

МОРФОГЕНЕЗ ЯРОВОЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ В КУЛЬТУРЕ ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ

О.В. Бычкова, Л.П. Хлебова, Д.В. Ерещенко

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

E-mail: olga4ka_asu@mail.ru, blebova61@mail.ru, darya.yereshchenko@mail.ru

Зрелые зародыши пшеницы – удобный тип эксплантов, доступный без ограничения в любое время года. Однако регенерационная способность каллусов, полученных из зрелых зародышей, низка в силу особенностей их гормонального статуса. Индукция и поддержание высокой скорости неорганизованного роста клеточных культур *in vitro* проходят на питательных средах с достаточно высоким уровнем экзогенных ауксинов, а процессы дифференциации – при наличии гормонов цитокининового ряда. Нами выполнено исследование особенностей прохождения различных образовательных процессов в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы (линия 12S2-24, сорта Памяти Янченко и Оазис) в зависимости от периода их культивирования на средах различного назначения. Зрелые зародыши культивировали в темноте при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$ на среде Мурашиге-Скуга с полным набором макро- и микросолей, содержащей 0,7% агара, 3% сахарозы и 2 мг/л 2,4-Д (инициирующая среда). Для индукции морфогенеза часть каллусов в течение 30 суток каждые 5 дней пассировали на дифференцирующую среду того же состава минеральных веществ и витаминов, дополненную 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина и выращивали на свету при температуре $22 - 24^\circ\text{C}$ с 16-ти часовым фотопериодом. Изучено 6 вариантов временных интервалов выращивания каллусов на иницилирующей среде (5, 10, 15, 20, 25, 30 суток) и вариант развития клеточных культур на исходной среде без переноса на дифференцирующую среду. Оценивали частоты каллусогенеза, морфогенеза и регенерации (относительно морфогенных каллусов).

Установлено, что при использовании в качестве эксплантов зрелых зародышей яровой твердой пшеницы, активная индукция каллусогенных процессов происходит на 5–7-ой день после помещения их на среду МС, содержащую 2 мг/л 2,4-Д. Максимальный уровень каллусогенеза (92,3%) наблюдали при инкубации культур на исходной среде в течение 30-ти суток. При краткосрочном культивировании эксплантов на иницилирующей среде (в течение 5-ти суток) и последующем переносе на дифференцирующую среду (МС + 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетин) происходит пролиферация уже оформившихся клеточных кластеров, однако новых каллусов не иницируется. Это обусловило низкую частоту каллусогенеза (44,3%). Развитие первичного каллуса на индуцирующей среде в течение 20 – 30 дней способствовало сохранению компетентности соматических тканей зрелых зародышей и обеспечило формирование максимального числа морфогенных структур различного качества. Направление развития морфогенеза зависело от времени пребывания культур на исходной среде: при увеличении инкубационного периода до 15 суток доля ризогенеза снижалась на 25%, в каллусе формировались узелковые структуры, из которых в дальнейшем развивались растения. Наиболее эффективный вариант реализации регенерационного потенциала морфогенных каллусов для сорта Оазис и линии 12S2-24 – 15 – 20-суточная экспозиция на исходной среде с последующим переносом на дифференцирующую среду; для сорта Памяти Янченко – выращивание каллусов на исходной среде в течение 25 суток. Продемонстрировано достоверное влияние генотипа и режима культивирования на интенсивность различных морфообразовательных процессов в культуре зрелых зародышей. Специфичность конкретного сортообразца проявлялась, начиная с 5 – 10-суточного пребывания эксплантов на иницилирующей среде. **Ключевые слова:** пшеница твердая яровая, генотип, зрелый зародыш, каллус, морфогенез, регенерация растений, среда Мурашиге-Скуга, 2,4-Д, кинетин, временной период культивирования.

Citation:

Bychkova, O.V., Khlebova, L.P., Ereschenko, D.V. (2016). Morphogenesis of Spring Durum Wheat in mature embryo cultures. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University*, 6 (3), 209–218.

Поступило в редакцию / Submitted: 21.10.2016

Принято к публикации / Accepted: 29.11.2016

crossref <http://dx.doi.org/10.15421/201688>

© Bychkova, Khlebova, Ereschenko, 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

MORPHOGENESIS OF SPRING DURUM WHEAT IN MATURE EMBRYO CULTURES

O.V. Bychkova, L.P. Khlebova, D.V. Ereschenko

*Altai State University, Barnaul, Russia**E-mail: olga4ka_asu@mail.ru, hlebova61@mail.ru, darya.yereshchenko@mail.ru*

Mature wheat embryo is a convenient type of explants because of its unlimited availability at any time of the year. But the regenerative capacity of the calli derived from mature embryos is low due to the peculiarities of their hormonal status. A high-performance protocol for culturing these explants is necessary to develop to use them in various areas of applied plant biotechnology. Induction and maintenance of a high rate for unorganized growth in plant cell cultures take place on a nutrient medium with high levels of an exogenous auxin, but the presence of a cytokinin is required to induce differentiation processes. We have carried out a study of the various morphogenetic processes in mature embryo cultures of three spring durum wheat genotypes, depending on the time of their cultivation on the callus induction medium. Mature embryos were cultured in the dark at 26 ± 1 °C on Murashige & Skoog (MS) medium containing MS basal salts and vitamins supplemented with 0.7% agar, 3% sucrose, as well as 2 mg L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (callus induction medium). For morphogenesis induction a part of calli was transferred every five days to a differentiating medium of the same composition of salts and vitamins supplemented with 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D and 0.5 mg L⁻¹ kinetin. Cell cultures were grown in the light at 22 – 24 °C with a 16-hour photoperiod. Six variants of time intervals for callus proliferation on the induction medium have been studied (5, 10, 15, 20, 25, 30 days). A variant of cell culture growing without transferring to the differentiating medium was examined too. Frequencies of callus induction, morphogenesis induction and regeneration capacity (relatively morphogenetic calli) were calculated.

We found active callus induction was visible on the 5th – 7th day after placing explants on the MS inducing medium. The greatest level of callusogenesis (92.3%) was discovered under incubating cultures on the original medium for 30 days. After the short-term cultivation of explants on the initiating medium (for five days) new calli on the differentiating medium were not initiated. In this variant, proliferation of the before induced cell clusters was taking place. This resulted in a low frequency of callus formation (44.3%). Development of the primary callus on the inducing medium for 20 – 30 days helped to keep the competence in somatic tissues of mature embryos and generated the largest number of morphogenetic structures of different qualities. The way of morphogenesis depended on the time interval for cell culture growing on the initial medium. Rhizogenesis decreased by 25% after increasing the incubation period to 15 days. This was followed by active nodular structure formation in calli and plant regeneration. For Oasis variety and 12S2-24 line the most effective variant for the realization of regenerative capacity of morphogenetic calli was to incubate cultures on the induction medium for 15 – 20 days and then to transfer them to the differentiating medium. For Pamyati Yanchenko variety the best variant was to grow calli on the induction medium for 25 days. We have shown the significant effects of a genotype and cultivation conditions at different developmental stages of mature embryo cultures from durum wheat. The specificity of a variety began to manifest after 5 – 10 days staying on the induction medium.

Keywords: spring durum wheat, genotype, mature embryo, callus, morphogenesis, regeneration of plants, Murashige-Skoog medium, 2,4-D, kinetin, time of culturing.

Одним из основных принципов, лежащих в основе биотехнологии растений, является феномен тотипотентности соматических клеток, позволяющий им в специально созданных условиях в результате перепрограммирования перейти в новое качество. Вторичная дифференцировка клеток *in vitro* может происходить различными способами и в различных направлениях. Однако успех большинства прикладных биотехнологий в конечном итоге зависит от реализации регенерационного потенциала клеточных культур. Таким образом, проблема управления процессами морфогенеза *in vitro* является центральным звеном практического использования клеточных технологий в селекции, интродукции, декоративном цветоводстве, различных областях растениеводства (Pellegrineschi *et al.*, 2004; Vasil, 2007; Stupko, Zbova, 2012; Никитина и др., 2013; 2014; Ерещенко и др., 2015; Бычкова, 2016; Мякишева и др., 2016б; Tikhomirova *et al.*, 2016). Способность культивируемых тканей к регенерации определяется целым рядом факторов, среди которых выделяют генотип и физиологический статус растения-донора, тип экспланта и его состояние, состав питательной среды и условия культивирования (Benkirane *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Mitić *et al.*, 2006; Chauhan *et al.*, 2007; Авксентьева, Петренко, 2009; Сельдмирова и др., 2011; Zhang *et al.*, 2014; Khlebova, Nikitina, 2016; Мякишева и др., 2016а; Никитина и др., 2016; Хлебцова и др., 2016).

Соматические клетки однодольных растений дифференцируются достаточно рано, что сопровождается потерей их митотической активности и морфогенетической способности. Ранняя утрата компетентности соматическими тканями, вероятно, связана с регуляцией метаболизма эндогенных гормонов группы ауксинов (Feher, 2005). Поскольку синтез ауксинов в растениях происходит в молодых тканях и органах, полагают, что зародыши имеют их более высокий эндогенный уровень по сравнению со зрелыми тканями. У злаков, как правило, лишь зиготические эмбрионы, молодые соцветия и ткани проростков используют для получения культур, способных к регенерации. У пшеницы наиболее компетентным эксплантом признаны незрелые зародыши (Григорьева, Шлепер, 2006; Круглова, Катасонова, 2009; Jia *et al.*, 2009; Miroschnichenko *et al.*, 2009; Gill *et al.*, 2014; Ерещенко и др., 2015; Бычкова,

2016; Хлебова и др., 2016). Однако их получение ограничено сезоном и стадией развития. Альтернативой данному виду эксплантов могут выступать зрелые зародыши, которые практически в неограниченном количестве доступны в любое время года (Jia *et al.*, 2007; Delporte *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2016; Россеев и др., 2016). Вместе с тем, особенности гормонального статуса зрелых зародышей существенно снижают эффективность их применения для получения регенерантов (Бычкова и др., 2016). Известно, что индукция и поддержание высокой скорости неорганизованного роста клеточных культур *in vitro* требует присутствия в питательных средах достаточно высокого уровня экзогенных ауксинов, а процессы дифференциации проходят при наличии гормонов цитокининового ряда. В связи с этим, особую роль может играть период нахождения культуры на индукционной и дифференцирующей средах, различающихся, как правило, составом и концентрацией регуляторов роста. В силу пониженной компетентности зрелых зародышей определение временных интервалов их культивирования на разных средах может оказаться одним из факторов, имеющих решающее значение для протекания морфогенетических процессов и последующей регенерации растений.

Целью нашего исследования явилось изучение особенностей прохождения различных образовательных процессов в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от периода их культивирования на средах различного назначения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили три генотипа яровой твердой пшеницы *Triticum durum* Desf.: сорта Памяти Янченко и Оазис, линия 12S2-24. Растения-доноры выращивали в полевых условиях на стационаре Алтайского научно-исследовательского института сельского хозяйства (Барнаул, Россия). Для индукции каллусогенеза в качестве эксплантов использовали зрелые зародыши. Семена стерилизовали путем погружения в 70%-ый этанол на 3 мин, затем материал переносили в 2%-ный раствор лизоформина-3000 на 15 мин, далее трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Зрелые зародыши, выделенные асептически, помещали щитком вверх на питательную среду по прописи Мурасиге-Скуга (МС) с полным набором макро- и микросолей, содержащую 0,7% агара, 3% сахарозы и 2 мг/л 2,4-Д. Клеточные культуры выращивали в темноте при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Для индукции морфогенеза часть каллусов в течение 30 суток каждые 5 дней пассировали на дифференцирующую среду того же состава минеральных веществ и витаминов, дополненную 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Культивирование осуществляли на свету при 16-ти часовом фотопериоде (день) и температуре 22 – 24 °С. Проведено изучение 6-ти вариантов временных интервалов выращивания каллусов на иницирующей среде (5, 10, 15, 20, 25, 30 суток) и вариант, когда развитие клеточных культур полностью проходило на исходной среде без переноса на дифференцирующую. Проростки, достигшие 5 – 7 см, с хорошо развитой корневой системой, высаживали в сосуды с почвой и доращивали до созревания в климатической камере Memmert (Германия) при температуре 12/17 °С (ночь/день) с 16-часовым фотопериодом. Оценивали следующие показатели, %: частоты каллусогенеза, морфогенеза и регенерации (относительно морфогенных каллусов). Эксперимент выполнен в 3-х повторениях: по 45 зародышей каждого генотипа на вариант. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Через 4 – 5 суток после пассирования зрелых зародышей твердой пшеницы на индукционную питательную среду, содержащую экзогенный ауксин, сформировались пролиферирующие каллусные культуры. На рисунке 1 представлен уровень каллусогенеза в зависимости от времени культивирования с момента посадки эксплантов.

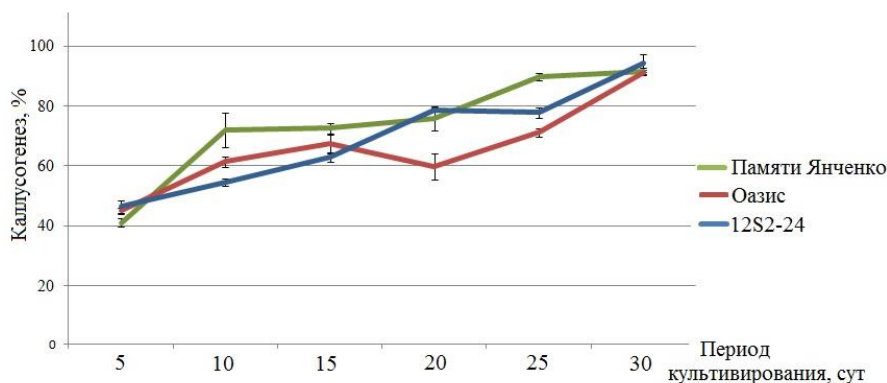


Рис. 1. Частота индукции каллуса в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от времени нахождения на иницирующей среде, %

Результаты свидетельствуют о тенденции повышения значения признака от 1-го к 6-му варианту. Максимальный показатель для всех генотипов наблюдали в 6-ом варианте, когда каллусы в течение 30-ти суток находились на индукционной среде: в среднем по сортам он составил 92,3%. В течение первых 5-ти суток лишь 44,3% эксплантов сформировали первичные каллусы, при переносе которых на дифференцирующую среду происходил их дальнейший рост. Новых клеточных линий при этом не формировалось. Следовательно, процессы дедифференциации специализированных клеток экспланта *in vitro* блокируются на среде с пониженным содержанием ауксина (0,5 мг/л 2,4-Д) и добавлением цитокинина (0,5 мг/л кинетина). Следует отметить, что частота каллусогенеза в результате пребывания культур на исходной среде в течение 9-ти недель без пересадки сохранилась на уровне 6-го варианта, составив 87,9%.

Ранее нами установлено, что при использовании зрелых зародышей активная индукция каллусогенных процессов наблюдается на 5–7-ой день после помещения их на питательную среду (Бычкова и др., 2016), что подтверждается результатами данного эксперимента (рис. 2). Морфогистологические исследования, выполненные на мягкой пшенице, также показали, что при введении в культуру зрелых зародышей инициация единичных клеточных делений начиналась с первого дня помещения экспланта на питательную среду, содержащую 2 мг/л 2,4-Д. После двух суток культивирования отмечены первые признаки активации пролиферативных процессов. После шести суток инкубации *in vitro* наблюдали интенсивные митотические деления, распространяющиеся в разных направлениях, формируя обособленные кластеры клеток (Delporte *et al.*, 2014).

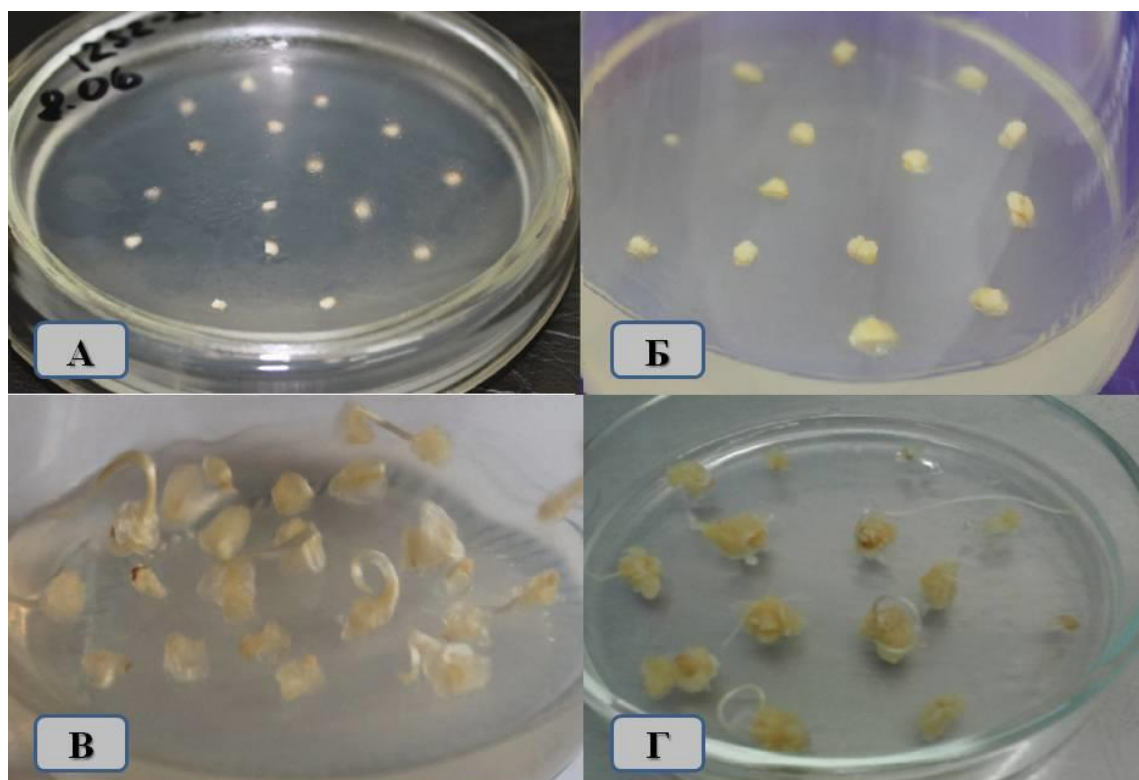


Рис. 2. Внешний вид клеточных культур яровой твердой пшеницы линии 12S2-24 на иницирующей питательной среде (МС + 2 мг/л 2,4-Д) через:
А – 5 суток, Б – 10 суток, В – 15 суток, Г – 20 суток культивирования

Дисперсионный анализ показал достоверное влияние всех рассматриваемых факторов на процессы каллусогенеза при введении в культуру *in vitro* зрелых зародышей твердой пшеницы ($F_{\text{факт.}} = 12,02; 123,26$ и 5,85 для факторов «генотип», «период культивирования» и их «взаимодействие», соответственно, $P < 0,01$). Сравнение отдельных генотипов между собой в пределах одного варианта выявило, что специфичность конкретного сортообразца начинает проявляться, начиная с 10-суточного пребывания на иницирующей среде, и сохраняется до 25 суток. Дальнейшее культивирование нивелирует сортовые различия, приводя к выравниванию результатов.

Данные по оценке морфогенных способностей полученных каллусных культур представлены на рисунке 3.

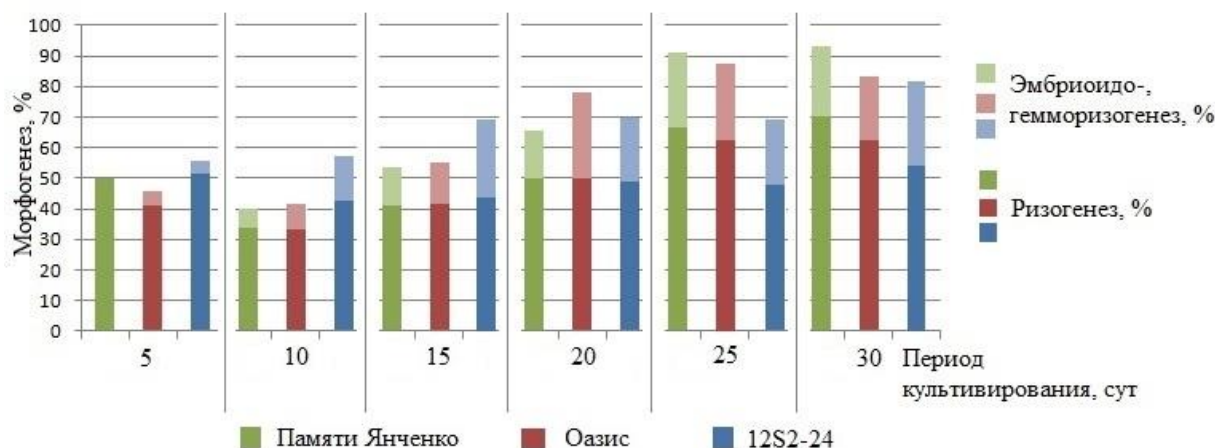


Рис. 3. Морфогенетическая способность каллусных культур яровой твердой пшеницы в зависимости от времени нахождения на иницирующей среде, %

При краткосрочном пребывании на исходной среде (до 10-ти суток) в среднем около половины каллусов при дальнейшем культивировании на среде дифференциации оказались неморфогенными. При этом культуры выглядели рыхлыми, сильно оводненными, без видимых меристематических структур. Пролиферация первичного каллуса на индуцирующей среде в течение 25 – 30 дней способствовала сохранению компетентности соматических тканей зрелых зародышей и обеспечила формирование морфогенных зон. Как результат, уровень признака у сорта Памяти Янченко, например, составил более 90%. На таком же высоком уровне проявили свой морфогенетический потенциал каллусы, развитие которых проходило исключительно на исходной среде. Среднее значение данного показателя оказалось сопоставимо с культурами 5 и 6-го вариантов, достигнув 86,1%.

Статистический анализ полученных данных подтвердил достоверность их различия в зависимости от периода культивирования каллусов на индукционной среде ($F_{\text{факт.}} = 79,01, P < 0,01$). Роль генотипа, также как и при оценке каллусогенеза, проявилась, начиная со 2-го варианта, и выражалась в специфичности реакции отдельного образца на условия культивирования; F-критерий фактора «взаимодействие генотип \times период культивирования» составил 7,06 при $P < 0,01$.

Успешность протекания морфогенных процессов в каллусных тканях применительно к прикладным биотехнологиям, как правило, определяется стабильной регенерацией растений. Получение регенерантов из морфогенного каллуса может быть достигнуто путем соматического эмбриогенеза либо органогенеза. Первый путь реализуется посредством формирования биполярных структур, сходных с зиготическими эмбрионами, и получившими название эмбрионидов.

Второй путь предполагает индукцию монополярных структур, приводящих к появлению стеблей (геммогенез), корней (ризогенез) или побегов (гемморизогенез). В связи с этим, представляло интерес оценить долю морфогенетических структур, развивающихся по пути эмбриоидо- и гемморизогенеза, поскольку в этом случае формируются полноценные растения (рис. 3). Установлено, что 5 – 10-суточное содержание каллусов на среде с повышенным уровнем экзогенного ауксина, приводит в дальнейшем к преимущественному развитию ризогенных процессов (рис. 4А).

При смене режима культивирования – перемещения культур в условия фотопериода на среду с кинетином – не происходило синтеза хлорофилла, который, как правило, предшествует появлению побегов. При увеличении инкубационного периода каллусов на исходной среде до 15 суток доля ризогенеза снижалась примерно на 25%, в каллусе формировались узелковые структуры, внутри которых появлялись зеленые пигментированные области (рис. 4Б), из которых развивались растеньица. Подобная тенденция сохранялась и на последующих вариантах. Уровень эмбриоидо-/гемморизогенеза при культивировании каллусов исключительно на иницирующей среде на 4% уступал наиболее оптимальным вариантам.

Установлено достоверное влияние генотипа и режима культивирования на интенсивность ризогенных процессов ($F_{\text{факт.}} = 8,26$ и $14,26$, соответственно, $P < 0,01$).

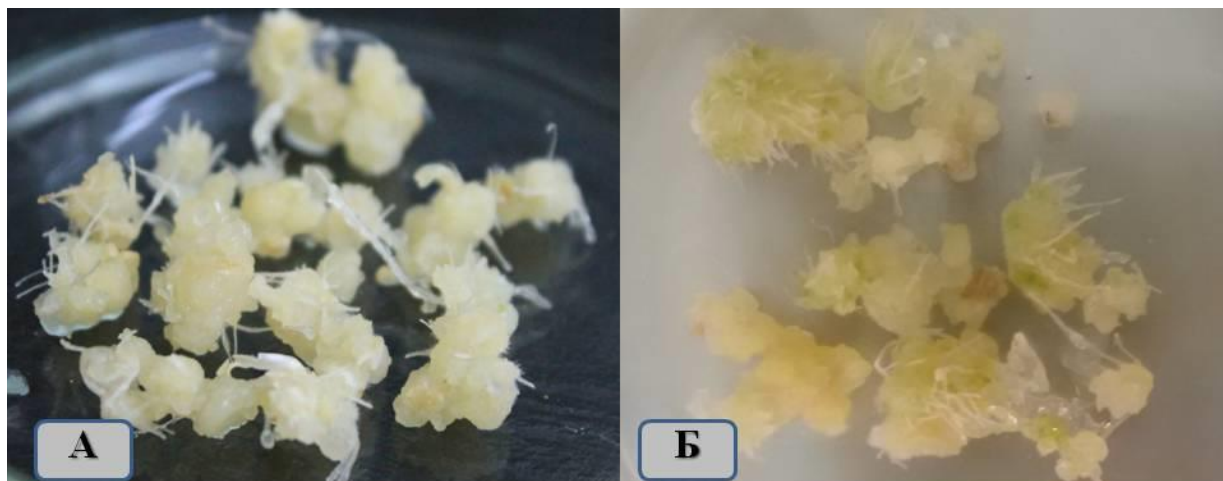


Рис. 4. Внешний вид каллусов сорта Памяти Янченко на 35 сутки культивирования на дифференцирующей среде (МС + 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетина) после пролиферации на иницирующей среде в течение: А – 15 суток; Б – 5 суток

На рисунке 5 представлена продуктивность морфогенных каллусов, полученных в культуре зрелых зародышей, выраженная относительным числом растений-регенерантов. Максимальные показатели наблюдали при выращивании клеточных культур в течение 15 – 20-ти суток на исходной среде с последующим переносом на среду с цитокинином: у линии 12S2-24 частота регенерации составила 36,3%, а у сорта Оазис – 36,1% (рис. 6).

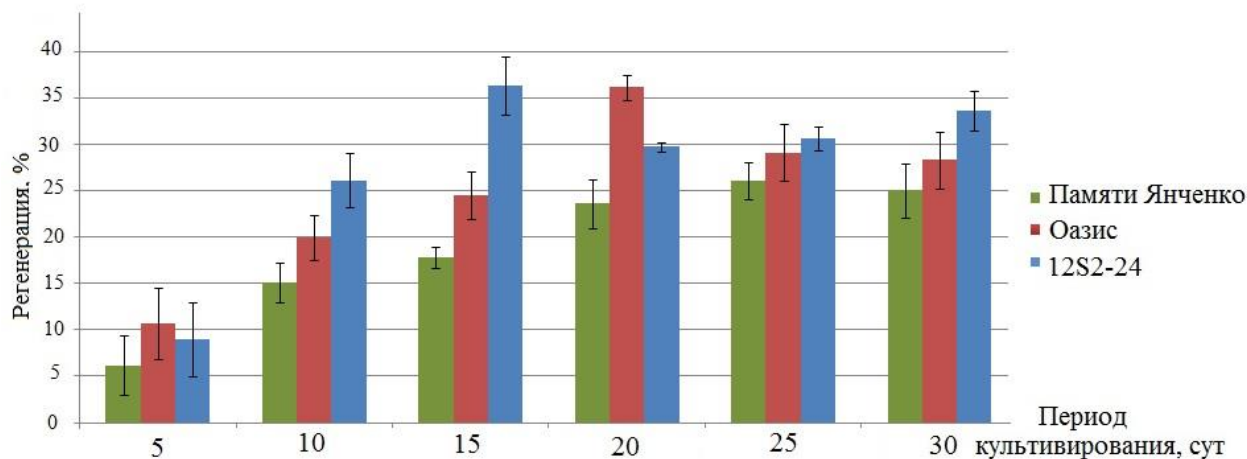


Рис. 5. Частота регенерации растений (относительно числа морфогенных каллусов) в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы, в зависимости от времени нахождения на иницирующей среде, %

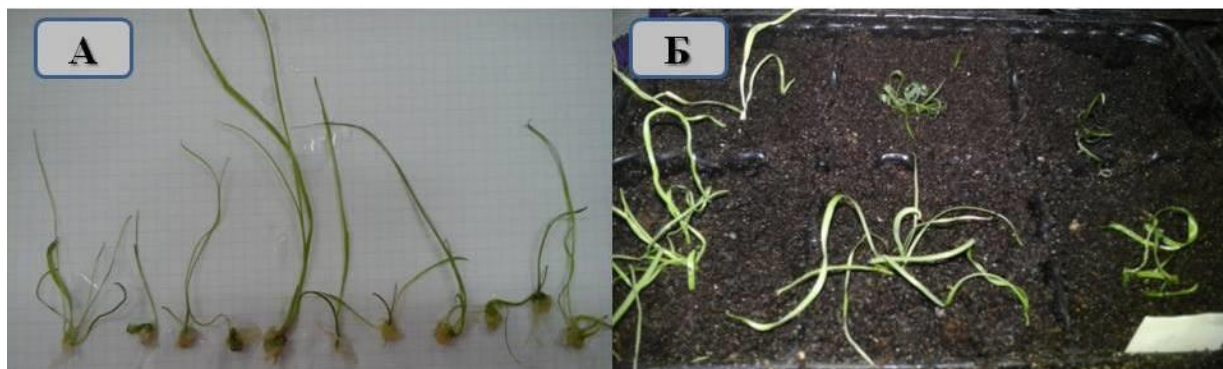


Рис. 6. Регенеранты сорта Оазис, полученные в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы
Для клеточных культур сорта Памяти Янченко наиболее эффективным оказался 5-ый вариант (25-суточная экспозиция на исходной среде). Реализация регенерационного потенциала морфогенных

каллусов с 5-дневным периодом инкубации на иницирующей среде была чрезвычайно низка для всех сортообразцов, составляя 6 – 10%. Дисперсионный анализ подтвердил достоверность влияния генотипа и условий культивирования на данный признак ($F_{\text{факт.}} = 8,38$ и $12,27$, соответственно, $P < 0,01$).

Сравнение особенностей прохождения различных образовательных процессов на разных этапах культивирования свидетельствует, что высокий уровень каллусогенеза не гарантирует получения максимального числа регенерантов. Регенерационная способность каллусов определялась преимущественно частотой эмбриоидогенных и гемморизогенных клеточных линий. Сходные результаты были получены нами при культивировании незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы. Анализ множественных взаимосвязей между каллусо-, морфогенезом и регенерацией растений выявил доминирующий фактор – процесс образования эмбриоидов и побегов, определяющий выход регенерантов. Доля его в вариабельности уровня регенерации растений составила 51% (Хлебова и др., 2016). На отсутствие корреляции между частотой индукции каллуса и регенерацией у пшеницы указывали и другие авторы (Zale *et al.*, 2004; Vi *et al.*, 2007). Высказано мнение, что ключевым моментом в культуре зрелых зародышей является уровень дифференциации индуцированного каллуса. Идентификация локусов (QTL), ответственных за реакцию пшеницы в культуре ткани, выявила, что большое количество независимых и тесно сцепленных генов контролируют различные стадии образовательных процессов *in vitro* (Jia *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2016). Выполненное нами настоящее исследование также подтвердило генотипическую обусловленность прохождения всех этапов формирования клеточных культур и регенерации растений.

ВЫВОДЫ

Установлено, что при использовании в качестве эксплантов зрелых зародышей яровой твердой пшеницы, активная индукция каллусогенных процессов происходит на 5–7-ой день после помещения их на среду МС, содержащую 2 мг/л 2,4-Д. Максимальный уровень каллусогенеза (92,3%) наблюдали при инкубации культур на исходной среде в течение 30-ти суток. При краткосрочном культивировании эксплантов на иницирующей среде (в течение 5-ти суток) и последующем переносе на дифференцирующую среду (МС + 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетина) происходит пролиферация уже оформившихся клеточных кластеров, однако новых каллусов не иницируется, что обусловило низкую частоту каллусогенеза (44,3%).

Развитие первичного каллуса на индуцирующей среде в течение 20 – 30 дней способствовало сохранению компетентности соматических тканей зрелых зародышей и обеспечило формирование максимального числа морфогенных структур различного качества. Направление развития морфогенеза зависело от времени пребывания культур на исходной среде: при увеличении инкубационного периода до 15 суток доля ризогенеза снижалась на 25%, в каллусе формировались узелковые структуры, из которых в дальнейшем развивались растеньица. Наиболее эффективный вариант реализации регенерационного потенциала морфогенных каллусов для сорта Оазис и линии 12S2-24 – 15 – 20-суточная экспозиция на исходной среде с последующим переносом на дифференцирующую среду; для сорта Памяти Янченко – выращивание каллусов на исходной среде в течение 25 суток.

Продемонстрировано достоверное влияние генотипа и режима культивирования на интенсивность различных морфообразовательных процессов в культуре зрелых зародышей. Специфичность конкретного сортообразца проявлялась, начиная с 5 – 10-суточного пребывания эксплантов на иницирующей среде.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории селекции твердой пшеницы Алтайского НИИ сельского хозяйства за рекомендации при выборе исходного материала для исследования и любезно предоставленные семена сортов и линий яровой твердой пшеницы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

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

Бычкова О.В. Оценка эффективности морфогенеза и регенерации яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro* // Acta Biologica Sibirica. – 2016. – Т. 2. – № 1. – С. 139 – 149. doi: 10.14258/abs.v2i1-4.923

Бычкова О.В., Ереценко Д.В., Розова М.А. Сравнительная оценка использования зрелых и незрелых зародышей яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro* // Acta Biologica Sibirica. – 2016. – Т. 2. – № 2. – С. 76 – 80.

Григорьева Л.П., Шлецер И.А. Скрининг сортов пшеницы по способности к морфогенезу в культуре незрелых зародышей *in vitro* // Известия Алтайского государственного университета. – 2006. – № 3. – С. 64 – 66.

- Ерещенко О.В., Хлебова Л.П., Розова М.А. Оценка регенерационного потенциала яровой твердой пшеницы для создания засухоустойчивого селекционного материала // Биотехнология и общество в XXI веке, Барнаул, 15–18 сентября 2015 г.: сборник статей Международной научно-практической конференции. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. – С. 341 – 345.
- Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплантат // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т. 41. – № 2. – С. 124-131.
- Мякишева Е.П., Дурникин Д.А., Таварткиладзе О.К. Изучение влияния витаминов на морфогенез растений-регенерантов картофеля *in vitro* в целях интенсификации производства элитного посадочного материала // Biological Bulletin of Bogdan Chmelnskiy Melitopol State Pedagogical University. – 2016a. – Т. 6 (2). – С. 166 – 173.
- Мякишева Е.П., Таварткиладзе О.К., Дурникин Д.А. Новые особенности процесса клонального микроразмножения сорта картофеля селекции Западной Сибири // Biological Bulletin of Bogdan Chmelnskiy Melitopol State Pedagogical University. – 2016b. – Т. 6 (1). – С. 375 – 389.
- Никитина Е.Д., Мухин В.Н., Хлебова Л.П., Мацюра А.В., Бычкова О.В. Оптимизация гормонального состава питательной среды для эффективной регенерации мягкой пшеницы *in vitro* // Biological Bulletin of Bogdan Chmelnskiy Melitopol State Pedagogical University. – 2016. – Т. 6 (2). – С. 294 – 302.
- Никитина Е.Д., Хлебова Л.П., Ерещенко О.В. Разработка отдельных элементов технологии клеточной селекции яровой пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессам // Известия Алтайского государственного университета. – 2014. – Т. 2. – № 3. – С. 50 – 54. DOI: 10.14258/izvasu(2014)3.2-09
- Никитина Е.Д., Хлебова Л.П., Соколова Г.Г., Ерещенко О.В. Создание стрессоустойчивого материала яровой мягкой пшеницы с использованием клеточной селекции *in vitro* // Известия Алтайского государственного университета. – 2013. – № 3 – 2 (79). – С. 95 – 98. DOI: 10.14258/izvasu(2013)3.2-20
- Россева В.М., Белан И.А., Россева Л.П. Использование метода *in vitro* в селекции пшеницы мягкой яровой // Вестник АГАУ. – 2016. – № 2. – С. 5 – 9.
- Сельдимирова О.А., Катасонова А.А., Круглова Н.Н. Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллусах различного происхождения у пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. – 2011. – Т. 43. – № 4. – С. 297 – 306.
- Хлебова Л.П., Никитина Е.Д., Мацюра А.В., Бычкова О.В. Взаимосвязь морфогенетических процессов в культуре ткани пшеницы // Biological Bulletin of Bogdan Chmelnskiy Melitopol State Pedagogical University. – 2016. – Т. 6 (2). – С. 311 – 320.
- Be R.M., Kou M., Chen L.G., Mao S.R., Wang H.G. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum* // Plant Breed. – 2007. – Vol. 126 (1). – P. 9 – 12.
- Benkirane H., Sabounji S., Chlyah A., Chlyah H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2000. – Vol. 61. – P. 107 – 113.
- Chauhan H., Desai S.A., Khurana P. Comparative analysis of the differential regeneration response of various genotypes of *Triticum aestivum*, *Triticum durum* and *Triticum dicoccum* // Plant Cell Tiss Org Cult. – 2007. – Vol. 91. – P. 191 – 199.
- Delporte F., Pretova A., Jardin P., Watillon B. Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat // Protoplasma. – 2014. – Vol. 251. – P. 1455 – 1470. DOI: 10.1007/s00709-014-0647-7
- Feher A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: Mujid, Abdul and Samaj, Josef. eds. Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs, Springer: – Berlin / Heidelberg, 2005. – Vol. 2. – P. 85 – 101.
- Gill A.K., Gosal S.S., Sah S.K. Differential cultural responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) with different explants // Journal of Cell and Tissue Research. – 2014. – Vol. 14 (2). – P. 4351 – 4356.
- Jia H., Yi D., Yu J. *et al.* Mapping QTLs for tissue culture response of mature wheat embryos // Mol. Cells. – 2007. – Vol. 23 (3). – P. 323 – 330.
- Jia H., Yu J., Yi D., Cheng Y., Xu W., Zhang L., Ma Z. Chromosomal intervals responsible for tissue culture response of wheat immature embryos // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2009. – Vol. 97 (2). – P. 159 – 165.
- Khlebova L. P., Nikitina E. D. Morphogenetic responses of wheat immature embryo culture depending on growing conditions of donor plants // Acta Biologica Sibirica. – 2016. – Vol. 2 (2). – P. 68 – 75.
- Li B., Caswell K., Leung N., Chibbar R.N. Wheat (*Triticum aestivum* L.) somatic embryogenesis from isolated scutellum: Days post anthesis, days of spike storage, and sucrose concentration affect efficiency // In Vitro Cellular Devel Biology-Plant. – 2003. – Vol. 39. – P. 20 – 23.
- Ma J., Deng M., Lu S., Yang Q. *et al.* Identification of QTLs associated with tissue culture response of mature wheat embryos // Springer Plus. – 2016. – Vol. 5. – P. 1552. DOI 10.1186/s40064-016-3241-y
- Miroshnichenko D., Filippov M., Dolgov S. Effects of daminozide on somatic embryogenesis from ature and mature embryos of wheat // Australian Journal of Crop Science. – 2009. – Vol. 3 (2). – P 83 – 94.

- Mitić N., Dodig, D., Nikolić R. Variability of *in vitro* culture response in wheat genotypes, genotype and environmental effects // *Genetika*. – 2006. – Vol. 38 (3). – P. 183 – 192.
- Pellegrineschi A., Brito R.M., McLean S., Hoisington D. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and NaCl on the establishment of callus and plant regeneration in durum and bread wheat // *Plant Cell, Tissue, Organ Culture*. – 2004. – Vol. 77 (3). – P. 245 – 250.
- Stupko V.Ju., Zobova N.V. Callus culture technology of spring soft wheat stress tolerant varieties selection // *Biochemistry and Biotechnology: research and development*. New York: Published by Nova Science Publishers, Inc, 2012. – P. 52 – 62.
- Tikhomirova L.I., Kechaykin A.A., Shmakov A.I., Alexandrova O.V. An effective way to carry out mass *in vitro* propagation of *Potentilla alba* L. // *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University*. – 2016. – Vol. 6(1). – P. 433 – 444. DOI <http://dx.doi.org/10.15421/201627>
- Vasil I.K. Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant Cell Rep.* – 2007. – N 26. – P. 1133 – 1154.
- Yin G.X., Wang Y.L., She M.Y., Du L.P., Xu H.J., Xg Ye Establishment of a highly efficient regeneration system for the mature embryo culture of wheat // *Agric Sci China*. – 2011. – Vol. 10 (1). – P. 9 – 17.
- Zale J.M., Borchardt-Wier H., Kidwell K.K., Steber C.M. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2004. – Vol. 76. – P. 277 – 281.
- Zhang W., Wang X., Fan R., Yin G., Wang K., Du L., Xiao L., Yt X. Effects of inter-culture, arabinogalactan proteins, and hydrogen peroxide on the plant regeneration of wheat immature embryos // *Journal of Integrative Agriculture*. Advanced Online Publication. – 2014. Doi: 10.1016/S2095-3119(14)60764-4

REFERENCES

- Avksent'eva, O.A., Petrenko, V.A. (2009). Rol' genotipa, sostava sredy i tipa eksplanta v formirovanii pervichnogo kallyusa izogennyh liniy pshenicy. *Vesnik Harkovskogo nacional'nogo universitetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya*, 9, 856, 56 – 62 (in Russian).
- Be, R.M., Kou, M., Chen, L.G., Mao, S.R., Wang, H.G. (2007). Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. *Plant Breed*, 126(1), 9 – 12.
- Benkirane, H., Sabounji, S., Chlyah, A., Chlyah, H. (2000). Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 61, 107 – 113.
- Bychkova, O.V. (2016). Ocenka effektivnosti morfogeneza i regeneracii yarovoi tvrdoj pshenicy v kul'ture *in vitro*. *Acta Biologica Sibirica*, 2(1), 139 – 149. doi: 10.14258/abs.v2i1-4.923 (in Russian).
- Bychkova, O.V., Ereshenko, D.V., Rozova, M.A. (2016). Sravnitel'naya ocenka ispol'zovaniya zrelyh i nezrelyh zarodyshei yarovoi tvrdoj pshenicy v kul'ture *in vitro*. *Acta Biologica Sibirica*, 2(2), 76 – 80 (in Russian).
- Chauhan, H., Desai, S.A., Khurana, P. (2007). Comparative analysis of the differential regeneration response of various genotypes of *Triticum aestivum*, *Triticum durum* and *Triticum dicoccum*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 91, 191–199.
- Delporte, F., Pretova, A., Jardin, P., Watillon, B. (2014). Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma*, 251, 1455 – 1470. DOI 10.1007/s00709-014-0647-7
- Ereshenko, O.V., Hlebova, L.P., Rozova, M.A. (2015). Ocenka regeneracionnogo potenciala yarovoi tvrdoj pshenicy dlya sozdaniya zasuhoustoichivogo selekcionnogo materiala. *Biotekhnologiya i obschestvo v XXI veke, Barnaul, 15–18 sentyabrya 2015 g.: sbornik statej Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii*. – Barnaul: Izd-vo Alt. un-ta (in Russian).
- Feher, A. (2005). Why somatic plant cells start to form embryos? In: Mujid, Abdul and Samaj, Josef. eds. *Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs*, Springer: Berlin/Heidelberg.
- Gill, A.K., Gosal, S.S., Sah, S.K. (2014). Differential cultural responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) with different explants. *Journal of Cell and Tissue Research*, 14(2), 4351 – 4356.
- Grigor'eva, L.P., Shlecer, I.A. (2006). Skringing sortov pshenicy po sposobnosti k morfogenezu v kul'ture nezrelyh zarodyshei *in vitro*. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta*, 3, 64 – 66 (in Russian).
- Hlebova, L.P., Nikitina, E.D., Macyura, A.V., Bychkova, O.V. (2016). Vzaimosvyaz' morfogeneticheskikh processov v kul'ture tkani pshenicy. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University*, 6 (2), 311 – 320 (in Russian).
- Jia, H., Yi, D., Yu, J. *et al.* (2007). Mapping QTLs for tissue culture response of mature wheat embryos. *Mol. Cells*, 23(3), 323 – 330.
- Jia, H., Yu, J., Yi, D., Cheng, Y., Xu, W., Zhang, L., Ma, Z. (2009). Chromosomal intervals responsible for tissue culture response of wheat immature embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 97(2), 159–165.

- Khlebova, L. P., Nikitina, E. D. (2016). Morphogenetic responses of wheat immature embryo culture depending on growing conditions of donor plants. *Acta Biologica Sibirica*, 2 (2), 68 – 75.
- Kruglova, N.N., Katasonova, A.A. (2009). Nezrelyi zarodysh pshenicy kak morfogeneticheski kompetentnyi eksplantat. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii*, 41(2), 124 – 131 (in Russian).
- Li, B., Caswell, K., Leung, N., Chibbar, R.N. (2003). Wheat (*Triticum aestivum* L.) somatic embryogenesis from isolated scutellum: Days post anthesis, days of spike storage, and sucrose concentration affect efficiency. *In Vitro Cellular Devel Biology-Plant*, 39, 20 – 23.
- Ma, J., Deng, M., Si Yu Lv, Yang, Q., et al. (2016). Identification of QTLs associated with tissue culture response of mature wheat embryos. *Springer Plus*, 5, 1552. DOI 10.1186/s40064-016-3241-y
- Miroshnichenko, D., Filippov, M., Dolgov, S. (2009). Effects of daminozide on somatic embryogenesis from immature and mature embryos of wheat. *Australian Journal of Crop Science*, 3(2), 83 – 94.
- Mitić, N., Dodig, D., Nikolić, R. (2006). Variability of *in vitro* culture response in wheat genotypes, genotype and environmental effects. *Genetika*, 38(3), 183 – 192.
- Myakisheva, E.P., Durnikin, D.A., Tavartkiladze, O.K. (2016a). Izuchenie vliyaniya vitaminov na morfogenez rastenii-regenerantov kartofelya invitro v celyah intensifikacii proizvodstva elitnogo posadochnogo materiala. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelniškij Melitopol State Pedagogical University*, 6(2), 166 – 173 (in Russian).
- Myakisheva, E.P., Tavartkiladze, O.K., Durnikin, D.A. (2016b). Novye osobennosti processa klonal'nogo mikrorazmnozheniya sorta kartofelya selekcii Zapadnoi Sibiri. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelniškij Melitopol State Pedagogical University*, 6(1), 375 – 389 (in Russian).
- Nikitina, E.D., Hlebova, L.P., Ereshenko, O.V. (2014). Razrabotka otdel'nykh elementov tehnologii kletochnoi selekcii yarovoi pshenicy na ustoichivost' k abioticheskim stressam. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2-3, 50 – 54. DOI: 10.14258/izvasu (2014)3.2-09 (in Russian).
- Nikitina, E.D., Hlebova, L.P., Sokolova, G.G., Ereshenko, O.V. (2013). Sozdanie stressoustoichivogo materiala yarovoi myagkoi pshenicy s ispol'zovaniem kletochnoi selekcii *in vitro*. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta*, 3, 2 (79), 95 – 98. DOI: 10.14258/izvasu (2013)3.2-20 (in Russian).
- Nikitina, E.D., Muhin, V.N., Hlebova, L.P., Macyura, A.V., Bychkova, O.V. (2016). Optimizaciya gormonal'nogo sostava pitatel'noi sredy dlya effektivnoi regeneracii myagkoi pshenicy *in vitro*. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelniškij Melitopol State Pedagogical University*, 6 (2), 294 – 302 (in Russian).
- Pellegrineschi, A., Brito, R.M., McLean, S., Hoisington, D. (2004). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and NaCl on the establishment of callus and plant regeneration in durum and bread wheat. *Plant Cell, Tissue, Organ Culture*, 77(3), 245 – 250.
- 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).
- Sel'dimirova, O.A., Katasonova, A.A., Kruglova, N.N. (2011). Formirovanie morfogeneticheskogo ochaga kak nachal'nyi etap morfogeneza *in vitro* v kallyusah razlichnogo proishozhdeniya u pshenicy. *Fiziologiya i biokhimiya kul't. rastenii*, 43, 4, 297 – 306 (in Russian).
- Stupko, V.Ju., Zobova, N.V. (2012). Callus culture technology of spring soft wheat stress tolerant varieties selection. *Biochemistry and Biotechnology: research and development*. New York: Published by Nova Science Publishers, Inc.
- Tikhomirova, L.I., Kechaykin, A.A., Shmakov, A.I., Alexandrova, O.V. (2016). An effective way to carry out mass *in vitro* propagation of *Potentilla alba* L. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelniškij Melitopol State Pedagogical University*, 6(1), 433 – 444. DOI <http://dx.doi.org/10.15421/201627> (in Russian).
- Vasil, I.K. (2007). Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep*, 26, 1133 – 1154.
- Yin, G.X., Wang, Y.L., She, M.Y., Du, L.P., Xu, H.J., Xg, Ye. (2011). Establishment of a highly efficient regeneration system for the mature embryo culture of wheat. *Agric Sci China*, 10(1), 9 – 17.
- Zale, J.M., Borchardt-Wier, H., Kidwell, K.K., Steber, C.M. (2004). Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 76, 277 – 281.
- Zhang, W., Wang, X., Fan, R., Yin, G., Wang, K., Du, L., Xiao, L., Yt, X. (2014). Effects of inter-culture, arabinogalactan proteins, and hydrogen peroxide on the plant regeneration of wheat immature embryos. *Journal of Integrative Agriculture. Advanced Online Publication*. Doi: 10.1016/S2095-3119(14)60764-4