основной массы эмбрионидов (41 %) оценивается 1 баллом (в соответствии с предложенной нами шкалой), а у сорта Марьяна 35 % эмбрионидов соответствуют показателю в 3 балла. При этом необходимо отметить, что средние показатели эффективности формирования эмбрионидов, т.е. от 6–10 на одну семядолю, практически не отличались у обоих сортов и составляли 21,5 и 20 % соответственно. И хотя индукция соматического эмбриогенеза у эксплантов сорта Васильковская шла быстрее и формирование эмбрионидов происходило прямо с поверхности эксплантов по сравнению с сортом Марьяна, в первом случае процесс образования вторичных эмбрионидов шел менее интенсивно. Но именно этот показатель является ключевым фактором для последующей регенерации растений.

В ряде исследований показано влияние различных генотипов сои на индукцию соматического эмбриогенеза [4, 7, 8, 14, 15, 17]. Однако также установлено, что помимо генотипа на частоту индукции эмбриогенеза могут оказывать влияние и некоторые другие факторы [8,

Сравнение пролиферативного эмбрионного потенциала незрелых семядолей в зависимости от количества образованных соматических эмбрионидов, %

Сорта	0 баллов	1 балл	2 балла	3 балла
Черныткa	32	30	12	26
Киевская-27	29	32	16	23
Киевская-91	29	34	9	28
Чернобурая	86	13	1	0
Васильковская	13,5	41	21,5	24
Альгаир	36,5	25	13,5	25
Марьяна	12	33	20	35

18, 19]. Например, для уменьшения воздействия внешних условий синхронизируют цветение и сбор эксплантов, совершенствуют методы культивирования тканей [8, 19]. Одним из факторов, влияющих на индукцию соматического эмбриогенеза, является использование незрелых семядолей одинаковой длины — 3–5 мм, ибо неоднократно было продемонстрировано, что размер незрелого зародыша может быть критичным при образовании соматических эмбрионидов [9, 14, 20]. Поэтому для введения сои в культуру *in vitro* обычно используют экспланты размером 2–3 мм, полученные из незрелых зародышей размером 3–5 мм [8]. Однако использование только универсального размера незрелых зародышей при оценке некоторых сортов сои, имеющих генетически детерминированную разную длину зрелых семян, может искажать реальный показатель их эмбрионного потенциала из-за того, что используемые для анализа незрелые зародыши при их фиксированной длине будут находиться на разных стадиях своего развития. Поэтому в ряде случаев стандартизация длины зародышей, используемых в экспериментах, непременно приведет к искажению показателя эмбрионного потенциала у таких генотипов сои. Уместно отметить, что у всех сортов сои, используемых в наших исследованиях, длина зрелых семян была практически одинаковой, что не могло отрицательно сказаться на достоверности результатов по оценке их эмбрионного потенциала.

При последующей регенерации растений из полученного эмбрионного каллуса было установлено, что лучше всего регенерация шла у сортов Марьяна и Киевская-91, хотя у последнего сорта эмбрионный потенциал составлял всего 71 % (рис. 4). Немного хуже по сравнению с названными двумя сортами этот процесс протекал у сорта Васильковская. Однако все три сорта отобраны нами для последующего использования в экспериментах по библиотечной трансформации.

Таким образом, анализ сортов сои украинской селекции, районированных в зоне Лесостепи и Полесья, по оценке их способности к индукции соматического эмбриогенеза позволил выделить сорта Васильковская и Марьяна как обладающие наиболее высоким эмбрионным потенциалом в культуре *in vitro*. Наряду

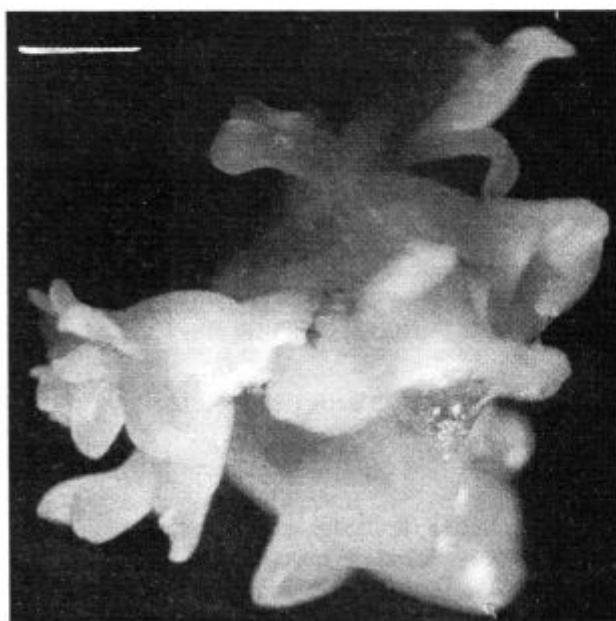


Рис. 4. Многочисленные развивающиеся побеги, произрастающие из компактного каллуса (сорт Марьяна). Масштаб $\times 6,4$

с этим установлено, что сорт Киевская-91, несмотря на более низкий эмбрионный потенциал, обладает высокими регенерационными способностями. Полученные результаты свидетельствуют о том, что эмбрионная ткань данных генотипов может эффективно использоваться в исследованиях с применением современных методов биотехнологии и генетической инженерии, в частности, для дальнейшей трансформации.

SUMMARY. Seven soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars zoned in forest-steppe and marshy woodlands of Ukraine: «Chernuatka», «Vasylkivska», «Kyivska-91», «Kyivska-27», «Marjana», «Chernobura» and «Altair» were established *in vitro* for somatic embryogenesis inducing. Cultivars «Marjana» (88 %) and «Vasylkivska» (86 %) demonstrated the highest embryogenic capacity among all the tested cultivars. During the further plant regeneration cultivars «Marjana» and «Kyivska-91» showed the best capacity to form adult plants despite the fact that embryogenic capability of the cultivar «Kyivska-91» was 71 %. According to the obtained data three genotypes were selected for the further investigation of effective methods of biolistic transformation of ukrainian cultivars.

РЕЗЮМЕ. З метою індукції соматичного ембріогенезу ввели в культуру *in vitro* сім сортів сої [*Glycine max* (L.) Merr.] української селекції, які районовані в зоні Лісостепу та Полісся: Чернятка, Васильківська, Київсь-

ка-27, Київська-91, Мар'яна, Чорнобура та Альтаїр. При порівняльній оцінці їх ембріогенного потенціалу встановили, що найвищим ембріогенним потенціалом володіли сорти Васильківська (86 %) та Мар'яна (88 %). При наступній регенерації рослин з отриманого ембріогенного калюса виявили, що найкращі регенераційні здібності мали сорти Київська-91 та Мар'яна, хоча у сорту Київська-91 ембріогенний потенціал становив лише 71 %. Згідно з отриманими результатами ці три сорти відібрані для наступного використання в дослідках по розробці ефективних методів біолістичної трансформації сортів сої української селекції.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Finer J.J., Cheng T.-S., Verma D.P.S.* Soybean transformation: technologies and progress // *Soybean Genetic, Molecular Biology and Biotechnology* / Eds D.P.S. Verma, R.C. Shoemaker. — CAB International, 1996 — P. 249–261.
2. *Hazel C.B., Klien T.M., Anis M., Wilde H.D., Parrott W.A.* Growth characteristics and transformability of soybean embryogenic cultures // *Plant Cell Rep.* — 1998. — **17**. — P. 765–772.
3. *Samoylov V.M., Tucker D.M., Thibaud-Nissen F., Parrott W.A.* A liquid-medium-based protocol for rapid regeneration from embryogenic soybean cultures // *Plant Cell Rep.* — 1998. — **18**. — P. 49–54.
4. *Simmonds D.H., Donaldson P.A.* Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes // *Plant Cell Rep.* — 2000. — **19**. — P. 485–490.
5. *Droste A., Leite P.C.P., Pasquali G., Mundstock E.C., Bondanese-Zanettini M.H.* Regeneration of soybean via embryogenic suspension culture // *Sci. Agric.* — 2001. — **58**. — P. 240–248.
6. *Parrott W.A., Williams E.G., Hildebrand D.F., Collins G.B.* Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* — 1989. — **16**. — P. 15–21.
7. *Komatsuda T., Ohyama K.* Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max* // *Theor. Appl. Genet.* — 1998. — **75**. — P. 695–700.
8. *Bailey M.A., Boerma H.R., Parrott W.A.* Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean // *In Vitro Cell Dev. Biol.* — 1993a. — **29**. — P. 102–108.
9. *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. — **3**. — P. 160–167.
10. *Finer J.* Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] // *Plant Cell Rep.* — 1988. — **7**. — P. 238–241.
11. *Finer J.J., Nagasawa A.* Development of an embryogenic suspension culture of soybean [*Glycine max* Merrill] // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* — 1988. — **15**. — P. 125–136.
12. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* — 1962. — **15**. — P. 473–497.
13. *Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K.* Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell Res.* — 1968. — **50**. — P. 151–158.
14. *Лакін Г.Ф.* Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
15. *Bailey M.A., Boerma H.R., Parrott W.A.* Genotype-specific optimisation of plant regeneration from somatic embryos of soybean // *Plant Sci.* — 1993. — **93**. — P. 117–120.
16. *Sato S., Newell C., Kolacz K., Tredo L., Finer J., Hinchey M.* Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems // *Plant Cell Rep.* — 1993. — **12**. — P. 408–413.
17. *Parrott W.A., Stewart C.N.* Possible factors affecting fertility of soybean plants from transgenic embryogenic cultures // *In Vitro Cell Dev. Biol.* — 1995. — **31**. — P. 29A.
18. *Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К.* Морфогенетические реакции образцов сои (*Glycine max* L., Merr. и *G. ussuriensis* L.) в культуре in vitro // *Цитология и генетика* — 1999. — **33**, № 5. — С. 7–14.
19. *Shoemaker R.S., Amberger L.A., Palmer R.G.* Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in soybean [*Glycine max* Merrill] // *In Vitro Cell Dev. Biol.* — 1991. — **27**. — P. 84–88.
20. *Lippmann B., Lippmann G.* Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean [*Glycine max* Merrill] // *Plant Cell Rep.* — 1984. — **4**. — P. 216–218.

Поступила 25.03.03