



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ ПШЕНИЦЫ *IN VITRO* НА ЖАРСТОЙКОСТЬ И ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНОЙ ИНФИЦИРОВАННОСТИ НА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

Мамедова М.Г.¹, Алисой Ф.А.¹, Талаи Дж.М.², Ибрагимов Э.Р.², Карагезов Т.Г.¹

¹Институт Молекулярной Биологии и Биотехнологий НАН Азербайджана, Баку

²Научно-Исследовательский институт Земледелия, Азербайджан, Баку

e-mail - gamira2010@mail.ru

Резюме

Проведено изучение применения различных схем стрессорного воздействия повышенной температурой для селективного отбора клеточных линий пшеницы на термоустойчивость. Установлено, что наличие эндофитной бактериальной инфекции кардинально изменяет также морфогенетические процессы *in vitro*. Эндофитный патоген идентифицирован как один из штаммов *Pseudomonas syringae*. Фактором, стимулирующим проявление бактериальной инфицированности, явился температурный стресс.

Ключевые слова: пшеница, *in vitro*, температурный стресс, резистентность, регенерационный потенциал, эндофитная инфекция, *Pseudomonas syringae*

Цитирование - Мамедова М.Г., Алисой Ф.А., Талаи Дж.М., Ибрагимов Э.Р., Карагезов Т.Г. Клеточная селекция пшеницы *in vitro* на жаростойкость и влияние эндофитной инфицированности на морфогенетический потенциал. *Биомика*. 2018. 10(1). С. 33-36. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-8

CELL SELECTION OF WHEAT *IN VITRO* FOR HEAT RESISTANCE AND THE EFFECT OF ENDOPHYTIC INFECTION ON MORPHOGENETIC POTENTIAL

Mamedova M.H.¹, Alisoy F.A.¹, Talai C.M.², Ibragimov E.R.², Karagozov T.H.¹

¹Institute of Molecular Biology and Biotechnologies, Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku

²Azerbaijan Research Institute of Crop Husbandry, Baku

e-mail - gamira2010@mail.ru

Resume

A study was conducted on the use of various schemes of stress effects with an elevated temperature for the selective selection of cell lines of wheat for heat resistance. It was established that the presence of endophytic bacterial infection also cardinally changes morphogenetic processes *in vitro*. The endophytic pathogen was identified as one of the strains of *Pseudomonas syringae*. The factor that stimulated the manifestation of bacterial infection was temperature stress.

Ke words: wheat, *in vitro*, temperature stress, resistance, regenerative potential, endophytic infection, *Pseudomonas syringae*.

Citation - Mamedova M.H., Alisoy F.A., Talai C.M., Ibragimov E.R., Karagozov T.H. Cell selection of wheat *in vitro* for heat resistance and the effect of endophytic infection on morphogenetic potential. *Biomics*. 2018. 10(1). P. 33-36. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-8 [In Russian]

Соматональная вариабельность, в основе которой лежат механизмы генетической и эпигенетической изменчивости растений *in vitro* составляет основу технологий клеточной селекции *in vitro*. Несмотря на очевидный прогресс по клеточной селекции различных культур, в частности, пшеницы,

разработке теоретических основ каллусообразования, эмбриогенеза и морфогенеза в культуре злаков, установлению факторов, определяющих успех нетрадиционных подходов для увеличения полезных, наследуемых вариаций *in vitro* при селективном отборе, еще остаются нерешенные проблемы,

связанные с резким снижением пролиферации клеточных культур после стрессорного воздействия абиотических и биотических факторов и потерей способности к регенерации. [Larkin, 1981; Kaepferetal, 2000; Никитина и др., 2015; Migueletal., 2011; Rakoczy-Trojanowska, 2002; Hussainetal., 2001; Abouzied, 2011; Akhtaretal., 2012].

Целью настоящего исследования явилось изучение отдельных схем отбора термоустойчивых клеточных линий пшеницы *in vitro*. Исходным материалом служили незрелые зародыши 6 сортов мягкой и твердой пшеницы местной селекции. Каллусную ткань получали из изолированных зародышей на 13-17 день после опыления. Зародыши высаживали щитком вверх на среду MS [Murashige et al., 1962] с добавлением 2мг/л 2,4Д. Каллус культивировался при температуре 25-26⁰С. Пересадку осуществляли каждые 4 недели, субкультивировали только морфогенный каллус. Клеточную селекцию проводили после 2-го пассажа по следующим схемам:

Схема I – Каллусные штаммы в конце каждого пассажа подвергались однократному воздействию при температуре 45⁰С в течение различного времени (20-60 минут). Схема II - клетки подвергались температурному воздействию в середине пассирования (после 2-х недель культивирования) и в конце пассирования. Схема III – культивирование осуществлялось при 36-37⁰С в течение всего пассажа. Общая протяженность стрессорного воздействия составляла для всех схем не менее 2-х пассажей. После стрессорного воздействия индукцию морфогенеза проводили помещением каллуса на среду, содержащую ИУК (0,5мг/л) в условия освещения и 16/8 фотопериода.

В данной работе обсуждаются результаты 60 минутного прогревания каллусных масс (схемы I; II.). Визуальная оценка морфогенного потенциала ткани производилась по пятибалльной шкале [Нгуен Тхи ли ань, 1995]. Для удобства обсуждений, изученные сорта твердой и мягкой пшеницы обозначались как: Баракатли-95 - 1Т; Карабах - 2Т; Сарай - 3Т; Гобустан - 1М; Азаматли-95 - 2М; Апшерон - 3М (где Т- твердая; М - мягкая пшеница).

Стрессорные воздействия во всех случаях снижали интенсивность ростовых процессов, что коррелировало с длительностью теплового воздействия в зависимости от использованных схем (Табл.).

Как следует из приведенных данных, одноразовое воздействие повышенными температурами незначительно влияло на рост каллусов у твердых сортов пшеницы. В большей степени повышенные температуры сказывались на ростовых показателях у мягких сортов. С увеличением числа пассажей подавление ростовой активности несколько снижается при стрессовых воздействиях по схемам I и II. По III-ей схеме воздействия подобная картина наблюдалась только у сортов 1Т, 1М и не различалась у сорта 3Т.

Таблица.

Влияние повышенной температуры на рост морфогенного каллуса у различных генотипов твердой и мягкой пшеницы (в % от контроля)
Table. The effect of high temperature on the growth of morphogenic callus in different genotypes *Triticum durum* Desf. and *Triticum aestivum* L. (in % of control)

сорт variety	пассаж passage	Варианты воздействия повышенной температуры Variants of exposure to high temperature		
		схема I scheme I	схема II scheme II	схема III scheme III
1Т	1	20,4	19,3	17,2
	2	18,2	17,0	16,1
2Т	1	20,6	19,4	40,4
	2	19,1	18,3	43,2
3Т	1	21,3	21,0	35,5
	2	20,1	19,2	35,7
1М	1	30,0	29,2	44,1
	2	28,7	27,1	42,2
2М	1	40,0	38,0	30,1
	2	38,4	35,0	32,2
3М	1	50,3	46,3	60,7
	2	44,2	41,0	65,6

1Т - Баракатли-95; 2Т - Карабах; 3Т - Сарай; 1М - Гобустан; 2М - Азаматли-95; 3М – Апшерон.

1Т - Barakatli-95; 2Т - Karabach; 3Т – Saray; 1М - Qobustan; 2М - Azamatli-95; 3М – Absheron

В определенной степени рост культуры под влиянием стрессовых факторов может являться интегральным критерием ее устойчивости. Изменение интенсивности роста каллусных тканей в зависимости от количества температурных воздействий также может свидетельствовать о характере адаптивности, связанной с селекцией клеток, обладающих повышенной резистентностью. Многоступенчатая селекция ставила своей целью отбор клеточных линий, устойчивых к тепловому стрессу и первичную оценку генетически детерминированной устойчивости и адаптивной способности изолированных клеток.

Ранее проведенные исследования с указанными генотипами пшеницы по изучению влияния повышенных температур на индукцию каллусообразования, пролиферацию, регенерационную способность полученных штаммов, их способности сохранять регенерационный потенциал в зависимости от вклада различных типов каллусных клеток как в отдельности, так и в смешанных типах каллусов позволили установить закономерности для отбора генотипов с определенной степенью сохранения и экспрессии признаков устойчивости, а также получить клеточные штаммы, обладающие повышенной резистентностью к высоким температурам по сравнению с исходными формами. Однако, последние исследования с этими же генотипами, результаты которых представлены в данной работе, но выращенными на ином агрофоне,

показали совершенно иную картину реализации морфогенного потенциала, как в контрольных, так и в опытных вариантах.

Пересадка каллусных штаммов, подвергнутых стрессу, на среду для регенерации показала, что воздействие температурой по схемам I и II снижало морфогенный потенциал на 70-90%, исключение составляли сорта 1Т и 2М, у которых морфогенный потенциал и регенерационная способность снижались на 21 и 58% соответственно. У сортов мягкой пшеницы (1М; 3М) и твердой пшеницы (2Т; 3Т), культивируемых на постоянном фоне повышенных температур (схема III), имело место еще более значительное снижение морфогенного потенциала. Отмечалась 30% гибель штаммов. Проявлялись такие морфологические изменения как увеличение доли ризогенного каллуса. У сорта 1М наблюдалось изменение морфологии и консистенции каллуса, изменение его цвета.

Клеточные массы твердых сортов пшеницы также демонстрировали мало различий между собой по степени подавления морфогенного потенциала. Наибольшее подавление морфогенного потенциала имело место у мягких сортов пшеницы. У мягкой пшеницы также отмечалась сортовая зависимость относительно теплового стрессора, независимо от использованных схем воздействия. С увеличением времени культивирования при стрессорном воздействии по схеме II подавление морфогенной способности у всех штаммов несколько снижалось, что можно отнести к проявлению адаптивности или приобретению определенной резистентности к тепловому стрессору.

В каллусных клетках, в основном, твердой пшеницы, подвергавшихся двукратной обработке повышенными температурами по схеме II, в 1 пассаже визуально не отмечалось изменений в морфологии. В течение 2-го пассажа рост биомассы замедлялся. У сохранившихся штаммов 3М, 1М, 2Т, 3Т, культивируемых по схеме III, в 4-ом пассаже, уже после окончания теплового воздействия, в нормальных условиях, наблюдалось проявление эндофитной инфекции. Проявление инфицированности иногда сопровождалось потемнением агаровой среды. Эндофитные патогены, в основном, наблюдались на поверхности и в толще каллусных клеток (рис.).

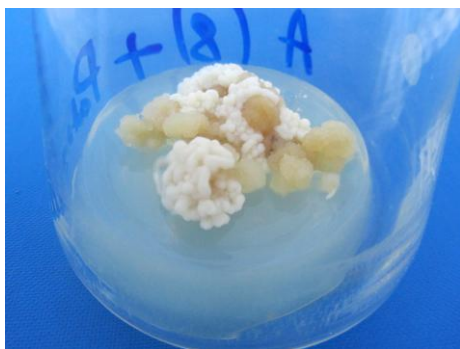


Рис. Проявление бактериальной инфицированности у сорта 1М.
Fig. The manifestation of bacterial

infection in variety 1М.

Пересадка на безгормональную среду зараженных каллусных клеток изменяло морфологию неидентифицированных на этот период патогенов.

У штаммов пшеницы, которые подвергались кратковременной тепловой обработке, не обнаруживалось проявление инфекции, хотя снижение морфогенного потенциала у сортов 1М; 3М; 2Т; 3Т было достаточно заметным. В вариантах с двукратным температурным воздействием (схема II) проявление инфицированности обнаруживалось значительно позже. Бактериальная контаминация увеличивалась с числом пассажей и обнаруживалась в дальнейшем еще и у сортов 1М;3М;2Т;3Т, которые также характеризовались наименьшей морфогенной способностью. Первоначально проявление инфицированности мало сказывалось на интенсивности пролиферации, что видимо определялось низкой скоростью размножения эндофитной инфекции.

По мере увеличения проявления эндофитной инфекции, интенсивность пролиферации каллусных тканей пшеницы значительно снижалась, каллус становился обводненным, и ранее имеющиеся морфогенные зоны у некоторых сортов мягкой пшеницы (3М; 1М) становились менее плотными. У сортов 2М; 1Т, в каллусных штаммах, у которых не обнаруживалось проявление эндофитной инфекции, морфогенетический потенциал и регенерационная способность сохранялись в норме, как и в предыдущих экспериментах, в соответствии с видовыми и сортовыми особенностями. Обнаруженная эндофитная микрофлора была нами в дальнейшем идентифицирована как бактерии рода *Pseudomonas*, а разновидность как один из штаммов *Pseudomonas syringae* S.Lindow [Самедов и др.,1988, Самедов и др.,1988].

Рассматривая проявление эндофитной инфекции, и ее взаимосвязь с ростовыми процессами и морфогенным потенциалом инфицированных штаммов следует отметить, что обнаруженная эндофитная инфекция проявляется визуально только при стрессорном воздействии повышенной температурой. В зависимости от силы и времени воздействия, она обнаруживается раньше или позже, однако, уже на первых этапах культивирования, ее влияние проявляется в изменении течения морфогенетических процессов, и создании «фона» изменений, которые могут быть ошибочно отнесены только к фактору применяемого стрессорного воздействия. Весьма возможно, что в ряде случаев потеря компетентности к морфогенезу, снижение и подавление регенерационной способности, преобладание процессов ризогенеза уже на первых этапах культивирования может свидетельствовать о наличии латентных форм инфицированности. Таким образом, обнаружение эндофитного патогена в культуральных штаммах пшеницы свидетельствует о том, что при использовании и разработке биотехнологических подходов в исследованиях по клеточной селекции, данный факт может иметь решающее значение, причем фактором,

стимулирующим проявление эндофитной инфекции, является повышенная температура культивирования каллусных клеток.

Литература / References

1. Нгуен Тхи ли ань Повышение устойчивости яровой пшеницы к абиотическим стрессам методами биотехнологии // Автореф. дис. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук. СПб. 1995. 22с. (In Russian) [Nguyen Thi Li an. Increasing the stability of spring wheat to abiotic stress by methods of biotechnology//Author's abstract. Dis.attain.of a scien. degreeof biol. sciences . 1995.22P].
2. Никитина Е.Д., Хлебова Л.П. Особенности морфогенеза яровой мягкой пшеницы в культуре *in vitro* в зависимости от условий произрастания // Ульяновский медико-биологический журнал. 2015. №2. С.125–131. (In Russian) [Nikitina E.D., Khlebova L.P. Features of morphogenesis of spring wheat in culture *in vitro* depending on the growth conditions. // Ulyanovsk Medical Biological Journal. 2015. N2. P. 125–131].
3. Самедов А.Н., Могелевская М.Н., Алиев Дж.А., Алиев Л.А. К вопросу о возбудителях бактериозов винограда // Изв. АН Аз.ССР (сер. биол. наук). 1988. N5. С. 26-31. (In Russian) [Samedov A.N., Mogelevskaya M.N., Aliyev J.A., Aliyev L.A. On the issue of exciters of bacteriosis of grapes // Proceedings of the Acad. Sci. Az. SSR (biol. sci.) 1988. N5. P. 26-31].
4. Самедов А.Н., Могелевская М.Н., Карагезов Т.Г., Худавердиева С.Р., Алиев Л.А. Обнаружение возбудителей бактериозов винограда на территории Апшерона //Изв. АН. Аз. ССР (сер. биол. наук). 1988. №6. С.18-23. (In Russian). [Samedov A.N., Mogelevskaya M.N., Karagezov T.G., Khudaverdieva S.R., Aliyev L.A. Detection of exciters of bacteriosis of grapes in the territory of Apsheron // Proceedings of the Acad. Sci. Az. SSR (biol. sci.) 1988. N6. P. 18-23].
5. Abouziad H.M. Assessment of genetic diversity among wheat somaclonal variants lines using morphological traits and molecular markers // Afr. J. Biotechnol. 2011. V. 1(66). P. 1451–1486. doi: 10.5897/AJB11.1759
6. Akhtar S., Niaz M., Rahman S., Asif M. Study of somaclonal variation in wheat for the induction of salinity tolerance // J. Agric. Res. 2012. V. 50(2). P. 165–176.
7. Hussain M., Khan G.S., Shaheen M.S., Ahmad M. Somaclonal variation in regenerated plants of ten wheat genotypes // J. Agric. Res. 2001. V. 39. № 11. P. 1–7.
8. Kaepler S.M., Kaepler H.F., Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants // Plant. Mol. Biol. 2000. V. 43. P. 179–188.
9. Larkin P.J., Scowcroft W.R. A novel source of variability from cell cultures for plant improvement // Theor. Appl. Genet. 1981. V. 60. N4. P. 97–214.
10. Miguel C., Marum L. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond // Journal of Experimental Botany. 2011. V. 62. N 11. P. 3713–3725. doi: 10.1093/jxb/err155
11. Murashiqe T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Phisiol. Plant. 1962. V.15. N 13. P. 473 - 497.
12. Rakoczy-Trojanowska M. The effect of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits // Cell Mol. Biol. 2002. V. 7. P. 1111–1120.