

ОПТИМИЗАЦИЯ ГОРМОНАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ *IN VITRO*

¹Никитина Е.Д., ¹Мухин В.Н., ²Хлебова Л.П., ²Мацюра А.В., ²Бычкова О.В.

¹Алтайский НИИ сельского хозяйства, Барнаул, Россия

²Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

E-mail: ¹aniish@mail.ru; ²khlebova61@mail.ru; amatsyura@gmail.com; olga4ka_asu@mail.ru

Цель нашего исследования – определить оптимальные сочетания и концентрации гормонов в дифференцирующей питательной среде, обеспечивающие реализацию морфогенетического потенциала культуры незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы, на основе применения полного факторного эксперимента типа 3² (ПФЭ). Материалом для исследования служили 4 сорта яровой мягкой пшеницы с высоким морфогенетическим и регенерационным потенциалом *in vitro*: Скала, Спектр, Зарница, Жница (Никитина, 2004; Ерещенко и др., 2014; Никитина, Хлебова, 2015). Растения-доноры выращивали в климатической камере при температуре 18/15 °С (день/ночь), освещении 20 клк и 16-ти часовом фотопериоде. Для индукции каллуса использовали 15 – 17-ти суточные незрелые зародыши размером 1.3 – 1.7 мм, пассированные на среду Линсмайер и Скуга (Linsmaier, Skoog, 1965), содержащую 0.8 % агара, 3 % сахарозы, 2 мг/л 2,4-Д. Клеточные культуры выращивали в темноте при температуре 26±1 °С, пересаживая каждые 30 – 35 дней на дифференцирующую среду, содержащую различные сочетания 2,4-Д и кинетина (6-фурфуриламинопурина). Концентрация регуляторов роста в питательной среде соответствовала матрице планирования эксперимента. В качестве параметра оптимизации (отклика) были выбраны частоты морфогенетических и регенерационных процессов в культуре незрелых зародышей, а в качестве факторов – концентрации фитогормонов цитокининовой и ауксиновой природы: кинетин (x₁) и 2,4-Д (x₂) соответственно.

Существование градиента концентраций фитогормонов, а именно больших различий между эмбрионным и неэмбрионным каллусами, а также между зародышами, способными формировать эмбрионный каллус, и зародышами, не способными его образовывать, 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. Для формирования эмбриоидо-гемморизогенных структур в каллусах мягкой пшеницы, обеспечивающих регенерацию растений, требуются более низкие концентрации регуляторов роста, чем для индукции корней. Культивирование на питательной среде, содержащей 0.5 мг/л кинетина и 2.0 мг/л 2,4-Д, позволило получить в среднем по всем генотипам 5.6 растений на один морфогенный каллус, с варьированием от 3.2 до 8.2 растений в зависимости от генотипа. Частота ризогенеза при этом была минимальна и составила 19.2%.

Повышение концентрации кинетина в питательной среде увеличивает частоту индукции морфогенетических и ризогенных структур в каллусных тканях всех тестируемых сортов яровой мягкой пшеницы, а для эмбриоидо-гемморизогенеза и регенерации растений имеет место обратная реакция на данный гормон. Эффективность действия ауксина на морфогенез и регенерацию растений определяется генотипическими особенностями исходных сортов, причем оптимальные значения регуляторов роста не одинаковы для культур анализируемых сортов и различных этапов регенерации.

Для каллусных тканей сортов Скала и Спектр оптимальный уровень кинетина для всех этапов регенерации, за исключением общей частоты морфогенеза, равен 0.5 мг/л, 2,4-Д находится в интервале 2.3 – 3.2 мг/л. Для клеточных культур сортов Зарница и Жница кинетин в концентрации 0,5 мг/л обеспечивает минимальный уровень частоты ризогенеза, в то время как для остальных показателей оптимальными являются значения в пределах 1.3 – 2.2 мг/л. Гормон группы ауксинов (2,4-Д), необходимый для успешной регенерации, составляет 1.9 – 2.7 мг/л. Уровень экзогенных гормонов, необходимых для стеблевой дифференциации ниже, чем для корнеобразования.

Ключевые слова: мягкая пшеница, незрелые эмбриональные культуры, дифференциальная питательная среда морфогенез, ризогенез, регенерация растений, регуляторы роста, полный факторный эксперимент.

Citation:

E.D. Nikitina, V.N. Mukhin, L.P. Khlebova, A.V. Matsyura, O.V. Bychkova (2016). Optimization of hormone composition of nutrient medium for *in vitro* efficient regeneration of bread wheat. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University*, 6 (2), 294–302.

Поступило в редакцию / Submitted: 19.07.2016

Принято к публикации / Accepted: 27.08.2016

crossref <http://dx.doi.org/10.15421/201660>

© Nikitina, Mukhin, Khlebova, Matsyura, Bychkova, 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

OPTIMIZATION OF HORMONE COMPOSITION OF NUTRIENT MEDIUM FOR IN VITRO EFFICIENT REGENERATION OF BREAD WHEAT

E.D. Nikitina¹, V.N. Mukhin¹, L.P. Khlebova², A.V. Matsyura², O.V. Bychkova²

¹Altai Research Institute of Agriculture, Barnaul, Russia

²Altai State University, Barnaul, Russia

E-mail: ¹aniish@mail.ru; ²khlebova61@mail.ru; amatsyura@gmail.com; olga4ka_asu@mail.ru

Optimal values of phytohormones in the differential nutrient medium providing the efficient realization of morphogenetic potencies of four spring bread wheat varieties (Skala, Spectr, Zarnitsa and Zhnitsa) from immature embryo cultures have been determined. For callus induction explants 1.5 – 1.7 mm in size were used, which were subsequently passed to the medium by Linsmaier&Skoog possessing 0.8 % of agar, 3 % of sucrose and 2.0 mg l⁻¹ dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Cell cultures were incubated in darkness at the temperature 26±1 °C. 30 – 35 days after in accordance with the scheme of complete factorial experiment of 3² type calli were passed to differential medium supplemented with 2,4-D at levels 0.5; 2.5; 4.0 mg l⁻¹ and with kinetin (6-furfurylaminopurine) at levels 0.5; 2.25 and 4.0 mg l⁻¹. Number of replications for each of 9 variants was four. As a result, 20 mathematic models (4 varieties × 5 stages of regeneration) designed as polynomial quadric equation were obtained. On the ground of the analysis of models it was established that optimal values for factors are not equal both for cultures of genotypes analyzed and for different regeneration stages. For callus tissues of Skala and Spectr an optimal value of kinetin for all regeneration stages was 0.5 mg l⁻¹ except for the frequency of morphogenesis. Optimal values of 2,4-D for the same varieties were within 2.3 – 3.2 mg l⁻¹. For cell cultures of Zarnitsa and Zhnitsa recommended concentration intervals made up 1.3 – 2.2 mg l⁻¹ on kinetin except for the frequency of rhizogenesis, and 1.9 – 2.7 on 2,4-D. The level of exogenous phytohormones necessary for stem differentiation was lower than the one for root formation. The dependence of morphogenesis results on the hormonal status of the explant has been discussed.

Keywords: bread wheat, immature embryo cultures, differential nutrient medium, morphogenesis, rhizogenesis, plant regeneration, growth regulators, complete factorial experiment of 3² type.

ВВЕДЕНИЕ

Стабильная регенерация растений в строго контролируемых экспериментальных условиях определяет практическую значимость использования культуры клеток и ткани (Вечернина, Таварткиладзе, 2014). Наиболее распространенные экспланты для получения морфогенной каллусной культуры пшеницы – незрелые зародыши (Круглова, Катасонова, 2009). Процесс получения регенерантов многоступенчатый и состоит из индукции и пролиферации каллуса, морфогенеза, который включает разные пути развития – соматический эмбриоидогенез и органогенез, и собственно регенерации растений (Катасонова и др., 2006).

Для семейства *Gramineae* наиболее сложным и трудно регулируемым этапом является морфогенез, который можно стимулировать как внутренними (генотип, тип экспланта и его возраст) (Wang, Wei, 2004; Сидор, Орлов, 2005; Григорьева, Шлецер, 2006; Авксентьева, Петренко, 2009; Файзиева, 2009), так и внешними факторами (состав и pH питательной среды, температура, свет, регуляторы роста растений) (Przetakiewicz et al., 2003; Pellegrineschi et al., 2004; Mokhtari, et al., 2013; Никитина, Хлебова, 2014). В ряде работ установлены тип наследования и локализация генов, ответственных за регенерацию *in vitro*, что позволяет использовать отдельные генотипы с высоким морфогенетическим потенциалом как доноры этого признака (Жумабаева, 2008; Андреев и др., 2009).

Из экзогенных факторов основными индукторами морфогенеза являются фитогормоны (Rai et al., 2011). Гипотеза гормональной регуляции (Skoog, Miller, 1957) и ее подтверждение в многочисленных экспериментах определили широкое использование ауксинов и цитокининов для инициации разных форм морфогенеза *in vitro*. Наиболее часто для индукции меристематической активности используют ауксин 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), который был определен лучшим гормоном для роста каллуса и регенерации растений в культуре незрелых зародышей мягкой пшеницы (Ozias-Akins, Vasil, 1982; Pellegrineschi et al., 2004). Гормон 2,4-Д усваивается медленней, чем индоллил-3-уксусная (ИУК) или α-нафтил-уксусная (НУК) кислоты, и поэтому является более активным для поддержания морфогенетического состояния.

Д. Эванс с коллегами обобщил данные по природе и количеству цитокининов, необходимых для индукции морфогенеза (Evans et al., 1981). Согласно представленному мнению, нет доказательств, что они нужны для инициации эмбриоидогенеза. В ряде работ показано, что эти гормоны способствуют созреванию соматических зародышей, особенно развитию семядолей, и стимулируют прорастание эмбриоидов (Gupta, Rashobte, 2012).

Таким образом, в научной литературе широко обсуждается вопрос эффективности определенных сочетаний и концентраций фитогормонов для индукции морфогенетических процессов в каллусных культурах разных видов растений, в том числе пшеницы (Pellegrineschi et al., 2004; Mokhtari et al., 2013).

Однако в этих работах описан эмпирический подбор гормонального состава питательных сред, основным недостатком которого является несистемность используемых вариантов, что может привести к некорректным выводам. Для целенаправленного поиска оптимального варианта стимуляторов морфогенеза *in vitro* целесообразно, на наш взгляд, использовать методы планирования эксперимента.

Цель нашего исследования – определить оптимальные сочетания и концентрации гормонов в дифференцирующей питательной среде, обеспечивающие реализацию морфогенетического потенциала культуры незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы, на основе применения полного факторного эксперимента типа 3^2 (ПФЭ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили 4 сорта яровой мягкой пшеницы с высоким морфогенетическим и регенерационным потенциалом *in vitro*: Скала, Спектр, Зарница, Жница (Никитина, 2004; Ерещенко и др., 2014; Никитина, Хлебова, 2015). Растения-доноры выращивали в климатической камере при температуре 18/15 °С (день/ночь), освещении 20 клк и 16-ти часовом фотопериоде.

Для индукции каллуса использовали 15 – 17-ти суточные незрелые зародыши размером 1.3 – 1.7 мм, пассированные на среду Линсмайер и Скуга (Linsmaier, Skoog, 1965), содержащую 0.8 % агара, 3 % сахарозы, 2 мг/л 2,4-Д. Клеточные культуры выращивали в темноте при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$, пересаживая каждые 30 – 35 дней на дифференцирующую среду, содержащую различные сочетания 2,4-Д и кинетина (6-фурфуриламинопурина). Концентрация регуляторов роста в питательной среде соответствовала матрице планирования эксперимента.

В качестве параметра оптимизации (отклика) были выбраны частоты морфогенетических и регенерационных процессов в культуре незрелых зародышей, а в качестве факторов – концентрации фитогормонов цитокининовой и ауксиновой природы: кинетин (x_1) и 2,4-Д (x_2) соответственно. Уровни факторов и интервалы варьирования представлены в табл. 1.

Таблица 1. Уровни факторов и интервалы варьирования

Уровни факторов	Натуральные значения		Кодовые значения	
	Кинетин, mg l ⁻¹	2,4-Д, mg l ⁻¹	X ₁	X ₂
Интервал варьирования	1.75	1.5	1	1
Основной уровень	2.25	2.0	0	0
Верхний уровень	4.0	3.5	+1	+1
Нижний уровень	0.5	0.5	-1	-1

Для перевода натуральных значений варьирующих факторов в кодовые использовали следующую формулу кодирования:

$$X_i = (x_i - x_{i0}) / ((x_i^{\max} - x_i^{\min}) / 2),$$

Где X_i – кодовое значение i -го фактора;

x_i – натуральное текущее значение i -го фактора;

x_{i0} – нулевой уровень фактора.

Корректность применения методов математического планирования в представленном эксперименте обосновывается выполнением необходимых предпосылок относительно отклика и факторов. Предварительный анализ изучаемого процесса показал нелинейный характер воздействия указанных факторов на отклик, что послужило основанием выбора трехуровневого плана. Обеспечивается воспроизводимость опытов при неизменных условиях его проведения, а также возможность фиксации уровней факторов при их одновременном варьировании. Это позволяет в результате реализации эксперимента выразить связь между входными и выходным параметром – функцией отклика – в виде полиномиального уравнения второго порядка:

$$Y_j = b_{j0} + b_{j1}x_1 + b_{j2}x_2 + b_{j12}x_1x_2 + b_{j11}x_1^2 + b_{j22}x_2^2; j = 1_5,$$

Где b_{j0} – свободный член уравнения; b_{j1} , b_{j2} , b_{j11} , b_{j22} , b_{j12} – оценки коэффициентов уравнения регрессии, соответствующие отклику Y_j и характеризующие линейные, квадратичные эффекты и эффекты взаимодействия факторов x_1 и x_2 ; Y_j – выраженные в процентах показатели:

Y_1 – морфогенез (отношение числа морфогенных линий к общему числу каллусов); Y_2 – эмбриоидо-гемморизогенез (отношение числа эмбриоидов и почек к числу морфогенных каллусов); Y_3 – ризогенез (отношение числа ризогенных каллусов к числу морфогенных каллусов); Y_4 – частота регенерации (1) (отношение числа регенерантов к числу морфогенных каллусов); Y_5 – частота регенерации (2) (отношение числа регенерантов к числу эмбриоидо-гемморизогенных каллусов).

Матрица плана ПФЭ 3^2 , вычисление коэффициентов, проверка адекватности моделей, нахождение экстремальных точек функции отклика осуществлялись согласно таблицам и формулам, приведенным в работе А.Н. Лисенкова (1979). Графическое представление поверхностей откликов получено с помощью приложения STATGRAPHICS.

Согласно плану эксперимента с двумя факторами при варьировании каждого на трех уровнях (9 вариантов с четырьмя параллельными наблюдениями в каждой точке), было реализовано 144 опыта, в результате которых получили 20 математических моделей (4 сорта \times 5 показателей – откликов).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В табл. 2 представлены коэффициенты полиномиальных уравнений регрессии для каждой математической модели.

Таблица 2. Коэффициенты регрессии математических моделей

Сорт	Этапы регенерации	Коэффициенты модели					
		b_0	b_1	b_2	b_{11}	b_{22}	b_{12}
Скала	Y_1	69.90*	0.03	2.83*	1.07	10.95*	0.35
	Y_2	74.20*	-8.46*	5.43*	8.97*	-10.57*	1.21
	Y_3	23.20*	5.69*	-4.05*	-11.05*	12.65*	0.87
	Y_4	517.70*	-102.98*	117.95*	-38.55*	-93.98*	-50.51*
	Y_5	457.10*	-130.66*	118.40*	11.10	-140.45*	-46.98*
Спектр	Y_1	75.20*	7.08*	-1.55	-0.98	0.46	6.55*
	Y_2	80.60*	-8.37*	8.88*	-3.95*	-7.58*	8.90*
	Y_3	28.50*	13.83*	-10.73*	0.12	-3.82*	-3.00*
	Y_4	545.10*	-116.58*	92.97*	-7.60	-107.28*	-79.59*
	Y_5	433.30*	-155.61*	111.90*	21.17*	-115.91*	-53.98*
Зарница	Y_1	63.80*	1.85*	5.55*	-7.09*	-19.47*	3.54*
	Y_2	99.80*	-7.43*	-33.04*	-38.58*	-23.74*	12.50*
	Y_3	17.10*	2.31	32.62*	21.13*	13.95*	-9.19*
	Y_4	489.30*	-64.94*	-27.43*	-170.47*	-168.41*	6.25
	Y_5	237.40*	-51.25*	-56.45*	-76.10*	-37.53*	28.13*
Жница	Y_1	68.50*	2.05*	9.27*	-10.04*	-11.18*	2.40*
	Y_2	64.50*	-6.51*	-24.07*	-11.87*	8.25*	-3.13
	Y_3	35.80*	6.79*	24.02*	12.15*	-8.80*	3.13
	Y_4	431.20*	-43.89*	62.50*	-79.72*	-134.30*	0.00
	Y_5	264.80*	-49.04*	-13.32*	-71.75*	-68.49*	4.19

* – коэффициенты значимы при уровне $P \leq 0.05$

Абсолютные значения коэффициентов регрессии оценивают линейные и нелинейные эффекты факторов, а знаки при них – направление их влияния на отклик. Согласно значениям b_1 , повышение концентрации кинетина увеличивает частоту индукции морфогенетических и ризогенных структур в каллусных тканях всех тестируемых сортов. Для эмбриоидо-гемморизогенеза и регенерации растений имеет место обратная реакция на данный гормон. Действие ауксина (2,4-Д) на различные этапы регенерации зависит от генотипических особенностей исходных сортов, что отражается в различных знаках коэффициента b_2 . Наличие значимых коэффициентов квадратичных эффектов и эффектов взаимодействия в большинстве моделей подтверждают гипотезу о нелинейном характере влияния изучаемых факторов на отклик. Отзывчивость клеточных культур на действие обоих гормонов оказалась различной по степени, но стабильной по соотношению ее между сортами, как для главных эффектов, так и для взаимодействия (табл. 2).

По результатам двухфакторного дисперсионного анализа для каждого сорта были определены доли влияния изучаемых факторов и их взаимодействия, по которым проведено ранжирование источников варибельности признаков среди исследованных генотипов (табл. 3).

Таблица 3. Ранги влияния факторов на совокупность регенерационных процессов

Сорт	Факторы		
	кинетин (x_1)	2,4-Д (x_2)	взаимодействие
Спектр	I	I	I
Скала	II	II	II
Зарница	III	III	III
Жница	IV	IV	IV

Наиболее выражено действие экзогенных фитогормонов на морфогенетические процессы в каллусных культурах наблюдали у сортов Спектр и Скала, что позволило им занять ведущие позиции (I и II ранги соответственно) как по каждому фактору в отдельности, так и при их взаимодействии. Зарница и Жница оказались менее чувствительными к присутствию в питательной среде регуляторов роста.

Представляет интерес геометрическая интерпретация полученных математических моделей. Их анализ показал, что поверхности откликов имеют в 11-ти случаях гиперболическую поверхность с седловыми точками и экстремальными значениями на границах эксперимента, в 8-ми – эллипсоидную с максимумом во внутренней области факториального пространства и в одном – эллипсоидную с минимумом во внутренней области факториального пространства. Типичные графики отклика и изолиний его равных значений представлены на рис. 1.

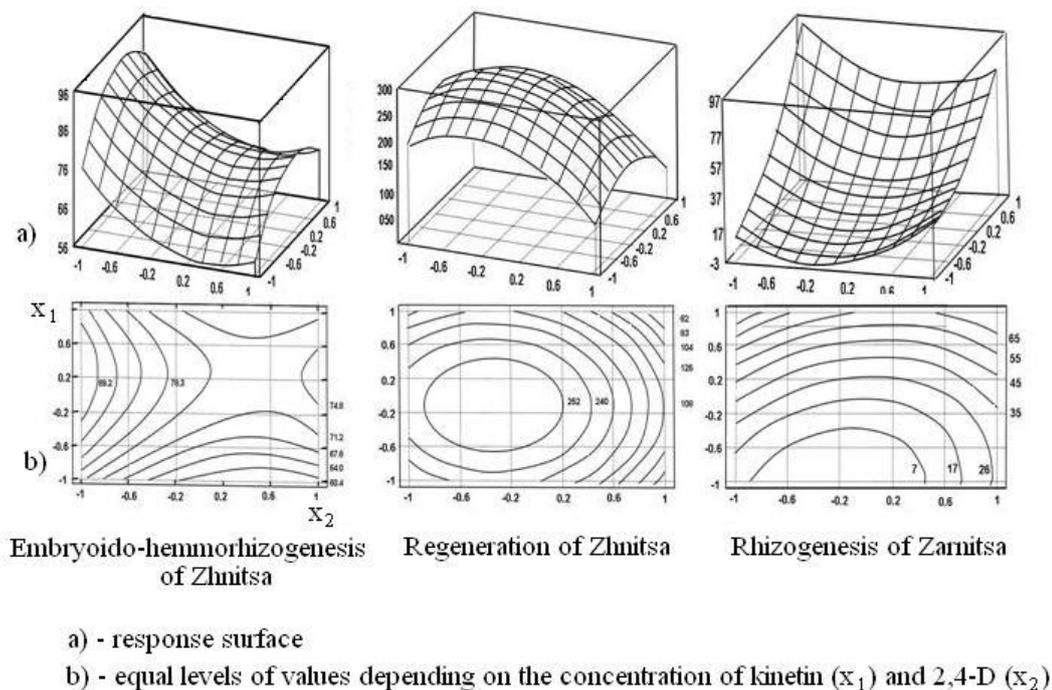


Рис. 1. Графические образы математических моделей оптимизации гормонального состава питательной среды для мягкой пшеницы

Экстремальные значения факторов определялись исходя из критериев оптимизации процессов получения максимальной частоты морфогенеза, эмбриоидо-гемморизогенеза, регенерации и минимальной – для ризогенеза. При этом сканированием поверхности отклика плоскостью, параллельной плоскости факториального пространства, анализировались изолинии с максимальным или минимальным (в соответствии критерию оптимизации) значением отклика.

Из уравнений изолиний $x_1 = f(x_2)$ рассчитывались координаты экстремальных точек, значения которых представлены на рис. 2.

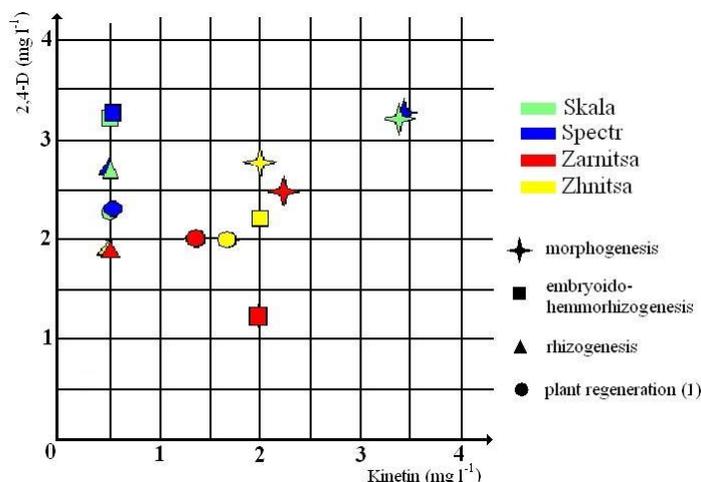


Рис. 2. Оптимальные значения фитогормонов в питательной среде для индукции морфогенеза и регенерации растений в культуре незрелых зародышей мягкой пшеницы

Установлено, что оптимальные значения концентрации гормонов не одинаковы как для разных сортов, так и различных морфогенных процессов. Так, например, для каллусных тканей сортов Скала и Спектр оптимальный уровень кинетина для всех этапов регенерации, за исключением общей частоты морфогенеза, равен минимальному значению, использованному в эксперименте, т.е. 0.5 мг/л. Оптимальные значения 2,4-Д для этих же генотипов находятся в интервале 2.3 – 3.2 мг/л.

Для клеточных культур сортов Зарница и Жница кинетин в концентрации 0.5 мг/л обеспечивал минимальный уровень частоты ризогенеза, в то время как для остальных показателей оптимальными являлись значения в пределах 1.3 – 2.2 мг/л. Гормон группы ауксинов (2,4-Д), необходимый для успешной регенерации, составил 1.9 – 2.7 мг/л.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одной из причин неоднозначного влияния экзогенных гормонов на морфогенетические процессы в клеточных культурах различных сортов мягкой пшеницы, вероятно, является их эндогенный уровень как в исходных эксплантах, так и в пролиферирующем каллусе. Немногочисленные данные относительно зависимости морфогенеза от гормонального статуса эксплантов подтверждают предположение, что присутствие в них достаточного количества регуляторов роста, например, цитокинина, может обуславливать образование стебля и его развитие *in vitro* даже на безгормональной питательной среде. Добавление данного компонента может создать его избыток и ингибировать процессы органогенеза (Копертех, Бутенко, 1995; Долгих и др., 2003).

Зависимость формообразовательных процессов в культуре ткани от содержания эндогенных гормонов в исходных эксплантах продемонстрирована 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).

Изучение гормональной регуляции морфогенеза у различных видов хвойных показало, что в эмбрионном каллусе лиственницы сибирской и кедра сибирского происходит резкое возрастание уровня цитокининов (в 2 раза) и АБК (абсцизовой кислоты) по сравнению с исходными эксплантами. Содержание ИУК в морфогенном каллусе кедра осталось без изменения, а у лиственницы существенно снизилось (Третьякова, Иваницкая, 2008). Напротив, одним из условий формирования эмбрионного каллуса ели обыкновенной являлось высокое содержание цитокининов в культивируемых зародышах. При этом сам эмбрионный каллус содержал значительно меньшее количество фитогормонов, чем исходный эксплант. Кроме того, в зародышах, способных индуцировать эмбрионный каллус, содержалось в 5–6 раз больше ИУК и в 2 раза больше АБК, чем у зародышей, не способных к

соматическому эмбриогенезу. Высказано предположение, что компетентность клеток к гормонам при образовании эмбриогенного каллуса у разных видов зависит от их эндогенного содержания в эксплантах. При этом способность зародышей *in vitro* к органогенезу зависит от соотношения цитокининов к АБК в культивируемых тканях, а при индукции соматического эмбриогенеза основную роль играет ИУК (Хмара, 2011; 2015).

Таким образом, существование градиента концентраций фитогормонов, а именно больших различий между эмбриогенным и неэмбриогенным каллусами, а также между зародышами, способными формировать эмбриогенный каллус, и зародышами, не способными его образовывать, 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 формирования эмбриоидо-гемморизогенных структур в каллусах мягкой пшеницы, обеспечивающих регенерацию растений, требуются более низкие концентрации регуляторов роста, чем для индукции корней. Культивирование на питательной среде, содержащей 0.5 мг/л кинетина и 2.0 мг/л 2,4-Д, позволило получить в среднем по всем генотипам 5.6 растений на один морфогенный каллус, с варьированием от 3.2 до 8.2 растений в зависимости от генотипа. Частота ризогенеза при этом была минимальна и составила 19.2%.

ВЫВОДЫ

Повышение концентрации кинетина в питательной среде увеличивает частоту индукции морфогенетических и ризогенных структур в каллусных тканях всех тестируемых сортов яровой мягкой пшеницы. Для эмбриоидо-гемморизогенеза и регенерации растений имеет место обратная реакция на данный гормон. Эффективность действия ауксина на морфогенез и регенерацию растений определяется генотипическими особенностями исходных сортов. Оптимальные значения регуляторов роста не одинаковы для культур анализируемых сортов и различных этапов регенерации.

Для каллусных тканей сортов Скала и Спектр оптимальный уровень кинетина для всех этапов регенерации, за исключением общей частоты морфогенеза, равен 0.5 мг/л, 2,4-Д находится в интервале 2.3 – 3.2 мг/л. Для клеточных культур сортов Зарница и Жница кинетин в концентрации 0,5 мг/л обеспечивает минимальный уровень частоты ризогенеза, в то время как для остальных показателей оптимальными являются значения в пределах 1.3 – 2.2 мг/л. Гормон группы ауксинов (2,4-Д), необходимый для успешной регенерации, составляет 1.9 – 2.7 мг/л.

Уровень экзогенных гормонов, необходимых для стеблевой дифференциации ниже, чем для корнеобразования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Авксентьева, О.О., Петренко, В.А. (2009). Роль генотипа, состава среды и типа экспланта в формировании первичного каллуса изогенных линии пшеницы. Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Карамзина. Серия Биология, 9(856), 56–62.
- Андреев, И.О., Спиридонова, Е.В., Майданюк, Д.Н., Кунах, В.А. (2009). Генетические эффекты культивирования *in vitro* тканей кукурузы. Физиология и биохимия культ. растений, 41(6), 487–495.
- Вечернина, Н.А., Таварткиладзе, О.К. (2014). Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. Барнаул: Издательство АлтГУ.
- Григорьева, Л.П., Шлецер, И.А. (2006). Скрининг сортов пшеницы по способности к морфогенезу в культуре незрелых зародышей *in vitro*. Известия Алтайского государственного университета, 3, 64–66.
- Долгих, Ю.И., Пустовоитова, Т.Н., Жданова, Н.Е., Осипова, Е.А. (2003). Содержание эндогенных гормонов в тканях кукурузы, способных и неспособных к морфогенезу *in vitro*. Физиология растений – основа фитобиотехнологии: Материалы ИИ Международной конференции. Пенза.
- Ерещенко, О.В., Никитина, Е.Д., Хлебова, Л.П. (2014). Оценка эффективности различных схем клеточной селекции яровой пшеницы на устойчивость к осмотическим стрессам. Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы ВИИ Всероссийской научно–практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. 220–224.

- Жумабаева, Б.А. (2008). Каллусогенез и регенерация растений сорта пшеницы Казахстанская 126. Вестник КазНУ, 1(36), 98.
- Зайнутдинова, Е.М. (2005). Эмбриодогенез видов рода *Triticum aestivum* в каллусной культуре in vitro. Дисс. к.б.н. Уфа.
- Катасонова, А.А., Шаяхметов, И.Ф., Круглова, Н.Н. (2006). Этапы биотехнологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы путем эмбриодогенеза в каллусной культуре in vitro. Известия Челябинского научного центра, 2(32), 78–82.
- Копертех, Л.Г., Бутенко, Р.Г. (1995). Нативные фитогормоны экспланта и морфогенез пшеницы in vitro. Физиология растений, 42(4), 555–558.
- Круглова, Н.Н., Катасонова, А.А. (2009). Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетический компетентный эксплант. Физиология и биохимия растений, 41(2), 124–131.
- Лысенков, А.Н. (1979). Математические методы планирования многофакторных медико-биологических экспериментов. М.: Медицина.
- Никитина, Е.Д. (2004). Роль генотипа в реализации морфогенетических процессов в культуре незрелых зародышей у *Triticum aestivum* L. Сибирский вестник сельскохозяйственной науки, 2(152), 32–34.
- Никитина, Е.Д., Хлебова, Л.П. (2014). Влияние температуры и освещения на прямое прорастание незрелых зародышей *Triticum aestivum* L. в культуре in vitro. Известия Алтайского государственного университета, 3/1(83), 46–50.
- Никитина, Е.Д., Хлебова, Л.П. (2015). Особенности морфогенеза яровой мягкой пшеницы в культуре in vitro в зависимости от условий произрастания. Ульяновский медико-биологический журнал, 2, 125–131.
- Сидор, Л.С., Орлов, П.А. (2005). Регенерационный потенциал различных видов пшеницы, ржи и ячменя в культуре листовых эксплантов. Цитология и генетика, 39(5), 28–34.
- Третьякова, И.Н., Иваницкая, А.С. (2008). Гормональная регуляция морфогенеза при образовании эмбрионного каллуса и соматических зародышей у сибирских видов хвойных. Биология клеток растений in vitro и биотехнология: Тезисы IX Международной конференции. Москва: ИД ФБК-ПРЕСС.
- Фаизиева, С.А. (2009). Регенерационная активность разных генотипов пшеницы и эгилопса в культуре in vitro. Дисс. к.б.н. Душанбе.
- Фоменко, Т.И., Бердичевец, Л.Г., Малюш, М.К., Чумакова, И.М. (2001). Влияние эндогенного и экзогенного действия гормонов на процесс каллусообразования и морфогенез у табака. Клеточные ядра растений. Экспрессия и реконструкция: Материалы I Региональной научной конференции. Минск.
- Хмара, К.А. (2011). Динамика содержания фитогормонов в каллусной ткани при индукции органогенеза in vitro зародышей *Picea abies* L. Karst. Труды КарНЦ РАН, 3, 131–136.
- Хмара, К.А. (2015). Содержание фитогормонов в каллусной ткани при индукции соматического эмбриогенеза у зародышей ели обыкновенной (*Picea abies* L. Karst.). Труды КарНЦ РАН, 12, 142–148.
- Evans, D., Sharp, W., Flick, C. (1981). *Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. Plant tissue culture, methods and applications in agriculture*. New York. London.
- Gupta, S., Rashobte, A.M. (2012). Down-stream components of cytokinin signaling in plant and the role of cytokinin throughout the plant. *Plant Cell Rep.*, 31(5), 801–812.
- Linsmaier, E., Skoog, F. (1965). Organic growth factor regulants of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 18(1), 100–127.
- Mokhtari, A., Alizadeh, H., Samadi, B., Omidi, M., Moeini, Z. (2013). Effect of plant growth regulators on direct shoot regeneration of wheat immature embryonic explants. *Journal of Agricultural Engineering and Biotechnology*, 1(3), 74–80.
- Ozias-Akins, P., Vasil, I.K. (1982). Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* (wheat): Evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*, 11(2), 95–105.
- 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 Cult.*, 77(3), 245–250.
- Przetakiewicz, A., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A. (2003). The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73, 245–256.

- Rai, M.K., Shekhawat, N.S., Harish, Gupta, A.K., Phulwaria, M., Ram, K., Jaiswal, U. (2011). The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant cell, tissue and organ culture*, 106(2), 179–190.
- Skoog, F., Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Proceed. Sympos. Soc. Exp. Biol.*, 11(2), 118–131.
- 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.

REFERENCES

- Andreev, I.O., Spiridonova, E.V., Maidanyuk, D.N., Kunah, V.A. (2009). Geneticheskie efekty kul'tivirovaniya *in vitro* tkanei kukuruzy. *Fiziologiya i biohimiya kul't. rastenii*, 41(6), 487–495 (in Russian)
- Avksent'eva, O.O., Petrenko, V.A. (2009). Rol' genotipa, sostava sredy i tipa eksplanta v formirovanii pervichnogo kallyusa izogennykh linii pshenicy. *Visnik Har'kivs'kogo nacional'nogo universitetu imeni V.N. Karamzina. Seriya Biologiya*, 9(856), 56–62 (in Russian).
- Dolgiy, Yu.I., Pustovoitova, T.N., Zhdanova, N.E., Osipova, E.A. (2003). Soderzhanie endogennykh gormonov v tkanyakh kukuruzy, sposobnykh i nesposobnykh k morfogenezu *in vitro*. *Fiziologiya rastenii – osnova fitobiotekhnologii: Materialy II Mezhdunarodnoi konferencii*. Penza (in Russian).
- Ereshenko, O.V., Nikitina, E.D., Hlebova, L.P. (2014). Ocenka effektivnosti razlichnykh shem kletochnoi selekcii yarovoi pshenicy na ustoichivost' k osmoticheskim stressam. *Tehnologii i oborudovanie himicheskoi, biotekhnologicheskoi i pishevoi promyshlennosti: materialy VII Vserossiiskoi nauchno–prakticheskoi konferencii studentov, aspirantov i molodykh uchenykh s mezhdunarodnym uchastiem*. 220–224 (in Russian).
- Evans, D., Sharp, W., Flick, C. (1981). *Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. Plant tissue culture, methods and applications in agriculture*. New York. London.
- Faizieva, S.A. (2009). *Regeneratsionnaya aktivnost' raznykh genotipov pshenicy i egilopsa v kul'ture in vitro*. Thesis of Doctoral Dissertation. Dushanbe (in Russian).
- Fomenko, T.I., Berdichevec, L.G., Malyush, M.K., Chumakova, I.M. (2001). Vliyanie endogenno go i ekzogenno go deistviya gormonov na process kallusobrazovaniya i morfogenez u tabaka. Kletochnye yadra rastenii. *Ekspressiya i rekonstrukciya: Materialy I Regional'noi nauchnoi konferencii*. Minsk (in Russian).
- Grigor'eva, L.P., Shlecer, I.A. (2006). Skringing sortov pshenicy po sposobnosti k morfogenezu v kul'ture nezrelykh zarodyshei *in vitro*. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta*, 3, 64–66 (in Russian).
- Gupta, S., Rashobte, A.M. (2012). Down–stream components of cytokinin signaling in plant and the role of cytokinin throughout the plant. *Plant Cell Rep.*, 31(5), 801–812.
- Hmara, K.A. (2011). Dinamika sodержaniya fitogormonov v kallusnoi tkani pri indukcii organogeneza *in vitro* zarodyshei *Picea abies* L. Karst. *Trudy KarNC RAN*, 3, 131–136 (in Russian).
- Hmara, K.A. (2015). Soderzhanie fitogormonov v kallusnoi tkani pri indukcii somaticheskogo embriogeneza u zarodyshei eli obyknovennoi (*Picea abies* L. Karst.). *Trudy KarNC RAN*, 12, 142–148 (in Russian).
- Katasonova, A.A., Shayahmetov, I.F., Kruglova, N.N. (2006). Etapy biotekhnologii polucheniya rastenii–regenerantov yarovoi myagkoi pshenicy putem embrioidogeneza v kallusnoi kul'ture *in vitro*. *Izvestiya Chelyabinskogo nauchnogo centra*, 2(32), 78–82 (in Russian).
- Koperteh, L.G., Butenko, R.G. (1995). Nativnye fitogormony eksplanta i morfogenez pshenicy *in vitro*. *Fiziologiya rastenii*, 42(4), 555–558 (in Russian).
- Kruglova, N.N., Katasonova, A.A. (2009). Nezrelyi zarodysh pshenicy kak morfogeneticheskii kompetentnyi eksplant. *Fiziologiya i biohimiya rastenii*, 41(2), 124–131 (in Russian).
- Linsmaier, E., Skoog, F. (1965). Organic growth factor regularments of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 18(1), 100–127.
- Lisenkov, A.N. (1979). *Matematicheskie metody planirovaniya mnogofaktornykh mediko–biologicheskikh eksperimentov*. Moscow: Medicina (in Russian).
- Mokhtari, A., Alizadeh, H., Samadi, B., Omidi, M., Moeini, Z. (2013). Effect of plant growth regulators on direct shoot regeneration of wheat immature embryonic explants. *Journal of Agricultural Engineering*

and *Biotechnology*, 1(3), 74–80.

- Nikitina, E.D. (2004). Rol' genotipa v realizacii morfogeneticheskikh processov v kul'ture nezrelykh zarodyshei u *Triticum aestivum* L. *Sibirskii vestnik sel'skohozyaistvennoi nauki*, 2(152), 32–34 (in Russian).
- Nikitina, E.D., Hlebova, L.P. (2015). Osobennosti morfogeneza yarovoi myagkoi pshenicy v kul'ture *in vitro* v zavisimosti ot uslovii proizrastaniya. *Ul'yanovskii mediko–biologicheskii zhurnal*, 2, 125–131 (in Russian).
- Nikitina, E.D., Hlebova, L.P. (2014). Vliyanie temperatury i osvesheniya na pryamoe prorastanie nezrelykh zarodyshei *Triticum aestivum* L. v kul'ture *in vitro*. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta*, 3/1(83), 46–50 (in Russian).
- Ozias–Akins, P., Vasil, I.K. (1982). Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* (wheat): Evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*, 11(2), 95–105.
- 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 Cult.*, 77(3), 245–250.
- Przetakiewicz, A., Orczyk, W., Nadolska–Orczyk, A. (2003). The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73, 245–256.
- Rai, M.K., Shekhawat, N.S., Harish, Gupta, A.K., Phulwaria, M., Ram, K., Jaiswal, U. (2011). The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant cell, tissue and organ culture*, 106(2), 179–190.
- Sidor, L.S., Orlov, P.A. (2005). Regeneracionnyi potencial razlichnykh vidov pshenicy, rzhi i yachmenya v kul'ture listovykh eksplantov. *Citologiya i genetika*, 39(5), 28–34 (in Russian).
- Skoog, F., Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Proceed. Sympos. Soc. Exp. Biol.*, 11(2), 118–131.
- Tret'yakova, I.N., Ivanickaya, A.S. (2008). Gormonal'naya regulyaciya morfogeneza pri obrazovanii embriogenogo kallusa i somaticheskikh zarodyshei u sibirskikh vidov hvoinykh. *Biologiya kletok rastenii in vitro i biotekhnologiya: Tezisy IX Mezhdunarodnoi konferencii*. Moscow: ID FBK–PRESS (in Russian).
- Vechernina, N.A., Tavartkiladze, O.K. (2014). *Metody biotekhnologii v selekcii, razmnnozenii i sohranении genofonda rastenii*. Barnaul: Izdatelstvo AltGU (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.
- Zainutdinova, E.M. (2005). *Embrioidogenez vidov roda Triticum aestivum v kallusnoi kul'ture in vitro*. Thesis of Doctoral Dissertation. Ufa. (in Russian).
- Zhumabaeva, B.A. (2008). Kallusogenez i regeneraciya rastenii sorta pshenicy Kazhstanskaya 126. *Vestnik KazNU*, 1(36), 98 (in Russian).