

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЗРЕЛЫХ И НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ЯРОВОЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Бычкова О.В.¹, Ерещенко Д.В.², Розова М.А.³

^{1,2} Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

³ Алтайский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Барнаул, Россия

E-mail: olga4ka_asu@mail.ru¹

Исследованы процессы индукции каллусогенеза различных генотипов яровой твердой пшеницы. Установлена генотипическая зависимость частоты морфогенеза. Показано, что эффективность процесса и тип каллуса обусловлены выбранным эксплантом. Установлено, что наибольшим морфогенетическим потенциалом обладают каллусы из незрелых зародышей. У морфогенетических линий, полученных из зрелых зародышей, процесс органогенеза не достигает организменного уровня, а заканчивается образованием корней (ризогенезом).

Ключевые слова: твердая пшеница, морфогенез, зрелые зародыши, незрелые зародыши, каллус, органогенез.

USE OF MATURE AND IMMATURE EMBRYOS OF SPRING DURUM WHEAT *IN VITRO*: A COMPARATIVE ANALYSIS

O. V. Bychkova¹, D.V. Ereschenko², M. A. Rozova³

^{1,2} Altai State University, Barnaul, Russia

³ Altai Research Institute of Agriculture, Barnaul, Russia

E-mail: olga4ka_asu@mail.ru¹

The processes of callusogenesis induction in genotypes of durum spring wheat was investigated. Installed genotypic frequency dependence of morphogenesis. The efficiency of the process and type of callus depend on the explant. It is established that the highest morphogenetic potential of the calli from immature embryos. From the morphogenetic lines derived from Mature embryos, the process of organogenesis does not reach the level of the organism, and ends with the formation of roots (rhizogenesis).

Keywords: durum wheat, morphogenesis, mature embryos, immature embryos, callus, organogenesis.

Следует цитировать / Citation:

Бычкова О.В., Ерещенко Д.В., Розова М.А. (2016). Сравнительная оценка использования зрелых и незрелых зародышей яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro*. *Acta Biologica Sibirica*, 2 (2), 76–80.

Bychkova O.V., Ereshchenko D.V., Rozova M.A. (2016). Use of mature and immature embryos of spring durum wheat *in vitro*: a comparative analysis. *Acta Biologica Sibirica*, 2 (2), 76–80.

Поступило в редакцию / Submitted: 11.05.2016

Принято к публикации / Accepted: 10.06.2016

crossref <http://dx.doi.org/10.14258/abs.v2i2.1349>

© Бычкова, Ерещенко, Розова, 2016

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License

ВВЕДЕНИЕ

Значительные успехи в селекции зерновых культур в последнее время были достигнуты благодаря использованию биотехнологических методов. Некоторые из них позволяют создавать новый исходный материал (Вечернина, Таварткиладзе, 2014), другие – проводить оценку устойчивости генотипов к различным неблагоприятным факторам среды (Россев, 2016). Те и другие задачи селекции подразумевают использование культуры растительных клеток *in vitro*. Оценка и отбор стрессоустойчивых форм на селективных средах в культуре *in vitro* предполагает получение каллусной ткани, которая должна быть сопряжена с дальнейшей регенерацией растений (Зобова, Конышева, 2007; Зобова, Луговцова, Ступко, 2011).

Многими авторами установлено, что тип выбранного экспланта оказывает существенное влияние на процесс каллусо- и морфогенеза. Так у злаков в качестве различных видов эксплантов используют: зрелые и незрелые зародыши, узлы кущения, пыльники, листовые экспланты, участки корней и др. (Wang, Wei, 2004 Сидор, Орлов, 2005; Бавол и др., 2008; Авксентьева, Петренко, 2009). В связи с высокой частотой образования первичного каллуса у пшеницы, до 100 % в зависимости от генотипа

(Авксентьева, Жмурко, 2012; Никитина, Хлебова, Ерещенко, 2014; Никитина, Хлебова, 2015), в селекции зерновых чаще всего используют культуру зрелых и незрелых зародышей. Незрелые зародыши – экспланты с высоким морфогенетическим потенциалом, однако существенным недостатком их применения является невозможность использовать зародыши в течение всего года. Зрелые зародыши удобны для круглогодичного использования, стали широко применяться в культуре *in vitro* для решения различных селекционных задач.

Целью данной работы являлось провести сравнительную оценку использования зрелых и незрелых зародышей твердой яровой пшеницы в культуре *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования служили шесть генотипов яровой твердой пшеницы *Triticum durum* Desf. различного эколого-географического происхождения, используемые в селекционных целях в Алтайском научно-исследовательском институте сельского хозяйства (АНИИСХ).

Для получения каллусов в качестве эксплантов использовали зрелые и незрелые зародыши, изолированные на 15-17-й день после опыления. Стерилизацию проводили 70%-ым спиртом на протяжении 10-ти (для зрелых зародышей) и 2-ух минут (для незрелых зародышей), затем 2%-ым раствором лизоформа-3000, в течение 15-ти и 10-ти минут, для зрелых и незрелых зародышей, соответственно. Далее трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Выделенные зрелые и незрелые зародыши помещали щитком вверх на питательную среду по прописи Мурасиге-Скуга (МС) с полным набором макро- и микросолей, содержащую 0,7% агара, 3 % сахарозы, 2 мг/л 2,4-Д в условиях стерильности. Клеточные культуры выращивали в темноте при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 14-18 суток. Далее каллусы были пересажены на среду для регенерации с уменьшенной до 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина, культивирование осуществлялось на свету при 16-ти часовом фотопериоде и температуре $20-22^\circ\text{C}$.

Эксперимент выполнен в 4 повторениях, пассировано около 60 зародышей на генотип. Отбор материала проводили в течение одного полевого сезона (2015 г.). Для статистического анализа использовали пакет прикладных программ Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Результаты исследований показали, что все генотипы формировали каллус, но скорость и частота индукции каллусообразования была различной. При использовании в качестве эксплантов незрелых зародышей формирование первичного каллуса началось на 3 сутки, тогда как в культуре зрелых зародышей интенсивная дедифференциация эксплантов начиналась лишь на 4-5 сутки. Массовое образование каллусов наблюдалась на 5-7 день после помещения зародышей на питательную среду.

Литературные данные о разности морфогенного потенциала различных типов эксплантов подтверждаются полученными нами результатами, которые представлены на рис. 1. Из рисунка видно, что количество образовавшихся каллусов в культуре зрелых зародышей варьировало от $80,7 \pm 5,0$ (Г-752) до $90,8 \pm 4,1$ (Оазис) в зависимости от генотипа. Средняя частота каллусообразования составляла 86,7 %. Дедифференциация незрелых зародышей происходила более интенсивно, средний уровень образования каллусов оказался выше и составил около 94%, варьируя от $90,9 \pm 2,1$ (Г-752) до $97,7 \pm 1,8$ (Оазис).

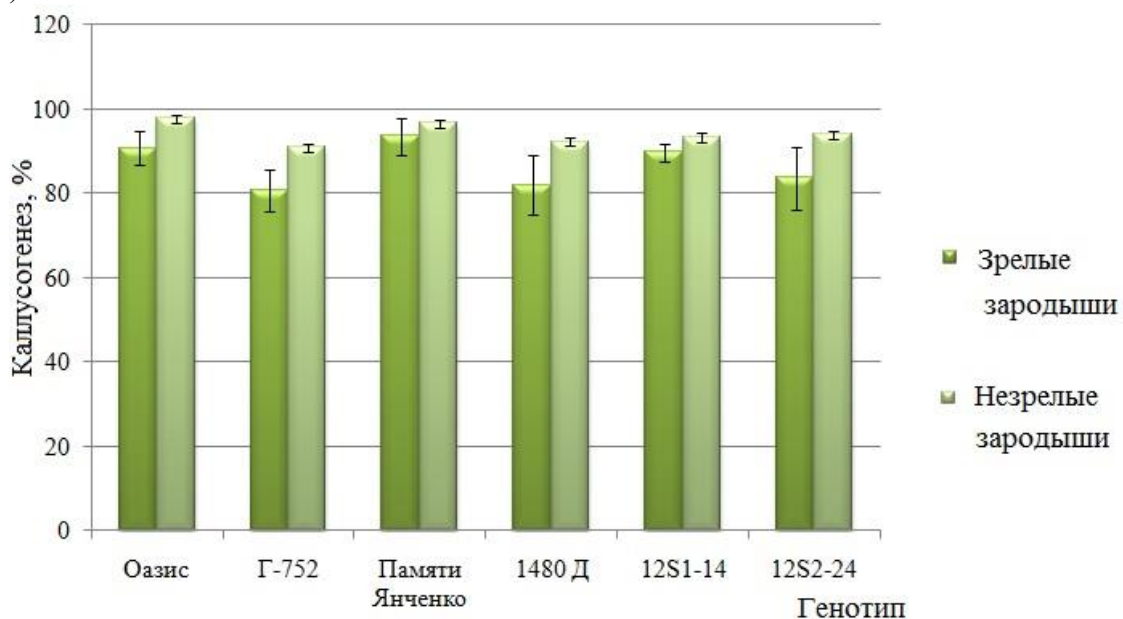


Рис. 1. Частота каллусогенеза образцов яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro*, %

Для большинства практических целей важен не столько уровень каллусогенеза, сколько количество образовавшихся морфогенных линий сопряженной дальнейшей регенерацией растений. Так ряд авторов придерживается мнения об отсутствии связи между частотой индукции каллуса и уровнем морфогенеза (Maddock, Risiott, Parmar, 1985; Hong-jun, Shuij, Osamu, 1989), поэтому одной из основных задач исследования являлась оценка морфогенетического потенциала изучаемых генотипов.

На рис. 2 представлена частота морфогенеза образцов яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro*. Из рисунка видно, что уровень морфогенеза существенно различался и в среднем составлял 91,5 % в культуре незрелых зародышей, что выше на 43,8 % по сравнению со зрелыми. Генотипами, показавшими лучшие результаты, как в культуре зрелых, так и незрелых зародышей, являются сорта Оазис, Памяти Янченко и линия Г-752.

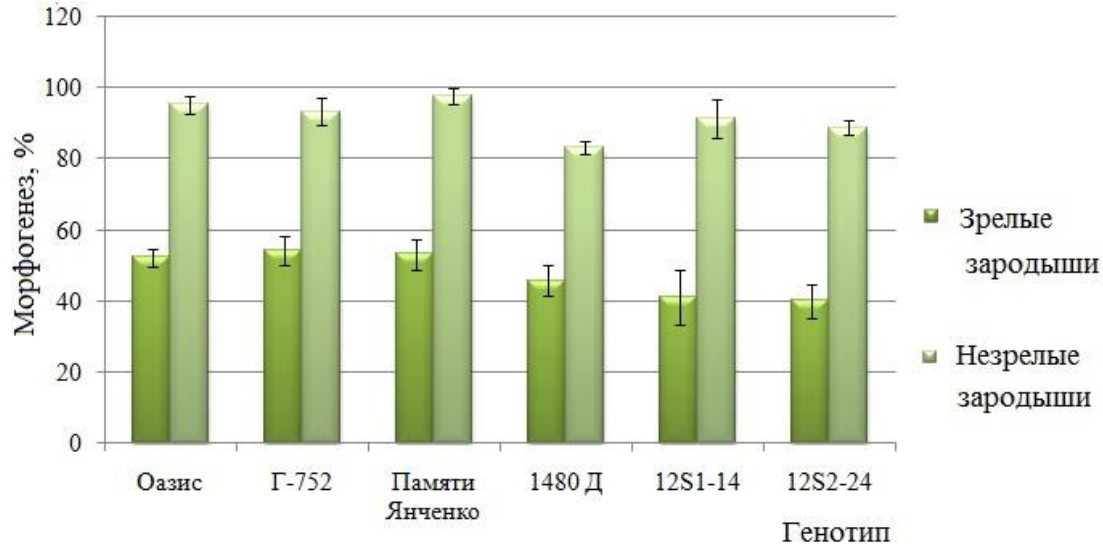


Рис. 2. Частота морфогенеза образцов яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro*, %

При качественной оценке морфогенетических линий полученных в культуре зрелых и незрелых зародышей были отмечены некоторые особенности процесса морфогенеза. Так, в культуре незрелых зародышей морфогенез заканчивался формированием растений (Ерещенко, Хлебова, Розова, 2015), что предполагает высокий уровень гемморизо-, и эмбриоидогенеза (рис. 3а).

В культуре зрелых зародышей наблюдали формирование большого количества корней – ризогенез (рис. 3б). Возможной причиной этого могло стать высокое эндогенное содержание гормонов как в исходных эксплантах, так и в пролиферирующем каллусе. Основными веществами, способными регулировать процессы морфогенеза у недифференцированных тканей являются цитокинины и ауксины.

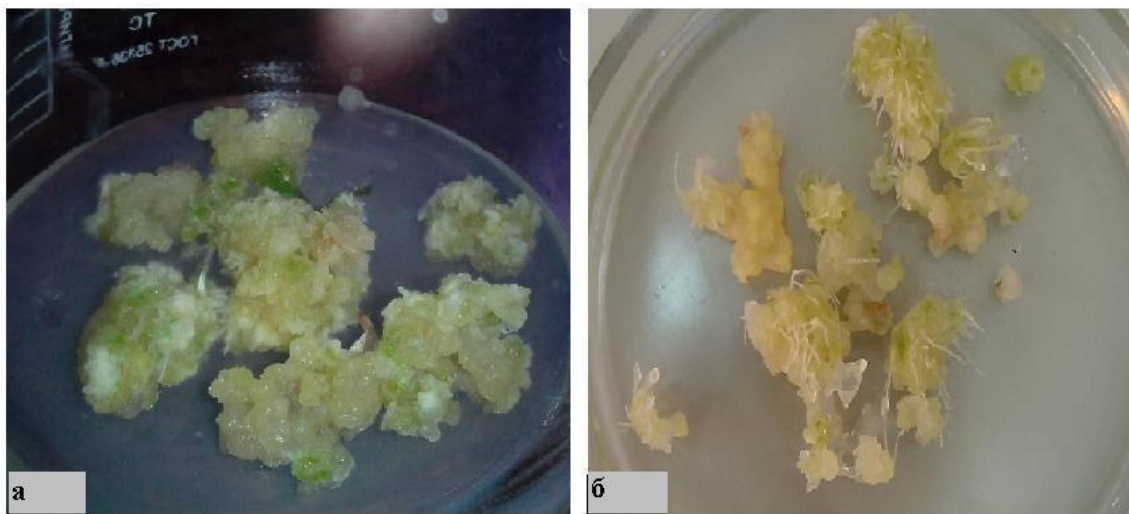


Рис. 3. Морфогенез яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro*

Так, из литературных данных известно, что формообразовательные процессы в культуре ткани зачастую зависят от содержания эндогенных гормонов в исходных эксплантах. Это продемонстрировано на растениях табака, трансгенных по гену изопентил-трансферазы (*ipt*) и

глюкоизомеразы (*xyl*), обладающих повышенной способностью синтеза цитокининов. Изменение эндогенного баланса регуляторов роста (цитокинины/ауксины) оказало влияние на процесс морфогенеза у трансгенных растений, введенных в культуру, что привело к более интенсивному формированию побегов и снижению процесса ризогенеза (Фоменко и др., 2001).

Таким образом, ответная реакция зависит не только от концентрации экзогенного применяемого фитогормона, но и от его эндогенного уровня в тканях растений и соотношения с другими гормонами. В данном случае, развивающийся зародыш не нуждается в экзогенных гормонах, так как он сам продуцирует стимуляторы роста.

Высокая отрицательная корреляция между частотами ризогенеза и регенерации растений, установленная в ряде работ (Maddock, Risiott, Parmar, 1985; Hong-jun, Shuij, Osamu, 1989), что говорит о неэффективности применения зрелых зародышей для получения растений-регенерантов. Однако использование данного типа экспланта позволяет проводить оценку селекционного материала в культуре *in vitro* на устойчивость к различным факторам среды (Россеев, Белан, Россева, 2011; Тагиманова, 2013; Сашко, 2014).

ВЫВОДЫ

Наличие эндогенных фитогормонов в зрелых зародышах твердой пшеницы, свидетельствует об особой роли чувствительности тканей экспланта к регуляторам роста, которые определяют его компетентность и готовность воспринимать экзогенный гормональный сигнал и реагировать на него определенным образом. Вполне вероятно, что особенностями гормонального статуса изучаемых сортов объясняется их специфическая реакция в зависимости от доз ауксина и цитокинина, присутствующего в питательной среде.

Для получения растений регенерантов, в частности соматклонов эффективнее использование незрелых зародышей. При оценке устойчивости генотипов к различным стрессовым факторам (ТМ, недостаток влаги, избыточное засоление и т.д.) возможно использование зрелых зародышей, где образование любых морфогенных линий уже говорит об устойчивости генотипа.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Авксентьева О.А., Жмурко В.В. Генетический контроль путей морфогенеза *in vitro* изогенных по генам PPD линий озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. // Вестник КазНУ. – 2012. – Т. 56. – № 4. – С. 133–136.

Авксентьева О.А., Петренко В.А. Роль генотипа, состава среды и типа экспланта в формировании первичного каллюса изогенных линий пшеницы // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. – 2009. – Вип. 9. – № 856. – Р. 56–62.

Бавол А.В., Дубровная О.В., Лялько И.И. Регенерация растений из различных типов эксплантов мягкой пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. – 2008. – Т.40. – № 2. – С. 150–156.

Вечернина Н. А., Тавркиладзе О.К. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. – Барнаул: Изд-во Алт. Ун-та, 2014. – 251 с.

Ерещенко О.В., Хлебова Л.П., Розова М.А. Оценка регенерационного потенциала яровой твердой пшеницы для создания засухоустойчивого селекционного материала // Биотехнология и общество XXI века: сборник статей Международной научно-практической конференции. – 2015. – С. 341–345.

Зобова Н.В., Коньшева Е.Н. Использование биотехнологических методов в повышении соле- и кислотоустойчивости ярового ячменя. – Новосибирск: СО Россельхозакадемии, 2007. – 124 с.

Зобова Н.В., Луговцова С.Ю., Ступко В.Ю. Условия обеспечения эффективных процессов регенерации в культуре изолированных зародышей ячменя, пшеницы и овса // Вестник КрасГАУ. – 2011. – № 12. – С. 109–115.

Никитина Е.Д., Хлебова Л.П. Особенности морфогенеза яровой мягкой пшеницы в культуре *in vitro* в зависимости от условий произрастания // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2015. – № 2. – С. 125–131.

Никитина Е.Д., Хлебова Л.П., Ерещенко О.В. Разработка отдельных элементов технологии клеточной селекции яровой пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессам // Известия АГУ. – 2014. – № 3/2 (83). – С. 50–54.

Россеев В.М., Белан И.А., Россева Л.П. Использование метода *in vitro* в селекции пшеницы мягкой яровой // Вестник АГАУ. – 2016. – № 2. – С. 5–9.

Россеев В.М., Белан И.А., Россева Л.П. Тестирование *in vitro* яровой мягкой пшеницы на засухоустойчивость // Вестник АГАУ. – 2011. – № 2. – С. 32–34.

Сашко Е.Ф. Оценка устойчивости гибридов *Triticum aestivum* L. к метаболитам патогена *Helminthosporium avenae eidam* // Селекция и семеноводство овощных культур. – 2014. – № 45. – С. 473–484.

Сидор Л.С., Орлов П.А. Регенерационный потенциал различных видов пшеницы, ржи и ячменя в культуре листовых эксплантов // Цитология и генетика. – 2005. – Т.40. – № 5. – С. 28–34.

Тагиманова Д.С., Ергалиева А.Ж., Райзер О.Б., Хапилина О.Н. Оценка генотипов яровой мягкой пшеницы на засухоустойчивость в условиях *in vitro* // Биотехнология. Теория и практика. – 2013. – № 2. – С. 42–46.

Фоменко Т.И., Бердичевец Л.Г., Малюш М.К., Чумакова И.М. Влияние эндогенного и экзогенного действия гормонов на процесс каллусообразования и морфогенез у табака // Клеточные ядра растений – Экспрессия и реконструкция: Материалы I Региональной научной конференции, г. Минск, 28–29 мая 2001 г. – Минск, 2001. – С. 152–158.

Hong –jun Liu, Shuij Misoo, Osamu Kamijima. Effect of genotype of the response in immature embryos culture of Japanese and Chinese wheat // Sci. Rept. Fac. Age. Kobe. Univ. – 1989. – Vol. 18. – P. 165–172.

Maddock S.E., Risiott R., Parmar S. Somaclonal variation in the gliadin patterns of grains of regenerated wheat plants // J. Exp. Bot. – 1985. – Vol. 36. – № 173. – P. 1976–1984.

Wang C., Wei Z. Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum* L.) leafbase // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2004. – Vol.77. – № 2. – P. 149–153.

REFERENCES

- Avksent'eva, O.A., Petrenko, V.A. (2009). Rol' genotipa, sostava sredy i tipa eksplanta v formirovanii pervichnogo kallyusa izogennyh linii pshenicy. *Vesnik Harkovsk'ogo nacional'nogo universiteta meni V.N.Karazina*. 9(856), 56–62. (In Russian).
- Avksent'eva, O.A., Zhmurko, V.V. (2012). Geneticheskiy kontrol' putei morfogeneza *in vitro* izogennyh po genam PPD linii ozimoi pshenicy *Triticum aestivum* L. *Vestnik KazNU*, 56(4), 133–136. (In Russian).
- Bavol, A.V., Dubrovnyaya, O.V., Lyal'ko, I.I. (2008). Regeneraciya rastenii iz razlichnyh tipov eksplantov myagkoi pshenicy. *Fiziologiya i biohimiya kul't. rastenii*, 40(2), 150–156. (In Russian).
- Ereshenko, O.V., Hlebova, L.P., Rozova, M.A. (2015). *Ocenka regeneracionnogo potenciala yarovoi tvrdoj pshenicy dlya sozdaniya zasuhoustoichivogo selekcionnogo materiala*, pp. 341–345. *Biotehnologiya i obshchestvo v XXI veke*. Minsk (In Russian).
- Fomenko, T.I., Berdichevec, L.G., Malyush, M.K., Chumakova, I.M. (2001). *Vliyanie endogenno i ekzogenno deistviya gormonov na process kallusoobrazovaniya i morfogeneza u tabaka*. Proceed. Int Conf. Kletochnye yadra rastenii. Ekspressiya i rekonstrukciya, 152–158. (In Russian).
- Hong-jun Liu, Shuij, Misoo, Osamu, Kamijima. (1989). Effect of genotype of the response in immature embryos culture of Japanese and Chinese wheat. *Sci. Rept. Fac. Age. Kobe. Univ.*, 18, 165–172.
- Maddock, S.E., Risiott, R., Parmar S. (1985). Somaclonal variation in the gliadin patterns of grains of regenerated wheat plants. *J. Exp. Bot.*, 36(173), 976–1984.
- Nikitina, E.D., Hlebova, L.P. (2015). Osobennosti morfogeneza yarovoi myagkoi pshenicy v kul'ture *in vitro* v zavisimosti ot uslovii proizvodstva. *Ul'yanovskii medico-biologicheskii zhurnal*. 2, 125–131. (In Russian).
- Nikitina, E.D., Hlebova, L.P., Ereshenko, O.V. (2014). Razrabotka otdel'nyh elementov tehnologii kletochnoi selekcii yarovoi pshenicy na ustoichivost' k abioticheskim stressam. *Izvestiya AGU*, 3-2 (83), 50–54. (In Russian).
- Rosseev, V.M., Belan, I.A., Rosseeva, L.P. (2011). Testirovanie *in vitro* yarovoi myagkoi pshenicy na zasuhoustoichivost'. *Vestnik AGAU*, 2, 32–34. (In Russian).
- Rosseev, V.M., Belan, I.A., Rosseeva, L.P. (2016). Ispol'zovanie metoda *in vitro* v selekcii pshenicy myagkoi yarovoi. *Vestnik AGAU*, 2, 5–9. (In Russian).
- Sashko, E.F. (2014). Ocenka ustoichivosti gibridov *Triticum aestivum* L. k metabolitam patogena *Helminthosporium avenae* eidam. *Selekciya i semenovodstvo ovoshnyh kul'tur*, 45, 473–484. (In Russian).
- Sidor, L.S., Orlov, P.A. (2005). Regeneracionnyi potencial razlichnyh vidov pshenicy, rzhi i yachmenya v kul'ture listovyh eksplantov. *Citologiya i genetika*, 40(5), 28–34. (In Russian).
- Tagimanova, D.S., Ergaliev, A.Zh., Raizer, O.B., Hapilina, O.N. (2013). Ocenka genotipov yarovoi myagkoi pshenicy na zasuhoustoichivost' v usloviyah *in vitro*. *Biotehnologiya. Teoriya i praktika*. 2, 42–46. (In Russian).
- Vechernina, N. A., Tavrkiladze, O.K. (2014). *Metody biotehnologii v selekcii, razmnozhenii i sohranении genofonda rastenii*. Barnaul: Barnaul State University. (In Russian).
- Wang, C., Wei, Z. (2004). Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum* L.) leafbase. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(2), 149–153.
- Zobova, N.V., Konysheva, E.N. (2007). *Ispol'zovanie biotehnologicheskikh metodov v povyshenii sole- i kisloutoichivosti yarovogo yachmenya*. Novosibirsk: Siberian Branch of Russian Agrarian Academy (In Russian).
- Zobova, N.V., Lugovcova, S.Yu., Stupko, V.Yu. (2011). Usloviya obespecheniya effektivnyh processov regeneracii v kul'ture izolirovannyh zarodyshei yachmenya, pshenicy i ovs. *Vestnik KrasGAU*. 12, 109–115. (In Russian).