

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Кафедра генетики та молекулярної біології

Дипломна робота

на здобуття ступеня вищої освіти «магістр»

на тему «**Особливості морфології калусу із зрілих зародків м'якої пшениці за їх культивування *in vitro***»

«Characteristics of callus morphology from mature bread wheat embryos during their cultivation *in vitro*»

Виконала: студентка денної форми навчання

Спеціальність 091 Біологія,
ОП Біологія

Олійник Ольга Євгенівна

Науковий керівник:

кандидат біологічних наук, доцент
Задерей Наталя Сергіївна

Рецензент:

кандидат біологічних наук, доцент
Паузер Олена Борисівна

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри
№ _____ від «___» _____ р.

Завідувач кафедри

Захищено на засіданні ЕК № 1
Протокол № _____ від «___» _____ р.
Оцінка _____ / _____ / _____
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал)

Голова ЕК

(підпис)

Чеботар С.В.
(прізвище та ініціали)

(підпис)

Філіпова Т.О.
(прізвище та ініціали)

Одеса – 2020

АНОТАЦІЯ

Проведено комплексне дослідження впливу різних концентрацій 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти на ріст та розвиток калусної тканини зародків м'якої озимої пшениці сорту Дриада 1.

При концентрації 2,4-Д 6 мг/л та 8 мг/л спостерігали стимуляцію калусогенезу у зрілих зародків м'якої пшениці сорту Дриада 1. У калусах, що сформувались на середовищах МС з 6 мг/л 2,4-Д відбувається закладка морфогенних структур *de novo*.

Дипломну роботу «Особливості морфології калусу із зрілих зародків м'якої пшениці за їх культивування *in vitro*» викладено на 42 сторінках друкованого тексту, вона містить 1 таблицю та 11 рисунків.

В роботі наведено посилання на 59 джерел літератури (16 кирилицею та 43 латиницею).

Ключові слова: калусна культура, 2,4- дихлорфеноксиоцтова кислота, м'яка пшениця.

In this work a comprehensive study of the effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in various concentrations on the growth and development of callus tissue in seedlings of bread winter wheat variety Dryada 1 was carried out. At a concentration of 2,4-D, 6 mg/l and 8 mg/l stimulation of callusogenesis in in mature embryos of wheat variety Dryada 1 was observed. In callus tissues developed on MS of 6 mg/l 2,4-D medium morphogenic structures were formed *de novo*.

The work «Characteristics of callus morphology from mature bread wheat embryos during their cultivation *in vitro*» is expounded on 42 pages, it contains 1 table and 11 figures. It provides links to 59 sources of literature (16 cyrillic and 43 latin).

Key words: callus culture, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, bread wheat.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Клітина селекція <i>in vitro</i>	7
1.2. Методи отримання калусної такни.....	10
1.2.1. Морфологія калусної тканини.....	13
1.2.2. Фітогормони та калусогенез.....	17
2. МІСЦЕ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	22
2.1. Стерилізація матеріалу.....	22
2.1.1. Приготування поживного середовища.....	22
2.2. Культивування зародків <i>in vitro</i>	24
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	25
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	33
ВИСНОВКИ	35
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	36

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

ІОК – індоліл-3-оцтова кислота;

2,4-Д – дихлорфеноксиоцтова кислота;

МС – середовище Мурасіге і Скуга.

ВСТУП

М'яка пшениця належить до числа найбільш цінних продовольчих зернових культур на земній кулі. Загальна посівна площа в світі цієї культури становить приблизно 240 млн. га, а валові збори зерна - 560 млн.т. [Гаврилюк, 2013].

Зерно пшениці і продукти його переробки по харчовим технологічним властивостям серед інших зернових культур займають особливе місце. Здатність пшениці синтезувати в зерні білки клейковини має велике значення для випічки білого хліба та інших хлібних виробів.

Основне призначення озимої пшениці - забезпечення населення хлібобулочними та кондитерськими виробами. Цінність пшеничного хліба визначається своєрідним хімічним складом зерна. Серед зернових культур пшеничне зерно відрізняється високим вмістом білку [Долгополова, 2009].

Кліматичні зміни, що все частіше відмічаються у різних регіонах нашої планети задають значної шкоди посівам сільськогосподарських рослин. У рослин, що підпадають під вплив різноманітних негативних абіотичних стресів, таких як посуха, екстремальні температури, засолення, відбуваються зміни генетичної регуляції клітинних функції, виникають дефекти фізіології та морфології, порушується метаболізм [Ahmad, 2010].

Для створення нових форм рослин, більш стійких до негативного впливу навколишнього середовища, застосовують різноманітні традиційні (селекція) та новітні технології, зокрема генетичну інженерію, віддалену гібридизацію з застосуванням методів дорощування незрілих гібридних зародків рослин *in vitro*, а також клітинна селекція з застосуванням живильних середовищ селективного характеру.

Клітинна селекція – це один з напрямків біотехнології, спрямований на отримання генетичної мінливості на основі всіх існуючих генотипів цінних сільськогосподарських рослин.

Довготривале культивування тканин рослин штучних живильних середовищах, що містять набір фітогормонів та інших фізіологічно активних речовин, приводить до виникнення різноманітних перебудов в геномах клітин рослин, тобто стійких мутацій, які можуть передаватись у поколіннях [Turan, 2014]. Такі генетично змінені форми рослин отримали назву соматональні варіанти, вони є цінним матеріалом для селекції і використовуються селекціонерами у їх роботі.

Метою нашої роботи було відпрацювання методики отримання калусів як джерела клітинних популяцій, що можуть бути використані для подальшого добору на штучних селективних середовищах в умовах *in vitro*.

Для вирішення заданої мети виконувались наступні задачі:

1. визначити умови достатні для отримання стерильного посадкового матеріалу;
2. дослідити необхідні умови культивування *in vitro* зрілих зародків м`якої пшениці;
3. визначити оптимальні для ефективного калусогенезу концентрації 2,4-Д;
4. дослідити цитологічну будову калусів отриманих на середовищах з різною концентрацією 2,4-Д.

Об`єкт досліджень – калусогенез *in vitro*.

Предмет досліджень - процес утворення калусу на зрілих зародках пшениці.

ВИСНОВКИ

1. Оптимальними умовами стерилізації експлантів пшениці є:
 - прожарювання насіння в полум'ї спиртівки;
 - передобробка насіння розчином антибіотиків (66,7 % розчин тетрацикліну та 74 % розчин ністатину) протягом 2-х діб;
 - промивання насіння у розчині детергенту «Твін-80»;
 - стерилізація насіння розчином «Білизна», що містить 5-15 % гіпохлориту натрію.
2. 2,4-Д у концентраціях 6 мг/л та 8 мг/л стимулює ефективний калусогенез у зрілих зародків м'якої пшениці сорту Дріада 1.
3. У калусах, що сформувались на середовищах МС з 6 мг/л 2,4-Д, відбувається закладка морфогенних структур *de novo*.
4. Цитологічні дослідження показали, що калус складається з великих вакуолізованих клітин паренхіматозного типу та мілких меристемоподібних клітин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Біотехнологія в агросфері : навч. посібник / М. Д. Мельничук, О. Л. Кляченко. – Київ. НУБіП, 2014. – 247с.
2. Біотехнологія рослин. Навчальний посібник / М.М. Мусієнко, О. О. Панюта – Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. – 114 с.
3. Бычкова О.В. Морфогенез яровой твердой пшеницы в культуре зрелых зародышей / О.В. Бычкова, Л.П. Хлебова, Д.В. Ерещенко // Біологічний вісник МДПУ імені Богдана Хмельницького. – 2016. – Т. 6, № 3. – 209–218
4. Гаврилюк М. М. НААН України інноваційне та господарське значення пшениці / М.М. Гаврилюк, П.Є. Каленич // Національна наукова сільськогосподарська бібліотека. – 2013. – Т. 9. № 7. – С. 38.
5. Долгополова Н. В. Значение озимой и яровой пшеницы в производстве продуктов питания. / Н. В. Долгополова, В. А. Скрипин, О. М. Шершнева, Ю. В.Алябьева // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2009. – Т.5, № 5. – С. 52–56.
6. Егорова Т. А. Основы биотехнологии: Учеб. пособие для высш. пед. учеб. заведений / Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 208 с.
7. Круглова Н. Н., Сельдимирова О.А. Морфогенез в андроклинических каллусах злаков: цитогистологические особенности // Успехи соврем. биол. – 2010. – Т. 130. № 3. – С. 247–257.
8. Культура клеток и тканей растений. Учебное пособие / О. А. Тимофеева, Н. И. Румянцева – Казань: КФУ, 2012. – 17 с.
9. Лапшин П. В. Клеточная селекция пшеницы *Triticum aestivum* на устойчивость к УФ-Б: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.23 / Лапшин Петр Владимирович; Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева. - Москва, 2001. – 25 с.

10. Никитина Е. Д., Мухин В.Н. Оптимизация гормонального состава питательной среды для культивирования *Triticum aestivum* L. *in vitro* / Е. Д. Никитина, В.Н. Мухин // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29. № 6. – С. 44–48.
11. Никитина Е. Д. Разработка отдельных элементов технологии клеточной селекции яровой пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессам / Е. Д. Никитина, Л.П. Хлебцова, О.В. Ерещенко // Биологические Науки. – 2014. – Т. 3. № 2. – С. 50–54.
12. От микроспоры – к сорту / Т. Б. Батыгина, Н. Н. Круглова, В. Ю. Горбунова, Г. Е. Титова, О. А. Сельдиминова М.: Наука, 2010. – 174 с.
13. Полевой В. В. Физиология растений: Учеб. для биол. спец. вузов / В. В. Полевой. – М.: Высш. шк., 1989. – 464 с.
14. Рахимбаев И. Р. Биотехнология зерновых культур / И. Р. Рахимбаев, Ш. Тивари, Н. К. Бишимбаева, С. В. Кушнарченко – Алма-Ата: Гылым, 1992. – 240 с.
15. Сатарова Т. М. Біотехнологія рослин: навч. посіб. / Т. М. Сатарова, О. Є. Абраїмова, А. І. Вінніков, А. В. Черенков. – Дніпропетровськ: Адверта, 2016. – 136 с.
16. Сельдиминова О. А. Роль фитогормонов в индукции каллусогенеза и регуляции путей морфогенеза каллусов злаков *in vitro*: обзор проблемы / О. А. Сельдиминова, Н. Н., Круглова, А. Е. Зинатуллина Научный результат. Физиология. – 2017. – Т. 3. №1 – С. 8–13.
17. Ahmad P. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress / P. Ahmad, C. A. Jaleel, M. A. Salem, G. Nabi, S. Sharma // Biotechnol. – 2010. – V. 30. – P. 161–175.
18. Altaf H. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities / H. Altaf, A. Q. Iqbal, N. Hummera, U. Ikram // IntechOpen. – 2012. – P.12.
19. Asaf S. Bacterial endophytes from arid land plants regulate endogenous hormone content and promote growth in crop plants: an example of

- Sphingomonas* sp. and *Serratia marcescens* / S. Asaf, M. A. Khan, A. L. Khan, M. Waqas, R. Shahzad, A. Y. Kim // *J. Plant Interact.* – 2017. – V. 12. – P. 31–38.
20. Asgher M. Minimising toxicity of cadmium in plants-role of plant growth regulators / M. Asgher, M. I. R. Khan, N. A. Anjum, N. A. Khan // *Protoplasma.* – 2015. – V. 252. – P. 399–413.
21. Balasubramanian D. Concepts in Biotechnology / D. Balasubramanian, C. F. A. Bryce, K. Dharmalingam, J. Green // *Universities Press.* – 2004. – V. 135 (4). – P. 425.
22. Basu S. K. Is genetically modified crop the answer for the next green revolution? / S. K. Basu, M. Dutta, A. Goyal, PK. Bhowmik, J. Kumar, S. Nandy // *GM Crops.* – 2010. – V. 1. – P. 68–79.
23. Bhatia S. Application of Plant vBiotechnology /S. Bhatia // *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences.* – 2015. – V. 5. – P. 157-207.
24. Cavallaro V. Optimizing in vitro large scale production of giant reed (*Arundo donax* L.) by liquid medium culture / V. Cavallaro, C. Patane, S.L. Cosentino, S.L., I. Di Silvestro, V. Copani // *Biomass Bioenergy.* – 2014. – V. 69. – P. 21–27.
25. Ceccarelli S. Plant breeding and climate changes / S. Ceccarelli, S. Grando, M. Maatougui, M. Michael, M. Slash, R. Haghparast // *J. Agric. Sci.* – 2010. – V. 148 (6). – P. 627–637.
26. Efferth T. Biotechnology applications of plant callus cultures / T. Efferth // *Engineering.* – 2019. – V. 5 (1). – P. 651–679.
27. Egamberdieva D. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat / D. Egamberdieva // *Acta Physiol Plant.* – 2009. – V. 31. – P. 861–864.
28. Egamberdieva D. Phytohormones and Beneficial Microbes: Essential Components for Plants to Balance Stress and Fitness / D. Egamberdieva,

- S. J. Wirth, A. A. Alqarawi, E. F. Abd Allah, A. Hashem // *Front Microbiol.* – 2017. – V. 8. – P. 2104.
29. Etesami H. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents / H. Etesami, H. A. Alikhani, H. M. Hosseini // *MethodsX* – 2015. – V. 2. – P. 72–78.
30. Fässler E. Effects of indole-3-acetic acid (IAA) on sunflower growth and heavy metal uptake in combination with ethylene diamine disuccinic acid / E. Fässler, M. W. Evangeloua, B. H. Robinson, R. Schulin // *Chemosphere.* – 2010. – V. 80. – P. 901–907.
31. Georgiev MI. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds / MI. Georgiev, J. Weber, A. Maciuk // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2009. – V. 83 (5). – P. 809–23.
32. Greenway H. Plant response to saline substrates. I. Growth and ion uptake of several varieties of *Hordeum* during and after sodium chloride treatment / Greenway H. *Australian Journal of Biology Science.* – 1962. – P. 16 – 38.
33. Harms C. T. Engineering genetic disease-resistance into crops: Biotechnological approaches to crop protection / T. C. Harms // *Crop Protection.* – 1992. – V. 11 (4). – P. 291–306.
34. Hu Y. F. Cadmium interferes with maintenance of auxin homeostasis in *Arabidopsis* seedlings // Y. F. Hu, G. Zhou, X. F. Na, L. Yang, W. B. Nan, X. Liu, et al. // *J. Plant Physiol.* – 2013. – V. 170. – P. 965–975.
35. Jaggard K.W. Possible changes to arable crop yields by 2050 / K. W. Jaggard, A. Qi, E. S. Ober // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* – 2010. – V. 365 (1554). – P. 2835–2851.
36. Joshi A. G. Shoot regeneration from leaf explants of *Withania somnifera* (L.) Dunal / A. G. Joshi, M. A. Padhya // *Notulae Scientia Biologicae.* – 2010. – V. 2 (1). – P. 163–168.

37. Kazan K. Auxin and the integration of environmental signals into plant root development / K. Kazan // *Ann. Bot.* – 2013. – V. 112. – P. 1655–1665.
38. Khan M. A. Action of plant growth regulators and salinity on seed germination of *Ceratoides lanata*. / M. A. Khan, B. Gul, D. J. Weber // *Can. J. Bot.* – 2004. – V. 82. – P. 37–42.
39. Kudoyarova G. R. Cytokinin producing bacteria stimulate amino acid deposition by wheat roots / G. R. Kudoyarova, A. I. Melentiev, E. V. Martynenko, L. N. Timergalina, T. N. Arkhipova, G. V. Shendel, et al. // *Plant Physiol. Biochem.* – 2014. – V. 83. – P. 285–291.
40. Kung S. From hybrid plants to transgenic plants / S. Kung. R. Wu. – San Diego : Academic Press, 1993. – V. 1. – 1-12 p.
41. Laible M. Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids / M. Laible, K. Boonrod // *Journal of Visualized Experiments.* – 2009. – V. 27. – P. 1135.
42. Lieber M. M. New practical and theoretical approaches to the induction of morphogenesis from plant tumors *in vitro* using new types of plant growth regulators: towards constructive paradigms in agriculture and medicine / MM. Lieber // *Theor Biol Forum.* – 2013. – V. 106 (1–2). – P. 73–87.
43. Ljung K. Auxin metabolism and homeostasis during plant development / K. Ljung // *Development.* – 2013. – V. 140. – P. 943–950.
44. Manjili F. A. Effects of phytohormones on proline content and antioxidant enzymes of various wheat cultivars under salinity stress / F. A. Manjili, M. Sedghi, M. Pessarakli // *J. Plant Nutr.* – 2012. – V. 35. – P. 1098–1111.
45. Momoko I. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression / I. Momoko, S. Keiko, I. Akira // *Plant Cell.* – 2013. – V. 25 (9). – P. 3159–3173.
46. Murashige T. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. A. Skoog // *Physiol Plant.* – 1962. – V. 15 (3). – P. 97–473.

47. Nascimento N. C. Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: an overview / N.C. Nascimento, A.G. Fett-Neto // *Methods Mol Biol.* – 2010. – V. 643. – P.1-13
48. Pereira S. I. A. Endophytic culturable bacteria colonizing *Lavandula dentata* L. plants: isolation, characterization and evaluation of their plant growth-promoting activities / S. I. A. Pereira, C. Monteiro, A. L. Vega, P. M. L. Castro // *Ecol. Eng.* – 2016. – V. 87. – P. 91–97.
49. Perianez-Rodriguez J. Post-embryonic organogenesis and plant regeneration from tissues: two sides of the same coin? / J. Perianez-Rodriguez, C. Manzano, MA. Moreno-Risueno // *Front Plant Sci.* – 2014. – V. 5. – P. 219.
50. Rao S. R. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites / S. R. Rao, G. A. Ravishankar // *Biotechnol Adv.* – 2002. – V. 20 (2). – P. 101–53.
51. Segui-Simarro J.M. Androgenesis Revisited / J.M. Segui-Simarro // *Bot. Rev.* – 2010. – V. 76. – P. 377–404.
52. Singh S. Growth, photosynthesis and oxidative responses of *Solanum melongena* L. seedlings to cadmium stress: mechanism of toxicity amelioration by kinetin / S. Singh, S. M. Prasad // *Sci. Hortic.* – 2014. – V. 176. – P. 1–10.
53. Slesak H. The effect of genotype on a barley scutella culture. Histological aspects / H. Slesak, G. Goralski, H. Pawłowska // *Cent. Eur. J. Biol.* – 2013. – V. 8 (1). – P. 30–37.
54. Teale W. D. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development / W. D. Teale, I. A. Paponov, K. Palme // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2006. – V. 7. – P. 847–859.
55. Turan M. Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings / M. Turan, M. Ekinici, E. Yildirim, A. Gneş, K. Karagz, R Kotan, et al. // *Turk. J. Agric. For.* – 2014. – V. 38. – P. 327–333.

56. Wang X. D. Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: the fate of the pluripotent and totipotent stem cells / X. D. Wang, K. E. Nolan, R. R. Irwanto, M. B. Sheahan, R. J. Rose // *Ann Bot.* – 2011. – V. 107 (4). – P. 599–609.
57. Wilkinson S. Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management / S. Wilkinson, G. R. Kudoyarova, D. S. Veselov, T. N. Arkhipova, W. J. Davies // *J. Exp. Bot.* – 2012. – V. 63. – P. 3499–3509.
58. Zhang P. Senescence-inducible expression of isopentenyl transferase extends leaf life, increases drought stress resistance and alters cytokinin metabolism in cassava / P. Zhang, W. Q. Wang W, G. L. Zhang, M. Kaminek, P. Dobrev, J. Xu, et al. // *J. Integr. Plant Biol.* – 2010. – V. 52. – P. 653–669.
59. Zur I. Hormonal requirements for effective induction of microspore embryogenesis in triticale (*xTriticosecale* Wittm.) anther cultures / I. Zur, E. Dubas, M Krzewska, P. Waligorski, M. Dziurka, F. Janowiak // *Plant Cell Rep.* – 2015. – V. 34. – P. 47–62.