

УДК 633.111.57.083

## ТОЛЕРАНТНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ К ВОЗДЕЙСТВИЮ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

© 2007 г. С. И. Гаргаун, С. А. Игнатова

*Южный биотехнологический центр в растениеводстве*

*Украинской академии аграрных наук и Министерства образования и науки Украины  
(Одесса, Украина)*

Исследовали прорастание семян, изолированных зрелых и незрелых зародышей трех сортов мягкой озимой пшеницы, отличающихся по уровню засухоустойчивости, в условиях *in vitro* при экзогенном воздействии полиэтиленгликоля (ПЭГ). Толерантность использованных эксплантов к указанному селективному агенту находилась в соответствии с полевой оценкой засухоустойчивости сортов. Наиболее устойчивым к действию данного стресс-фактора оказался сорт Фантазия, а сорта Куяльник и Виктория имели приблизительно одинаковую чувствительность к ПЭГ, что совпадает с полевой характеристикой сортов. Установлено, что признак прорастания в данных условиях *in vitro* является сортоспецифичным.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum L.*, семена, изолированные зародыши, толерантность, осмотический стресс

Лимитирующим фактором формирования высокого урожая зерна озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum L.*) на юге Украины и в Приазовской степи являются засушливые периоды, часто наблюдающиеся в этих регионах и оказывающие отрицательное влияние на растения во время роста и созревания. Исследования ряда авторов [3, 8] показывают, что наиболее часто на юге Украины засухи повторяются в период посев – всходы, поэтому изучение механизмов засухоустойчивости растений озимой пшеницы на ранних этапах онтогенеза имеет важное теоретическое и практическое значение [14, 15].

Засуха, вызывая водный стресс у растений, приводит к прямым или косвенным нарушениям метаболизма, накоплению различных токсических соединений и недостатку питательных веществ [4, 10]. Исходя из определения свойства адаптации растений как генетически детерминированного процесса формирования систем устойчивости организма, проявляющихся на различных структурных уровнях,

его совершенствование возможно и в условиях *in vitro* [5, 11].

Биотехнологические методы играют значительную роль в селекционном процессе. Они позволяют с высокой эффективностью создавать разнообразный исходный материал и получать устойчивые генотипы [2, 6], дают возможность воздействовать непосредственно на генетический аппарат растений, что сокращает объемы и продолжительность селекционных схем [1]. Технологии *in vitro* повышают эффективность селекции путем расширения генетического базиса, ускоренного создания и отбора новых исходных форм с полезными необходимыми признаками.

В связи с этим разработка условий для построения эффективных систем *in vitro*, направленных на отбор толерантных к засухе форм зерновых культур для использования их в селекции, является одним из перспективных и важных направлений биотехнологии растений. Для создания результативных биотехнологических систем необходим подбор селективного фактора, условий культивирования эксплантов, изучение последовательности и воспроизводимости результатов на этапах отбора для полу-

---

Адрес для корреспонденции: Игнатова Светлана Александровна, Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН и МОН, Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина

чения форм с максимальным проявлением искомого признака.

Целью данной работы являлось исследование характера прорастания семян, изолированных зрелых и незрелых зародышей и их роста при экзогенном воздействии стресс-факторов, имитирующих засуху в условиях *in vitro*.

## МЕТОДИКА

Объектом исследований служили семена сортов озимой мягкой пшеницы селекции СГИ – Куяльник, Виктория и Фантазия, расставленные в порядке увеличения уровня их засухоустойчивости [13]. В качестве фактора, имитирующего стресс при засухе, был использован полиэтиленгликоль (ПЭГ) [10] с молекулярной массой 1500 и 6000. Семена стерилизовали по принятой методике [9], затем проращивали в чашках Петри, содержащих водные растворы ПЭГ 1500 и 6000 в концентрациях 5, 10, 15 и 20 %. Контрольный вариант содержал дистиллированную воду. Все варианты этой серии выдерживали трое суток в темноте в термостате при температуре 24-25°C, после чего подсчитывали количество проросших семян. Затем чашки с проросшими семенами переносили для выращивания в условия 16-часового фотопериода с освещённостью 2,5 кЛк и температурой 22-24°C. На 10-е сутки проводили подсчёт сформировавшихся проростков. Показатели прорастания в опытных вариантах выражали в процентах к контролю.

Для работы со зрелыми зародышами вышеуказанных сортов, семена после стерилизации оставляли на ночь в холодильнике при температуре 7-8°C, утром из них выделяли зародыши. Зрелые зародыши для исследования уровня прорастания помещали на варианты питательной среды МС [15] без гормонов с добавлением ПЭГ в концентрациях 15 % и 20 % (относительно объёма питательной среды). Контролем являлась среда МС без гормонов. На третьи и 10-е сутки проводили учёт тех же показателей.

Для проведения экспериментов на незрелых зародышах колосья срезали на 14-16 день после опыления, образованные семена стерилизовали [9], зародыши выделяли и высаживали в стерильных условиях на опытные варианты, содержавшие среду МС с добавленными в неё селективными агентами ПЭГ 1500 и 6000 в минимальных концентрациях 5 и 10 %. При выборе таких концентраций учитывали повышенную физиологическую уязвимость зародышей. Контрольные варианты содержали среду МС. Проростки культивировали в термостате в условиях, указанных выше. На третьи и 10-е сут подсчитывали те же показатели, что и в предыдущих сериях опытов.

Оценку достоверности полученных данных проводили по критерию Стьюдента [7]. На рисунках приведены средние значения и их стандартные отклонения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Самое низкое прорастание в контроле было у сорта Куяльник. Показатели прорастания семян на растворах использованных концентраций ПЭГ 1500 показали чёткую дифференциацию изучаемых сортов по толерантности (рис. 1, а), что согласуется с представленной в каталоге [13] характеристикой данных сортов по засухоустойчивости. Во всех опытах с этим типом ПЭГ сорт Фантазия явно превосходил остальные сорта. В вариантах с ПЭГ 6000 прорастание семян при воздействии этого фактора проходило плавно и развивалось без резких скачков (рис. 1, б). Следует отметить, что в варианте с ПЭГ 6000, по сравнению с ПЭГ 1500, жизнеспособность растений сорта Фантазия была выше, чем у других сортов, и составляла 72,27 % от контроля.

При изучении влияния использованных в работе стресс-факторов на количество сформированных из семян 10-дневных проростков было выявлено, что в условиях воздействия ПЭГ 1500 и ПЭГ 6000 семена сорта Фантазия про-

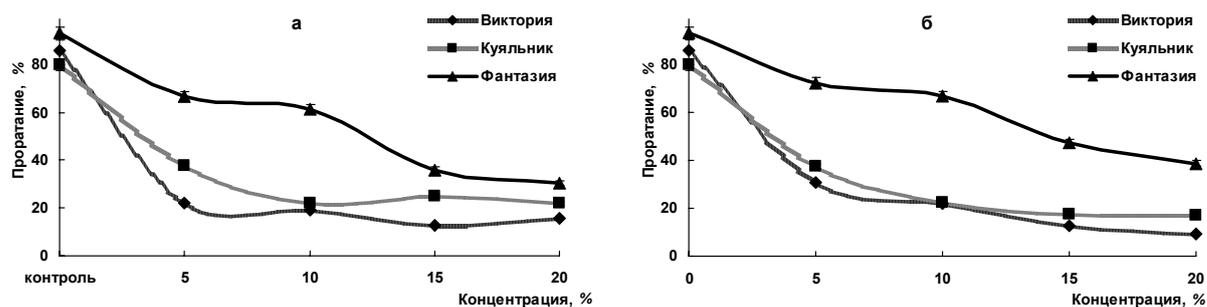


Рис. 1. Прорастание семян озимой пшеницы на третьи сутки: а – ПЭГ 1500, б – ПЭГ 6000

## ТОЛЕРАНТНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ

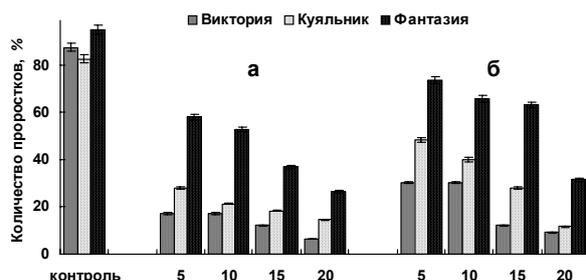


Рис. 2. Количество сформированных из семян проростков на 10-е сутки: а – ПЭГ 1500, б – ПЭГ 6000

явили при прорастании более высокую жизнеспособность и сформировали большее количество проростков по сравнению с другими образцами (рис. 2).

В следующей серии опытов работа проводилась на изолированных зрелых зародышах, которые играют особую генетическую роль, так как в них заключена программа развертывания наследственной информации. Для культивирования использовали полноценную питательную среду, содержащую экстремальный фактор – ПЭГ. В результате было выявлено, что в вариантах с ПЭГ 1500 в обеих концентрациях (15 и 20 %) показатели прорастания сорта Фантазия были выше, чем у сорта Виктория – на 7 % и у сорта Куяльник – на 5-22 % (рис. 3). По числу проростков Фантазия также значительно превоз-

сходила другие сорта. Еще большая дифференциация сортов проявилась в вариантах с ПЭГ 6000, когда прорастание сорта Фантазия было на 15 % выше чем сорта Виктория и на 9-25 % выше чем сорта Куяльник. В этом эксперименте сорт Виктория проявил меньшую чувствительность к воздействию ПЭГ, чем Куяльник.

В экспериментах по прорастанию незрелых зародышей на третьи сутки (рис. 4) при воздействии ПЭГ 1500 было выявлено, что на 5 % концентрации самые высокие показатели прорастания были у зародышей устойчивого сорта Фантазия. У зародышей сорта Куяльник эти показатели были в 1,85 а у сорта Виктория – ниже в 4,11 раза ниже по сравнению с Фантазией. На 10 % концентрации этого селективного фактора прорастание зародышей сортов Куяльник и Виктория было соответственно в 1,44 и 3,40 раза ниже, чем у зародышей сорта Фантазия.

На средах с добавлением ПЭГ 6000 в этих же концентрациях наиболее высокие значения показателя прорастания незрелых зародышей выявлены у сорта Фантазия. Однако в целом, на 10 % концентрации ПЭГ 6000 по сравнению с 5 % значения изучаемых показателей понизились у всех сортов. Тем не менее, сорт Фантазия показал наиболее высокую толерантность к воздействию ПЭГ 1500 и 6000 при использовании всех концентраций данных осмотиков.

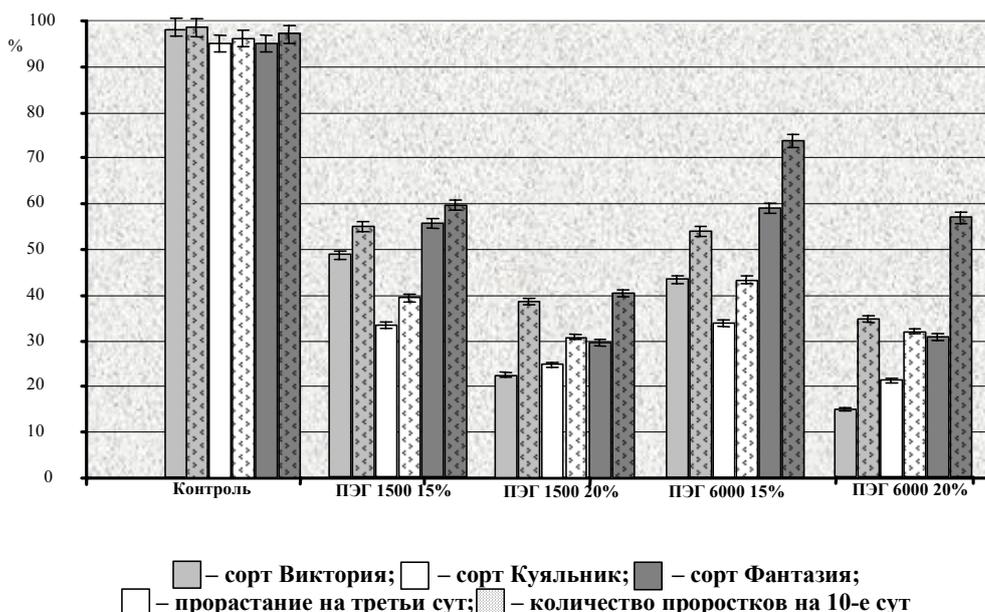


Рис. 3. Прорастание изолированных зрелых зародышей на 3-и сут и количество сформированных проростков на 10-е сут.

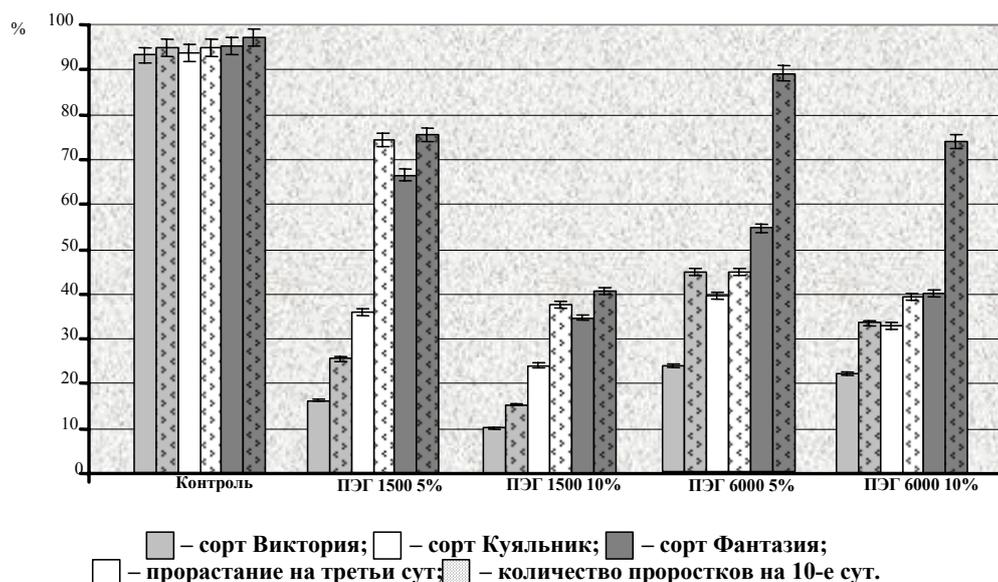


Рис. 4. Проращение незрелых зародышей на 3-и сут и количество сформированных проростков на 10-е сут.

Наблюдения за формированием проростков из незрелых зародышей на 10-е сут позволили выявить, что в контроле их количество практически одинаково у данных сортов (рис. 4). В вариантах с ПЭГ 1500 на 5 % концентрации различия между сортами Куяльник и Фантазия стали менее заметными и приблизились по абсолютным значениям. На 10 % концентрации этого типа ПЭГ количество сформированных проростков значительно уменьшилось у всех сортов, но более толерантным к действию данного стресс-фактора был сорт Фантазия. В серии опытов с ПЭГ 6000 на 5 % и 10 % концентрациях значения изучаемых показателей у всех сортов были выше, чем в опытах с ПЭГ 1500 в этих же концентрациях. На 5 % концентрации сорт Фантазия по количеству сформированных проростков в два раза превзошел остальные сорта. На 10 % концентрации величины этого показателя снизились на 5-15 % относительно предыдущего варианта среды.

Таким образом, изучение прорастания семенного материала, изолированных зрелых и незрелых зародышей сортов мягкой пшеницы, а также наблюдение за ростом сформированных проростков в условиях *in vitro* при повышенном осмотическом потенциале среды, позволило получить информацию о первичной толерантности этих эксплантов к стресс- факторам. Наиболее функциональными эксплантами в этой работе были зрелые семена и незрелые зародыши. В качестве селективного фактора для дифференцированного отбора форм мягкой пшеницы, различающихся по толерантности к осмотическому

стрессу, целесообразно использование ПЭГ 6000 в сублетальной концентрации – 20 %. Данный подход можно использовать в предварительной оценке засухоустойчивости селекционного материала мягкой пшеницы, причем по срокам проведения такая оценка значительно короче (10-15 дней), чем полевая. Такой подход можно использовать на начальном этапе создания биотехнологической системы отбора по данному биологическому признаку. Из полученных результатов также видно, что признак прорастания в условиях осмотического стресса является сортоспецифичным и, возможно, коррелирует с уровнем устойчивости сортов в полевых условиях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алимгазинова Б.Ш., Искаков А.Р., Кожухметов К.К. Нетрадиционные биотехнологии в селекции пшеницы и ячменя на устойчивость к абиотическим стрессам // Повышение эффективности селекции полевых культур. – Алматы: РНИ «Бастау», 1997. – С. 29-39.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. – М.: ФБК, ПРЕСС, 1999. – 160 с.
3. Бучинский И.Е. Засухи и суховеи. – Л.: Гидрометеоиздат, 1976. – 214 с.
4. Григорюк И.А., Петренко Н.И., Шведова О.Е., Ярошенко Е.А. Водный и азотный обмен зерновых культур в условиях разной водообеспеченности // Физиология и биохимия культ. растений. – 2000. – Т. 32, № 5. – С. 401-409.
5. Гродзинский Д.М. Надежность растительных систем. – Киев: Наук. думка, 1983. – 368 с.

## ТОЛЕРАНТНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ

6. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Экспериментальные подходы в клеточной селекции на устойчивость к абиотическим стрессам у эфиромасличных растений // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Логос, 2006. – Т. 3. – С. 446-451.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
8. Латюк Г.И. Засухоустойчивость сортов озимой пшеницы в период прорастания // Использование искусственного климата в селекционно-генетических исследованиях. – Одесса, 1988. – С. 29-33.
9. Лукьянюк С.Ф., Игнатова С.А. Методы культуры тканей и органов в селекции растений. Методические рекомендации. – Одесса: ВСГИ, 1980. – 21 с.
10. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. – Киев: Наукова думка, 1990. – 280 с.
11. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
12. Шматко И.Г., Григорюк И.А. Реакция растений на водный и температурный стрессы // Физиология и биохимия культ. растений. – 1992. – 24, № 1. – С. 3-14.
13. Каталог новых сортов та гібридів СГІ. – Одеса, 2005. – 124 с.
14. Fazel N. M., Ghanadha M., Zali A.A. Effects of osmotic stress on seed germination of Iranian wheat genotypes // The 3<sup>rd</sup> International Iran and Russia Conference Agriculture and Nature Resources. – Moscow, Russia, 2002. – P. 93-94.
15. Litvinenko N.A. Breeding of common winter wheat of intensive type for adaptation potential increase under South Ukraine condition // 5<sup>th</sup> International Wheat Conference. – Ankara, Turkey, 1996. – P. 47.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.

Поступила в редакцію  
30.11.2006 г.

## THE TOLERANCE OF BREAD WHEAT EXPLANTS TO OSMOTIC STRESS *IN VITRO*

S. I. Gargaun, S. A. Ignatova

*South Plant Biotechnology Center Ukrainian Academy of Agrarian Science  
(Odessa, Ukraine)*

Investigated germination of the seeds, the isolated mature and immature embryos of three grades of a bread winter wheat differing on a level of drought resistance, in conditions *in vitro* at exogenous influence polyethylenglycole (PEG). The tolerance of used explants to the specified selective agent accords to the field estimation grades of drought resistance. The steadiest to action of this stress-factor has appeared a grade Fantasia, and grades Kuyalnik and Victoria were approximately at one level of sensitivity to PEG, that coincides with the field characteristic of grades. It is also established, that the attribute of germination in the given conditions *in vitro* depends on a grade.

**Key words:** *Triticum aestivum L., seeds, isolated embryos, tolerance to osmotic stress*

## ТОЛЕРАНТНІСТЬ ЕКСПЛАНТІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ДО ВПЛИВУ ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ В УМОВАХ *IN VITRO*

С. І. Гаргаун, С. О. Ігнатова

*Південний біотехнологічний центр у рослинництві  
Української аграрної академії наук та Міністерства освіти і науки України  
(Одеса, Україна)*

Досліджували проростання насіння, ізольованих зрілих та незрілих зародків трьох сортів м'якої озимої пшениці, які відрізняються за рівнем посухостійкості, в умовах *in vitro* за екзогенною дією поліетиленгліколя (ПЕГ). Толерантність використаних експлантів до вказаного селективного агента відповідала польовій оцінці посухостійкості сортів. Найстійкішими до дії даного стресс-фактора виявився сорт Фантазія, а сорти Куяльник та Вікторія перебували приблизно на одному рівні чутливості до ПЕГ, що збігається з польовою характеристикою сортів. Встановлено, що ознака проростання в даних умовах *in vitro* є сортоспецифічною.

**Ключові слова:** *Triticum aestivum L., насіння, ізольовані зародки, толерантність, осмотичний стрес*