



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>



БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД СЕЛЕКТИВНОЙ ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ *IN VITRO* АВТОНОМНЫХ ЗАРОДЫШЕЙ В УСКОРЕННОЙ ОЦЕНКЕ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ ГИБРИДНЫХ КОМБИНАЦИЙ ХЛЕБНЫХ ЗЛАКОВ (НА ПРИМЕРЕ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ)

Круглова Н.Н.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа, Россия
E-mail: kruglova@anrb.ru

В статье анализируется биотехнологический метод селективной эмбриокультуры *in vitro*, разработанный в целях ускоренной оценки засухоустойчивости вновь полученных гибридных комбинаций экономически важных хлебных злаков. На примере яровой мягкой пшеницы с позиций эмбриологии и гистофизиологии растений рассматриваются основные этапы этого метода. Дается краткий обзор литературных и собственных работ, посвященных такой критической стадии эмбрионального развития злаков, как их автономность. Особое внимание обращается на способы выявления засухоустойчивости автономных зародышей гибридных комбинаций в селективной эмбриокультуре *in vitro* и в почвенных условиях *ex vitro*, а также лабораторной оценке зерновок полученных регенерантов в условиях имитации засухи. Проанализированы эмбриональные показатели засухоустойчивых регенерантов в условиях полевой засухи. Обсуждается целесообразность использования разработанного биотехнологического метода в селекционных программах по получению засухоустойчивых гибридных комбинаций хлебных злаков.

Ключевые слова: эмбриокультура *in vitro* ♦ автономный зародыш ♦ засухоустойчивость ♦ хлебные злаки ♦ яровая мягкая пшеница

Поступила в редакцию: 06.09.2024

BIOTECHNOLOGICAL METHOD OF SELECTIVE EMBRYO CULTURE *IN VITRO* OF AUTONOMOUS EMBRYOS FOR THE ACCELERATED ASSESSMENT OF DROUGHT RESISTANCE OF CEREAL HYBRID COMBINATIONS (USING THE EXAMPLE OF SPRING SOFT WHEAT)

Kruglova N.N.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of
the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia
E-mail: kruglova@anrb.ru

The article analyzes a biotechnological method of selective embryo culture *in vitro*, developed in order to accelerate the assessment of drought resistance of newly obtained hybrid combinations of economically important cereals. Using the example of spring soft wheat, the main stages of this method are considered from the standpoint of plant embryology and histophysiology. The brief review of literary and own works devoted to such a critical stage of embryonic development of cereals as their autonomy is given. Special attention is paid to the manners of detecting the drought resistance of autonomous embryos of hybrid combinations in selective embryo culture *in vitro* and in *ex vitro* soil conditions, as well as laboratory evaluation of regenerants caryopses in drought simulation conditions. The embryonic parameters of drought-resistant regenerants in conditions of field drought are analyzed. The expediency of using the developed biotechnological method in breeding programs for obtaining drought-resistant hybrid combinations of cereals is discussed.

Keywords: embryo culture *in vitro* ♦ autonomous embryo ♦ drought resistance ♦ cereals ♦ spring soft wheat

Принято в печать: 19.09.2024

[Цитировать | Cite as](#)

DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-3-164-175](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-3-164-175)

EDN: [PTPZFP](#)



ВВЕДЕНИЕ

Физиологическая засуха определяется как длительный и значительный недостаток осадков, чаще при повышенной температуре и пониженной влажности воздуха, в результате которого иссякают запасы влаги в почве (Кудоярова и др., 2013). Засуха – один из наиболее распространенных абиотических стрессовых факторов, приводящих к значительным потерям урожая сельскохозяйственных растений в условиях современной тенденции аридизации климата (Plant life..., 2020). Эта проблема актуальна и для Южного Урала – зоны рискованного земледелия (Зыбалов, 2013).

Селекционерами разрабатываются различные способы создания засухоустойчивых сортов экономически важных культур, в том числе основного хлебного злака – пшеницы (Sallam et al., 2019 и мн. др.). Такие сорта должны сохранять относительно высокий показатель урожая при дефиците воды в почве и воздухе.

Эффективность селекционных программ по созданию засухоустойчивых районированных сортов пшеницы во многом базируется на ускорении создания селекционных образцов. Этому требованию отвечает биотехнологический метод эмбриокультуры *in vitro* как культивирование разновозрастных зиготических зародышей (Круглова, 2021; Круглова и др., 2021; Kruglova, Zinatullina, 2023), несмотря на некоторые его ограничения (подробнее см: Зинатуллина, 2023б).

Следует отметить, что метод эмбриокультуры *in vitro* находит успешное применение при иных направлениях селекционной работы с хозяйственно ценными растениями (Plant Embryo Culture., 2011; Голева и др., 2014; Россев и др., 2016; Эмбриокультура., 2022 и др.).

Цель данного обзора – дать обобщение итогов разработки основных этапов биотехнологического метода селективной эмбриокультуры *in vitro* автономных зародышей, предназначенного для ускоренной оценки засухоустойчивости селекционных образцов яровой мягкой пшеницы. Метод разработан в лаборатории физиологии растений УИБ УФИЦ РАН и опубликован в ряде работ 2019–2023 гг.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для разработки метода послужила коллекция из 10 гибридных комбинаций яровой мягкой пшеницы поколения (Э43018×Тулайковская золотистая, Л42875×Экада 70, Л42875×76/98а, Башкирская 26×Экада 70, Л42938×Салават Юлаев, Боевчанка×Ирень, Дуэт×Башкирская 28, Л42809×Л42866, Воронежская 16×Л42833, Боевчанка×Башкирская 26), полученных в лаборатории селекции и семеноводства яровой пшеницы Селекционного центра Башкирского НИИ СХ УФИЦ РАН (заведующий лабораторией к.с.-х.н. В.И. Никонов). Эти гибридные линии по структуре урожая в сравнении со стандартным сортом Омская 35 в полевых условиях были оценены как засухоустойчивые. Зрелые зерновки были переданы для лабораторных испытаний в УИБ УФИЦ РАН согласно договору о творческом сотрудничестве между институтами на 2018–2023 гг.

Донорные растения выращивали в полевых условиях научного стационара Уфимского Института биологии УФИЦ РАН (Уфимский район) в вегетационные сезоны 2019-2022 гг. В каждый год исследования высевали по 100 зрелых зерновок каждого генотипа.

Наступление фенологических фаз развития растений определяли по (Круглова, Сельдимирова, 2011). Учитывая, что пшеница относится к самоопыляющимся растениям (Батыгина, 2014 и мн. др.), во время фенологической фазы цветения зрелой пылью проводили искусственное опыление собственных 10 цветков средней трети главного колоса. В каждом случае выборка составляла 30 главных колосьев 10 растений.

В качестве эксплантов использовали зародыши различных стадий развития, полученные в результате искусственного опыления. Применяли авторскую периодизацию зиготического эмбриогенеза злаков (Kruglova et al., 2020a; Зинатуллина, 2022в).

Для выявления стадии развития незрелых зародышей, оптимальной при разработке анализируемого метода (стадия автономности), использовали метод эмбриокультуры *in vitro* яровой мягкой пшеницы с учетом эмбриологических нюансов (Основы биотехнологии., 2017; Круглова, 2022; Зинатуллина, 2023а). Незрелые зародыши различных последовательных стадий развития инокулировали на среду, составленную по прописи полной среды МС (Murashige, Skoog, 1962) без добавления гормонов. Полученные проростки переносили на культуральную среду, составленную по прописи Blaydes (1966). Зародыши инкубировали в темноте при +27°C в течение 21 сут до фенологической фазы кущения. Такие проростки переносили в условия *ex vitro* в вегетационные сосуды, заполненные почвенной смесью,

которые размещали на лабораторной площадке и проращивали до фенологической фазы полной спелости зерна. Анализировали морфологические и гистологические характеристики инокулированных зародышей, а также физиологические условия культивирования *in vitro*, приводящие к формированию полноценных фертильных регенерантов со зрелыми зерновками.

Оценку засухоустойчивости незрелых зародышей проводили по их отзывчивости в виде формирования нормальных проростков в условиях *in vitro*, имитирующих дефицит влаги введением в состав полной среды МС (Murashige, Skoog, 1962) осмотика маннита в концентрации 8% (Зинатуллина, Никонов, 2021), без добавления гормонов. Зародыши инкубировали в темноте при +27°C в течение 21 сут до фенологической фазы кущения. Ввели визуальную оценку морфологических показателей развивающихся проростков.

Засухоустойчивость генотипов оценивали по всхожести зрелых зерновок при проращивании в течение 3 сут в чашках Петри, в темноте, в условиях, имитирующих дефицит влаги введением маннита в концентрации 8% (Зинатуллина, Никонов, 2021).

Часть исследований провели с использованием гистологического (Световой микроскоп..., 2013) и кариологического (Паушева, 1980) методов. Постоянные и временные препараты просматривали и фотографировали с применением микроскопа проходящего света Axio Imager.A1 light microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany), оснащенного объективом EC Plan-NEOFLURAL 10×/0.3, фотографировали с использованием цифровой камеры AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Прижизненную съёмку объектов вели с применением стереомикроскопа Technival 2 (Carl Zeiss, Jena, Germany) и цифровой камеры Olympus Camedia C-4000 (Olympus Optical Co., LTD, Japan).

Все эксперименты проводили в трёх биологических повторностях. Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Microsoft Office Excel 2010, учитывая основные статистические параметры.

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА СЕЛЕКТИВНОЙ ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ *IN VITRO* АВТОНОМНЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ

Выявление стадии автономности зародышей гибридных комбинаций пшеницы

Выявление оптимального экспланта (зародыш в определенной стадии развития) тесно связано с проблемой становления автономности зародыша – особого структурно-функционального состояния, отражающего способность незрелого зародыша к саморегуляции и проявляющегося в завершении эмбриогенеза вне материнского организма, без участия материнских гормонов. Автономность незрелого зародыша рассматривается как один из этапов автономизации онтогенеза, с которого зародыш (новый спорофит) переходит на относительно самостоятельный путь развития (Батыгина, 2014; Круглова, 2023в). Стадию автономности предложено относить к критическим стадиям эмбриогенеза растений (Батыгина, 2014), в том числе хлебных злаков (Kruglova et al., 2020b, 2022; Kruglova, Zinatullina, 2022).

Экспериментально на безгормональной среде выявили стадию автономности зародыша как самую раннюю стадию развития инокулированных зародышей, способных к самостоятельному развитию независимо от влияния гормонов. Установлено, что этому условию у всех изученных гибридных комбинаций удовлетворяют незрелые зародыши на стадии органогенеза (согласно использованной периодизации эмбриогенеза злаков), формирующие в условиях культуры *in vitro* полноценные проростки. Такие зародыши длиной 1.5-2 мм образуются к 12–15 сут после искусственного опыления и характеризуются нормальной для злаков морфологией; данные световой микроскопии продемонстрировали наличие в зародышах сформированных органов, типичных для зародышей злаков: щиток (семядоля), лигула (вырост щитка), дифференцированная почечка, состоящая из апекса побега

и первого листа, колеоптиль, эпибласт, колеориза, зародышевый корень (Круглова и др., 2022; Круглова, 2023а).

*Выявление засухоустойчивых гибридных комбинаций
в селективной эмбриокультуре *in vitro* и в почвенных условиях *ex vitro**

В литературе предложено использование различных осмотических агентов-имитаторов засухи: сахароза, хлорид натрия, маннит, сорбит и наиболее часто – полиэтиленгликоль с молекулярной массой 6000 Да (ПЭГ 6000). Принципиально важен выбор не только селективного агента, но и его в адекватной концентрации: при низких концентрациях устойчивость к стрессу может не проявляться, а слишком высокие концентрации могут быть летальными для растений (Сельдимирова, 2019; Ступко и др., 2019).

В результате проведенной серии экспериментов по тестированию иммитанта засухи в отношении зрелых зерновок пшеницы нами был отобран и использован в работе такой селективный агент, как маннит в концентрации 8% (Зинатуллина, Никонов, 2021).

Для выявления способности генотипа противостоять засухе разработали подход, состоящий в инокуляции автономных зародышей пшеницы *in vitro* на селективную среду, подготовленную по полной прописи среды МС (Murashige, Skoog, 1962), в состав которой введен указанный иммитант засухи эмпирически подобранной концентрации. Генотип оценивался как засухоустойчивый, если (1) из автономных зародышей *in vitro* формировались регенеранты в фенологических фазах проростка и кущения; (2) в почвенных условиях *ex vitro* регенеранты развивались в фертильные растения с нормально развитыми зрелыми зерновками (Круглова и др., 2019).

Установлено, что в условиях проведенных экспериментов автономные зародыши 8 из 10 гибридных комбинаций (Э43018×Тулайковская золотистая, Л42875×Экада 70, Л42875×76/98а, Башкирская 26×Экада 70, Л42938×Салават Юлаев, Л42809×Л42866, Дуэт×Башкирская 28, Боевчанка×Башкирская 26) в условиях имитации засухи *in vitro* при культивировании в течение 9 сут формировали проростки. Гистологический анализ подтвердил нормальное строение апексов побега и корня таких проростков (Зинатуллина, Никонов, 2021). Автономные зародыши комбинаций Воронежская 16×Л42833 и Боевчанка×Ирень дегенерировали в условиях выполненных экспериментов на 3 сут культивирования *in vitro* на селективной среде (табл. 1).

Таблица 1. Формирование проростков из автономных зародышей гибридных комбинаций пшеницы в селективных условиях эмбриокультуры *in vitro* с введением в среду иммитанта засухи (8% маннит)

Гибридная комбинация	Количество проростков, % от инокулированных зародышей
Э43018×Тулайковская золотистая	73.9±3.4 ²
Л42875×Экада 70	67.3±3.3 ²
Л42875×76/98а	64.2±0.6 ²
Башкирская 26×Экада 70	54.1±1.3 ¹
Л42938×Салават Юлаев	53.5±0.9 ³
Л42809×Л42866	51.9±0.7 ³
Дуэт×Башкирская 28	48.5±0.3 ³
Боевчанка×Башкирская 26	33.5±0.9 ³
Воронежская 16×Л42833	0
Боевчанка×Ирень	0

Примечание: ¹ – значимо на 0.1%-м уровне, ² – значимо на 1.0%-м уровне, ³ – значимо на 5.0%-м уровне

Проростки переносили на питательную среду Blaydes (1966) и после культивирования *in vitro* в течение 30-35 сут получили растения-регенеранты в фенофазе кущения.

Для дальнейших экспериментов регенеранты размещали на светоплощадке в условия *ex vitro* в сосуды с почвенной смесью. В таких условиях развитие регенерантов завершалось фенологической фазой полной спелости зерна с формированием зрелых зерновок (Зинатуллина, Никонов, 2021).

В целом, согласно экспериментальным данным, указанные выше 8 гибридных комбинаций пшеницы оценены как засухоустойчивые. Такая оценка совпадает с данными полевых исследований этих генотипов, проведенных ранее сотрудниками Селекционного центра БашНИИ СХ УФИЦ РАН. В то же время результаты культивирования *in vitro* на селективной среде 2 гибридных комбинаций свидетельствуют об их статусе как незасухоустойчивых согласно использованным нами критериям, хотя в полевых условиях эти генотипы оценены как засухоустойчивые.

Лабораторная оценка зерновок засухоустойчивых и незасухоустойчивых гибридных комбинаций пшеницы в условиях имитации засухи

Для того чтобы разрешить противоречие между полевыми и экспериментальными данными по оценке засухоустойчивости/незасухоустойчивости изучаемых гибридных комбинаций, провели лабораторную оценку всхожести зерновок всех изученных генотипов в условиях имитации засухи. Отметим, что такое тестирование полученных форм в условиях имитации засухи считается неременным звеном селекционного процесса по признаку «засухоустойчивость», так как в благоприятные годы в полевых условиях выявить засухоустойчивые формы практически невозможно (Росеев и др., 2016).

Использовали зрелые зерновки регенерантов 8 гибридных комбинаций пшеницы, оцененные как засухоустойчивые согласно использованным критериям (Круглова и др., 2019). Поскольку в условиях выполненных экспериментов 2 гибридные комбинации не сформировали зрелые зерновки (см табл. 1) и тем самым были оценены как незасухоустойчивые, использовали зерновки этих комбинаций, переданные для исследований сотрудниками лаборатории селекции и семеноводства яровой пшеницы Селекционного центра БашНИИ СХ РАН.

Лабораторную оценку всхожести зерновок провели в условиях имитации засухи 8% раствором маннита при +27⁰С в темноте в течение 3 сут. В результате выявлена достаточно высокая лабораторная всхожесть зерновок 8 гибридных комбинаций пшеницы, ранее в полевых и лабораторных условиях оцененных как засухоустойчивые, а также низкая всхожесть зерновок гибрида Воронежская 16×Л42833 и отсутствие всхожести зерновок гибрида Боевчанка×Ирень, ранее оцененных в лабораторных условиях как незасухоустойчивые (табл. 2).

Таблица 2. Лабораторная всхожесть зерновок регенерантов гибридных комбинаций пшеницы в условиях имитации засухи (3 сут, 8% маннит)

Гибридная комбинация	Лабораторная всхожесть зерновок, %
Э43018×Тулайковская золотистая	79.1±3.4
Л42875×Экада 70	78.7±3.1
Л42875×76/98a	76.8±3.6
Башкирская 26×Экада 70	75.1±3.2
Л42938×Салават Юлаев	68.4±3.7
Боевчанка×Башкирская 26	67.4±4.1
Дуэт×Башкирская 28	65.4±2.1
Л42809×Л42866	50.4±2.3
Воронежская 16×Л42833	8.1±1.1
Боевчанка×Ирень	0

Примечание: все показатели значимы на 5.0%-м уровне

Для ещё большей достоверности оценки засухоустойчивости/незасухоустойчивости гибридных комбинаций провели гистологические и кариологические исследования, показавшие нормальный статус тканей апекса побегов 3-суточных проростков, а также нормальный для пшеницы набор хромосом ($n=42$) в клетках кончиков проростков гибридных комбинаций, оцененных как засухоустойчивые, в то время как в тканях апексов побегов незасухоустойчивых генотипов выявлены различные аномалии.

В целом, проведенные исследования показали, что 8 из 10 гибридных комбинаций пшеницы (Э43018×Тулайковская золотистая, Л42875×Экада 70, Л42875×76/98а, Башкирская 26×Экада 70, Л42938×Салават Юлаев, Боевчанка×Башкирская 26, Дуэт×Башкирская 28, Л42809×Л42866), ранее оцененные в полевых условиях как засухоустойчивые, также и в лабораторных условиях подтвердили свой стресс-устойчивый статус. Такие результаты позволяют рекомендовать указанные 8 гибридных комбинаций пшеницы к использованию в дальнейших селекционных программах по созданию районированных сортов с признаком «засухоустойчивость». В то же время для как можно более точной оценки засухоустойчивости получаемых селекционерами гибридных комбинаций важно использовать комплексный (полевой и лабораторный) подход, как это показано нами на примере пшеницы (Зинатуллина, 2022а,б; Круглова, 2023б).

ОЦЕНКА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЗАСУХОУСТОЙЧИВЫХ РЕГЕНЕРАНТОВ ПШЕНИЦЫ В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ

Разработанный биотехнологический метод селективной эмбриокультуры *in vitro* автономных зародышей позволяет получать засухоустойчивые регенеранты яровой мягкой пшеницы. В то же время следует подчеркнуть, что оценка всхожести зерновок, морфологии, гистологии и кариологии полученных засухоустойчивых регенерантов гибридных комбинаций пшеницы была проведена в лабораторных условиях моделирования засухи введением в состав питательной среды 8% маннита.

Для того чтобы рекомендовать данный метод к массовому биотехнологическому применению в селекционных целях создания засухоустойчивых сортов пшеницы, важно проанализировать показатели регенерантов в полевых условиях засухи. Особенно важно изучить эмбриональные характеристики засухоустойчивых регенерантов. Хорошо известно, что в основе формирования качественных семян лежит нормальное прохождение зародышем всех стадий эмбриогенеза.

Следует отметить, что предложенный нами эмбриологический подход к исследованию регенерантов яровой мягкой пшеницы и хлебных злаков в целом, как показывает анализ доступной литературы, оригинален в биотехнологической практике.

Исследования эмбриональных показателей были проведены на примере засухоустойчивых растений-регенерантов пшеницы гибридной комбинации Л42938×Салават Юлаев в сравнении с аналогичными показателями растений (нерегенерантов) незасухоустойчивой гибридной комбинации пшеницы Боевчанка×Ирень в вегетационные сезоны 2020 г. и 2021 г. По данным Башкирского управления по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды, на основании показателей стандартизированных индексов осадков и испаряемости 2020 г. отнесен к умеренно влажным, 2021 г. – к засушливым годам (<http://www.meteorb.ru/about/gidrometeorologicheskaya-informatsiya>).

Установлено, что зародыши обеих гибридных комбинаций пшеницы в оба года исследований развивались согласно характерному для представителей семейства злаков Graminad-типу эмбриогенеза (по: Батыгина, 2014; Kруглова et al., 2020a), при этом последовательно проходили стадии зиготы, двуклеточного, четырехклеточного, многоклеточного зародыша, стадию органогенеза. Зрелые зародыши формировались к 25,0-30,0 сут после опыления и характеризовались типичным для злаков строением. На рисунках 1 и 2 эти события отражены на примере регенерантов засухоустойчивой гибридной комбинации Л42938×Салават Юлаев.

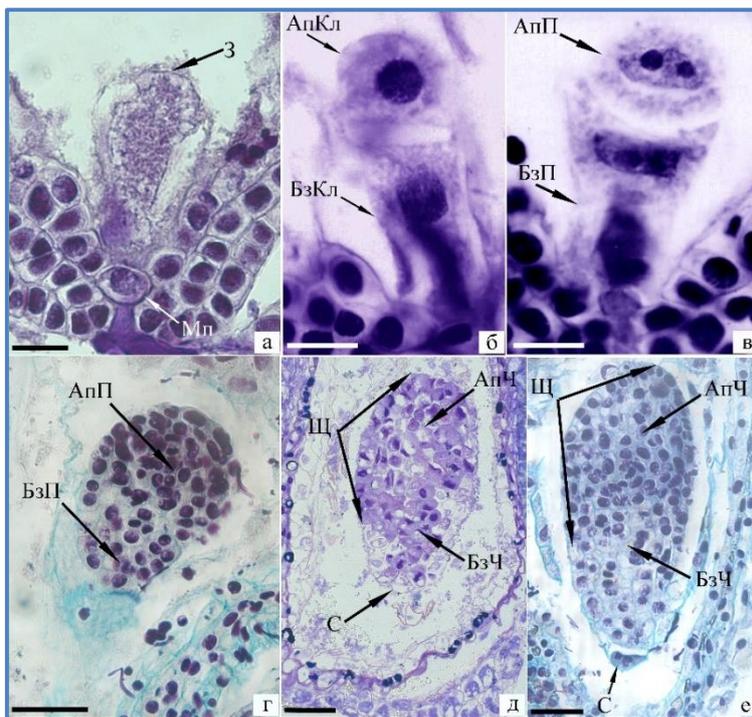


Рис. 1. Зародыши растений-регенерантов засухоустойчивой гибридной комбинации пшеницы Л42938×Салават Юлаев на ранних стадиях эмбриогенеза:

а – зигота; б – двухклеточный зародыш; в – четырехклеточный зародыш; г – многоклеточный зародыш; д – заложение щитка в многоклеточном зародыше; е – смещение щитка в многоклеточном зародыше. Все срезы продольные. Масштаб: а–в – 20 мкм; г–е – 50 мкм. Условные обозначения: АпКл – апикальная клетка, АпП – апикальный полюс, АпЧ – апикальная часть, БзКл – базальная клетка, БзП – базальный полюс, БзЧ – базальная часть, З – зигота, МП – микропиле, С – суспensor, Щ – щиток. По: Круглова, Сельдиминова, 2022.

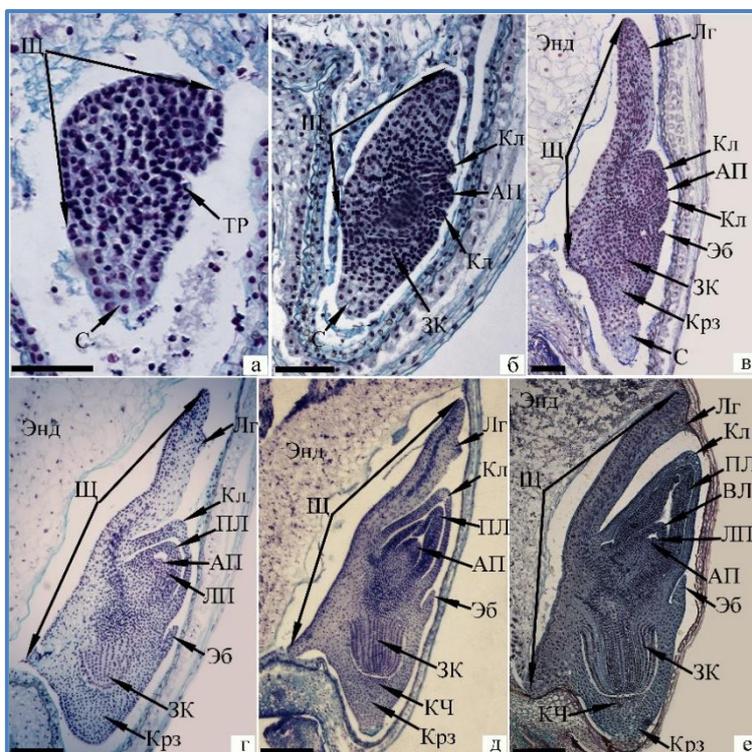


Рис. 2. Зародыши растений-регенерантов засухоустойчивой гибридной комбинации пшеницы Л42938×Салават Юлаев на поздних стадиях эмбриогенеза:

а – формирование точки роста; б – формирование апекса побега и главного зародышевого корня; в – формирование эпибласта, колеоризы, лигулы; г – сформированный зародыш; д – формирование корневого чехлика; е – зрелый зародыш. Все срезы продольные. Масштаб: а–в – 100 мкм; г–е – 400 мкм. Условные обозначения: АП – апекс побега, ВЛ – второй лист, ЗК – главный зародышевый корень, Кл – колеоптиль, Крз – колеориза, КЧ – корневого чехлик, Лг – лигула, ЛП – листовый примордий, ПЛ – первый лист, С – суспensor, ТР – точка роста, Щ – щиток, Эб – эпибласт, Энд – эндосперм. По: Круглова, Сельдиминова, 2022.

Воздействие повышенной температуры воздуха в засушливый 2021 г. не оказало влияния на процесс эмбриогенеза и структуру развивающихся зародышей засухоустойчивых растений-регенерантов гибридной комбинации Л42938×Салават Юлаев. Однако при анализе эмбриональных показателей зародышей растений незасухоустойчивой гибридной комбинации Боевчанка×Ирень отмечены различные аномалии их структуры, асинхронность и остановка в развитии, дегенерация части развивающихся зародышей практически на всех стадиях эмбриогенеза начиная уже с зиготы (рис. 3). В целом остановка в развитии, аномалии и дегенерации структуры отмечены у 24,1% зародышей этой гибридной комбинации на разных стадиях эмбриогенеза (Круглова, Сельдимирова, 2022).

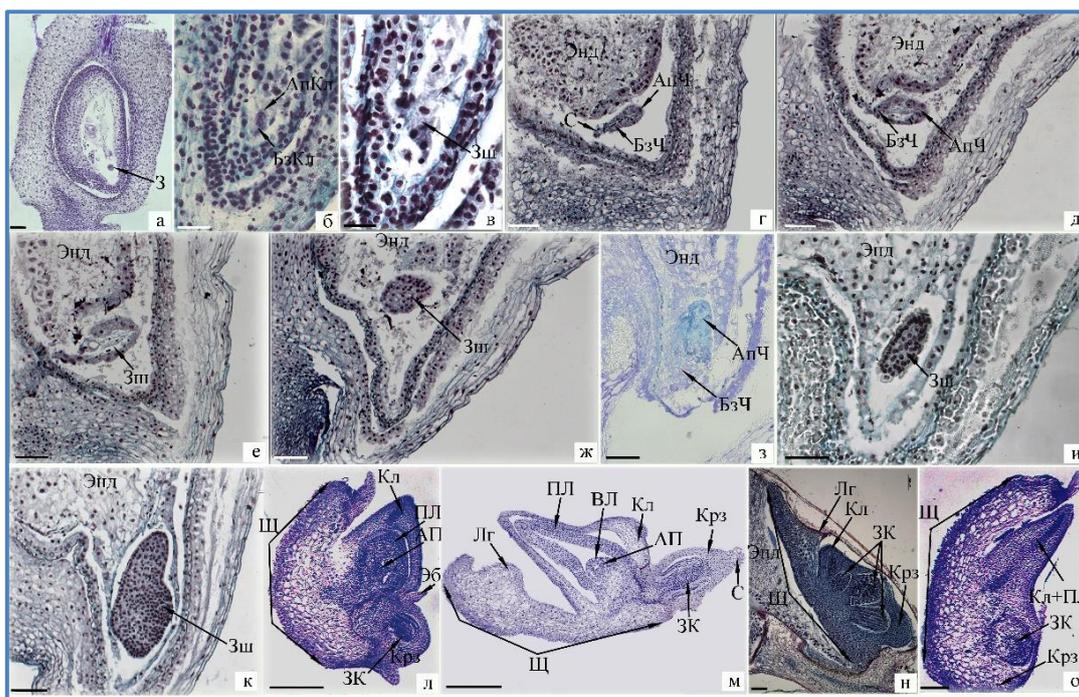


Рис. 3. Аномалии зародышей растений незасухоустойчивой гибридной комбинации пшеницы

Боевчанка×Ирень: а – аномальная неполяризованная зигота; б – аномальный двухклеточный зародыш с равными клетками; в – четырехклеточный зародыш аномальной строения; г-з – дегенерация многоклеточных зародышей; и – многоклеточный зародыш нормального строения; к – зародыш нормального строения в стадии органогенеза; аномалии структуры зрелых зародышей: боковое расположение главного зародышевого корня (л), нарушения морфологии щитка, колеоптиля и колеоризы (м), формирование дополнительного зародышевого корня (н), срастание колеоптиля и первых листьев (о). Все срезы продольные. Масштаб: а, г, д-к – 100 мкм, б, в – 50 мкм, л, м – 500 мкм, н – 200 мкм, о – 250 мкм.
 Условные обозначения: Ап – апекс побега, АпК – апикальная клетка, АпЧ – апикальная часть, БзК – базальная клетка, БзЧ – базальная часть, ВЛ – второй лист, З – зигота, ЗК – главный зародышевый корень, Зш – зародыш, Кл – колеоптиль, Крз – колеориза, Лг – лигула, Пл – первый лист, С – суспензор, Щ – щиток, Эб – эпибласт, Энд – эндосперм.
 По: Круглова, Сельдимирова, 2022.

Полученные эмбриологические данные подтверждают как чувствительность зародышей пшеницы к действию температур воздуха даже на доли градуса выше оптимальной для эмбриогенеза в +19⁰С (по: Farooq et al., 2011), так и данные о важной роли генотипа в реакции растений на дефицит влаги (Kumar et al., 2021). Особенно важно то, что в условиях полевой засухи получил подтверждение выявленный в лабораторных условиях селективной эмбриокультуры *in vitro* засухоустойчивый статус гибридной комбинации Л42938×Салават Юлаев.

Важно обсудить и такой вопрос. При разработке современных биотехнологий хозяйственно ценных растений с использованием методов культуры *in vitro* необходимо решать различные генетические проблемы – от сохранения геномной стабильности до направленного индуцирования изменений в геноме на основе биологических феноменов соматональной и эпигенетической изменчивости. В последнем случае изменчивость генома

индуцируется на начальных этапах таких биотехнологий, во время культивирования *in vitro* эксплантов на питательных средах, в состав которых, как правило, входят гормоны и иные возможные индукторы генетических изменений. Полученные регенеранты с измененным геномом проходят жесткий отбор на последующих этапах культивирования *in vitro*, а также в условиях *ex vitro*. Дальнейшее развитие прошедших такой отбор плодоносящих регенерантов в полевых условиях *in planta* протекает уже без отклонений от нормы. По крайней мере, согласно полученным нами данным для гибридной комбинации Л42938×Салават Юлаев, это справедливо в отношении эмбриональных признаков, весьма консервативных в эволюционном плане (по: Батыгина, 2014).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективность селекционных разработок в области ресурсосведения яровой мягкой пшеницы базируется главным образом на реализации адаптивного потенциала полученных гибридных линий и сортов.

Инокуляция зародышей пшеницы, находящихся в критической стадии автономности, в условия *in vitro* на селективную питательную среду, имитирующую засуху, отбор толерантных к дефициту воды зародышей и формирование из них плодоносящих растений-регенерантов позволяет дать ускоренную оценку степени засухоустойчивости растений в селекционных целях. Определенное значение при этом имеет принципиальное совпадение результатов лабораторных исследований засухоустойчивости гибридной комбинации пшеницы Л42938×Салават Юлаев с ее достаточно высокими качественными эмбриологическими показателями при полевых испытаниях в условиях засухи.

В целом, разработанный биотехнологический метод следует отнести к экспресс-диагностическим подходам в селекции растений, поскольку использование автономных зародышей уже на 12-15 сут после их получения методом гибридизации сокращает время экспериментальных исследований в сравнении с проростками и тем более сформированными растениями более поздних фенологических фаз. Это приводит к существенному выигрышу во времени в отборе вновь полученных гибридных комбинаций для дальнейшей селекционной работы – в сравнении с обычной в селекционной практике оценкой устойчивости к дефициту влаги традиционными полевыми методами.

Важно подчеркнуть, что разработанный биотехнологический метод может быть использован в селекционной работе по созданию засухоустойчивых сортов не только яровой мягкой пшеницы из рода *Triticum*, но и других хлебных злаков этого рода, а также других представителей семейства Poaceae. Действительно, эмбриональные характеристики представителей одного семейства и тем более рода растений достаточно универсальны и стабильны.

Всё это позволяет сделать вывод о целесообразности использования незрелых автономных зародышей, культивируемых в селективных условиях имитации засухи *in vitro*, в ускорении селекционной работы при первичной оценке устойчивости к дефициту влаги вновь созданных гибридных комбинаций экономически ценных хлебных злаков уже на самом раннем этапе их онтогенеза – при формировании и развитии зародышей. В то же время следует учитывать, что засухоустойчивость относится к мультигенным признакам, и для достоверного выявления этого признака у вновь созданных гибридных комбинаций необходимо комплексное привлечение различных методов и подходов.

Полученные данные имеют определенное теоретическое значение, поскольку получено подтверждение той концепции фундаментальной биологии развития растений, что зиготический зародыш уже на ранних стадиях развития характеризуется наличием морфогенетического и адаптивного потенциала всей особи (в данном случае – засухоустойчивости).

Автор выражает искреннюю благодарность к.б.н. О.А. Сельдимировой и к.б.н. А.Е. Зинатуллиной (УИБ УФИЦ РАН) за совместную разработку проанализированного метода, а также к.с.-х.н. В.И. Никонову (Башкирский НИИ СХ УФИЦ РАН) за предоставленный материал для исследований.

В работе использована приборная база Центра коллективного пользования «Агидель» УФИЦ РАН.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства высшего образования и науки РФ № 075-01134-23-00 по теме № 123020800002-2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батыгина Т.Б. Биология развития растений. СПб.: ДЕАН, 2014. 764 с.
2. Голева Г.Г., Батлук Ю.А., Ващенко Т.Г., Черкасова Н.Н., Голев А.Д. Получение растений-регенерантов озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в культуре *in vitro* // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. Сельскохозяйственные науки. 2014. № 3(42). С. 17–22.
3. Зинатуллина А.Е. К вопросу о комплексной оценке засухоустойчивости пшеницы в полевых и лабораторных условиях // Экобиотех. 2022а. Т. 5. № 3. С. 108–117. DOI: [10.31163/2618-964X-2022-5-3-108-117](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2022-5-3-108-117)
4. Зинатуллина А.Е. Оценка засухоустойчивости хлебных злаков на основе эмбриологических данных (на примере пшеницы) // Экобиотех. 2022б. Т. 5. № 1. С. 26–40. DOI: [10.31163/2618-964X-2022-5-1-26-40](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2022-5-1-26-40)
5. Зинатуллина А.Е. Периодизации зиготического эмбриогенеза злаков *in planta* и их использование в биотехнологических исследованиях *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2022в. № 1. С. 60–69. DOI: [10.31040/2222-8349-2023-0-1-60-69](https://doi.org/10.31040/2222-8349-2023-0-1-60-69)
6. Зинатуллина А.Е. Стадия эмбриогенеза *in planta* влияет на реализацию морфогенетического потенциала зародышей пшеницы *in vitro* // Экобиотех. 2023а. Т. 6. № 1. С. 35–44. DOI: [10.31163/2618-964X-2023-6-1-35-44](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2023-6-1-35-44)
7. Зинатуллина А.Е. Эмбриокультура *in vitro* как биотехнологический метод: возможности и ограничения // Известия Уфимского научного центра РАН. 2023б. № 3. С. 37–43. DOI: [10.31040/2222-8349-2023-0-3-37-43](https://doi.org/10.31040/2222-8349-2023-0-3-37-43)
8. Зинатуллина А.Е., Никонов В.И. Лабораторная оценка регенерантов гибридных комбинаций пшеницы в условиях *in vitro* и *ex vitro* // Экобиотех. 2021. Т. 4. № 2. С. 81–88. DOI: [10.31163/2618-964X-2021-4-2-81-88](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2021-4-2-81-88)
9. Зыбалов В.С. Засуха и меры борьбы с ней на Южном Урале // Вестник Челябинского государственного агроинженерного университета. 2013. Т. 63. С. 101–106.
10. Круглова Н.Н. Регуляция эмбрионального органогенеза злаков в условиях *in vitro* // Экобиотех. 2021. Т. 4. № 1. С. 11–23. DOI: [10.31163/2618-964X-2021-4-1-11-23](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2021-4-1-11-23)
11. Круглова Н.Н. Тактика выбора экспланта при биотехнологических исследованиях засухоустойчивости пшеницы методом эмбриокультуры *in vitro* // Экобиотех. 2022. Т. 5. № 2. С. 41–58. DOI: [10.31163/2618-964X-2022-5-2-41-58](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2022-5-2-41-58)

12. Круглова Н.Н. Выявление критических стадий раннего онтогенеза как методологический подход в изучении биологии развития растений в биотехнологических целях // Экобиотех. 2023а. Т. 6. № 1. С. 24–34. DOI: [10.31163/2618-964X-2023-6-1-24-34](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2023-6-1-24-34)
13. Круглова Н.Н. Комплексная оценка устойчивости к длительному дефициту воды в полевых и лабораторных условиях как методологический подход в селекции засухоустойчивых сортов хлебных злаков // Таврический вестник аграрной науки. 2023б. № 3(35). С. 120–136. DOI: [10.5281/zenodo.10141347](https://doi.org/10.5281/zenodo.10141347), EDN: VBRQTM
14. Круглова Н.Н. Частные и общие критические периоды в онтогенезе цветковых растений // Известия Уфимского научного центра РАН. 2023в. № 3. С. 17–23. DOI: [10.31040/2222-8349-2023-0-3-17-23](https://doi.org/10.31040/2222-8349-2023-0-3-17-23)
15. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цитогистологические аспекты. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.
16. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А. Эмбриогенез *in vivo* засухоустойчивых регенерантов яровой мягкой пшеницы, полученных в эмбриокультуре *in vitro* // Таврический вестник аграрной науки. 2022. № 1(29). С. 65–78. DOI: [10.33952/2542-0720-2022-1-29-65-78](https://doi.org/10.33952/2542-0720-2022-1-29-65-78). EDN: NEBDGL
17. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А., Зинатуллина А.Е. Эмбриокультура *in vitro* в экспериментальной оценке засухоустойчивости хлебных злаков // Таврический вестник аграрной науки. 2021. № 2(26). С. 127–144. DOI: [10.33952/2542-0720-2021-2-26-127-144](https://doi.org/10.33952/2542-0720-2021-2-26-127-144)
18. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А., Зинатуллина А.Е. Эмбриональные данные в биотехнологических исследованиях засухоустойчивости пшеницы в целях селекции // Известия Уфимского научного центра РАН. 2022. № 3. С. 16–22. DOI: [10.31040/2222-8349-2022-0-3-16-22](https://doi.org/10.31040/2222-8349-2022-0-3-16-22)
19. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А., Зинатуллина А.Е., Никонов В.И. Выявление засухоустойчивых генотипов пшеницы в культуре незрелых зародышей *in vitro* // Вестник БГАУ. 2019. Т. 52. № 4. С. 37–41. DOI: [10.31563/1684-7628-2019-52-4-37-41](https://doi.org/10.31563/1684-7628-2019-52-4-37-41)
20. Кудоярова Г.Р., Холодова В.П., Веселов Д.С. Современное состояние проблемы водного баланса растений при дефиците воды // Физиология растений. 2013. Т. 60. № 2. С. 155–165. DOI: [10.7868/S0015330313020140](https://doi.org/10.7868/S0015330313020140)
21. Основы биотехнологии растений / Б.Р. Кулуев, Н.Н. Круглова, А.А. Зарипова, Р.Г. Фархутдинов. Уфа: РИЦ БашГУ, 2017. 244 с.
22. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980. 304 с.
23. Россеев В.М., Белан И.А., Россеева Л.П. Использование метода *in vitro* в селекции пшеницы мягкой яровой // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2016. № 2 (136). С. 5–9.
24. Эмбриокультура растений в создании новых сортов / Рихтер Ал.А., Рихтер В.А., Рихтер Ан.А. Симферополь: Ариал, 2022. 332 с.
25. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений / Н.Н. Круглова, О.В. Егорова, О.А. Сельдиминова, Д.Ю. Зайцев, А.Е. Зинатуллина. Уфа: Гилем, 2013. 128 с.
26. Сельдиминова О.А. Тестирование селективных агентов для оценки яровой мягкой пшеницы на устойчивость к засухе // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 1. С. 51–62. DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-1-51-62](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-1-51-62)
27. Ступко В.Ю., Зобова Н.В., Сидоров А.В., Гаевский Н.А. Перспективные способы оценки яровой мягкой пшеницы на чувствительность к эдафическим стрессам // Достижения науки и техники АПК. 2019. Т. 33. № 10. С. 45–50. DOI: [10.24411/0235-2451-2019-11010](https://doi.org/10.24411/0235-2451-2019-11010)

28. *Blaydes D.F.* Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean // *Physiol. Plant.* 1966. V. 19. P. 748–753.
29. *Farooq M., Bramley H., Palta J.A., Siddique K.H.M.* Heat Stress in Wheat during Reproductive and Grain-Filling Phases // *Critical Reviews in Plant Sciences.* 2011. V. 30. P. 491–507. DOI: [10.1080/07352689.2011.615687](https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615687)
30. *Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E.* Structural features and hormonal regulation of the zygotic embryogenesis in cereals // *Biology Bulletin Review.* 2020a.V. 10. P. 115–126. DOI: [10.1134/S2079086420020048](https://doi.org/10.1134/S2079086420020048)
31. *Kruglova N.N., Titova G.E., Zinatullina A.E.* Critical Stages of Cereal Embryogenesis: Theoretical and Practical Significance // *Russian Journal of Developmental Biology.* 2022. V. 53. P. 405–420. DOI: [10.1134/S1062360422060042](https://doi.org/10.1134/S1062360422060042)
32. *Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E., Veselov D.S.* Embryo of Flowering Plants as the Critical Stage of Embryogenesis Relative Autonomy (by Example of Cereals) // *Russian Journal of Developmental Biology.* 2020b. V. 51. P. 1–15. DOI: [10.1134/S1062360420010026](https://doi.org/10.1134/S1062360420010026)
33. *Kruglova N.N., Zinatullina A.E.* In Vitro Culture of Autonomous Embryos as a Model System for the study of Plant Stress Tolerance to Abiotic Factors (on the Example of Cereals) // *Biology Bulletin Review.* 2022. V. 12. P. 201–211. DOI: [10.1134/S2079086422020050](https://doi.org/10.1134/S2079086422020050)
34. *Kruglova N.N., Zinatullina A.E.* Some Methodological Approaches to the Identification of Heat-Resistant Genotypes of Crop Plants (by the Example of Cereals) // *Biology Bulletin Review.* 2023. V. 13. P. 371–381. DOI: [10.1134/S2079086423040060](https://doi.org/10.1134/S2079086423040060)
35. *Kumar M., Patel M.K., Kumar N., Bajpei A.B., Siddique K.H.M.* Metabolomics and Molecular Approaches Reveal Drought Stress Tolerance in Plants // *International Journal of Molecular Sciences.* 2021. V. 22. DOI: [10.3390/ijms22179108](https://doi.org/10.3390/ijms22179108)
36. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473-497. DOI [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)
37. *Plant life under changing environment: responses and management / D.K. Tripathi (ed.).* New York: Academic Press (Elsevier), 2020. 1020 p. DOI: [10.1016/C2018-1-02300-8](https://doi.org/10.1016/C2018-1-02300-8)
38. *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols / T.A. Thorpe, E.C. Yeung (eds.).* New York; London; Dordrecht; Heidelberg: Springer, 2011. 377 p.
39. *Sallam A., Alqudah A. M., Dawood M. F., Baenziger P. S., Borner A.* Drought stress tolerance in wheat and barley: advances in physiology, breeding and genetics research // *International Journal of Molecular Sciences.* 2019. V. 20. DOI: [10.3390/ijms20133137](https://doi.org/10.3390/ijms20133137)

Цитировать как

Круглова Н.Н. Биотехнологический метод селективной эмбриокультуры *in vitro* автономных зародышей в ускоренной оценке засухоустойчивости гибридных комбинаций хлебных злаков // *Экобиотех*, 2024, Т. 7 № 3. С. 164-175. DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-3-164-175](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-3-164-175)
EDN: PTPZFP

Cited as

Kruglova N.N. Biotechnological method of selective embryo culture *in vitro* of autonomous embryos for the accelerated assessment of drought resistance of cereal hybrid combinations (using the example of spring soft wheat). *Ėkobioteh.* 2024, V. 7 (3). P. 164-175. DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-3-164-175](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-3-164-175)
EDN: PTPZFP (In Rus.)