

ВЗАИМОСВЯЗЬ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ ПШЕНИЦЫ

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

¹Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

²Алтайский НИИ сельского хозяйства, Барнаул, Россия

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

Изучена сопряженность формообразовательных процессов в культуре незрелых зародышей 15 сортов яровой мягкой пшеницы различного эколого-географического происхождения. Выявлен полиморфизм сортов по способности к каллусо-, морфогенезу и регенерации растений. Частота каллусогенеза составила 94,3 %, варьируя от 76,6 до 100 % в зависимости от генотипа. Отмечен активный морфогенетический процесс в каллусных тканях у 72 % тестируемых сортов. Уровень регенерации зависит от типа морфогенеза (эмбриоидо-, гемморизогенеза и ризогенеза). В среднем по всем сортам он невысок и равен 97,9 %, т.е. одна морфогенная линия продуцирует примерно одно растение. У 80,2 % морфогенных каллусов процесс органогенеза не достигает стадии развития целого растения, а заканчивается образованием корней. По пути эмбриоидо- и гемморизогенеза регенерация растений идёт у 19,8 % морфогенных каллусов. Предложены сорта (Спектр, Скала, Leones, Жница), обладающие высоким регенерационным потенциалом, в качестве модельных объектов для изучения теоретических аспектов эмбриоидо- и органогенеза, а также генетической трансформации растений. Установлена положительная корреляция эмбриоидо-гемморизогенеза и регенерации растений ($r = 0,777$), свидетельствующая о существовании общей генетической системы, контролирующей эти события. При изменении факториального признака на 1 % уровень результирующего (регенерация) возрастает на 3,6 %. Между ризогенезом и уровнем регенерации отмечена обратная взаимосвязь ($r = -0,749$). Увеличение частоты ризогенеза на 1 % ведет к снижению регенерации на 1,1 %. Сопряженность каллусо- и морфогенеза отсутствует. Анализ множественных взаимосвязей между каллусо-, морфогенезом и регенерацией растений выявил доминирующий фактор – процесс образования эмбриондов и побегов, определяющий выход регенерантов. Доля его в вариативности уровня регенерации растений составляет 51 %. Влияние ризогенеза равно 12 %. Обсуждаются возможные причины установленных коррелятивных связей различных формообразовательных процессов *in vitro*.

Ключевые слова: пшеница мягкая яровая, генотип, незрелый зародыш, каллус, морфогенез, соматический эмбриогенез, органогенез, ризогенез, регенерация растений, корреляция.

RELATIONSHIP OF MORPHOGENETIC PROCESSES IN WHEAT TISSUE CULTURE

L.P. Khlebova¹, E.D. Nikitina², A.V. Matsyura¹, O.V. Bychkova¹

¹Altai State University, Barnaul, Russia

²Altai Research Institute of Agriculture, Barnaul, Russia

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

Relationship of different morphogenetic processes in immature embryo cultures from 15 spring bread wheat varieties of different ecological and geographical origin was studied. Embryos (14–16 days post anthesis with 1.3–1.5 mm in size) were placed with the scullum upwards on a solid agar medium containing the inorganic components of Linsmaier & Skoog (LS), 3 % sucrose, 2.0 mg l⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Induced calli were subcultured after 25–30 days interval in fresh medium supplemented with 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D and 0.5 mg l⁻¹ kinetin. Embryogenic calli were transferred to LS medium containing 0.2 mg l⁻¹ indole-3-acetic acid (IAA). Varietal polymorphism was revealed in relation to callusogenesis, morphogenesis and plant regeneration. The frequency of callusogenesis made 94.3 % with variation from 76.6 % to 100 % depending on a genotype. An active morphogenic process was revealed in 72 % of the varieties tested. The regeneration level depended on the type of morphogenesis (embryoidogenesis, hemmorhizogenesis and rhizogenesis). On average across all varieties it was not high and made 97.9 %; that is one morphogenic line produced about one plant. Organogenesis in 80.2 % of morphogenic calluses did not reach the development stage of the whole plant and stopped with root production.

Citation:

L.P. Khlebova, E.D. Nikitina, A.V. Matsyura, O.V. Bychkova (2016). Relationship of morphogenetic processes in wheat tissue culture. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University*, 6 (2), 311–320.

Поступило в редакцию / Submitted: 17.07.2016

Принято к публикации / Accepted: 27.08.2016

crossref <http://dx.doi.org/10.15421/201662>

© Khlebova, Nikitina, 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

Plant regeneration by embryo- and hemmorhizogenesis occurred in 19.8 % of morphogenic calluses. For the study of theoretical aspects of embryo- and organogenesis as well as genetic transformation of plants the varieties with high regeneration potential are proposed as model objects (Spektr, Skala, Leones, and Zhnitsa). Positive correlation of embryo-, hemmorhizogenesis and plant regeneration was revealed ($r = 0.777$), and it proves that there is a common genetic system responsible for those processes. When factorial trait shifted by 1 %, the resultant trait (regeneration) increases by 3.59 %. Negative correlation was found between rhizogenesis and regeneration level ($r = -0.749$). The rise in rhizogenesis frequency by 1 % results in regeneration decrease by 1.1 %. There is no correlation of calluso- and morphogenesis indicating that they are genetically independent. The analysis of multiple correlations between calluso-, morphogenesis and plant regeneration revealed the dominant factors determining regenerant output. They were the processes of the embryo- and hemmorhizogenesis. Their contribution to the variability of plant regeneration level was about 51 %. The effect of rhizogenesis was about 12 %. Possible reasons of the revealed correlations between different morphogenetic processes are discussed.

Keywords: spring bread wheat, genotype, immature embryo, callus, morphogenesis, somatic embryogenesis, organogenesis, rhizogenesis, plant regeneration, correlation.

ВВЕДЕНИЕ

Культивирование клеток и тканей растений открывает принципиально новые перспективы перед различными областями биологии (Мякишева и др., 2016; Skaptsov et al., 2016). Из культивируемой растительной клетки можно получить целостное растение, что достигается, благодаря ее тотипотентности, т. е. уникальной способности не только дедифференцироваться и делиться, но и давать начало организованным структурам. Регенерацию растений из культуры тканей можно достичь, используя один из трех методов: культуру зародышей, соматический эмбриогенез и органогенез (Вечернина, 2004; Вечернина, Таварткиладзе, 2014).

Для эффективного использования пшеницы *in vitro* важным фактором является природа экспланта. Наилучшие результаты получены при введении в культуру 12 – 17-дневных незрелых зародышей, представляющих собой сложную интегрированную систему, состоящую из структурных элементов, между которыми существуют строго определенные морфофизиологические корреляции (Benkirane et al., 2000; Marcinska et al., 2001; Li et al., 2003; Круглова, Катасонова, 2009; Miroshnichenko et al., 2009; Катасонова, Круглова, 2011; Mokhtari et al., 2013; Никитина и др., 2013; Zhang et al., 2015; Ерещенко и др., 2015).

При изолировании незрелого зародыша и помещении его на питательную среду, содержащую ауксины, происходит нарушение упорядоченности делений, ингибируется апикальное доминирование, формируется каллусная культура, основным свойством которой является ее структурная и функциональная гетерогенность (Григорьева, Шлецер, 2006; Chauhan et al., 2007; Sarker et al., 2007; Stupko, Zbova, 2012; Никитина и др., 2015; Бычкова, 2016).

Неоднородность каллусных клеток обуславливает их разные пути морфогенеза. Согласно исследованиям S.E. Maddock et al. (1983), регенерация растений может быть достигнута путем гемморизогенеза, т.е. сопряженного развития почек и корней. По данным других авторов (Ozias-Akins, Vasil, 1982; 1983; Magnusson, Bornman, 1985; Benkirane et al., 2000; Eudes et al., 2003) формирование растений идет через соматический эмбриогенез (эмбриоидогенез) – процесс развития зародышеподобной биполярной структуры (эмбриоида), образующейся асексуально из соматической или половой клеток.

Однако большинство исследователей (Salyaev et al., 2001; Nasircilar et al., 2006; Jia et al., 2009; Никитина и др., 2013; 2014; Seldimirova, Kruglova, 2013) наблюдали одновременное развитие из морфогенного каллуса как соматических эмбриоидов, так и гемморизогенных структур, полученных в процессе органогенеза.

Несмотря на то, что соотношение между образованием каллусов, почек, корней и растений считается важным показателем при использовании культуры незрелых зародышей пшеницы, до сих пор эта проблема недостаточно изучена. Цель настоящего исследования – анализ взаимосвязей между варьирующими признаками культуры незрелых зародышей мягкой пшеницы и выявление значимых из них для процесса регенерации в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили 15 сортов яровой мягкой пшеницы различного эколого-географического происхождения: Алтайская 81, Алтайская 50, Алтайская 88, Вега, Барнаульская 83, Целинная 20, Целинная 60, Скала, Зарница, Жница, Тулунская 10, Ботаническая 2, Спектр, Россиянка, Leones. В качестве эксплантов для индукции каллуса использовали незрелые зародыши размером 1,3 – 1,5 мм, изолированные асептически на 14 – 16 сутки после цветения донорных растений.

Зародыши помещали в конические колбы щитком вверх на твердую питательную среду Линсмайер-Скуга (RM-64) (Linsmaier, Skoog, 1965), содержащую 0,8 % агара, 30 г/л сахарозы и 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д).

Клеточные культуры выращивали в темноте при температуре 26 ± 1 °С. Для индукции морфогенеза каллусы 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. Выявленные зоны морфогенеза переносили на среду, содержащую 0,2 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК) и культивировали на свету при температуре 24 ± 1 °С. Проростки, достигшие 5 – 7 см, с хорошо развитой корневой системой, высаживали в сосуды с почвой и дорастивали до созревания в климатической камере при температуре 12/17 °С (ночь/день) с 16-часовым фото периодом. Эксперимент выполнен в 4 повторениях по 60 зародышей на генотип. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010 и StatPlus 2009.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Тотипотентность культивируемых клеток, т.е. способность перейти к выполнению программы развития, определяется в первую очередь генотипическими особенностями исходной формы (Григорьева, Шлецер, 2006; Nasircilar et al., 2006; Chauhan et al., 2007; Авксентьева, Петренко, 2009). Поэтому исследования были начаты с изучения реакции сортов на условия культивирования *in vitro*. Установлено, что все тестируемые формы обладали достаточно высокой способностью к индукции каллусных культур (рис. 1). В среднем частота каллусогенеза составила 94,3 %, варьируя от 76,6 (Жница) до 100 % (Целинная 20, Целинная 60, Россиянка, Барнаульская 83) в зависимости от генотипа ($НСР_{0,05} = 8,9$). Данные дисперсионного анализа подтвердили сортоспецифичность интенсивности каллусогенеза ($F_{факт.} = 6,5 > F_{теор.} = 2,6$).

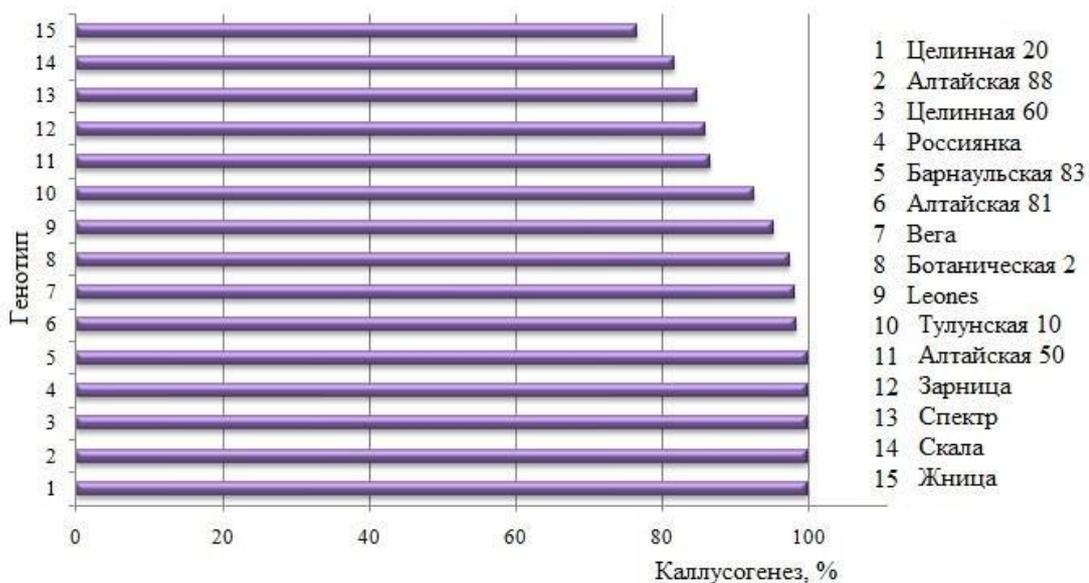


Рис. 1. Частота индукции каллуса в культуре незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы, %.
Figure 1. The frequency of callus induction from immature embryo cultures of spring bread wheat, %.

Наибольшей способностью к индукции морфогенных линий отличались сорта Leones, Скала, Целинная 60, Спектр, Целинная 20 и Ботаническая 2 (73,7 – 91,2 %) (рис. 2). Довольно низкий морфогенетический потенциал продемонстрировал сорт Тулунская 10, у которого лишь примерно каждый третий каллус генерировал морфогенные структуры. Уровень признака у большинства генотипов варьировал в пределах 43 – 70 % ($НСР_{0,05} = 17,9$).

Однако, несмотря на более или менее успешный морфогенетический процесс в каллусных тканях (среднее по сортам равно 66,9 %), у половины изученных образцов мягкой пшеницы получено незначительное количество регенерантов. Так, например, сорта Целинная 60, Россиянка, Алтайская 88, Алтайская 50 и Алтайская 81 продуцировали лишь от 2 до 12 растений на 100 морфогенных каллусов (рис. 3).

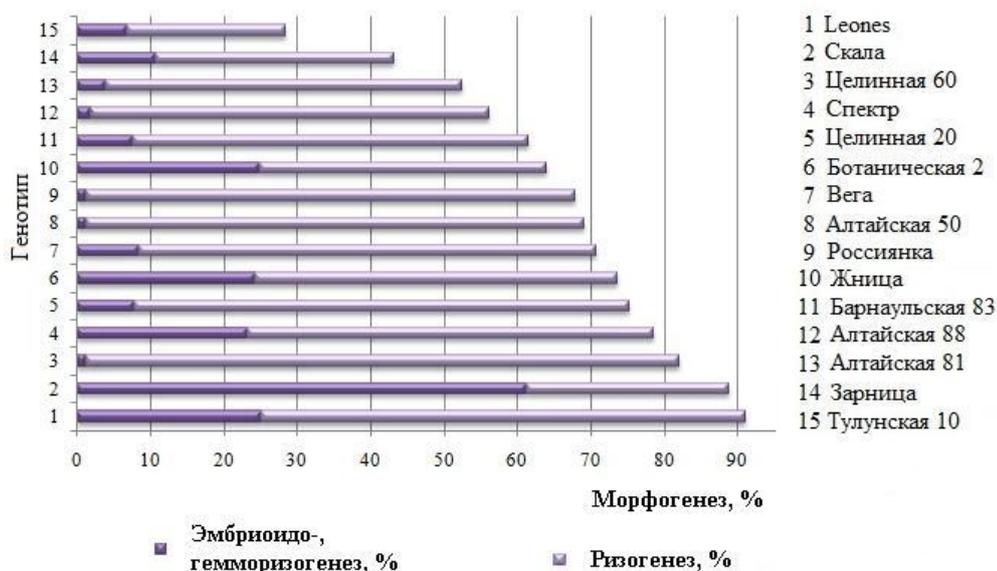


Рис. 2. Морфогенетическая способность каллусных культур сортов мягкой яровой пшеницы, %.
 Figure 2. The frequency of morphogenetic callus from immature embryo cultures of spring bread wheat, %.

Очевидно, это связано с особенностями протекания морфогенеза, проходящего преимущественно по пути органогенеза с преобладанием ризогенного типа. Это привело к тому, что органогенный процесс в каллусах указанных генотипов не достиг организменного уровня (развития целых растений), а закончился образованием корней. Частота ризогенеза относительно морфогенного каллуса оказалась высокой и составила в среднем по сортам 80,2 % ($НСР_{0,05} = 13,3$). Лишь 19,8 % морфогенных клеточных линий развивались по типу эмбриондо- и гемморизогенеза, варьируя от 1,5 до 68,8 % у разных генотипов ($НСР_{0,05} = 13,3$) (рис. 2). Оценка влияния генотипического разнообразия исходных сортов на морфообразовательные процессы в культуре незрелых зародышей, согласно результатам дисперсионного анализа, показала его значимость при $P < 0,01$ ($F_{факт.} = 9,3; 17,7; 15,1 > F_{теор.} = 2,6$ для морфо-, ризо- и эмбриондо-, гемморизогенеза соответственно). Данный факт позволяет заключить, что реализация конкретного пути морфогенеза детерминирована, т.е. в значительной степени определяется генетическими и физиологическими характеристиками экспланта.

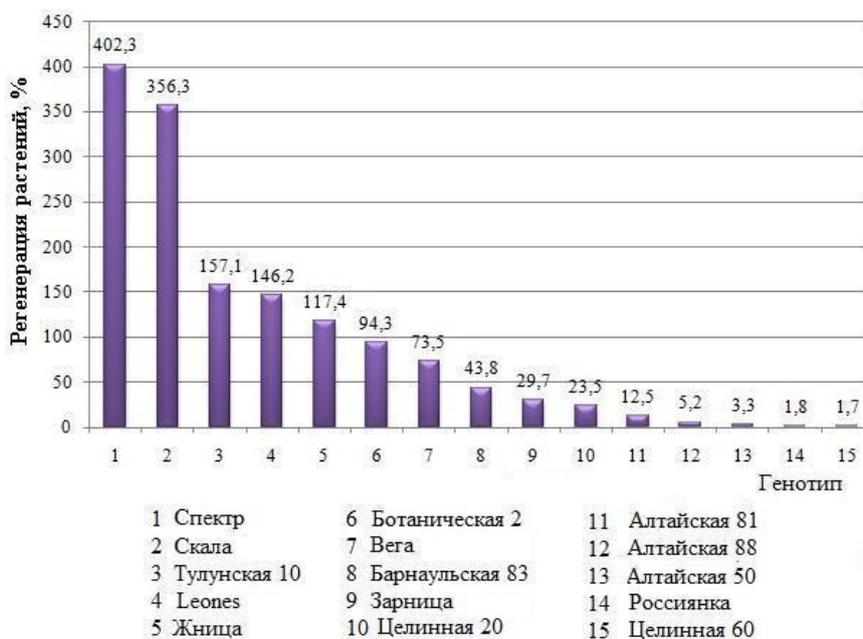


Рис. 3. Частота регенерации растений (относительно числа морфогенных каллусов) в культуре незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы, %.
 Figure 3. Plant regeneration frequency (relative to the number of morphogenic callus) from immature embryos of spring bread wheat, %.

Стабильная регенерация растений является необходимым условием практического использования культуры ткани. В среднем ее уровень составил 97,9 %, т.е. от одной морфогенной линии удалось получить примерно одно растение (рис. 3). Регенерационный потенциал сортов существенно варьировал в зависимости от генотипа ($F_{\text{факт.}} = 21,8 > F_{\text{теор.}} = 2,6$, достоверно при $P < 0,01$). Как отмечено выше, треть изученных образцов регенерировали лишь единичные растения. В то же время у сортов Жница, Leones, Тулунская 10, Скала и Спектр он достаточно высок и изменялся в пределах от 117,4 до 402,3 % ($НСР_{0,05} = 50,1$). Эти формы могут быть использованы в качестве модельных объектов для изучения теоретических аспектов эмбриоидо- и органогенеза, а также в исследованиях по генетической трансформации растений.

Таким образом, тестирование сортов мягкой пшеницы показало, что клеточные культуры, индуцированные из незрелых зародышей, являясь гетерогенными системами с определенными морфофизиологическими взаимодействиями, обуславливают специфику развития отдельных структур и органов *in vitro*.

Как известно, процесс получения регенерантов в культуре незрелых зародышей многоступенчатый и состоит из индукции и пролиферации каллуса, морфогенеза и регенерации растений. Каждый предыдущий этап определяет возможность последующего. Однако нет оснований считать, что повышение уровня одного из них неизбежно приведет к увеличению другого. В связи с этим возникает необходимость оценки сопряженности различных образовательных процессов *in vitro* и ее статистической значимости. Результаты такой оценки представлены на рис. 4, где отражены взаимосвязи различных культуральных процессов.

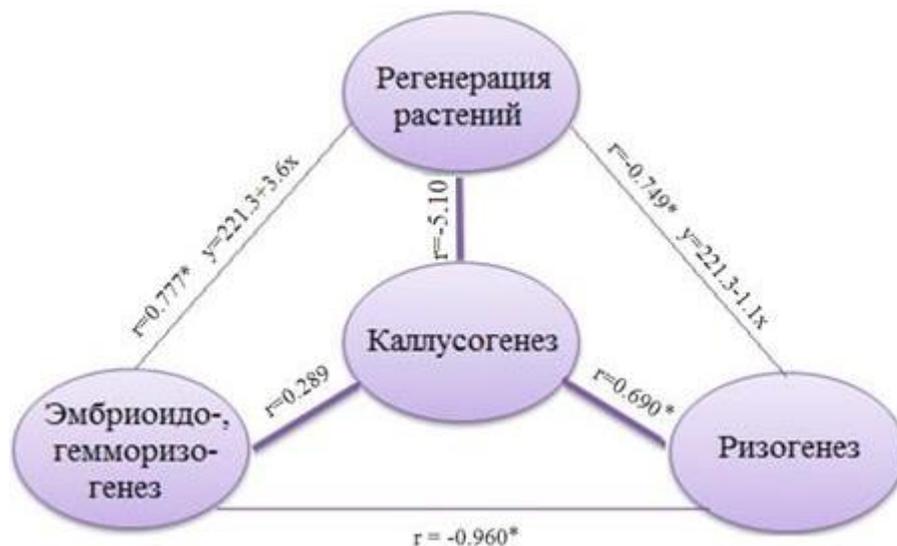


Рис. 4. Взаимосвязь каллусогенеза, типов морфогенеза и регенерации растений в культуре незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы (* значимо при $P < 0,01$).

Figure 4. The relationship of callus formation, types of morphogenesis and plant regeneration in immature embryo culture of spring bread wheat (* significant at $P < 0.01$).

Существенная положительная корреляция установлена между частотой эмбриоидо-гемморизогенеза и регенерацией растений ($r = 0,777$), что дает основание полагать о возможно общей генетической системе, контролирующей образование эмбриоидов, побегов и растений в каллусах. Из уравнения прямолинейной регрессии ($y = 221,3 + 3,6x$, где y – частота регенерации растений; x – частота эмбриоидо-гемморизогенеза) следует, что изменение факториального признака (x) на 1 % приводит к возрастанию уровня результативного (y) на 3,6 %. Следовательно, оптимизация эмбриоидо- и гемморизогенеза будет способствовать увеличению частоты регенерации растений.

Согласно результатам корреляционного анализа, установлено отсутствие сопряженности между частотой индукции каллуса и общим уровнем морфогенеза, что позволяет рассматривать морфогенез генетически независимым от каллусогенеза. Сходные результаты были получены ранее в исследованиях, выполненных как на пшенице, так и других злаках (Maddock et al., 1985; Komatsuda et al., 1989; Zale et al., 2004).

Несмотря на рассмотренную выше генотипическую обусловленность всех культуральных процессов, вероятно, нет выраженной взаимосвязи между генетическими факторами, определяющими эти два признака. Культивирование *in vitro* разновозрастных зародышей мягкой пшеницы показало, что основным условием формирования морфогенных каллусов является инокуляция экспланта на определенной стадии органогенеза, которая характеризуется определенным cito-гистологическим статусом зародыша. Введение в культуру зародышей на более ранней или более поздней стадии приводило к индукции неморфогенных каллусов (Круглова, Катасонова, 2009). Таким образом, потенциал зародыша пшеницы относительно реализации каллусогенеза существенно шире, чем его морфогенетические способности *in vitro*, по крайней мере, в предлагаемых нами условиях культивирования. Подтверждением этого является более широкое варьирование частоты морфогенеза в зависимости от генотипа (рис. 2) в сравнении с частотой индукции каллуса (рис. 1).

Исключение составляет установленная нами достоверная положительная корреляция между показателями каллусо- и ризогенеза ($r = 0,690$). Учитывая, что все признаки в культуре ткани в различной степени взаимосвязаны, то при исследовании их методом парной корреляции можно считать доказанной лишь ту связь, механизм которой биологически понятен. В данной ситуации между рассматриваемыми признаками существует не причинная взаимосвязь, а, вероятнее всего, совместная, определяемая общим третьим параметром. Для индукции каллуса, так же как и для индукции корней необходимо присутствие в питательной среде гормона ауксиновой природы, который, вероятно, и определил эту взаимосвязь.

Кроме того, изучение закономерностей перераспределения осмотически активных компонентов в тканях растений в процессе роста и морфогенеза показало, что в каллусах пшеницы, имеющих зоны вторичной дифференцировки, происходило увеличение концентрации сахаров, а при разрушении этих зон в осмотическом потенциале каллусной ткани начинали доминировать ионы (Kuzevanov et al., 1991). Наблюдения за индукцией каллусов из ткани корнеплода красной столовой свеклы позволили установить, что каллусообразование происходит исключительно из клеток зон, имеющих «сахарный» статус. Этот факт свидетельствует в пользу предположения о том, что регуляция осмотического баланса как в процессе каллусогенеза, так и морфогенеза имеет сходство и идет путем увеличения концентрации сахаров. На основании этих данных был сделан вывод о наличии двух путей поддержания осмотического потенциала, связанных со степенью дифференциации клеток – «сахарный» путь и «солевой» путь. Первый характерен для молодых клеток, а второй – для более дифференцированных клеток (Kuzevanov et al., 1990). Таким образом, процессы каллусогенеза и морфогенеза имеют общие механизмы поддержания гомеостатического равновесия клеток, но не являются взаимоопределяющими. Вместе с тем, это факт может обусловить наличие положительной корреляции между каллусогенными и морфогенными процессами *in vitro*, в частности, каллусогенезом и ризогенезом, установленным в нашем эксперименте.

Установлена отрицательная корреляция между эмбриоидо-гемморизогенезом и ризогенезом. Коэффициент корреляции очень высок, определяя практически прямолинейную зависимость, и равен $-0,960$. Увеличение частоты формирования корней приведет к уменьшению эмбриогенных и гемморизогенных линий, что, в свою очередь, будет снижать выход регенерантов. Доказательством этого является наличие существенной обратной взаимосвязи между ризогенными процессами и уровнем регенерации ($r = -0,749$). Значение выборочного коэффициента регрессии уравнения прямолинейной регрессии ($y = 221,3 - 1,1x$), показывает, что при увеличении частоты ризогенеза на 1 % происходит снижение регенерации на 1,1%.

Данный факт, вероятнее всего, можно связать с особенностями протекания морфообразовательных процессов. Не смотря на то, что каллусные культуры пшеницы реализуют морфогенетические программы различными путями (геммогенез, ризогенез, гемморизогенез, соматический эмбриогенез) установлено, что начало реализации каждого пути морфогенеза связано с формированием в толще морфогенного каллуса морфогенетических очагов, представленных главным образом меристематическими клетками (Konieczny et al., 2003; Круглова, Катасонова, 2009; Сельдимирова и др., 2011; Delporte et al., 2014). По мере дальнейшего культивирования меристематические очаги постепенно приобретают отчетливую зональность, оформляется эпидермальный слой, происходит инвагинация его поверхности. Заложение почек происходит экзогенно, а корней – эндогенно в толще каллуса. По мере развития почек и корней между ними постепенно устанавливается связь путем формирования в каллусе элементов сосудистой системы. В результате формируются растения (гемморизогенез) либо самостоятельные побеги (геммогенез) и

корни (ризогенез). Соматические зародыши, заложившиеся внутри морфогенного каллуса как единая система, в процессе роста и развития появляются на поверхности каллуса и дают начало растениям-регенерантам (эмбриоидогенез) (Катасонова, Круглова, 2011; Seldimirova et al., 2013; Delporte et al., 2014). Таким образом, все *de novo* формируемые структуры имеют общее происхождение, связанное с клетками меристематического очага, по сути «конкурируя» друг с другом. Наличие в каллусах общего пула меристематических очагов определяет в конечном итоге отрицательную корреляцию эмбриоидогемморизогенных и ризогенных процессов.

Для выявления полной структуры связей в данном комплексе признаков, а также доминантных, наиболее тесно сопряженных между собой, провели анализ множественных взаимосвязей. Множественный коэффициент корреляции существенен и равен 0,797. Согласно коэффициенту множественной детерминации (R^2), изменчивость уровня регенерации сортов мягкой пшеницы в культуре незрелых зародышей на 63 % связана с действием изучаемых факторов.

Из уравнения регрессии:

$$y = 221,3 - 2,06x_1 + 1,3x_2 + 3,6x_3 - 1,1x_4^*,$$

где y – частота регенерации; x_1 – каллусогенез; x_2 – морфогенез; x_3 – эмбриоидо-гемморизогенез; x_4 – ризогенез, * – влияние значимо

Следует, что уровень регенерационного потенциала культуры определяется совокупностью морфогенных процессов (эмбриоидо-, гемморизогенезом и ризогенезом). Доминирующим фактором в вариабельности зависимой переменной (y) является частота образования эмбриоидов и побегов, доля которой составляет 51 %. Влияние ризогенеза отрицательно и равно 12 %. Согласно полученным данным, необходимо оптимизировать условия культивирования незрелых зародышей, обеспечивающие проявление доминантных коррелятивных связей, а именно повышение частоты индукции эмбриоидо- и гемморизогенных структур и снижение частоты ризогенных.

ВЫВОДЫ

Выполненное исследование выявило полиморфизм среди 15 сортов яровой мягкой пшеницы по способности к каллусо-, морфогенезу и регенерации растений в культуре незрелых зародышей. Выделены сорта с высоким выходом растений-регенерантов (Спектр, Скала, Leones, Жница), которые можно рекомендовать для биотехнологических исследований. Формообразовательные процессы в культуре незрелых зародышей *in vitro* взаимосвязаны различным образом. Установлена сильная положительная корреляция между уровнем эмбриоидо-гемморизогенеза и частотой регенерации растений, свидетельствующая о возможном существовании общей генетической системы, контролирующей эти события, и отрицательная – между частотами ризогенеза и регенерации растений. Сопряженность каллусогенеза и общей частоты морфогенеза отсутствует, что указывает на отсутствие связи между генетическими факторами, определяющими эти два признака. Выявлен доминирующий фактор – процесс образования эмбриоидов и побегов, определяющий уровень регенерации растений.

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.
- Вечернина Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2004. – 205 с.
- Вечернина Н. А., Тавркиладзе О.К. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2014. – 251 с.
- 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.
- Катасонова А.А., Круглова Н.Н. Зародыш пшеницы как компетентный эксплант для получения морфогенных каллусов *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2011. – № 2. – 27–31.

- 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., Таварткиладзе О.К., Дурникин Д.А. Новые особенности процесса клонального микроразмножения сорта картофеля селекции Западной Сибири // Biological Bulletin of Bogdan Chmelniński Melitopol State Pedagogical University. – 2016. – № 1. – С. 375–389.
- 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., Пронина Р.Д. Соматическая изменчивость *in vitro* как источник создания исходного материала для селекции мягкой пшеницы // Acta Biologica Sibirica. – 2015. – Т. 1. – № 3–4. – С. 171–186.
- 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
- Сельдиминова О.А., Катасонова А.А., Круглова Н.Н. Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллюсах различного происхождения у пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. – 2011. – Т. 43. – № 4. – С. 297–306.
- 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. – № 251. – P. 1455–1470. doi: 10.1007/s00709-014-0647-7.
- Eudes F., Acharya S., Laroche A., Selinger L.B., Cheng K.J. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2003. – Vol. 73. – P. 147–157.
- 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.
- Komatsuda T., Enomoto S., Nekajima K. Genetics of callus proliferation and shoot differentiation in barley // J. Hered. – 1989. – Vol. 80. – P. 345–350.
- Konieczny R., Czaplicki A.Z., Golczyk H., Przywara L. Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture // Plant Cell, Tissue, Organ Cult. – 2003. – Vol. 73. – № 2. – P. 177–187.
- Kuzevanov V.Ya., Nefed'ev L.V., Sumtsova V.M., Lankevich S.V., Salyaev R.K. Growth rhythmicity and chemical differentiation of cells in wheat seedlings and calluses // Abstract of VIIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam, June 24–29, 1990. – Amsterdam, 1990. – P. 300.
- Kuzevanov V.Ya., Sumtsova V.M., Sizych S.V., Lankevich S.V., Brook T.A., Salyaev R.K. Morphogenesis and growth rhythmicity in wheat callus // Golden Jubilee Symposium on Genetic Research and Education (Current Trends and the Next Fifty Years). New Delhi, February 12–15, 1991. – New Delhi, 1991. – Vol. 3. P. 856–857.
- 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.
- Linsmaier E., Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1965. – Vol. 18. – № 1. – P. 100–127.
- Maddock S.E., Lancaster V.A. et al. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*T. aestivum*) // J. Exp. Bot. – 1983. – Vol. 34. – № 144. – P. 915–926.
- 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.
- Magnusson J., Bornman C.H. Anatomical observation on somatic embryogenesis from scutellar tissue immature zygotic embryos of *Triticum aestivum* // Physiol. Plant. – 1985. – Vol. 63. – P. 137–145.

- Marcinska I., Filek M., Biesaga-Koscielniak J., Sagi F., Bartok T. Cytokinin activities in cells of wheat inflorescence in dependence of its developmental stage // *Cellular & Molecular Biology Letters*. – 2001. – Vol. 6. – P. 313–318.
- Miroshnichenko, D., Filippov M., Dolgov S. Effects of daminozide on somatic embryogenesis from immature and mature embryos of wheat // *Australian Journal of Crop Science*. – 2009. – № 3(2). – P. 83–94.
- Mokhtari A., Alizadeh H., Samadi B. Ya., Omidi M., Otroshy M., Moeini Z. Effect of plant growth regulators on direct shoot regeneration of wheat immature embryonic explants // *Journal of Agricultural Engineering and Biotechnology*. – 2013. – Vol. 1. – Iss. 3. – P. 74–80.
- Nasircilar A.G., Turgut K., Fiscin K. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of different wheat genotypes // *Pak. J. Bot.* – 2006. – № 38(2). – P. 637–645.
- Ozias-Akins P., Vasil I.K. Improved of somatic embryogenesis in *T. aestivum* (wheat) // *Protoplasma*. – 1983. – Vol. 117. – № 1. – P. 40–44.
- Ozias-Akins P., Vasil I.K. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* (wheat): Evidence for somatic embryogenesis // *Protoplasma*. – 1982. – Vol. 110. – № 2. – P. 95–105.
- Salyaev R.K., Dudareva L.V., Lankevich S.V., Sumtsova V.M. The effect of low-intensity coherent radiation on the processes of morphogenesis in the wheat callus culture // *Dokl. Akad. Nauk.* – 2001. – Vol. 376. – P. 830–832.
- Sarker K.K., Kabir A.H., Sharmin S.A., Nasrin Z., Alam M.F. Improved somatic embryogenesis using L-asparagine in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Sjemenarstvo*. – 2007. – Vol. 24. – № 3–4. – P. 187–196.
- Seldimirova O.A., Kruglova N.N. Properties of the initial stages of embryoidogenesis *in vitro* in wheat calli of various origin // *Biology Bulletin*. – 2013. – Vol. 40. – № 5. – P. 447–454. doi: 10.1134/S1062359013050154
- Skaptsov M., Kutsev M., Filipenko M., Khrapov E., Shinoyama H. Effect of modified heptamethyltrisiloxane on the efficiency of Agrobacterium-mediated transformation and expression of recombinant structure in plant cell and tissue culture // *Key engineering materials*. – 2016. – Vol. 683. – P. 506–510.
- 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.
- 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*. – 2015. – Vol. 14. – Iss. 1. – P. 11–19. doi: 10.1016/S2095-3119(14)60764-4.

REFERENCES

- Avksentyeva, O.A., Petrenko, V.A. (2009). Role of the genotype, composition of medium and type of explant in formation of the first callus of wheat isogenic lines. *Vesnik Harkovs'kogo nacional'nogo universiteta umeni V.N. Karazina. Seriya: biologiya*, 9(856), 56–62 (in Russian).
- 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). Evaluation of morphogenesis and regeneration of hard spring wheat *in vitro*. *Acta Biologica Sibirica*, 2(1), 139–149. doi: 10.14258/abs.v2i1-4.923 (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
- Ereschenko, O.V., Khlebova, L.P., Rozova, M.A. (2015). *Evaluation of durum wheat regeneration potential to create a drought-resistant selection material*. Proceed. Int. Conf. Biotehnologiya I obshestvo v XXI v. Barnaul: Altai State University (in Russian).

- Eudes, F., Acharya, S., Laroche, A., Selinger, L.B., Cheng, K.J. (2003). A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73, 147–157.
- Grigorieva, L.P., Shletser, I.A. (2006). Screening wheat cultivars for morphogenesis ability in immature embryo culture in vitro. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta*. 3, 64–66 (in Russian).
- 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.
- Katasonova, A.A., Kruglova, N.N. (2011). Wheat embryo as a competent explant for obtaining morphogenetical calluses in vitro. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo centra RAN*, 2, 27–31 (in Russian).
- Komatsuda, T., Enomoto, S., Nekajima, K. (1989). Genetics of callus proliferation and shoot differentiation in barley. *J. Hered.*, 80, 345–350.
- Konieczny, R., Czaplicki, A.Z., Golczyk, H., Przywara, L. (2003). Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture. *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.*, 73(2), 177–187.
- Kruglova, N.N., Katasonova, A.A. (2009). Immature wheat embryo as the morphogenetically competent explant. *Fiziologiya i biohimiya kul'turnyh rastenii*, 41(2), 124–131 (in Russian).
- Kuzevanov, V.Ya., Nefed'ev, L.V., Sumtsova, V.M., Lankevich, S.V., Salyaev, R.K. (1990). *Growth rhythmicity and chemical differentiation of cells in wheat seedlings and calluses*. Abstract of VIIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam.
- Kuzevanov, V.Ya., Sumtsova, V.M., Sizych, S.V., Lankevich, S.V., Brook, T.A., Salyaev, R.K. (1991). *Morphogenesis and growth rhythmicity in wheat callus*. Golden Jubilee Symposium on Genetic Research and Education (Current Trends and the Next Fifty Years). New Delhi, 3, 856–857.
- 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.
- Linsmaier, E., Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 18(1), 100–127.
- Maddock S.E., Lancaster V.A. et al. (1983). Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*T. aestivum*). *J. Exp. Bot.*, 34(144), 915–926.
- Maddock, S.E., Risjott, R., Parmar, S. (1985). Somaclonal variation in the gliadin patterns of grains of regenerated wheat plants. *J. Exp. Bot.*, 36(173), 1976–1984.
- Magnusson, J., Bornman, C.H. (1985). Anatomical observation on somatic embryogenesis from scutellar tissue immature zygotic embryos of *Triticum aestivum*. *Physiol. Plant*, 63, 137–145.
- Marcinska, I., Filek, M., Biesaga-Koscielniak, J., Sagi, F., Bartok, T. (2001). Cytokinin activities in cells of wheat inflorescence in dependence of its developmental stage. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 6, 313–318.
- Miakishcheva, E.P., Tavartkiladze, O.K., Durnikin, D.A. (2016). Clonal micropropagation of potato varieties by Western Siberia selection - the new features. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelniyskiy Melitopol State Pedagogical University*, 6(1), 375–389.
- 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.
- Mokhtari, A., Alizadeh, H., Samadi, B. Ya., Omidi, M., Otroshy, 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.
- Nasircilar, A.G., Turgut, K., Fiscin, K. (2006). Callus induction and plant regeneration from mature embryos of different wheat genotypes. *Pak. J. Bot.*, 38(2), 637–645.
- Nikitina, E.D., Khlebova, L.P., Ereschenko, O.V. (2014). The development of some technology elements of the spring wheat cell selection for resistance to abiotic stresses. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta*, 3–2(83), 50–54. doi: 10.14258/izvasu(2014)3.2-09 (in Russian).
- Nikitina, E.D., Khlebova, L.P., Pronina, R.D. (2015). In vitro somaclonal variation as initial material for bread wheat breeding. *Acta Biologica Sibirica*, 1(3–4), 171–186 (in Russian).
- Nikitina, E.D., Khlebova, L.P., Sokolova, G.G., Ereschenko, O.V. (2013). The development of stress-resistant stock of spring bread wheat by in vitro cell selection. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta*, 3–2(79), 95–98. doi: 10.14258/izvasu(2013)3.2-20 (in Russian).
- Ozias-Akins, P., Vasil, I.K. (1983). Improved of somatic embryogenesis in *T. aestivum* (wheat). *Protoplasma*, 117(1), 40–44.

- Ozias-Akins, P., Vasil, I.K. (1982). Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* (wheat): Evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*, 110(2), 95–105.
- Salyaev, R.K., Dudareva, L.V., Lankevich, S.V., Sumtsova, V.M. (2001). The effect of low-intensity coherent radiation on the processes of morphogenesis in the wheat callus culture. *Dokl. Akad. Nauk*, 376, 830–832.
- Sarker, K.K., Kabi, A.H., Sharmin, S.A., Nasrin, Z., Alam, M.F. (2007). Improved somatic embryogenesis using L-asparagine in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sjemenarstvo*, 24(3-4), 187–196.
- Seldimirova, O.A., Katasonova, A.A., Kruglova, N.N. (2011). Formation of morphogenetic centre as an initial stage of morphogenesis in vitro of wheat calli of different origin. *Fiziologiya i biohimiya kul'turnikh rastenii*, 43(4), 297–306 (in Russian).
- Seldimirova, O.A., Kruglova, N.N. (2013). Properties of the initial stages of embryoidogenesis in vitro in wheat calli of various origin. *Biology Bulletin*, 40(5), 447–454. doi: 10.1134/S1062359013050154
- Skaptsov, M., Kutsev, M., Filipenko, M., Khrapov, E., Shinoyama, H. (2016). Effect of modified heptamethyltrisiloxane on the efficiency of Agrobacterium-mediated transformation and expression of recombinant structure in plant cell and tissue culture. *Key engineering materials*, 683, 506–510.
- 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.
- Vechernina, N.A. (2004). *Biotechnology methods in plant breeding, propagation and gene pool preservation*. Barnaul: Altai State University (in Russian).
- Vechernina, N.A., Tavartkiladze, O.K. (2014). *Biotechnology methods in plant breeding, propagation and gene pool preservation*. Barnaul: Altai State University (in Russian).
- 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. (2015). Effects of inter-culture, arabinogalactan proteins, and hydrogen peroxide on the plant regeneration of wheat immature embryos. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(1), 11–19. doi: 10.1016/S2095-3119(14)60764-4.