

*Е.Д. Никитина, Л.П. Хлебцова*

**Влияние температуры и освещения  
на прямое прорастание незрелых зародышей  
*Triticum aestivum* L. в культуре *in vitro***

*E.D. Nikitina, L.P. Khlebova*

**The Influence of Temperature and Light  
on Direct Sprouting of *Triticum aestivum* L.  
Immature Embryos *in vitro***

В статье приведены результаты исследования связи прямого прорастания зародышей *T. aestivum* с уровнем температурного фактора и наличия/отсутствия освещения при их инкубации *in vitro*.

Для индукции каллуса использовали незрелые зародыши размером 1,2–1,5 мм семи сортов яровой мягкой пшеницы. В качестве субстрата выступала среда Линсмайер и Скуга (RM-64), содержащая 0,8% агара, 3,0% сахарозы, 2,0 мг/л 2,4-Д. Клеточные культуры выращивали в темноте. Влияние температуры культивирования эксплантов на прямое прорастание зародышей оценивали при разных уровнях термического фактора: 26, 29, 32, 32 (14 дней) → 26 °С. Часть материала параллельно инкубировали на свету при температуре 26 °С. Показано, что физические факторы (свет и температура) ингибируют прямое прорастание эксплантов на 67,3 и 86,0% соответственно. Повышение уровня термического фактора с 26 до 32 °С снижает частоту предварительного прорастания зародышей пшеницы в 7,1 раза. Лучшим вариантом является культивирование эксплантов в течение двух недель при температуре 32 °С с последующим понижением ее до 26 °С. Инкубация эксплантов на свету ведет к снижению значений признака в 3,1 раза. Определяющим фактором, супрессирующим частоту прорастания незрелых зародышей, является температура их культивирования. Ее вклад в общую фенотипическую изменчивость составляет 38,4%.

**Ключевые слова:** мягкая пшеница, эксплант, незрелый зародыш, прямое прорастание, каллус, морфогенез, регенерация, температура, освещение.

**DOI 10.14258/izvasu(2014)3.1-08**

Важным фактором успешного использования *in vitro* видов семейства *Gramineae* является природа экспланта, т.е. тип ткани, вводимой в культуру, дальнейшее развитие которой дает начало морфогенному каллусу, способному к регенерации растений. В частности, у пшеницы наилучшие результаты получены при культивировании 10–17-дневных не-

The article presents the results of examine the relationship of direct sprouting *Triticum aestivum* L. immature embryos *in vitro* and a temperature factor during their incubation in the dark and light. Immature embryos of 1,2–1,5 mm sizes from 7 spring bread wheat varieties have been used for callus induction. As a substrate Linsmayer-Skoog's media (RM-64) containing 0,8% agar, 3,0% sucrose, 2,0 mg/l 2,4-D have been applied. The cultures were incubated in the dark. The effect of the explant incubation temperature on the direct sprouting of embryos was evaluated at different levels of the thermal factor: 26, 29, 32, 32 (14 days) → 26 °С. The part of the material was incubated in parallel at the light at the temperature 26 °С.

It is shown that the physical factors such as light and temperature depress the explant direct sprouting on 67,3 and 86,0% respectively. The increase of the thermal factor from 26 to 32 °С reduces the rate of the wheat embryos pre-germination in 7.1 times. The best option is culturing explants for two weeks at 32 °С with the following decreasing temperature to 26 °С. The incubation of explants in the light leads to lower values of the feature in 3,1 times. A determining factor suppressing the sprouting rate of immature embryos is the incubation temperature. Its contribution to the total phenotypic variability is 38,4%.

**Key words:** bread wheat, explant, immature embryo, direct sprouting, callus, morphogenesis, regeneration, temperature, light.

зрелых зародышей [1–4]. Однако эффективность их использования резко снижается из-за прямого прорастания — процесса образования растений прежде, чем зародыши достигнут структурной и физиологической зрелости [5]. Это ведет к снижению частоты образования каллусных культур и их морфогенного потенциала.

Научные сведения, посвященные решению данной проблемы, весьма ограничены. Тем не менее в ряде работ предложены некоторые методические приемы, супрессирующие процесс прямого прорастания зародышей *in vitro* у злаков, которые сводятся, как правило, к оптимизации состава питательных сред. В частности, рекомендуют добавление к питательной среде гидролизата казеина [5]. Однако, ингибируя прорастание зародышей пшеницы, препарат одновременно сдерживает возможности каллусообразования из тканей щитка. Показано также, что абсцизовая кислота и ее аналоги существенно изменяют частоту прорастания зародышей на поздних стадиях развития (20–25 дней после опыления) [6]. Зародыши 10–14-дневного возраста показали негативную реакцию на присутствие данного компонента. Они резко снизили выход эмбриогенного каллуса с 78 до 20%. О влиянии концентрации фитогормона на этот процесс у ячменя свидетельствует работа К. Норстога и Р. Клейна [7], где установлено, что на среде, содержащей 2,4-Д ниже, чем 1М, более 90% зародышей прорастали. При увеличении концентрации гормона от 2 до 40 М частота прорастания снижалась с 72 до 3%. С этими данными согласуются результаты ряда ученых [8–10], свидетельствующие об увеличении значения признака при концентрации гормона ниже 2 мг/л. Однако следует учитывать, что слишком высокие концентрации ауксина (2,4-Д) снижают каллусообразование и приводят к некрозу тканевых культур [11]. В исследованиях Дж. Кармана с соавторами обнаружено кинетин-индуцирующее влияние на прорастание зародышей пшеницы [12]. Аналогичные данные получены Б. Ахловаля [13].

Исходя из анализа литературных сведений можно заключить, что применение предложенных экзогенных факторов химической природы не обеспечивает достаточно эффективную регенерацию растений при использовании незрелых зародышей. Это связано с тем, что они подавляют не только частоту прямого прорастания эксплантов, но и пролиферацию каллуса, а также его морфогенные способности, что ограничивает последующую регенерацию. В этой связи возникла необходимость поиска физических факторов, ингибирующих рассматриваемый негативный процесс.

В данной статье приведены результаты исследований по изучению связи прямого прорастания зародышей *T. aestivum* с уровнем температурного фактора и наличия/отсутствия освещения при их инкубации *in vitro*. Выбор градации температуры был основан на том, что оптимум значений для роста и развития пшеницы лежит в интервале 23–32 °С.

Для индукции каллуса использовали незрелые зародыши размером 1,2–1,5 мм семи сортов яровой мягкой пшеницы: Ботаническая 2, Тулунская 10, Вега, Скала, Спектр, Целинная 20 и Барнаульская 83 по 50 штук на генотип (пять повторностей). Всего

было пассировано 1750 эксплантов. Работу проводили в асептических условиях в ламинар-боксах. В качестве субстрата использовали среду Линсмайер и Скуга (RM-64) [14], содержащую 0,8% агара, 3,0% сахарозы, 2,0 мг/л 2,4-дихлофеноксисукусной кислоты (2,4-Д). Клеточные культуры выращивали в темноте. Влияние температуры культивирования эксплантов на прямое прорастание зародышей оценивали при разных уровнях термического фактора: 26, 29, 32, 32 (14 дней) → 26 °С. Часть материала параллельно инкубировали на свету при температуре 26 °С.

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2007.

На клеточном уровне дедифференциация способствует снятию специализации, т.е. утрате приобретенных различий и переходу к меристематическому состоянию. В то же время исходная генетическая информация сохраняется, но для ее реализации требуются специфические условия [15]. К таким факторам, способным влиять на экспрессию генетической информации, относят свет и температуру. Эти факторы обладают индуктивным эффектом [16], приводят в действие пусковой механизм, который включает процессы, происходящие за счет внутренних источников энергии.

Полученные нами результаты свидетельствуют, что с ростом температуры наблюдалась тенденция снижения частоты прямого прорастания незрелых зародышей (рис. 1). В среднем по всем сортам данный показатель менялся от 26,9 (26 °С) до 3,0% (32 → 26 °С). Максимальное значение признака получено у сорта Ботаническая 2 при температуре инкубации эксплантов 26 °С и составило 50%, т.е. каждый второй зародыш прорастает уже на начальных этапах культивирования и резко понижает эффективность использования метода. Близкие результаты получены у сорта Скала — 44,8%. Наименьшее значение признака отмечено у сорта Барнаульская 83 — 12%.

Повышение температуры на 3 °С (29 °С) снижало прямое прорастание зародышей в среднем по всем образцам до 11%, т.е. в 2,4 раза. Однако у двух сортов наблюдалось увеличение изучаемого показателя. Так, у Тулунской 10 доля проросших зародышей выросла с 17,1 (26 °С) до 33,9% (29 °С), у Барнаульской 83 изменение оказалось менее значительным (на 2,7%).

Дальнейшее повышение температурного фактора до 32 °С привело к резкому снижению значения признака, которое составило 1,4–7,8%, а у двух сортов этот показатель был равен 0 (Спектр и Барнаульская 83).

Лучшим вариантом явилось культивирование эксплантов в течение двух недель при температуре 32 °С с последующим понижением ее до 26 °С. Частота прорастания зародышей у всех сортов (за исключением сорта Ботаническая 2) достигла минимума, составив в среднем 3,7%.

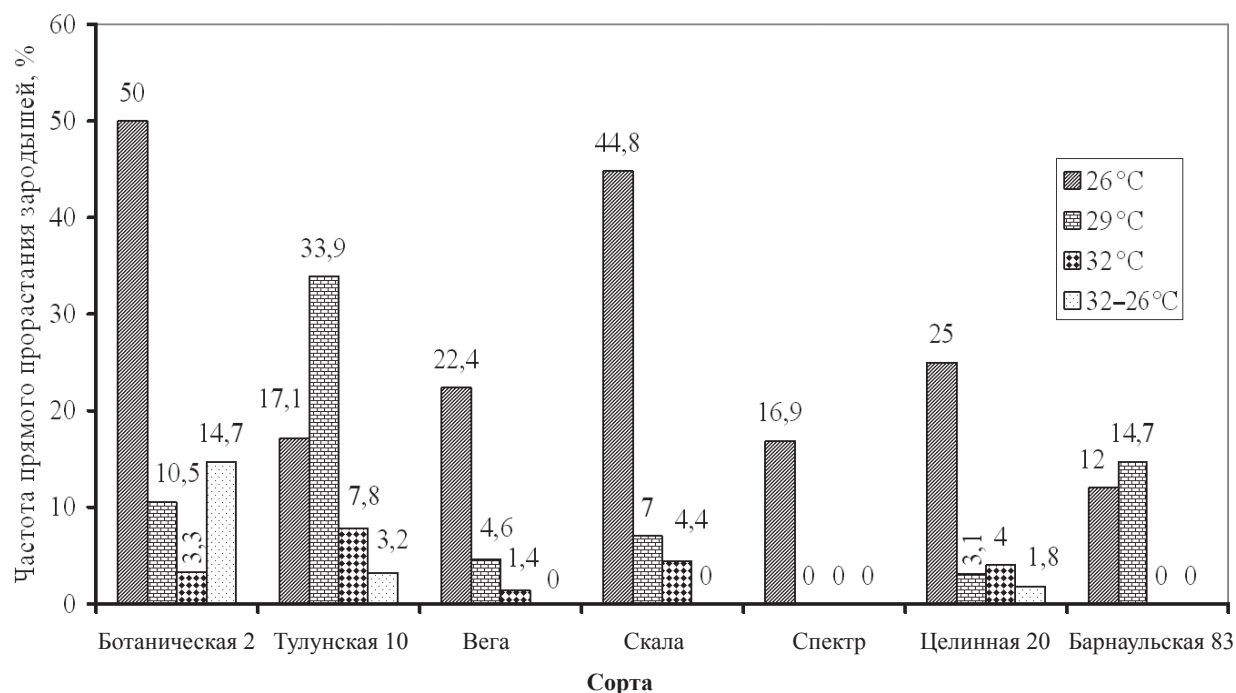


Рис. 1. Частота прямого прорастания *in vitro* незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы при различных уровнях температурного фактора

Достоверность указанных различий статистически подтверждена результатами двухфакторного дисперсионного анализа (табл. 1).

Таблица 1

Влияние генотипов и температуры культивирования на прямое прорастание *in vitro* незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы

Источник вариации	$F_{\phi}$	Доля влияния фактора, %
Генотипы	8,4*	13,1
Температура	49,5*	38,4
Взаимодействие генотип × температура	4,2*	19,6
Случайное		28,9

\* — достоверно при уровне  $P = 0,01$ .

Высокочисленным оказалось влияние разнообразия обоих факторов, а также их взаимодействия. При этом по доле вклада изученных источников вариации в наблюдаемую изменчивость следует выделить действие температурных условий — 38,4%. Взаимодействие рассматриваемых факторов составило 19,6% от общей изменчивости признака, что свидетельствует о некоторой специфичности реакции конкретного генотипа на изменение темпера-

туры. В частности, сорт Ботаническая 2 реагировал повышением показателя до 14,7% в последнем варианте, а Тулунская 10 и Барнаульская 83 — во втором варианте (рис. 1).

Результаты сравнительного изучения двух режимов культивирования незрелых зародышей (освещенность/темнота) показали, что при инкубации на свету у всех сортов происходило существенное (в 3,1 раза) снижение доли проросших зародышей — в среднем с 26,9 до 8,8% (рис. 2). Наилучшие результаты получены у сортов Ботаническая 2 и Барнаульская 83 — снижение частоты прорастания у них составило 8,5 и 5,2 раза соответственно. Менее выраженная и сходная реакция на свет отмечена у сортов Спектр, Тулунская 10 и Вега — значения признака у них уменьшились в 1,9; 2,1 и 2,2 раза соответственно.

Изменчивость признака в данном эксперименте была обусловлена разнообразием генотипов, наличием/отсутствием освещения, их взаимодействием и случайными факторами (табл. 2).

Генотипическая специфичность исходного материала и генотип-средовое взаимодействие явились определяющими факторами, ингибирующими прямое прорастание зародышей. По доле влияния на изменчивость признака они примерно равноценны (29,3 и 26,9% соответственно). Вклад наличия/отсутствия освещения составил 5,5% всей вариальности результатов.

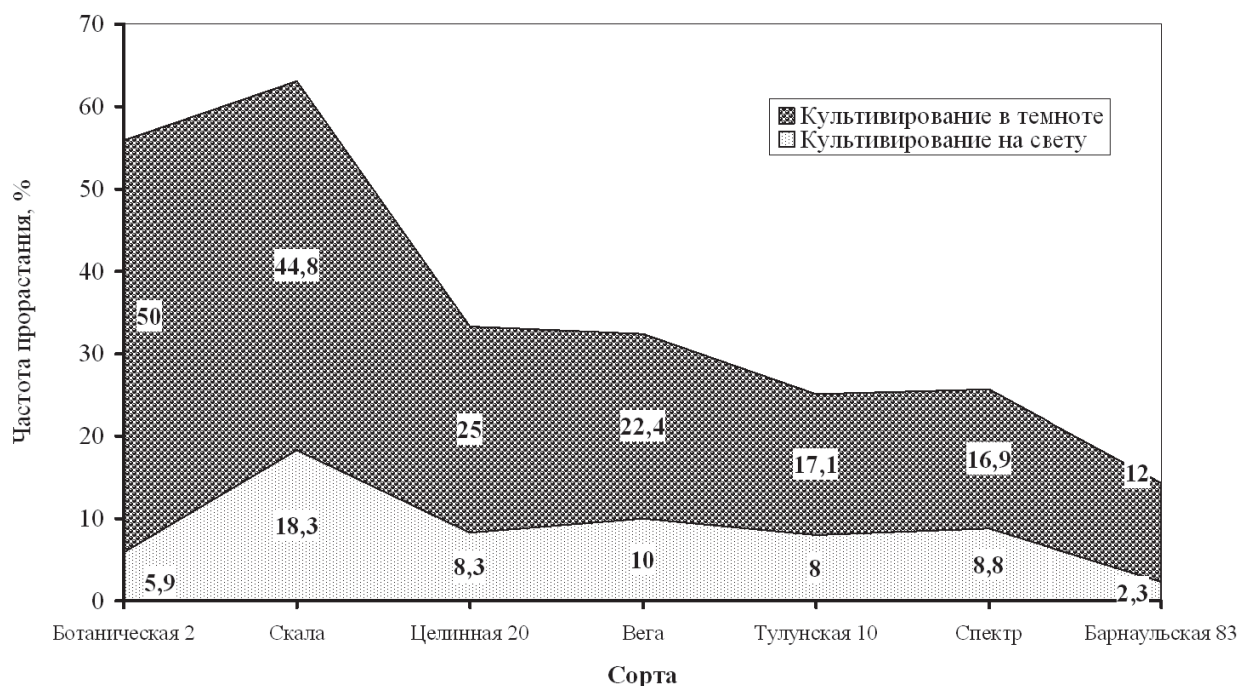


Рис. 2. Частота прямого прорастания *in vitro* незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы при культивировании в темноте и на свету

Таблица 2  
Влияние генотипов и освещения на прямое прорастание *in vitro* незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы

Источник вариации	$F_{\phi}$	Доля влияния фактора, %
Генотипы	7,2*	29,3
Наличие/отсутствие освещения	8,1*	5,5
Взаимодействие генотип x освещение	6,6*	26,9
Случайное		38,3

\* — достоверно при уровне  $P = 0,01$ .

Таким образом, выполненные исследования показали, что физические факторы (свет и температура) ингибируют прямое прорастание эксплантов на 67,3 и 86,0% соответственно и тем самым повышают эффективность технологии получения регенерантов в культуре незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы. Повышение уровня термического фактора с 26 до 32 °С снижает частоту предварительного прорастания зародышей пшеницы в 7,1 раза. Лучшим вариантом является культивирование эксплантов в течение двух недель при температуре 32 °С с последующим понижением ее до 26 °С. Инкубация эксплантов на свету ведет к снижению значений признака в 3,1 раза. Определяющим фактором, супрессирующим частоту прорастания незрелых зародышей, является температура их культивирования. Ее вклад в общую фенотипическую изменчивость составляет 38,4%.

### Библиографический список

1. Гапоненко А.К., Мунтян М.А. Регенерация растений различных генотипов пшеницы *Triticum aestivum* L. *in vitro* // Доклады АН СССР. — 1984. — Т. 278, №5.
2. Хамула П.В., Солодовниченко В.Д., Базько Л.В. Влияние генотипа и размера зародыша мягкой пшеницы на частоту каллусообразования // Селекционно-генетические аспекты повышения продуктивности зерновых культур. — Мироновка, 1987.
3. Никитина Е.Д. Роль генотипа в реализации морфогенетических процессов в культуре незрелых зародышей у *Triticum aestivum* L. // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. — 2004. — №2 (152).
4. Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетический компетентный эксплант // Физиология и биохимия растений. — 2009. — Т. 41, №2.

5. Ozias-Akins P., Vasil I.K. Plant Regeneration from Cultured Immature Embryos and Inflorescences of *Triticum aestivum* (Wheat): Evidence for Somatic Embryogenesis // *Protoplasma*. — 1982. — V. 110, №2.
6. Qureshi J.A., Kartha K.K. Modulation of Somatic Embryogenesis in Early and Late Stage Embryos of Wheat (*Triticum aestivum*) under the Influence of (+) — Abscisic Acid and its Analogs // *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* — 1989. — V. 18, №1.
7. Norstog K., Klein R. Development of Cultured Barley Embryos // *Can. J. Bot.* — 1972. — V. 50.
8. Chawla H.S., Wenzel G. Regeneration Potential of Callus from Wheat and Barley // *Arch. Zuchtungforsch.* — 1987. — V. 17, №6.
9. Przetakiewicz A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. The Effect of Auxin on Plant Regeneration of Wheat, Barley and Triticale // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. — 2003. — V. 73, №3.
10. 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 Cult.* — 2004. — V. 77, №3.
11. Карасонова А.А, Круглова Н.Н. Зародыш пшеницы как компетентный эксплант для получения морфогенных каллусов *in vitro* // *Известия Уфимского научного центра РАН.* — 2011. — №2.
12. Carman J.G., Jefferson N.E., Campbell W.F. Induction of Embryogenic *Triticum aestivum* L. Calli // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* — 1988. — V. 12, №1.
13. Ahloowalia B.S. Plant Regeneration from Callus Culture in Wheat // *Crop Science.* — 1982. — V. 22.
14. Linsmaier E., Skoog F. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Culture // *Physiol. Plant.* — 1965. — V. 18, №1.
15. Круглова Н.Н. Периодизация эмбриогенеза пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // *Известия Уфимского научного центра РАН.* — 2012. — №2.
16. Либберт Э. Физиология растений. — М., 1976.