УДК 581:3: 576.3:576.535:577.175.152
EDN HEBDGL

Круглова Н. Н., Сельдимирова О. А.

ЭМБРИОГЕНЕЗ *IN VIVO* ЗАСУХОУСТОЙЧИВЫХ РЕГЕНЕРАНТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ, ПОЛУЧЕННЫХ В ЭМБРИОКУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Уфимский институт биологии – обособленное структурное подразделение
ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук»

Реферат. *Разработанная авторами модификация биотехнологического метода селективной эмбриокультуры in vitro автономных зародышей с введением в состав питательной среды 8 % маннита для моделирования условий засухи позволяет получать засухоустойчивые регенеранты яровой мягкой пшеницы. Важно проанализировать эмбриональные показатели засухоустойчивых регенерантов в полевых условиях in vivo. Цель работы состояла в изучении эмбриогенеза in vivo засухоустойчивых регенерантов яровой мягкой пшеницы гибрида Л42938 × Салават Юлаев, отобранных в селективной эмбриокультуре in vitro (опыт), в вегетационные сезоны 2020 г. (умеренно влажный год) и 2021 г. (засушливый год). Проведено сравнение с аналогичными показателями незасухоустойчивого гибрида яровой мягкой пшеницы Боевчанка × Ирень (контроль). Исследования проводили в Уфимском районе Республики Башкортостан. Использовали методы искусственного опыления, фенологических наблюдений и светооптического анализа. Установлено, что зародыши обоих гибридов в оба года исследований развивались согласно Graminad-типу эмбриогенеза, при этом последовательно проходили стадии зиготы (0,5 сут после опыления), двуклеточного (1,5 сут после опыления), четырехклеточного (2,5 сут после опыления), многоклеточного (4,0 сут после опыления) зародыша, стадию органогенеза (5,5–23,0 сут после опыления). Зрелые зародыши формировались к 25,0 сут после опыления и характеризовались типичным для злаков строением. В умеренно влажный 2020 г. зародыши и в опыте, и в контроле развивались без отклонений от нормы. Воздействие повышенной температуры воздуха в засушливый 2021 г. не оказало влияния на процесс эмбриогенеза и структуру развивающихся зародышей засухоустойчивых регенерантов (опыт), однако привело к остановке в развитии, аномалиям структуры и дегенерации 24,1 % зародышей на разных стадиях эмбриогенеза незасухоустойчивого гибрида (контроль). Сделан вывод о целесообразности использования засухоустойчивых регенерантов, полученных в селективной эмбриокультуре in vitro, в селекционных программах, направленных на ускоренное создание устойчивых к дефициту влаги районированных сортов яровой мягкой пшеницы.*

Ключевые слова: *Triticum aestivum L., эмбриогенез in vivo, селективная эмбриокультура in vitro, засухоустойчивость.*

Для цитирования: *Круглова Н. Н., Сельдимирова 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. EDN: HEBDGL.*

For citation: *Kruglova N. N., Seldimirova O. A. Embryogenesis in vivo of drought-resistant regenerants of spring soft wheat obtained by embryo culture in vitro // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2022. No. 1(29). P. 65–78. EDN: HEBDGL.*

Введение

Засуха как один из наиболее распространенных абиотических стресс-факторов приводит к значительным потерям урожая сельскохозяйственных

растений [1]. Селекционеры разрабатывают различные способы создания засухоустойчивых сортов экономически важных культур, в том числе основного хлебного злака – пшеницы [2–4].

Эффективность селекционных программ по созданию засухоустойчивых районированных сортов пшеницы во многом базируется на реализации адаптивного потенциала уже имеющихся и вновь создаваемых генотипов. Более полно выявить различные адаптивные программы развития селекционных образцов позволяет биотехнологический метод культивирования разновозрастных зиготических зародышей (эмбриокультура *in vitro*) [5]. При оценке способности генотипа противостоять засухе зародыши инокулируют на селективные питательные среды, в состав которых введены осмотические имитаторы засухи (сахароза, маннит, сорбит, полиэтиленгликоль и др.) эмпирически подобранных концентраций; генотип оценивается как засухоустойчивый в случае формирования из зародышей в условиях *in vitro* и *ex vitro* фертильных регенерантов с нормально развитыми семенами [6]. Для злаков установлено, что в качестве эксплантов перспективно использование именно незрелых зародышей, наиболее отзывчивых на условия селективной эмбриокультуры *in vitro* в силу как эпигенетической модификации ДНК, так и наличия специфических транскрипционных факторов [7]. Особый интерес в этом отношении вызывают незрелые зародыши, находящиеся в стадии автономности (у пшеницы 15–17 сут после опыления) и тем самым способные завершить эмбриогенез вне материнского организма [8].

На основе использования автономных незрелых зародышей с учетом их цитофизиологических показателей нами разработана модификация метода селективной эмбриокультуры *in vitro* яровой мягкой пшеницы, направленная на получение устойчивых к засухе регенерантов [9]. Модификация прошла апробацию на примере 17 генотипов (сортов и гибридных линий) этого хлебного злака. Было установлено, что полученные засухоустойчивые регенеранты по последовательности прохождения и продолжительности фенологических фаз в лабораторных условиях *ex vitro* развиваются сходно с развитием донорных растений в полевых условиях *in vivo*; такие регенеранты формируют зрелые зерновки высокого качества, что подтверждается показателями их лабораторной всхожести [10].

Однако, чтобы рекомендовать данную модификацию к массовому биотехнологическому применению в селекционных целях создания засухоустойчивых генотипов пшеницы, важно проанализировать эмбриональные показатели регенерантов в полевых условиях *in vivo*. 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 хлебных злаков, как показывает анализ доступной литературы, оригинален в биотехнологической практике.

Цель исследований – изучение эмбриогенеза *in vivo* засухоустойчивых регенерантов яровой мягкой пшеницы, отобранных в селективной эмбриокультуре *in vitro* автономных зародышей.

Материалы и методы исследований

Материалом для исследований послужили засухоустойчивые регенеранты яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. гибридной линии Л42938 × Салават Юлаев. Регенеранты были ранее отобраны в эмбриокультуре *in vitro* автономных зародышей на селективном фоне с введением 8 % маннита для моделирования засухи [10]. В качестве контроля использовали растения яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. гибридной линии Боевчанка × Ирень. Ранее эта линия в тех же условиях эмбриокультуры *in vitro* была оценена как незасухоустойчивая, не

формирующая регенеранты [10], поэтому в данных исследованиях использовали зрелые зерновки исходных растений.

Исследования проводили на опытных участках научного стационара Уфимского института биологии – обособленного структурного подразделения ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук». Стационар расположен в Уфимском районе Республики Башкортостан (54.35° с. ш., 55.37° в. д.); почва территории стационара – чернозем выщелоченный [11].

Опытные и контрольные растения выращивали в течение весенне-летних сезонов 2020 г. и 2021 г. В Уфимском районе в этот период 2020 г. зарегистрирована среднемесячная температура воздуха в мае +13,6 °С, июне – +17,3 °С, июле – +18,9 °С, августе – +18,6 °С [12]; в соответствующий период 2021 г. этот показатель составил в мае +16,7 °С, июне – +19,1 °С, июле – +21,9 °С, августе – +20,7 °С [13]. 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 [14].

В каждый год исследования высевали по 100 зрелых зерновок опытного и контрольного образцов.

Наступление фенологических фаз развития растений в опыте и контроле оценивали по [15].

Учитывая, что пшеница – это самоопыляющееся растение [15], во время фенологической фазы цветения (вторая декада июля каждого года исследований) зрелой пыльцой опытных и контрольных растений провели искусственное опыление собственных 10 цветков средней трети главного колоса. В каждом случае выборка составляла 25 главных колосьев 25 растений; в целом, в оба года исследования провели искусственное опыление по 250 цветков в опыте и контроле.

В течение 25 сут (вторая декада июля – вторая декада августа каждого года исследования, во время которых наблюдали фенологические фазы цветения, молочной, восковой и полной спелости зерна) через каждые 0,5 сут после опыления (СПО) развивающиеся зародыши опытных и контрольных растений фиксировали в реактиве Чемберлена [16], при этом на каждый срок выборочно фиксировали по 5 зародышей с главных колосьев разных растений. Всего в опыте и контроле в каждый год исследования провели по 48 фиксаций, зафиксировали по 240 зародышей на последовательных стадиях развития. Зародыши до времени исследования хранили в реактиве Чемберлена в условиях холодильной камеры POZIS (РФ) при +4 …+8 °С.

Постоянные гистологические препараты зародышей каждого срока фиксации готовили по [16] с окрашиванием толуидиновым синим или тройным окрашиванием реактивом Шиффа, гематоксилином по Эрлиху, алциановым синим.

Препараты анализировали с использованием микроскопа проходящего света Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Germany), оснащенного объективом EC Plan-NEOFLURAL 10×0,3. Наиболее удачные препараты зародышей каждого срока фиксации фотографировали с использованием цифровой фотокамеры AxioCam MRc5 с программным обеспечением Axio Vision 4.7 (Carl Zeiss, Germany).

Результаты и их обсуждение

Сравнительный анализ гистологических препаратов развивающихся зародышей засухоустойчивых регенерантов гибридной линии Л42938 × Салават Юлаев показал сходство процесса эмбриогенеза в оба года исследований. Приведем данные, полученные в засушливом 2021 г.

Через 0,5 СПО в микропилярной зоне зародышевого мешка выявлялась зигота. В этой клетке крупное ядро и большая часть цитоплазмы располагались в апикальной части, а большая вакуоль – в базальной (рисунок 1 а). Таким образом, зиготе уже с момента возникновения свойственна полярность в виде существования апикально-базальной оси, отражающей дифференцированное состояние клетки и, по мнению некоторых исследователей [17], служащей основой полярности будущего зародыша цветковых растений. Считается, что и дорсовентральность строения, характерная для зародышей злаков, начинает устанавливаться также на стадии зиготы, как это показано на примере пшеницы в модельных условиях *in vitro* [18].

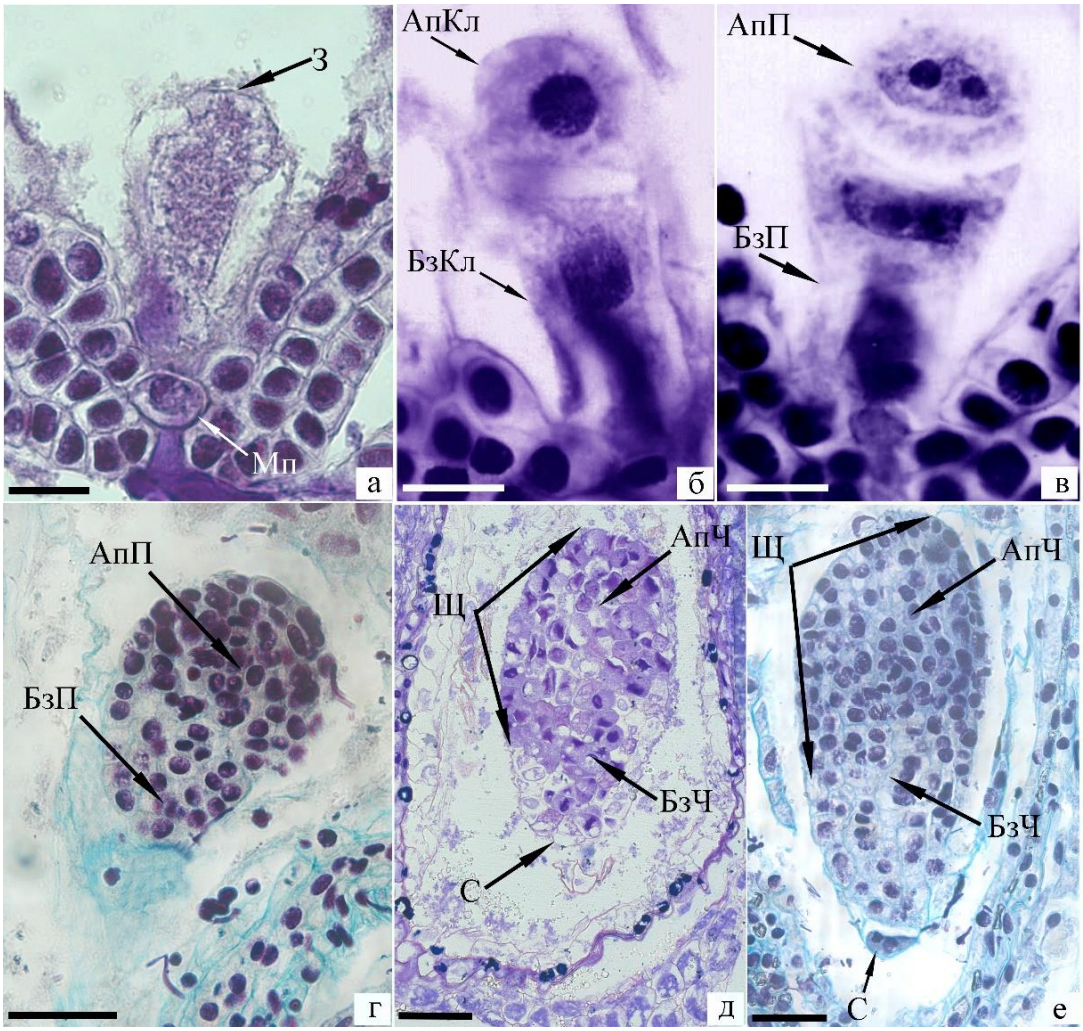

Рисунок 1 – Зародыши регенерантов гибрида пшеницы Л42938 × Салават Юлаев через 0,5–7,5 сут после опыления

Примечания: *а – зигота, продольный срез, 0,5 сут после опыления; б – двуклеточный зародыш, продольный срез, 1,5 сут после опыления; в – четырехклеточный зародыш, продольный срез, 2,5 сут после опыления; г – многоклеточный зародыш, продольный срез, 4,0 сут после опыления; д – заложение щитка в многоклеточном зародыше, продольный срез, 5,5 сут после опыления; е – смещение щитка в многоклеточном зародыше, продольный срез, 7,5 сут после опыления. АпКл – апикальная клетка, АпП – апикальный полюс, АпЧ – апикальная часть, БзКл – базальная клетка, БзП – базальный полюс, БзЧ – базальная часть, З – зигота, МП – микропиле, С – суспензор, Щ – щиток. Масштаб: а–в – 20 мкм; г–е – 50 мкм.*

На 1,5 СПО зигота делилась с образованием двуклеточного зародыша. При этом в результате асимметричного деления зиготы формировались две неравные клетки: более мелкая апикальная и более крупная базальная (рисунок 1, б). Такие структурные различия сопряжены с функциональными различиями в процессе преобразований каждой из клеток в ходе дальнейшего развития зародыша [19]. Таким образом, именно у двуклеточного зародыша впервые проявлялась специализация клеток.

Два последующих, также асимметричных, деления апикальной и базальной клеток приводили к формированию четырехклеточного зародыша на 2,5 СПО. Такой зародыш характеризовался наличием двух клеток апикального (будущего побегового) и двух клеток базального (будущего корневого) полюсов (рисунок 1 в). Следует отметить, что фигура деления располагалась наклонно к продольной оси двуклеточного зародыша. Высказано мнение, что такое наклонное положение клеточной перегородки влияет на дальнейшее формирование дорсовентральности строения зародыша [20].

На 4,0 СПО в результате интенсивных делений клеток апикального и базального полюсов формировался многоклеточный зародыш. Предполагается [21], что зародыш при этом накапливает критическую массу, необходимую для формирования органов. Зародыш рос в основном в продольном направлении, а процесс деления клеток отмечался главным образом на апикальном полюсе (рисунок 1 г).

Дальнейшее развитие связано с морфологической дифференциацией клеточной массы зародыша, что приводило к формированию органов. Первым из органов на 5,5 СПО латерально формировался щиток – единственная семядоля. При этом продолжались интенсивные клеточные деления в апикальной части зародыша. В базальной же части зародыша клетки значительно увеличивались в размерах, сильно вакуолизировались, в них уменьшалось количество цитоплазмы. Базальную часть такого зародыша следует определить как суспензор (рисунок 1 д). На 7,5 СПО в зародыше происходили сложные клеточные преобразования, в результате которых щиток из латерального положения постепенно смещался в терминальное (рисунок 1 е).

На 10,5 СПО в апикальной части зародыша под щитком формировалась точка роста (будущий апекс побега) в виде очага меристематических клеток (рисунок 2 а).

На 13,0 СПО опыления точка роста преобразовалась в апекс побега. Формировался следующий орган – колеоптиль, имевший вид полого конуса с расположенным в верхней его части щелевидным отверстием. В базальной части зародыша происходило эндогенное обособление меристемы главного зародышевого корня. Щиток приобретал вытянутую форму (рисунок 2 б).

В ходе дальнейшего развития зародыша, на 15,5 СПО после опыления, отверстие колеоптиля сужалось. В области под колеоптилем формировался ещё один орган – эпибласт. Главный зародышевый корень удлинялся в базальном направлении, под ним формировался следующий орган – колеориза (корневое влагалище). Щиток сильно удлинялся, на его брюшной стороне в виде выроста формировалась лигула (рисунок 2 в). Со стороны щитка формировалась питающая ткань – эндосперм (анализ формирования и развития эндосперма не входил в наши задачи).

Формирование органов зародыша полностью завершалось на 17,0 СПО. В сформированном зародыше отмечались все характерные для злаков [22] органы: семядоля-щиток с выростом-лигулой, колеоптиль, эпибласт, зародышевый корень, колеориза, а также почечка, состоявшая из апекса побега, первого листа и примордия второго листа (рисунок 2 г).

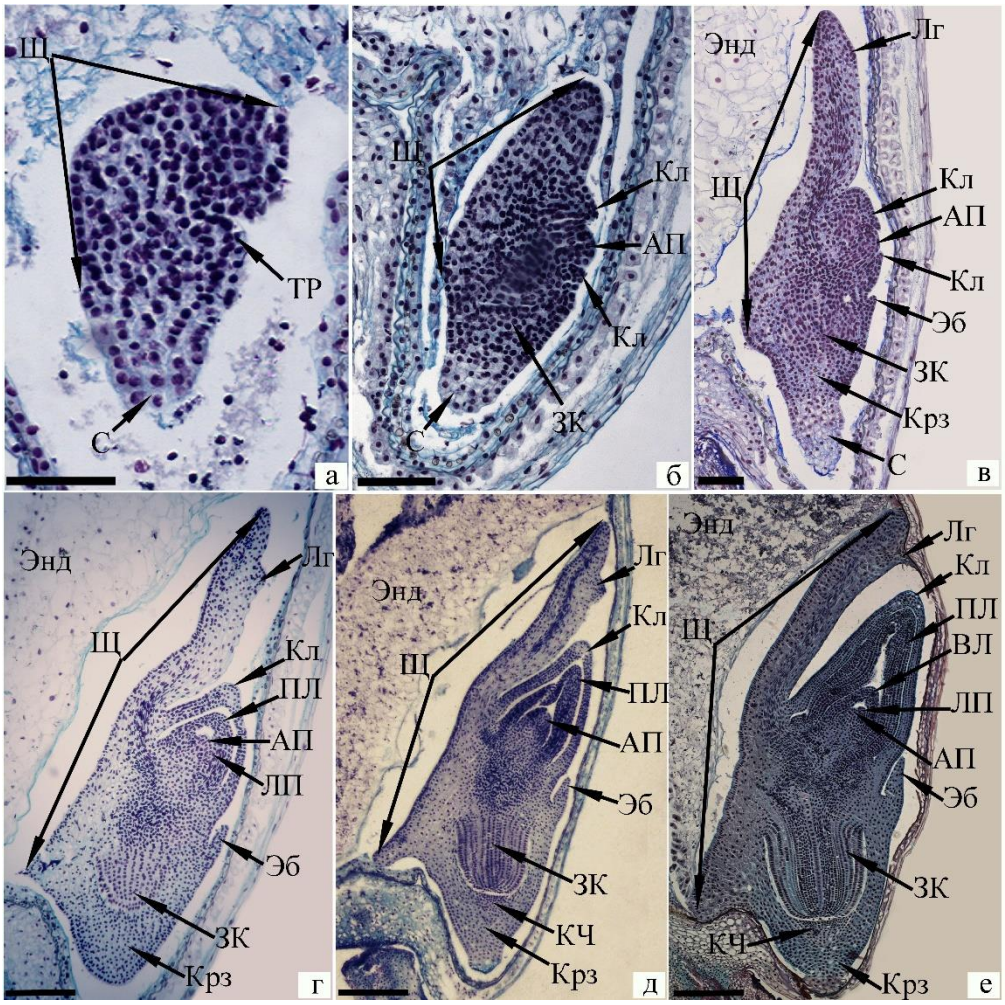

Рисунок 2 – Зародыши регенерантов гибрида пшеницы Л42938 × Салават Юлаев через 10,5–25,0 сут после опыления

Примечания: *а – формирование точки роста, продольный срез, 10,5 сут после опыления; б – формирование апекса побега и главного зародышевого корня, продольный срез, 13,0 сут после опыления; в – формирование эпибласта, колеоризы, лигулы, продольный срез, 15,5 сут после опыления; г – сформированный зародыш, продольный срез, 17,0 сут после опыления; д – формирование корневого чехлика, продольный срез, 21,0 сут после опыления; е – зрелый зародыш, продольный срез, 25,0 сут после опыления. АП – апекс побега, ВЛ – второй лист, ЗК – главный зародышевый корень, Кл – колеоптиль, Крз – колеориза, КЧ – корневой чехлик, Лг – лигула, ЛП – листовой примордий, ПЛ – первый лист, С – суспензор, ТР – точка роста, Щ – щиток, Эб – эпибласт, Энд – эндосперм. Масштаб: а–в – 100 мкм; г–е – 400 мкм.*

Далее (21,0–25,0 СПО) происходил активный рост зародыша благодаря растяжению составляющих его клеток. На 21,0 СПО зародышевый корень полностью отделялся от колеоризы; формировался корневой чехлик (рисунок 2 д). На 23,0 СПО в почечке закладывался второй лист (данные не приведены).

Зародыш на 25,0 СПО является зрелым (рисунок 2 е). Каждый из сформировавшихся органов зрелого зародыша злаков играет определенную роль. Так, основная функция щитка – установление связи между питательной тканью – эндоспермом и всеми органами зародыша; колеоптиль служит для защиты конуса нарастания при «пробивании» почвы прорастающей зерновкой; колеориза и эпибласт участвуют в поставке воды развивающемуся зародышу [22].

Таким образом, в своем развитии зародыши засухоустойчивых регенерантов гибридной линии яровой мягкой пшеницы Л42938 × Салават Юлаев в условиях выполненных исследований в умеренно влажный (2020 г.) и засушливый (2021 г.) годы последовательно проходили стадии зиготы (0,5 СПО), двуклеточного (1,5 СПО), четырехклеточного (2,5 СПО), многоклеточного (4,0 СПО) зародыша, а также длительную стадию органогенеза (5,5–23,0 СПО). Зрелые зародыши формировались на 25,0 СПО и содержали типичные для злаков органы. В целом, эмбриогенез по последовательности прохождения стадий развития и их длительности протекал согласно Graminad-типу, характерному для представителей семейства злаков [21]. Полученные эмбриональные результаты в оба года исследований полностью совпадают с литературными данными по эмбриогенезу яровой мягкой пшеницы сорта Диамант [14] и озимой мягкой пшеницы сортов Мечта 1 и Мироновская 808 [23], а также с результатами проведенного нами ранее исследования эмбриогенеза яровой мягкой пшеницы гибридной линии Фотос [24]. Важно подчеркнуть, что засушливые условия 2021 г. не оказали влияния на нормальный ход эмбриогенеза засухоустойчивых регенерантов.

Несколько иные результаты получены при анализе гистологических препаратов зародышей незасухоустойчивой гибридной линии яровой мягкой пшеницы Боевчанка × Ирень. Установлено, что в целом развитие зародышей этого гибрида в оба года исследований по последовательности и длительности стадий эмбриогенеза не отличалось от аналогичных событий у засухоустойчивых регенерантов, однако в засушливый 2021 г. отмечены различные аномалии и дегенерации структуры части развивающихся зародышей практически на всех стадиях эмбриогенеза.

Так, на 0,5 СПО выявлены случаи потери полярности зиготой (рисунок 3 а), на 1,5 СПО – равные по объему апикальная и базальная клетки двуклеточного зародыша как результат аномального деления зиготы (рисунок 3 б), на 2,5 СПО – четырехклеточный зародыш аномального строения (рисунок 3 в). На 4,5–7,5 СПО отмечена дегенерация некоторых многоклеточных зародышей, при этом зародыши располагались или поперечно относительно продольной оси формирующейся зерновки, то есть аномально (рисунок 3 г-ж), или сохраняли продольное расположение (рисунок 3 з). Важно отметить, что сопряженно с дегенерацией зародышей дегенерировал и эндосперм (рисунок 3 а-з). В ряде случаев отмечена остановка в развитии зародышей: на 13,5 СПО выявлены зародыши ещё в многоклеточной стадии (рисунок 3 и), на 21,0 СПО – зародыши ещё в стадии органогенеза (рисунок 3 к). Отмечены аномалии и в структуре некоторых зрелых зародышей на 25,0 СПО: боковое расположение главного зародышевого корня (рисунок 3 л), нарушения морфологии щитка, колеоптиля и колеоризы (рисунок 3 м), формирование дополнительного главного зародышевого корня (рисунок 3 н), срастание колеоптиля и первых листьев (рисунок 3 о).

Количество таких отклонений от нормы отмечено у 58 из 240 просмотренных зародышей (24,1 %).

Известно, что развивающиеся зародыши пшеницы чувствительны к действию температур воздуха даже на доли градуса выше оптимальной [25]. Физиологически оптимальной температурой воздуха в период формирования и созревания зерновок (и, соответственно, развития зародыша) яровой пшеницы в полузасушливых агроклиматических зонах, к каким относится Южный Урал [26], считается показатель +19,0 °С [27]. В умеренно влажный 2020 г. среднемесячные показатели температуры воздуха во время эмбриогенеза изученных гибридных комбинаций в регионе проведения полевых исследований составили в июле +18,9 °С, в августе

+18,6 °С [12], то есть почти соответствовали физиологически оптимальной температуре. В соответствующие периоды засушливого 2021 г. эти показатели составили в июле +21,9 °С, в августе – +20,7 °С [13], то есть были выше физиологически оптимальной температуры.

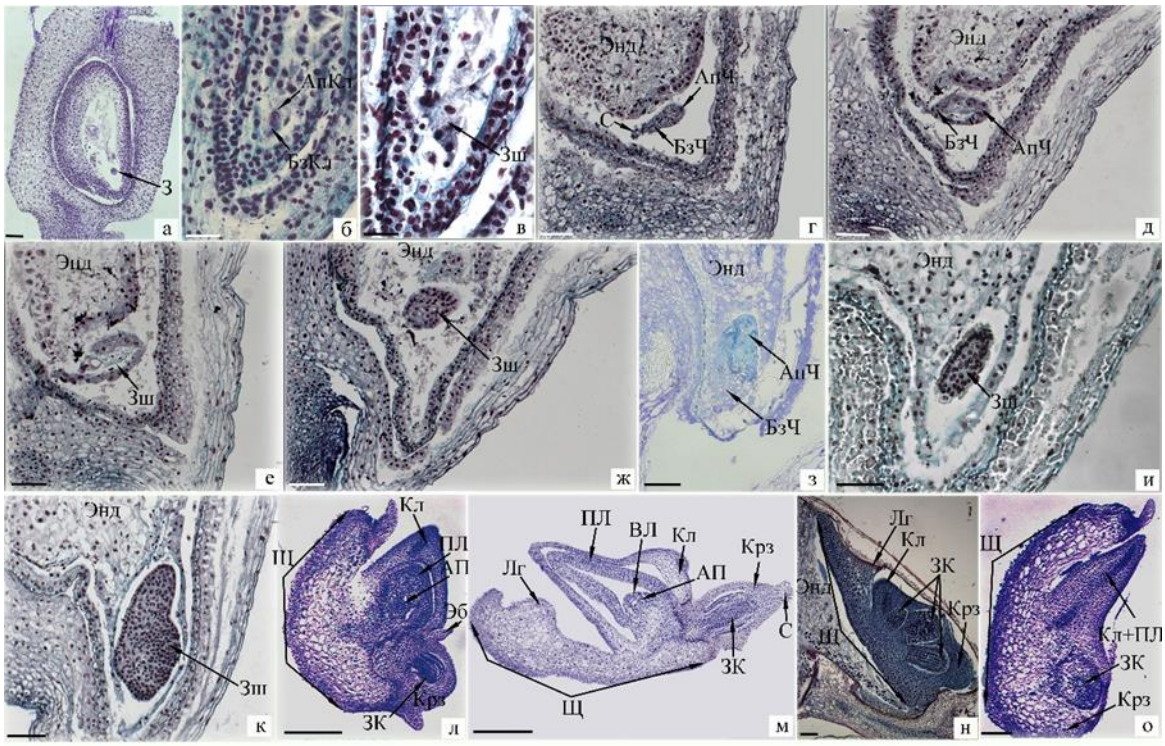

Рисунок 3 – Зародыши гибрида пшеницы Боевчанка×Ирень через 0,5–25,0 сут после опыления

Примечания: *а – аномальная неполяризованная зигота, продольный срез, 0,5 сут после опыления; б – аномальный двуклеточный зародыш с равными клетками, продольный срез, 1,5 сут после опыления; в – четырехклеточный зародыш аномальной строения, продольный срез, 2,5 сут после опыления; дегенерация многоклеточных зародышей на 4,5 (г), 5,0 (д), 5,5 (е), 6,0 (ж), 7,5 (з) сут после опыления, продольные срезы; и – многоклеточный зародыш, продольный срез, 13,5 сут после опыления; к – зародыш в стадии органогенеза, продольный срез, 21,0 сут после опыления; аномалии структуры зрелых зародышей на 25,0 сут после опыления: боковое расположение главного зародышевого корня (л), нарушения морфологии щитка, колеоптиля и колеоризы (м), формирование дополнительного зародышевого корня (н), срастание колеоптиля и первых листьев (о).*
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. Масштаб: а, г, д–к – 100 мкм, б, в – 50 мкм, л, м – 500 мкм, н – 200 мкм, о – 250 мкм.

Почти четверть зародышей незасухоустойчивой гибридной линии Боевчанка × Ирень практически на всех стадиях эмбриогенеза оказалась чувствительной к воздействию температуры воздуха выше физиологического оптимума (2021 г.), что выразилось в аномалиях и дегенерации структуры зародышей или остановке их развития. Полученные данные во многом совпадают с крайне немногочисленными литературными сведениями о влиянии повышенного температурного фактора на структуру развивающихся зародышей пшеницы в полевых условиях. Так, авторы работы [23], анализируя результаты гистологического анализа зародышей озимой мягкой пшеницы на последовательных стадиях эмбриогенеза при выращивании в полевой лаборатории, также выявили

аномалии в строении зародышей при повышенных температурах, однако только во второй половине эмбриогенеза.

В то же время эмбриогенез засухоустойчивых регенерантов гибридной линии Л42938 × Салават Юлаев в условиях умеренной влажности (2020 г.) и засушливости (2021 г.), а также эмбриогенез незасухоустойчивой гибридной линии Боевчанка × Ирень при умеренной влажности (2020 г.) проходил без всяких отклонений от нормы на всех стадиях от зиготы до зрелой структуры.

Результаты, полученные для обеих изученных гибридных линий, подтверждают данные о важнейшей роли генотипа в реакции растений на дефицит влаги [28]. Кроме того, эти данные, по нашему мнению, свидетельствуют о верной оценке признака «засухоустойчивость» у гибридной линии Л42938 × Салават Юлаев в селективной эмбриокультуре *in vitro*.

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 [29] до направленного индуцирования изменений в геноме на основе биологических феноменов сомаклональной и эпигенетической изменчивости [30, 31]. 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 условиях *in vivo* протекает уже без отклонений от нормы. По крайней мере, согласно полученным нами данным, для гибридной линии Л42938 × Салават Юлаев, это справедливо в отношении эмбриональных признаков, весьма консервативных в эволюционном плане [32].

В целом, анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о целесообразности использования как разработанной авторами модификации метода селективной эмбриокультуры *in vitro* автономных зародышей, так и полученных засухоустойчивых регенерантов в селекционных программах, направленных на создание устойчивых к дефициту влаги районированных сортов яровой мягкой пшеницы. Безусловно, засухоустойчивость относится к мультигенным признакам, и для достоверного выявления этого признака у вновь созданных гибридных комбинаций пшеницы необходимо комплексное привлечение различных методов и подходов, как это подчеркивается в обобщении [33]. В то же время применение селективной эмбриокультуры *in vitro* автономных зародышей, при относительности полученных результатов, дает возможность провести быструю первичную оценку степени засухоустойчивости новых селекционных форм пшеницы на самых ранних этапах онтогенеза, уже через 15–17 сут после их получения методом гибридизации. Безусловно, это приводит к существенному выигрышу во времени в сравнении с оценкой устойчивости селекционных образцов к дефициту влаги традиционными полевыми методами [34].

Выводы

В данной работе представлены результаты изучения эмбриогенеза засухоустойчивых регенерантов яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. гибридной линии Л42938 × Салават Юлаев (опыт) в сравнении с эмбриогенезом незасухоустойчивой гибридной линии Боевчанка × Ирень (контроль) в полевых условиях *in vivo* в вегетационные сезоны 2020 г. (умеренно влажный год) и 2021 г. (засушливый год). В условиях выполненных исследований зародыши обеих

гибридных линий в оба года исследования развивались согласно характерному для злаков Graminad-типу эмбриогенеза, при этом последовательно проходили стадии зиготы (0,5 СПО), двуклеточного (1,5 СПО), четырехклеточного (2, 5 СПО), многоклеточного (4,0 СПО) зародыша, стадию органогенеза (5,5–23,0 СПО). Зрелые зародыши формировались на 25,0 СПО и содержали типичные для злаков органы: щиток с выростом-лигулой, колеоптиль, эпибласт, зародышевый корень, колеоризу, а также почечку, состоявшую из апекса побега, первого листа и примордия второго листа. В умеренно влажный 2020 г. зародыши и в опыте, и в контроле развивались без отклонений от нормы. Среднемесячные показатели температуры воздуха в засушливый 2021 г. при прохождении эмбриогенеза (+21,9 °С в июле, +20,7 °С в августе) были выше физиологического оптимума для эмбриогенеза пшеницы (+19,0 °С), однако не оказали влияния на процесс эмбриогенеза и структуру развивающихся зародышей засухоустойчивых регенерантов. В то же время 24,1 % просмотренных зародышей незасухоустойчивой гибридной линии оказались чувствительными к воздействию неблагоприятного повышения температуры воздуха, что выразилось в аномалиях и дегенерации структуры зародышей или остановке их развития.

Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о целесообразности использования как разработанной авторами модификации метода селективной эмбриокультуры *in vitro* автономных зародышей, так и полученных засухоустойчивых регенерантов в селекционных программах, направленных на создание устойчивых к дефициту влаги районированных сортов яровой мягкой пшеницы.

Авторы выражают искреннюю благодарность заведующему лабораторией селекции и пшеницы Башкирского НИИ СХ УФИЦ РАН к.с-х.н. В.И. Никонову за материал для исследований, предоставленный согласно договору о сотрудничестве между институтами (2018–2023 гг.).

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190099-6 с использованием оборудования Центра коллективного пользования УФИЦ РАН «Агидель».

Литература

1. Plant life under changing environment: responses and management / Ed. by Tripathi D. K. Academic Press (Elsevier), 2020. 1020 p. DOI: 10.1016/C2018-1-02300-8.
2. Mwadzingeni L., Shimelis H., Dube E., Laing M. D., Tsilo T. J. Breeding wheat for drought tolerance: progress and technologies // Journal of Integrative Agriculture. 2016. Vol. 15. No. 5. P. 935–943. DOI: 10.1016/S2095-3119(15)61102-9.
3. Raveena, Bharti R., Chaudhary N. Drought resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.): a review // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2019. Vol. 8. No. 9. P. 1780–1792. DOI: 10.20546/ijcmas.2019.809.206.
4. 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. Vol. 20. No. 13. DOI: 10.3390/ijms20133137.
5. Kumari P., Thaneshwari R. Embryo rescue in horticultural crops // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2018. Vol. 7. P. 3350–3358. DOI: 10.20546/ijcmas.2018.706.393.
6. Круглова Н. Н., Сельдимирова О. А., Зинатуллина А. Е. Эмбриокультура *in vitro* в экспериментальной оценке засухоустойчивости хлебных злаков (обзор) // Таврический вестник аграрной науки. 2021. № 2(26). С. 127–144. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-2-26-127-144.
7. Baillo E. H., Kimotho R. N., Zhang Z., Xu P. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement // Genes. 2019. Vol. 10. DOI: 10.3390/genes10100771.

8. Kruglova N. N., Titova G. E., Seldimirova O. A., Zinatullina A. E., Veselov D. S. Embryo of flowering plants at the critical stage of embryogenesis relative autonomy (by example of cereals) // Russian Journal of Developmental Biology. 2020. Vol. 51. No. 1. P. 1–15. DOI: 10.1134/S1062360420010026.

9. Кулуев Б. Р., Круглова Н. Н., Зарипова А. А., Фархутдинов Р. Г. Основы биотехнологии растений. Уфа: изд-во Башкирского государственного университета, 2017. 244 с.

10. Круглова Н. Н., Сельдимирова О. А., Зинатуллина А. Е., Никонов В. И. Выявление засухоустойчивых генотипов пшеницы в культуре незрелых зародышей *in vitro* // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. 2019. Т. 52. № 4. С. 37–41. DOI: 10.31563/1684-7628-2019-52-4-37-41.

11. Почвы Башкортостана. Т. 1. Эколого-генетическая и агропроизводственная характеристика. Уфа: Гилем, 1995. 385 с.

12. Метеосводка за 2020 г. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.meteoservice.ru/archive/ufa/2020 (дата обращения 02.10.2021).

13. Метеосводка за 2021 г. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.meteoservice.ru/archive/ufa/2021 (дата обращения 02.10.2021).

14. Гидрометеоинформация [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.meteorb.ru/about/gidrometeorologicheskaya-informatsiya (дата обращения 02.10.2021).

15. Батыгина Т. Б. Хлебное зерно. Л.: Наука, 1987. 99 с.

16. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980. 304 с.

17. Harnvanichvech Y., Gorelova V., Sprakel J., Weijers D. The *Arabidopsis* embryo as a quantifiable model for studying pattern formation // Quantitative Plant Biology. 2021. Vol. 2. P. 1–13. DOI: 10.1017/qpb.2021.3.

18. Maryenti T., Kato N., Ichikawa M., Okamoto T. Establishment of an *in vitro* fertilization system in wheat *Triticum aestivum* L.) // Plant Cell Physiology. 2019. Vol. 60. No. 4. P. 835–843. DOI: 10.1093/pcp/pcy250.

19. Tian R., Paul P., Joshi S., Perry S.E. Genetic activity during early plant embryogenesis // Biochemical Journal. 2020. Vol. 477. P. 3743–3767. DOI: 10.1042/BCJ20190161.

20. Chakrabortty B., Willemsen V., de Zeeuw T., Liao C. Y., Weijers D., Mulder B., Scheres B. A plausible microtubule-based mechanism for cell division orientation in plant embryogenesis // Current Biology. 2018. Vol. 28. P. 3031–3048. DOI: 10.1016/j.cub.2018.07.025.

21. Батыгина Т. Б. Биология развития растений. Санкт-Петербург: ДЕАН, 2014. 764 с.

22. Kruglova N. N., Seldimirova O. A., Zinatullina A. E. Structural features and hormonal regulation of the zygotic embryogenesis in cereals // Biology Bulletin Reviews. 2020. Vol. 10. No. 2. P. 115–126. DOI: 10.1134/S2079086420020048.

23. Основы эмбриогенеза злаков // Под ред. Яковлева М. С. Киев: Наукова думка, 1991. 176 с.

24. Seldimirova O. A., Kruglova N. N., Titova G. E., Batygina T. B. Comparative ultrastructural analysis of the in vitro microspore embryoids and in vivo zygotic embryos of wheat as a basis for understanding of cytophysiological aspects of their development // Russian Journal of Developmental Biology. 2017. Vol. 48. No. 3. P. 185–197. DOI: 10.1134/S1062360417030109.

25. 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. Vol. 30. No. 6. P. 491–507. DOI: 10.1080/07352689.2011.615687.

26. Агроклиматические ресурсы Башкирской АССР. Л.: Гидрометеоиздат, 1976. 234 с.

27. Khan A., Ahmad M., Ahmed M., Hussain I. M. Rising atmospheric temperature impact on wheat and thermotolerance strategies // *Plants*. 2021. Vol. *10. No.* 43. DOI: 10.3390/plants10010043.

28. 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. Vol. 22. No. 17. DOI: 10.3390/ijms22179108.

29. Егорова Н. А. Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение *in vitro*. Симферополь: ИД «Автограф», 2021. 315 с. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4.

30. Bednarek P. T., Orlowska R. Plant tissue environment as a switch-key of (epi)genetic changes // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2020. Vol. 140. P. 245–257. DOI: 10.1007/s11240-019-01724-1.

31. Jacquier N. M. A., Gilles L. M., Martinant J.-P., Rogowsky P. M., Widiez T. Maize *in planta* haploid inducer lines: a cornerstone for doubled haploid technology // Methods in Molecular Biology. 2021. Vol. 2288. P. 25–48. DOI: 10.1007/978-1-0716-1335-1_2.

32. Radoeva T., Vaddepalli P., Zhang Z., Weijers D. Evolution, initiation, and diversity in early plant embryogenesis // Developmental Cell. 2019. Vol. 50. No. 5. P. 533–543. DOI: 10.1016/j.devcel.2019.07.011.

33. Пикало С., Демидов О., Юрченко Т., Хоменко С., Гуменюк О., Харченко М., Прокопік Н. Методи оцінки посухостійкості селекційного матеріалу пшениці // Вісник Львівського університету. Серія. біологічна. 2020. Вип. 82. С. 63–79. DOI: 10.30970/vlubs.2020.82.05.

34. Sattar S., Afzal R., Bashir I., Shahid A. Biochemical, molecular and morpho-physiological attributes of wheat to upgrade grain production and compete with water stress // International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research. 2019. Vol. 3. No. 3. P. 510–528. DOI: 10.29329/ijiaar.2019.206.16.

References

1. Plant life under changing environment: responses and management // Ed. by Tripathi D. K. Academic Press (Elsevier), 2020. 1020 p. DOI: 10.1016/C2018-1-02300-8.

2. Mwadzingeni L., Shimelis H., Dube E., Laing M. D., Tsilo T. J. Breeding wheat for drought tolerance: progress and technologies // Journal of Integrative Agriculture. 2016. Vol. 15. No. 5. P. 935–943. DOI: 10.1016/S2095-3119(15)61102-9.

3. Raveena, Bharti R., Chaudhary N. Drought resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.): a review // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2019. Vol. 8. No. 9. P. 1780–1792. DOI: 10.20546/ijcmas.2019.809.206.

4. 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. Vol. 20. No. 13. DOI: 10.3390/ijms20133137.

5. Kumari P., Thaneshwari R. Embryo rescue in horticultural crops // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2018. Vol. 7. P. 3350–3358. DOI: 10.20546/ijcmas.2018.706.393.

6. Kruglova N. N., Seldimirova O. A., Zinatullina A. E. Embryo culture *in vitro* in the experimental evaluation of drought resistance in cereals (review) // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2021. No. 2(26). P. 127–144. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-2-26-127-144.

7. Baillo E. H., Kimotho R. N., Zhang Z., Xu P. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement // Genes. 2019. Vol. 10. DOI: 10.3390/genes10100771.

8. Kruglova N. N., Titova G. E., Seldimirova O. A., Zinatullina A. E., Veselov D. S. Embryo of flowering plants at the critical stage of embryogenesis relative autonomy (by example of cereals) // Russian Journal of Developmental Biology. 2020. Vol. 51. No. 1. P. 1–15. DOI: 10.1134/S1062360420010026.

9. Kuluev B. R., Kruglova N. N., Zaripova A. A., Farkhutdinov R. G. Bases of plant biotechnology. Ufa: Publishing house of Bashkir State University, 2017. 244 p.

10. Kruglova N. N., Seldimirova O. A., Zinatullina A.E., Nikonov V. I. Identifying of drought tolerant wheat genotypes in culture of immature embryos *in vitro* // Vestnik of the Bashkir State Agrarian University. 2019. Vol. 52. No. 4. P. 37–41. DOI: 10.31563/1684-7628-2019-52-4-37-41.

11. Soils of Bashkortostan. Vol. 1. Ecological-genetic and agricultural characteristics. Ufa: Gilem, 1995. 385 p.

12. Weather report for 2020 [Electronic resource]. Access point: https://www.meteoservice.ru/archive/ufa/2020 (reference's date 02.10.2021).

13. Weather report for 2021 [Electronic resource]. Access point: https://www.meteoservice.ru/archive/ufa/2021 (reference's date 02.10.2021).

14. Hydrometeorological data [Electronic resource]. Access point: http://www.meteorb.ru/about/gidrometeorologicheskaya-informatsiya (reference's date 02.10.2021).

15. Batygina T. B. Cereals. Leningrad: Nauka, 1987. 99 p.

16. Pausheva Z. P. Workshop on plant cytology. Moscow: Kolos, 1980. 304 p.

17. Harnvanichvech Y., Gorelova V., Sprakel J., Weijers D. The *Arabidopsis* embryo as a quantifiable model for studying pattern formation // Quantitative Plant Biology. 2021. Vol. 2. P. 1–13. DOI: 10.1017/qpb.2021.3.

18. Maryenti T., Kato N., Ichikawa M., Okamoto T. Establishment of an *in vitro* fertilization system in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Plant Cell Physiology. 2019. Vol. 60. No. 4. P. 835–843. DOI: 10.1093/pcp/pcy250.

19. Tian R., Paul P., Joshi S., Perry S.E. Genetic activity during early plant embryogenesis // Biochemical Journal. 2020. Vol. 477. P. 3743–3767. DOI: 10.1042/BCJ20190161.

20. Chakrabortty B., Willemsen V., de Zeeuw T., Liao C. Y., Weijers D., Mulder B., Scheres B. A plausible microtubule-based mechanism for cell division orientation in plant embryogenesis // Current Biology. 2018. Vol. 28. P. 3031–3048. DOI: 10.1016/j.cub.2018.07.025.

21. Batygina T. B. Plant developmental biology. Saint-Petersburg: DEAN, 2014. 764 p.

22. Kruglova N. N., Seldimirova O. A., Zinatullina A. E. Structural features and hormonal regulation of the zygotic embryogenesis in cereals // Biology Bulletin Reviews. 2020. Vol. 10. No. 2. P. 115–126. DOI: 10.1134/S2079086420020048.

23. Bases of embryogenesis in cereals // Ed. by Yakovlev M. S. Kiev: Naukova dumka, 1991. 176 p.

24. Seldimirova O. A., Kruglova N. N., Titova G. E., Batygina T. B. Comparative ultrastructural analysis of the *in vitro* microspore embryoids and in vivo zygotic embryos of wheat as a basis for understanding of cytophysiological aspects of their development // Russian Journal of Developmental Biology. 2017. Vol. 48. No. 3. P. 185–197. DOI: 10.1134/S1062360417030109.

25. 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. Vol. 30. No. 6. P. 491–507. DOI: 10.1080/07352689.2011.615687.

26. Agro-climatic resources of the Bashkir ASSR. Leningrad: Gidrometeoizdat, 1976. 234 p.

27. Khan A., Ahmad M., Ahmed M., Hussain I. M. Rising atmospheric temperature impact on wheat and thermotolerance strategies // Plants. 2021. Vol. 10. No. 43. DOI: 10.3390/plants10010043.

28. 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. Vol. 22. No. 17. DOI: 10.3390/ijms22179108.

29. Yegorova N. A. Biotechnology of essential oil plants: creation of new forms and micropropagation *in vitro*. Simferopol: Publishing House «Autograph», 2021. 315 p. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4.

30. Bednarek P. T., Orlowska R. Plant tissue environment as a switch-key of (epi)genetic changes // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2020. Vol. 140. P. 245–257. DOI: 10.1007/s11240-019-01724-1.

31. Jacquier N. M. A., Gilles L. M., Martinant J.-P., Rogowsky P. M., Widiez T. Maize *in planta* haploid inducer lines: a cornerstone for doubled haploid technology // Methods in Molecular Biology. 2021. Vol. 2288. P. 25–48. DOI: 10.1007/978-1-0716-1335-1_2.

32. Radoeva T., Vaddepalli P., Zhang Z., Weijers D. Evolution, initiation, and diversity in early plant embryogenesis // Developmental Cell. 2019. Vol. 50. No. 5. P. 533–543. DOI: 10.1016/j.devcel.2019.07.011.

33. Pykalo S., Demidov O., Yurchenko T., Khomenko S., Gumenyuk O., Kharchenko M., Prokopik N. Methods for evaluation of wheat breeding material for drought tolerance // Visnyk of Lviv University. Biological series. 2020. Iss. 82. P. 63–79. DOI: 10.30970/vlubs.2020.82.05.

34. Sattar S., Afzal R., Bashir I., Shahid A. Biochemical, molecular and morpho-physiological attributes of wheat to upgrade grain production and compete with water stress // International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research. 2019. Vol. 3. No. 3. P. 510–528. DOI: 10.29329/ijiaar.2019.206.16.

UDC 581:3: 576.3:576.535:577.175.152

Kruglova N. N., Seldimirova O. A.

EMBRYOGENESIS *IN VIVO* OF DROUGHT-RESISTANT REGENERANTS OF SPRING SOFT WHEAT OBTAINED BY EMBRYO CULTURE *IN VITRO*

Summary. *The modification of the biotechnological method of selective embryo culture in vitro of autonomous embryos developed by the authors with the introduction of 8% mannitol into the nutrient medium for modeling drought conditions makes it possible to obtain drought-resistant spring soft wheat regenerants. It is important to analyze the embryonic characteristics of drought-resistant regenerants in the field conditions in vivo. The aim of our work was to study the embryogenesis in vivo of drought-resistant regenerants of spring soft wheat hybrid L42938 × 'Salavat Yulaev', picked in selective embryo culture in vitro (experiment) during the growing seasons of 2020 (moderately humid year) and 2021 (dry year). Obtained data were compared with similar indicators of the non-drought-resistant hybrid of spring soft wheat 'Boevchanka' x 'Iren' (control). The study was conducted in the Ufa district, Republic of Bashkortostan. Methods of artificial pollination, phenological observations and light-optical analysis were used. During the years of research, embryos of both hybrids developed according to Graminad-type of embryogenesis and passed successively the stages of zygote (0.5 days after pollination),*

two-cellular (1.5 days after pollination), four-cellular (2.5 days after pollination), multicellular (4.0 days after pollination) embryo, as well as the stage of organogenesis (5.5–23.0 days after pollination). Mature embryos were formed by the 25th day after pollination; their structure was typical for cereals. In moderately humid 2020, embryos, both in the experiment and control, developed without deviations from the norm. Influence of elevated air temperature in dry 2021 did not affect the process of embryogenesis and the structure of developing embryos of drought-resistant regenerants (experiment). However, it led to a halt in development, structural anomalies and degeneration of 24.1 % of embryos at different stages of embryogenesis of the non-drought-resistant hybrid (control). All the mentioned above enable us to draw conclusions on the practicality of using drought-resistant regenerants obtained in selective embryo culture in vitro in breeding programs aimed at the accelerating creation of zoned spring soft wheat varieties resistant to moisture deficiency.

Keywords: *Triticum aestivum L., embryogenesis in vivo, selective embryo culture in vitro, drought resistance.*

Круглова Наталья Николаевна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории физиологии растений Уфимского института биологии – обособленного структурного подразделения ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук»; 450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября, 69; e-mail: kruglova@anrb.ru.

Сельдимирова Оксана Александровна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии растений Уфимского института биологии – обособленного структурного подразделения ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук»; 450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября, 69; e-mail: o_seldimirova@mail.ru.

Kruglova Natalia Nikolaevna, Dr. Sc. (Biol.), professor, chief researcher at the Laboratory of plant physiology of the Ufa Institute of biology – subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences; 69, Oktyabrya av., Ufa, 450054, Russia; e-mail: kruglova@anrb.ru.

Seldimirova Oksana Aleksandrovna, Cand. Sc. (Biol.), leading researcher at the Laboratory of plant physiology of the Ufa Institute of biology – subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences; 69, Oktyabrya av., Ufa, 450054, Russia; e-mail: o_seldimirova@mail.ru.

Дата поступления в редакцию – 01.03.2022.
Дата принятия к печати – 04.04.2022.