

УДК 633.11:581.48:631.547

О. Н. Ружицкая¹, канд. биол. наук, доц., **С. А. Игнатова**², д-р биол. наук, зав. лабораторией культуры тканей, **Н. А. Безверхая**¹, студ.

¹ Национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра ботаники
ул. Дворянская, 2, г. Одесса, 65026, Украина,

² Южный Биотехнологический центр в растениеводстве УААН,
ул. Овидиопольская дорога, 3, г. Одесса, 65036, Украина

СПОСОБНОСТЬ К ПРОРАСТАНИЮ В УСЛОВИЯХ IN VITRO ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ НЕВСХОЖИХ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ

В условиях *in vitro* изучали возможность прорастания зародышей невосхожих (в результате длительного хранения) семян пшеницы (*Triticum aestivum* L.). 27% изолированных зародышей невосхожих семян формировали росток и корни на питательной среде МС. Качество и количество проростков уменьшались, если зародыши помещали на среду МС, дополненную фитогормонами.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L, семена, зародыши, прорастание, питательная среда.

Исследование по выяснению закономерностей и механизмов потери всхожести семенами вследствие их длительного хранения, а также путей ее восстановления, привлекало и продолжает привлекать к себе большое внимание в связи с тем, что имеет не только научное, но и практическое значение. Особый интерес к таким работам проявляют генетики и селекционеры, владеющие большими генетическими коллекциями семян не только хозяйственно ценных растений, но и таких, которые являются моделями, удобными для научных исследований.

Известно, что негативные изменения, которые происходят в семенах в процессе длительного хранения ("старение семян"), касаются практически всех сторон их обмена веществ. Показано, что старение семян сопровождается деструктивными изменениями ультраструктур клеток [1], снижением митотического потенциала клеток семян и накоплением хромосомных повреждений [2, 3]. Биохимические механизмы старения и потери качества семян связывают как с истощением запасов питательных веществ и накоплением различных ядов в процессе метаболизма семян, так и деструкцией и денатурацией белков, углеводов, нуклеиновых кислот и липидов [4, 5 и др.]. Вместе с тем, результаты единичных работ по восстановлению жизнеспособности "старых" семян свидетельствуют о том, что в некоторых случаях семена теряют всхожесть еще до того, как

зародыш станет нежизнеспособным, в результате недоступности питательных веществ эндосперма [6, 7].

Учитывая, что в культуре *in vitro* возможно оценить морфо-генетические потенции изолированных частей растительного организма при воздействии разнообразными химическими и физическими факторами, целью нашей работы являлось выявление возможности прорастания невсхожих (в результате длительного хранения) семян пшеницы путем проращивания изолированных зародышей этих семян на агаризованных питательных средах с добавками ростовых веществ.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили в лаборатории Южного Биотехнологического центра в растениеводстве УААН и лаборатории кафедры ботаники Одесского национального университета им. И. И. Мечникова. В исследованиях использовали семена озимой пшеницы сорта Обрий урожая 1996 года, хранившиеся на протяжении девяти лет в бумажных пакетах в условиях склада.

Жизнеспособность семян оценивали по всхожести, которую определяли по ГОСТ 12038-84. Изолированные простерилизованные [8] зародыши семян высаживали на агаризованную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) [9], а также на три ее варианта с добавлением фитогормонов: I. МС+10 мг/л гибберелловой кислоты (ГК), 1 мг/л бензиламинопурина (БАП); II. МС+10 мг/л ГК, 1 мг/л кинетина (kin); III. МС+10 мг/л ГК, 1 мг/л зеатина. В качестве контроля использовали стандартную питательную среду МС без добавления фитогормонов. Проращивание изолированных зародышей на питательных средах проводили в течение 32 суток. В ходе проращивания учитывали количество проросших зародышей и анализировали структуру их проростков. На 32-е сутки проращивания определяли длину и массу ростков и корней нормальных проростков.

Полученные экспериментальные данные подвергали обработке методом вариационной статистики [10]. В таблицах представлены средние арифметические, рассчитанные из данных по 45 зародышам. Данные средней длины ростков и корней приведены с учетом ошибки среднего арифметического.

Результаты исследований и их обсуждение

В ходе стандартной методики проращивания семян для оценки всхожести было установлено, что семена сорта Обрий урожая 1996 года полностью утратили способность к прорастанию (рис. 1)

Результаты проращивания изолированных зародышей невсхожих семян пшеницы на разных по составу питательных средах представлены в табл. 1. Согласно полученным данным, на используе-



Рис. 1. Зерновки пшеницы на 7-е сутки проращивания в ходе стандартной методики определения всхожести

ных агаризованных питательных средах 9–34% изолированных зародышей невсхожих семян пшеницы прорастают. Как видно из табл. 1, количество проросших зародышей на контрольной среде МС было значительно большим, чем на других средах и на 32-е сутки проращивания составило 34% от количества высаженных зародышей.

Таблица 1

Влияние состава питательной среды на количество и структуру проросших зародышей на 32-е сутки проращивания

n–45

Питательная среда	Количество проросших зародышей (%)			
	только ростком	только корнем	есть росток и корни	Всего
МС (контроль)	7	0	27	34
I - МС+10 мг/л ГК. 1 мг/л БАП	2	0	7	9
II - МС+10 мг/л ГК. 1 мг/л kin.	9	0	16	25
III - МС+10 мг/л ГК. 1 мг/л зеатина	11	0	20	31

Обычно среди проросших семян можно выделить следующие морфологические типы: 1) семена, проросшие только ростком; 2) семена, проросшие только корнем; 3) семена, проросшие ростком и корнем (т. е. сформировавшие нормальные проростки).

Анализ структуры проросших зародышей показал, что при проращивании изолированных зародышей на питательных средах

наибольшее количество проростков являются нормальными, т. е. имеют и росток и корни. Зародышей проросших только корнем не было ни в одном варианте сред. На контрольной среде МС из 34% проросших зародышей 7% сформировали только росток, а 27% — и росток и корни. На среде I отмечается наименьшее количество проросших зародышей — 9%, из которых 7% сформировали нормальные проростки. На среде II общее количество проросших зародышей составило 25%, сформировавших и росток и корни — 16%. На среде III проросших зародышей всего — 31%, образовавших нормальные проростки — 20%.

Таким образом, путем проращивания изолированных зародышей на питательных средах нам удалось реализовать способность к прорастанию и формированию нормальных проростков у 7–27% невосхожих семян пшеницы (рис. 2).



Рис. 2. Проростки, сформировавшиеся из изолированных зародышей невосхожих семян пшеницы на питательных средах на 32-е сутки проращивания. Примечание: МС — питательная среда Мурасиге и Скуга (контроль); I — МС+10 мг/л ГК, 1 мг/л БАП; II — МС+10 мг/л ГК, 1 мг/л kin, III — МС+10 мг/л ГК, 1 мг/л зеатина

Для оценки влияния состава питательной среды на качество проростков, сформированных изолированными зародышами старых семян пшеницы, мы также измеряли длину и массу корней и ростков проростков (табл. 2).

Как видно из табл. 2, средняя длина ростка и корней проростков из невосхожих семян достоверно не отличается при проращивании зародышей на средах МС, I и II. При проращивании зародышей на среде III отмечается уменьшение по сравнению с контролем средней длины ростка и корней указанных проростков на 46% и 57% соответственно. Следует отметить, что на 32-е сутки проращивания длина ростка во всех вариантах питательных сред составляла не менее 1,4 см.

Таблица 2

Влияние состава питательной среды на длину и массу ростка и корней проростка

Питательная среда	Средняя длина, см		Масса сырого вещества, г	
	ростка	корешков	ростка	корешков
МС (контроль)	13,5 ± 3,0	23,6 ± 6,5	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,01
I – МС+10 мг/л ГК, 1 мг/л БАП	16,5 ± 1,0	17,7 ± 9,6	0,20 ± 0,02	0,07 ± 0,01
II – МС+10 мг/л ГК, 1 мг/л kin,	12,6 ± 3,7	14,0 ± 4,8	0,15 ± 0,02	0,08 ± 0,01
III – МС+10 мг/л ГК, 1 мг/л зеатина	7,3 ± 2,5*	10,1 ± 3,5,0**	0,09 ± 0,01	0,03 ± 0,001*

Примечание: различия достоверны по сравнению с контролем при: ** — $p < 0,05$; * — $p < 0,1$.

Добавочные компоненты альтернативных стандартной среде МС питательных сред не вызвали достоверных изменений средней массы ростка проростков. Однако при проращивании зародышей на среде III отмечается наименьшая масса корешков проростков.

Средние показатели длины и массы проростка являются важной характеристикой их качества. Тем не менее они не позволяют судить о степени разнокачественности формируемых проростков. Это позволяет сделать детальная характеристика проростков путем разбивки их на классы (группы) по степени развития. Состояние корневой системы проростка является важной его характеристикой, во многом определяющей дальнейшее развитие растения. Мы распределяли анализируемые проростки по группам в зависимости от имеющихся у них корешков и выражали в процентах от общего количества сформированных проростков. Согласно полученным данным, на разных по составу питательных средах сформированные изолированными зародышами проростки различаются по количеству корешков (табл. 3).

Таблица 3

Распределение проростков, сформировавшихся из изолированных зародышей на различных средах, %

Питательная среда	Количество корешков, шт				
	1	2	3	4	более 4
МС (контроль)	0	25	33	8	34
I – МС+10 мг/л ГК, 1 мг/л БАП	0	0	34	33	33
II – МС+10 мг/л ГК, 1 мг/л kin,	43	14	0	29	14
III – МС+10 мг/л ГК, 1 мг/л зеатина	22	44	0	11	23

Как видно из табл. 3, наибольшее количество зародышей, формирующих проростки с количеством корешков более 4 шт., отмечается на питательных средах МС и I — 33–34% от общего количества сформированных проростков. В то же время при проращивании на средах III и II количество таких проростков значительно меньше и появляются проростки с одним корнем.

Таким образом, на стандартной питательной среде МС отмечаются наиболее положительные результаты проращивания зародышей и роста проростков. Добавление в данную среду фитогормонов (ГК, БАП, кинетин, зеатин) в указанных концентрациях негативно отразилось на количестве проросших зародышей и/или качестве их проростков, что может быть связано с недостаточным обеспечением тканей зародыша эндогенными фитогормонами.

Выводы

1. Путем проращивания изолированных зародышей на агаризованных питательных средах удалось восстановить способность к прорастанию у 9–34% невсхожих (в результате старения) семян пшеницы.

2. Из проанализированных питательных сред наиболее положительные результаты отмечены на стандартной питательной среде МС. Обогащение ее фитогормонами (ГК, БАП, кинетин, зеатин) негативно отразилось на количестве проросших зародышей и/или качестве их проростков.

3. Представляется целесообразным проведение дальнейших исследований, направленных на поиск путей восстановления жизнеспособности семян в культуре *in vitro*.

Литература

1. Робертс Е. Г. Цитологические, генетические и метаболические изменения, связанные с потерей жизнеспособности // *Жизнеспособность семян: Пер. с англ.* — М.: Колос, 1978а. — С. 244–293.
2. Задорожна О. А. Міялівість рослин у зв'язку із старінням насіння: Автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.15. — Харків, 1997. — 18 с.
3. Толстопплет Е. В. Цитофизиологические и цитогенетические проявления естественного старения в зависимости от генотипа и условий хранения генофонда сельскохозяйственных культур: Автореф. дис... канд. биол. наук: 13.00.15. — Харьков, 1994. — 17 с.
4. Овчаров К. Е., Кошелев Ю. П., Мурашова Н. Д., Генкель К. П., Седенко Д. М. Биохимические изменения при старении семян // *Научно-технический Бюллетень ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова.* — 1978. — Вып. 77. — С. 36–39.
5. Ангелова В. С., Холодова В. П. Выделение растворимых белков из зародышей семян пшеницы разной жизнеспособности // *Физиология растений.* — 1993. — Т. 40, № 6. — С. 889–892.
6. Усманов П. Д. Старение семян *Arabidopsis thaliana* и его преодоление // *Физиология растений.* — 1999. — Т. 46, № 3. — С. 492–494.
7. Smritimata Bhattacharyya (Ganguli) and Swati-Mandi. Studies into Causes of Non-germination of Aged Wheat Seeds // *Annals of Botany.* — 1985. — № 6. — P. 477–479.

8. Игнатова С. А., Игнатъева Ю. В., Лукьянюк С. Ф. Выделение и культивирование протопластов люцерны // Авторское свидетельство № 1323046. — 15.07.1987. — Бюлл. № 26. — С. 54–57.
9. Биотехнология растений: культура клеток / Пер. с англ. Негрука В. И.; С предисл. Бутенко Р. Г. — М.: Агропромиздат, 1989. — 280 с.
10. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.

О. М. Ружицька¹, С. А. Ігнатова², Н. А. Безверха¹

¹ Національний університет ім. І. І. Мечникова,
Шампанський провулок, 2, м. Одеса, 65058, Україна,

² Південний Біотехнологічний центр у рослинництві УААН,
вул. Овідіопольська дорога, 3, м. Одеса, 65036, Україна

ЗДАТНІСТЬ ДО ПРОРОСТАННЯ В УМОВАХ IN VITRO ІЗОЛЬОВАНИХ ЗАРОДКІВ НЕСХОЖОГО НАСІННЯ ПШЕНИЦІ

Резюме

В умовах *in vitro* вивчали можливість проростання зародків несхожого (у результаті тривалого зберігання) насіння пшениці (*Triticum aestivum* L.). Виявлено, що 27% ізольованих зародків несхожого насіння формували росток і корені на поживному середовищі МС. Якість і кількість проростків зменшувалися, якщо зародки поміщали на середовище МС, доповнене фітогормонами.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L, насіння, зародки, проростання, поживне середовище.

O. N. Rujitskaya¹, S. A. Ignatova², N. A. Bezverchaya¹

¹ Odessa National University, Department of Botany,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

² Plant Breeding and Genetics Institute,
Ovidiopol'skaya Doroga, 3, Odessa, 65036, Ukraine

THE GERMINATION CAPACITY OF THE EXCISED EMBRYOS OF AGED NON-GERMINATING WHEAT SEEDS IN CULTURE IN VITRO

Summary

The germination capacity of the embryos of aged non-germinating wheat seeds (*Triticum aestivum* L.) in culture *in vitro* have been analysed. It has been shown 27 per cent of excised embryos of aged non-germinating seeds, when placed on hormone free MS nutrient medium, produced plumule and radicle. Quality and quantity result of sprouts has decreased, when embryos placed on MS nutrient medium supplemented with hormone.

Keywords: *Triticum aestivum* L, seeds, embryo, germination, nutrient medium.