УДК 631+633.11:581.143.6

Роговых И.А.

магистрант 2 курса

кафедра химической и биохимической инженерии

Институт геологии и нефтегазового дела им. К. Турысова

Казахский национальный исследовательский технический университет

им. К.И. Сатпаева

(г. Алматы, Казахстан)

Научный руководитель:

Анапияев Б.Б.

доктор биологических наук, профессор

Казахский национальный исследовательский технический университет

им. К.И. Сатпаева

(г. Алматы, Казахстан)

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА ИНДУКЦИЮ КАЛЛУСОГЕНЕЗА ИЗ СОМАТИЧЕСКИХ ЭКСПЛАНТОВ ПШЕНИЦЫ IN VITRO

Аннотация: *изучено каллусообразование из корневых и листовых частей пророщенных семян двух генотипов мягкой озимой пшеницы П-1 и П-2. Сравнивали два варианта культивирования: среду Мурасиге-Скуга с 2 мг/л 6-бензиламинопурина и среду Гамборга B5 с 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. На варианте B5-2,4-Д частота каллусогенеза составила 54,5%, на варианте МС-БАП - 30,0%. Среди образцов с установленной генотипической принадлежностью показатель для П-1 достигал 64,0%, для П-2 - 25,0%. Результаты показывают зависимость каллусогенеза от совокупности состава базовой среды, гормонального фона и генотипа.*

Ключевые слова: *мягкая озимая пшеница, каллусогенез, соматический эксплант, 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, 6-бензиламинопурин, культура ин витро, генотип, среда Мурасиге-Скуга, среда Гамборга B5.*

Введение.

Культура растительных тканей in vitro применяется для изучения морфогенеза, получения каллусных линий и разработки регенерационных систем, необходимых в клеточной селекции и генетической трансформации. Для пшеницы эффективность таких систем определяется как физиологическим состоянием экспланта, так и составом питательной среды и генотипом исходного растения. Среды Мурасиге-Скуга и Гамборга B5 стали базовыми моделями минерального питания растительных культур [5, с. 151–158, 6, с. 473–497].

Регуляторы роста направляют дедифференцировку и дальнейшее развитие клеток. Синтетический ауксин 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) широко используется при индукции каллуса у злаков, тогда как цитокинин 6-бензиламинопурин (БАП) чаще связывают с дифференцировкой и регенерацией побегов. Морфогенетическая реакция зависит не только от концентрации регуляторов, но и от типа экспланта, длительности культивирования и гормонального баланса [2, с. 61–65, 3, с. 273–288].

Для пшеницы характерна выраженная генотипическая зависимость ответа на культуру тканей. Даже при одинаковых условиях разные генотипы могут различаться по частоте образования каллуса и способности к последующей регенерации [4, с. 1455–1470, 8, с. 177–183]. Поэтому сравнительная оценка местного материала представляет практический интерес при разработке воспроизводимых протоколов.

Цель исследования — оценить каллусообразование из соматических эксплантов двух генотипов мягкой озимой пшеницы при культивировании на средах, различающихся базовым составом и внесённым регулятором роста.

Материалы и методы.

Объектом исследования служили два генотипа мягкой озимой пшеницы (Triticum aestivum L.), обозначенные П-1 и П-2. Семена очищали, последовательно обрабатывали 0,5%-ным раствором хлоргексидина и 70%-ным этиловым спиртом, после чего промывали дистиллированной водой.

Стерилизованные семена проращивали в чашках Петри на увлажнённой фильтровальной бумаге в темноте при комнатной температуре в течение 4–10 суток. Внешний вид пророщенных семян и маркированного исходного материала представлен на рис. 1.

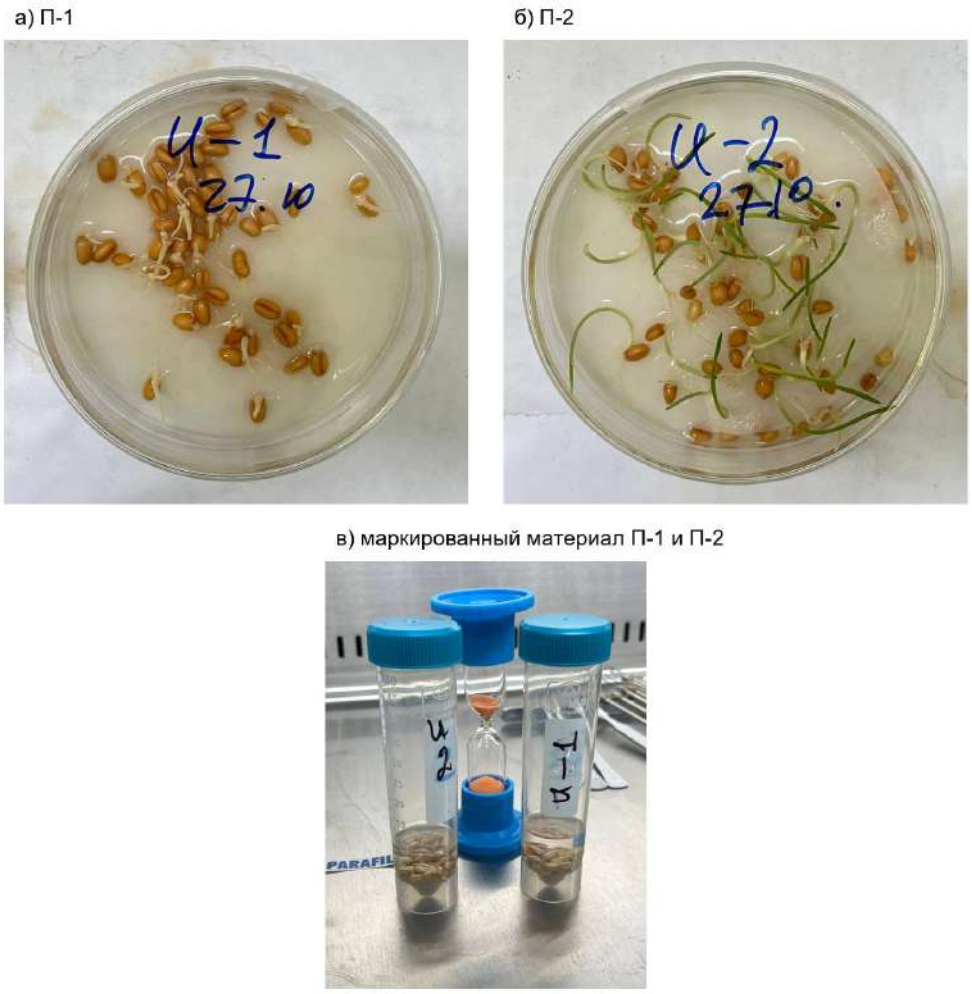


Рисунок 1. Пророщенные семена генотипов П-1 и П-2 и маркированный исходный материал.

В качестве соматических эксплантов использовали корневые и листовые части пророщенных семян. Работу проводили с соблюдением асептики, инструменты обрабатывали спиртом и фламбировали. Экспланты переносили в пробирки с одним из двух вариантов питательной среды. Первый вариант представлял собой среду Мурасиге-Скуга с 2 мг/л БАП (МС-БАП), второй —

среду Гамборга B5 с 2 мг/л 2,4-Д (B5-2,4-Д). В обе среды вносили сахарозу, мио-инозит и агар согласно лабораторной рецептуре.

Культуры содержали в темноте при комнатной температуре. На 4-е и 10-е сутки оценивали контаминацию и появление признаков каллусообразования, на 14-е сутки фиксировали число эксплантов с каллусом. Частоту каллусогенеза рассчитывали как отношение числа эксплантов, образовавших каллус, к общему числу высаженных эксплантов, выраженное в процентах. Из-за отсутствия данных о повторностях результаты анализировали описательно, без проверки статистической значимости.

Результаты и обсуждение.

На обоих вариантах среды наблюдалось образование каллусной ткани, однако частота ответа различалась. На среде МС-БАП каллус сформировался у 12 из 40 эксплантов, что соответствовало 30,0%. На среде B5-2,4-Д каллус образовали 12 из 22 эксплантов, или 54,5% (табл. 1). Таким образом, зарегистрированная частота каллусогенеза на варианте B5-2,4-Д была выше на 24,5 процентного пункта и примерно в 1,8 раза относительно МС-БАП.

Таблица 1. Каллусообразование на вариантах питательных сред.

Вариант среды	Высажено эксплантов	Образовалось каллусов	Каллусогенез, %
МС + 2 мг/л БАП	40	12	30,0
B5 + 2 мг/л 2,4-Д	22	12	54,5
Всего	62	24	38,7

Полученное различие согласуется с каллусогенной активностью 2,4-Д, применяемого для индукции деления и дедифференцировки клеток пшеницы [1, с. 98–108, 4, с. 1455–1470, 7, с. 97–108]. Вместе с тем в опыте одновременно различались регулятор роста и базовый состав среды. Поэтому результаты характеризуют два комплексных варианта культивирования и не позволяют

отделить собственный эффект 2,4-Д или БАП от влияния минеральной основы B5 и MC.

При анализе образцов с установленной генотипической принадлежностью П-1 показал 64,0% каллусогенеза: каллус сформировался у 16 из 25 эксплантов. Для П-2 показатель составил 25,0% — 8 каллусов из 32 эксплантов. Разница достигала 39 процентных пунктов, а отношение частот составляло 2,56. Пять эксплантов, включённых в сравнение питательных сред, не имели сохранённой генотипической маркировки и не образовали каллус, их исключили из сопоставления П-1 и П-2, но учли в общей выборке (табл. 2).

Таблица 2. Каллусообразование у генотипов пшеницы.

Генотип	**Высажено эксплантов**	**Образовалось каллусов**	**Каллусогенез, %**
П-1	25	16	64,0
П-2	32	8	25,0
Без генотипической маркировки	5	0	0
Всего	62	24	38,7

Выраженные численные различия между П-1 и П-2 подтверждают необходимость генотип-специфической настройки протоколов, описанную для культуры тканей пшеницы [4, с. 1455–1470, 7, с. 97–108, 8, с. 177–183]. Однако отсутствие исходной таблицы распределения эксплантов по четырём сочетаниям «генотип × среда» не позволяет проверить взаимодействие этих факторов. Поэтому влияние генотипа и влияние варианта среды представлены как два отдельных описательных сравнения.

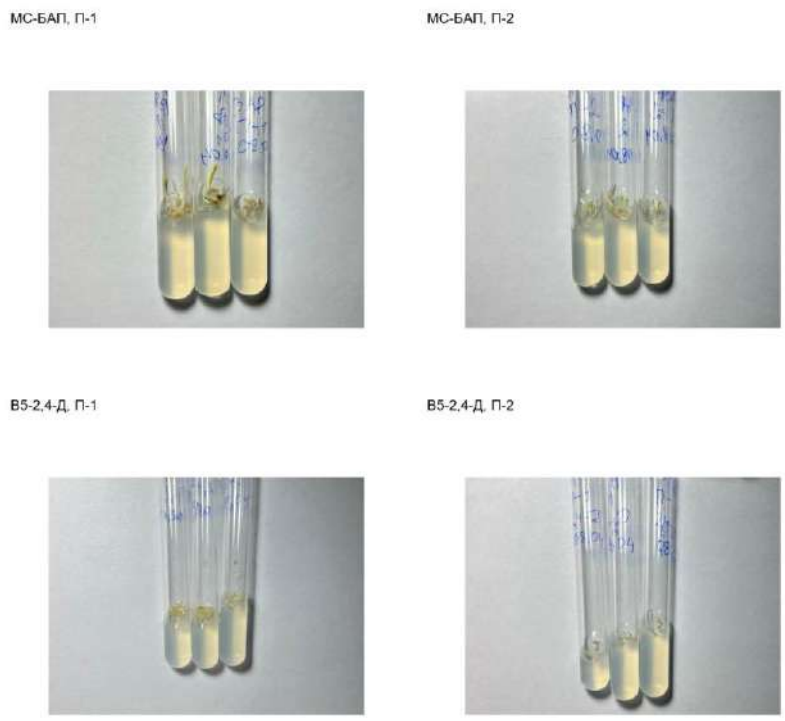


Рисунок 2. Культуры эксплантов генотипов П-1 и П-2 на средах МС-БАП и В5-2,4-Д.

Морфологические наблюдения подтверждали появление каллусной ткани у обоих генотипов и на обоих вариантах среды (рис. 2). Обозначения И-1 и И-2 в исходной фотодокументации соответствуют генотипам П-1 и П-2. Поскольку регенерацию побегов в данном опыте количественно не оценивали, вывод о преимуществе МС-БАП для регенерации не включали в результаты исследования.

Заключение.

В культуре корневых и листовых частей пророщенных семян мягкой озимой пшеницы наибольшая частота каллусогенеза зарегистрирована на комплексном варианте В5 с 2 мг/л 2,4-Д — 54,5%, тогда как на МС с 2 мг/л БАП она составила 30,0%. Среди эксплантов с установленной генотипической принадлежностью П-1 характеризовался более высокой частотой каллусообразования (64,0%) по сравнению с П-2 (25,0%). Полученные данные

указывают на совместное влияние условий минерального и гормонального питания и генотипа. Для последующего факторного анализа необходимо сохранять индивидуальную маркировку каждого экспланта по сочетанию генотипа и среды и предусмотреть биологические повторности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Круглова Н.Н. Продолжительность культивирования in vitro зародышевых каллусов пшеницы влияет на проявление их морфогенетического и регенерационного потенциала // Экобиотех. 2022. Т. 5, № 3. С. 98–108. https://doi.org/10.31163/2618-964X-2022-5-3-98-108
2. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Потенциально морфогенный каллус пшеницы в культуре in vitro // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 2. С. 61–65. https://doi.org/10.31040/2222-8349-2018-0-2-61-65
3. Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Каллусогенез как путь морфогенеза in vitro у злаков // Онтогенез. 2018. Т. 49, № 5. С. 273–288. https://doi.org/10.1134/S0475145018050038
4. Delporte F., Pretova A., Du Jardin P., Watillon B. Morpho-histology and genotype dependence of in vitro morphogenesis in mature embryo cultures of wheat // Protoplasma. 2014. Vol. 251, No. 6. P. 1455–1470. https://doi.org/10.1007/s00709-014-0647-7
5. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Experimental Cell Research. 1968. Vol. 50, No. 1. P. 151–158. https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. 1962. Vol. 15, No. 3. P. 473–497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
7. Murin R., Meszaros K., Nemecek P., Kuna R., Farago J. Regeneration of immature and mature embryos from diverse sets of wheat genotypes using media containing different auxins // Acta Agronomica Hungarica. 2012. Vol. 60, No. 2. P. 97–108. https://doi.org/10.1556/AAgr.60.2012.2.2
8. Parmar S.S., Sainger M., Chaudhary D., Jaiwal P.K. Plant regeneration from mature embryo of commercial Indian bread wheat (Triticum aestivum L.) cultivars // Physiology and Molecular Biology of Plants. 2012. Vol. 18, No. 2. P. 177–183. https://doi.org/10.1007/s12298-012-0101-2

Rogovykh I.A.
master's degree student of 2nd year
Department of Chemical and Biochemical Engineering
Institute of Geology and Oil Gas Engineering named after K. Turysov
Satbayev University
(Almaty, Kazakhstan)

Scientific advisor:
Anapiyaev B.B.
PhD in Biological Sciences, Professor
Satbayev University
(Almaty, Kazakhstan)

INFLUENCE OF GROWTH REGULATORS ON CALLUSOGENESIS INDUCTION FROM SOMATIC EXPLANTS OF WHEAT IN VITRO

Abstract: *callus formation from root and leaf parts of germinated seeds of two genotypes of soft winter wheat P-1 and P-2 was studied. Two cultivation variants were compared: Murashige-Skoog medium supplemented with 2 mg/L 6-benzylaminopurine and Gamborg B5 medium supplemented with 2 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. In the B5-2,4-D variant, callusogenesis frequency was 54.5%, while in the MS-BAP variant it was 30.0%. Among samples with established genotypic identity, the value for P-1 reached 64.0%, while for P-2 it was 25.0%. The results show that callusogenesis depends on the combination of basal medium composition, hormonal background, and genotype.*

Keywords: *soft winter wheat, callusogenesis, somatic explant, 2 factor, 4-dichlorophenoxyacetic acid, 6-benzylaminopurine, in vitro culture, genotype, Murashige-Skoog medium, Gamborg B5 medium.*