

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ ДЛЯ УСКОРЕНИЯ ПРОЦЕССА СЕЛЕКЦИИ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Галина Геннадьевна Голева¹
Татьяна Григорьевна Ващенко¹
Ирина Васильевна Тростянская¹
Наталья Николаевна Черкасова²
Александр Дмитриевич Голев³

¹ Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I

² Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова

³ Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова

Представлены результаты исследований (2015-2016 гг.) по оптимизации метода эмбриокультуры (культуры зародышей), имеющего практическое значение для селекции, так как позволяет преодолеть трудности выращивания гибридных семян озимой пшеницы, способствует быстрому размножению ценных генотипов и, как следствие, ускорению селекционного процесса. Объект исследований – незрелые зерновки озимой мягкой пшеницы сорта Алая заря из средней части колоса, где зародыши развиты лучше (5-7-й колосок). Выделение зародыша осуществляли из зерновок растений, выращенных в поле, на 16-17-е, 19-20-е, 22-24-е сутки после опыления. Техника приготовления, стерилизации питательных сред и культивирования зародышей *in vitro* общепринятая. Установлено, что оптимизированная питательная среда по Гамборгу (В₅) с агарозой (7,5 мг/л), вместо рекомендуемого агар-агара, способствует увеличению числа как полученных (с 80 до 95,4%), так и выживших эксплантов озимой пшеницы (с 28,5 до 56,4%), что подтверждено методом дисперсионного анализа. Лучшее развитие растений-регенерантов, формирование хорошо развитых корней, листьев (3-4 шт./раст.) и побегов кущения (4-5 шт./раст.) обеспечивается за счет добавления в питательную среду цитокинина 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л (лучший вариант). При пассировании эксплантов на среды с большим содержанием фитогормона (до 1-4 мг/л) наблюдается угнетение растений-регенерантов, а на безгормональной среде растения неспособны формировать побеги кущения. Лучшие результаты по количеству полученных *in vitro* эксплантов (65,2%) получены при культивировании 22-дневных зародышей, при этом наблюдается достаточно высокая их выживаемость (31,5%). Полученные результаты целесообразно использовать для ускоренного получения нового исходного материала, микроразмножения и сохранения ценных генотипов при селекции озимой пшеницы и других зерновых культур.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: озимая мягкая пшеница, технология *in vitro*, эмбриокультура, состав питательной среды, фитогормоны, эксплант, возраст зародыша, дисперсионный анализ.

OPTIMIZATION OF THE EMBRYO CULTURE METHOD FOR ACCELERATION OF WINTER WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) SELECTION PROCESS

Galina G. Goleva¹
Tatiana G. Vashchenko¹
Irina V. Trostyanskaya¹
Nataliya N. Cherkasova²
Alexandr D. Golev³

¹ Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great

² A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar

³ Voronezh State University of Forestry and Technologies named after G.F. Morozov

The authors present the results of research (2015-2016) in order to optimize the method of embryo culture (germ culture), which has a practical importance for selection because it allows overcoming the difficulties of growing hybrid seeds of winter wheat and contributes to the rapid reproduction of valuable genotypes and a subsequent acceleration of the selection process. The object of research was immature grains of soft winter wheat of the Alaya Zarya cultivar taken from the middle part of the spike, where the embryos are better developed (5th to 7th spikelet). The embryos were isolated from kernels of plants grown in the field on the following days: 16-17, 19-20 and 22-24 after pollination. The techniques for preparation, sterilization of culture media and *in vitro* cultivation of

embryos were conventional. It was established that the optimized culture medium by Gamborg (B₅) with agarose (7.5 mg/L) instead of the recommended agar increased the number of both obtained (from 80 to 95.4%) and survived explants of winter wheat (from 28.5 to 56.4%), as confirmed by the analysis of variance. The best development of regenerated plants, the formation of well-developed roots, leaves (3-4 per plant) and tillers (4-5 per plant) were obtained by enriching the culture medium with 6-BAP cytokinin in the concentration of 0.5 mg/L (the best variant). When explants were passaged on a medium with high phytohormone content (up to 1-4 mg/L), an inhibition of regenerated plants was observed and the plants on no-hormone medium failed to form tillers. The best results according to the number of *in vitro* explants (65.2%) were obtained by cultivation of 22-day-old embryos, which also had a relatively high survival rate (31.5%). The obtained results might be used to accelerate the availability of new source material, micropropagation and conservation of valuable genotypes in the selection of winter wheat and other crops.

KEY WORDS: soft winter wheat, *in vitro* technology, embryo culture, composition of culture medium, phytohormones, explant, age of the embryo, analysis of variance.

В ведение

В селекции полевых культур внутривидовая гибридизация является одним из основных методов создания популяций для последующего отбора. Озимая пшеница – самоопыляющаяся культура, и все физиолого-биохимические процессы, протекающие в растениях, направлены на поддержание именно этого способа опыления. Проводя гибридизацию, селекционеры используют принудительное перекрестное опыление, что противоречит естественному способу опыления культуры. При этом снижается завязываемость семян, а формирующиеся гибридные зерновки часто бывают щуплыми, слаборазвитыми либо не всегда прорастают. Поэтому сохранение и размножение нового гибридного материала – важная задача селекции.

В последнее время все большее значение для сохранения и поддержания внутривидовых и отдаленных гибридов в селекции злаковых и других сельскохозяйственных культур приобретает метод эмбриокультуры (культуры зародышей *in vitro*). Метод позволяет преодолеть неспособность гибридных семян к прорастанию, что способствует быстрому размножению, длительному сохранению ценных генотипов и ускорению селекционного процесса. Незрелые зародыши являются традиционным эксплантом для зерновых, преимущества которых перед другими эксплантами состоят в способности к эффективному соматическому эмбриогенезу [9], высокой интенсивности пролиферации и компетентности всех тканей зародыша при культивировании *in vitro* [7]. Регенерационная способность этих культур сохраняется на протяжении многих недель культивирования.

Метод клеточных технологий в селекции однодольных ограничивается трудностями при культивировании клеток, тканей и органов. Успех получения культуры клеток и регенерации из них растений определяется, главным образом, тремя факторами: природой экспланта, составом питательной среды и генотипом растения.

В связи с трудностями культивирования зародышей озимой пшеницы *in vitro* публикаций по данной теме немного. При этом большинство исследований посвящено разработке методики получения растений-регенерантов озимой пшеницы путем непрямой регенерации из каллусов. Однако растения, полученные таким методом, зачастую отличаются от исходных донорских растений, что нежелательно при размножении нового гибридного материала. Возможности применения биотехнологических методов в селекционном процессе озимой пшеницы весьма ограничены, так как они являются узкоспецифичными не только для различных генотипов одного вида, но даже для разных этапов культивирования эксплантов одного генотипа. В связи с этим и возникла необходимость разработки условий эмбриокультуры озимой пшеницы для создания нового и сохранения ценного селекционного материала в культуре *in vitro*.

Всё это определило *актуальность* и необходимость проведения работы в данном направлении, *цель* которой заключалась в оптимизации технологии получения растений-регенерантов озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum L.*) методом эмбриокультуры путем прямой регенерации.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- оптимизировать гормональный комплекс питательной среды для инициации регенерантов растений озимой пшеницы при культивировании *in vitro* незрелых зародышей разного возраста;
- установить оптимальный возраст зародышей для увеличения выхода из них растений-регенерантов.

Методика проведения исследований

Исследования проведены в 2015-2016 гг. при творческом сотрудничестве с отделом биотехнологии ФГБНУ «ВНИИСС имени А.Л. Мазлумова».

В исследованиях использовали общепринятую технику приготовления и стерилизации питательных сред [4]. Среды стерилизовали автоклавированием в течение 20 минут при 1,15 атм. Культивирование зародышей пшеницы *in vitro* осуществляли при температуре 23-26°C, 16-часовом фотопериоде с освещенностью 5000 люкс и относительной влажностью воздуха 70%.

Процесс выделения зародышей из зерновок проводили в стерильных условиях ламинар-бокса. Стерилизацию гибридных зерновок, из которых выделялись зародыши, осуществляли раствором 6%-го хлорамина, время экспозиции – 10 мин. Перед стерилизацией зерновки предварительно вычленили из колосковых чешуй [11]. Для лучшего проникновения хлорамина перед стерилизацией зерновки промывали в водном растворе моющего средства Тритон. После стерилизации зерновки промывали дистиллированной автоклавированной водой 4 раза по 15 мин.

Инокулированные зародыши помещали щитком вниз [3, 13] на питательные среды Гамборга и Эвелега (B₅) [12], различающиеся по гормональному составу.

Объект исследований – незрелые зерновки разного возраста сорта Алая заря, вычленение которых проводили на 16-17-е, 19-20-е, 22-24-е сутки после опыления.

Донорские растения выращивали в поле, где, по сравнению с условиями закрытого грунта, фазы роста и развития растений протекают нормально. Экспланты (зерновки исходных донорских растений) отбирали при низкой влажности воздуха с неповреждённых и здоровых растений. Для введения в культуру *in vitro* использовали наиболее развитые зародыши из средней части колоса (5-7-й колосок).

Результаты исследований и их обсуждение

Установлено, что питательная среда влияет на развитие эксплантов, не только обеспечивая условия для развития, но и ускоряя его. Ранее нашими исследованиями было установлено, что для формирования жизнеспособных регенерантов озимой пшеницы оптимальной является питательная среда с основой по Гамборгу (B₅) [11]. Однако проблема оптимизации питательной среды остается все еще актуальной. Поэтому мы изучали два варианта среды Гамборга (B₅): стандартную, в состав которой входит агар-агар (7,5 мг/л), и модифицированную нами, в которой агар-агар был заменен на агарозу в таком же объеме (7,5 мг/л).

В ходе исследований было установлено, что введение в состав питательной среды агарозы способствовало значительному увеличению числа полученных эксплантов озимой пшеницы (с 80 до 95,4%). При этом отмечено также и существенное увеличение выживших эксплантов (с 28,5 до 56,4%) (табл. 1).

Таблица 1. Выживаемость эксплантов озимой пшеницы в зависимости от состава питательной среды

Питательная среда	Введено зародышей, шт.	Количество эксплантов, %	
		получено всего	в том числе выживших
Гамборга (B ₅) (агар-агар)	70	80,0	28,5
Гамборга (B ₅) (агароза)	131	95,4	56,4

Результаты дисперсионного анализа показали, что влияние состава питательной среды на выживаемость эксплантов озимой пшеницы было достоверным (табл. 2).

Таблица 2. Влияние фактора «состав питательной среды» на выживаемость эксплантов (результаты дисперсионного анализа)*

Фактор	SS	Degree of Freedom	MS	F	p
Получено эксплантов, всего					
Intercept	789,3	1	789,3	784,6	0,00
Питательная среда	5,3	1	5,3	5,3	0,03
Error	56,3	56	1,0		
Количество выживших эксплантов					
Intercept	350,1	1	350,1	80,4	0,00
Питательная среда	39,2	1	39,2	9,0	0,00
Error	243,9	56	4,4		

* – величина уровня вероятности $p < 0,05$ свидетельствует о достоверном влиянии фактора

Использование агарозы в составе питательной среды способствовало двукратному увеличению числа выживших *in vitro* проростков озимой пшеницы и лучшему их развитию (рис. 1).

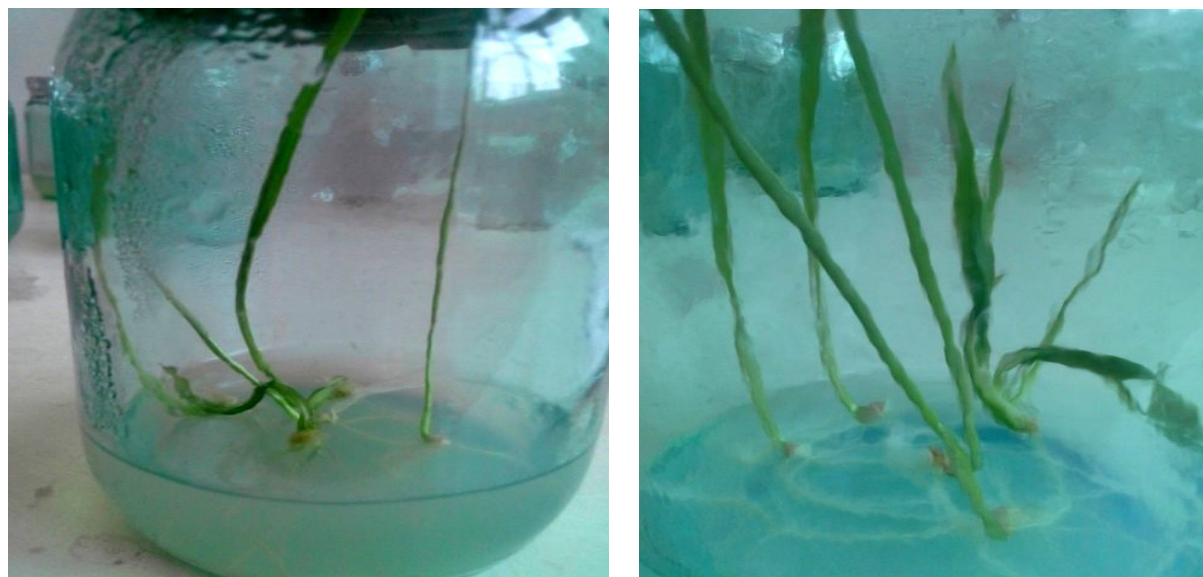


Рис. 1. Проростки озимой пшеницы на стандартной (слева) и модифицированной (справа) среде Гамборга (B₅)

Таким образом, было установлено, что использование агарозы в концентрации 7,5 мг/л вместо агар-агара для получения твердой питательной среды способствует существенному увеличению выхода регенерантов, стимулирует ростовые процессы и обеспечивает лучшее развитие растений.

Полученные *in vitro* проростки озимой пшеницы в дальнейшем переносили (пасировали) на среды с фитогормонами, которые обеспечивают процессы морфогенеза у эксплантов, основу которых составляла среда Гамборга (B₅).

В опыте было изучено 5 концентраций сред с добавлением фитогормона 6-БАП, стимулирующего ростовые процессы у растений:

- 1) среда Гамборга (B₅) + 6-БАП 4 мг/л;
- 2) среда Гамборга (B₅) + 6-БАП 3 мг/л;
- 3) среда Гамборга (B₅) + 6-БАП 2 мг/л;
- 4) среда Гамборга (B₅) + 6-БАП 1 мг/л;
- 5) среда Гамборга (B₅) + 6-БАП 0,5 мг/л.

В качестве контроля использовали безгормональную среду Гамборга (B₅).

Использование различных концентраций фитогормона цитокининовой природы 6-бензиладопурина (6-БАП) показало различное влияние на ростовые процессы регенерантов.

На контрольном варианте формировались сильные, хорошо развитые растения с 3-4 листьями, однако побегообразование было слабым (рис. 2).



Рис. 2. Растения-регенеранты озимой пшеницы, выращенные на безгормональной среде Гамборга B₅ (контроль)

При увеличении концентрации фитогормона 6-БАП до 3 и 4 мг/л у растений-регенерантов не наступала фаза кущения, их рост приостанавливался и в дальнейшем они погибали (рис. 3).



Рис. 3. Растения озимой пшеницы на питательной среде Гамборга (B₅) с добавлением 3 мг/л (слева) и 4 мг/л (справа) 6-БАП

При снижении концентрации 6-БАП до 2 и 1 мг/л растения-регенеранты формировались слабыми, были бледно-зеленого цвета, отмечался лишь рост листьев без образования побегов (рис. 4).



Рис. 4. Растения озимой пшеницы на питательной среде Гамборга В₅ с добавлением 1 мг/л (слева) и 2 мг/л (справа) 6-БАП

Формирование хорошо развитой корневой системы и побегов кущения у регенерантов озимой пшеницы было отмечено при пассировании на среду с концентрацией 0,5 мг/л 6-БАП (3-4 листа и 4-5 побегов) (рис. 5).



Рис. 5. Растения озимой пшеницы, полученные при культивировании на питательной среде Гамборга (В₅) с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП

Полученные результаты подтвердили данные исследований в опытах, проведённых нами ранее [10], о формировании регенерантов со слабым развитием при концентрации 0,2 и 0,4 мг/л.

Увеличение концентрации 6-БАП до 1-4 мг/л приводило к угнетению растений озимой пшеницы, а на безгормональной среде побеги вовсе не формировались.

При использовании в качестве эксплантов незрелых зародышей злаков нерешенным остается вопрос об их возрасте от момента опыления, при котором в культуре *in vitro* выход регенерантов увеличивается. По мнению большинства исследователей, зрелая ткань, в частности зрелые зародыши, менее отзывчива на условия культивирования [2, 5, 14]. Это связано с тем, что по мере дифференцировки и морфогенеза клетки тканей злаков, по-видимому, утрачивают свойство тотипотентности [15], поэтому регенерация растений происходит лучше, если в качестве экспланта брать наиболее молодые меристематические ткани [3]. В связи с этим рекомендуется подбирать среды для

выращивания зародышей с учётом степени дифференциации как зародыша, так и окружающих тканей, которые имеют свою специфику на каждом этапе развития [1].

По данным большинства исследователей, оптимальной стадией развития незрелого зародыша для получения быстрорастущих эмбриогенных каллусных культур считается 10-18 дней после опыления [5, 6, 8]. В это время все основные структуры зародыша уже сформированы. Эндосперм становится клеточным, и резервный питательный материал только начинает запасаться.

На основании результатов цито-гистологических исследований А.А. Катасоновой [6] и Н.Н. Кругловой [8] разработана периодизация эмбриогенеза пшеницы, согласно которой выделяется три этапа в развитии зародыша: 1-й этап – недифференцированный зародыш, 2-й этап – дифференциация зародыша и 3-й этап – дифференцированный зародыш. По их данным, на 10-12-е сутки после опыления зародыш пшеницы находится в начале органогенеза, на 15-17-е сутки – в завершении фазы органогенеза. Культивирование *in vitro* зародыша, находящегося на этих этапах развития, ведет к формированию каллуса. На 20-22-е сутки зародыш уже имеет все сформированные органы, и при культивировании такого зародыша *in vitro* формируются проростки пшеницы без каллусообразования – путем прямого органогенеза. Эта фаза развития незрелого зародыша пшеницы, приходящаяся на 20-22-е сутки после опыления, соответствует так называемой стадии *автономности* зародыша, когда он становится способным к саморегуляции и не зависит от материнского растения. Начиная со стадии автономности зародыши, как правило, развиваются по пути эмбриогенеза. У зародышей, изолированных на более ранних фазах развития, выращиваемых *in vitro*, отмечается индукция каллусообразования [7].

Поэтому для культивирования зародышей методом прямой регенерации их инокуляцию мы проводили (согласно периодизации А.А. Катасоновой [6] и Н.Н. Кругловой [8]) на третьей подстадии второй стадии (16-17-е сутки после опыления) и первой (19-20-е сутки после опыления) и второй (22-24-е сутки после опыления) подстадиях третьей стадии эмбриогенеза.

В ходе исследований было установлено, что зародыши более раннего возраста (16-17-е сутки после опыления) характеризовались низкой отзывчивостью на условия культивирования *in vitro*. Только у 10% эксплантов было отмечено формирование растений-регенерантов, и в дальнейшем все они дегенерировали (табл. 3).

Таблица 3. Влияние возраста зародышей на выход растений-регенерантов озимой пшеницы в культуре *in vitro* на среде Гамборга (В₅)

Возраст зародыша (сутки после опыления)	Введено зародышей, шт.	Количество проростков			
		получено		выживших	
		шт.	%	шт.	%
16-17	50	5	10,0	0	0,0
22	92	60	65,2	29	31,5
24	15	8	53,3	5	33,3

Зародыши, вычленение которых проводили на второй подстадии третьей стадии эмбриогенеза (22-24-е сутки после опыления), характеризовались лучшей отзывчивостью на условия культивирования. Чаще формировались проростки из 22-дневных зародышей (65,2%), лучшая сохранность отмечена у 24-дневных зародышей (рис. 6).



Рис. 6. Результаты культивирования разновозрастных зародышей при инокуляции на 16-17-е (слева), 22-е (в центре) и 24-е сутки после опыления

Однако влияние возраста зародышей на выход растений-регенерантов было не-достоверным (табл. 4).

Таблица 4. Оценка значимости влияния возраста зародышей озимой пшеницы на выход растений-регенерантов на питательной среде с агаром

Фактор	SS	Degree of Freedom	MS	F	p
Число проростков					
Intercept	112,1	1	112,1	51,4	0,00
Возраст зародыша	5,4	1	5,4	2,5	0,14
Error	28,3	13	2,2		
Число выживших растений					
Intercept	30,8	1	30,8	4,9	0,05
Возраст зародыша	0,1	1	0,1	0,0	0,88
Error	81,6	13	6,3		

Замена в составе питательной среды агар-агара на агарозу привела к значительному повышению выхода растений. При этом более чем в три раза увеличился выход регенерантов из 22-дневных зародышей и в 1,5 раза – из 24-дневных. Удалось получить растения и из 16-17-дневных зародышей (табл. 5).

Таблица 5. Влияние возраста зародышей на выход растений-регенерантов в культуре *in vitro* (среда Гамборга (B₅) + агароза)

Возраст зародыша (сутки после опыления)	Введено зародышей, шт.	Количество проростков			
		получено		выживших	
		шт.	%	шт.	%
16-17	39	37	94,9	22	56,4
19-20	71	69	97,2	36	50,7
22	30	30	100,0	30	100,0
24	30	26	86,7	15	50,0

Зародыши всех возрастов, за исключением 22-дневных, характеризовались одинаковой компетентностью к условиям культивирования *in vitro*.

Различия между разновозрастными зародышами проявились в особенностях темпов роста регенерантов. Растения из зародышей старшего возраста были лучше развиты, у них отмечалось усиление ростовой функции, особенно у тех, которые были получены из 22-дневных зародышей (рис. 7).

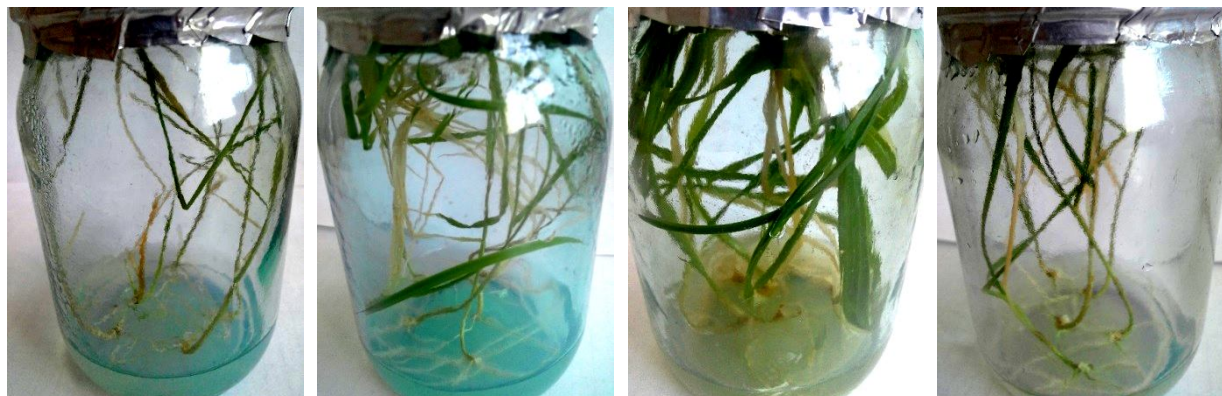


Рис. 7. Результаты культивирования незрелых зародышей, введенных в культуру (слева направо) на 16-е, 19-е, 22-е и 24-е сутки после опыления

При пересадке регенерантов чаще погибали растения из зародышей раннего возраста. Результаты дисперсионного анализа подтвердили, что на среде с агарозой возраст экспланта оказывал существенное влияние на выход растений-регенерантов (табл. 6).

Таблица 6. Оценка значимости влияния возраста зародышей озимой пшеницы на выход растений-регенерантов на питательной среде с агарозой

Фактор	SS	Degree of Freedom	MS	F	p
Число проростков					
Intercept	730,0	1	730,0	1394,5	0,00
Возраст зародыша	2,2	3	0,7	1,4	0,26
Error	20,4	39	0,5		
Число выживших растений					
Intercept	454,9	1	454,9	149,2	0,00
Возраст зародыша	43,3	3	14,4	4,7	0,01
Error	118,9	39	3,0		

Выводы

Установлено, что при использовании метода эмбриокультуры введение в состав питательной среды с основой по Гамборгу (B₅) вместо агар-агара агарозы (7,5 мг/л) стимулирует процесс роста и обеспечивает лучшее развитие растений-регенерантов озимой пшеницы на безгормональной среде в начале процесса культивирования зародыша *in vitro*, что подтверждается существенным увеличением числа полученных (с 80,0 до 95,4%) и выживших (с 28,5 до 56,4%) эксплантов.

Лучшее развитие растений-регенерантов озимой пшеницы, формирование хорошо развитых корней, листьев (3-4 шт./раст.) и побегов кущения (4-5 шт./раст.) наблюдаются при добавлении в питательную среду цитокинина 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л.

При пассировании эксплантов на среды с гормонами увеличение их содержания до 1-4 мг/л приводит к угнетению растений озимой пшеницы, а полное их отсутствие – к неспособности формировать побеги кушения.

Лучшие результаты по количеству полученных *in vitro* эксплантов озимой пшеницы (65,2%) получены при культивировании 22-дневных зародышей, при этом у них наблюдается достаточно высокая выживаемость (31,5%).

Зародыши более раннего возраста (16-17-е сутки после опыления) характеризуются низкой отзывчивостью на условия культивирования *in vitro*, только у 10% эксплантов отмечено формирование растений-регенерантов, в дальнейшем все они дегенерировали.

Таким образом, полученные результаты целесообразно использовать для ускоренного получения нового исходного материала, микроразмножения и сохранения ценных генотипов при селекции озимой пшеницы и других зерновых культур.

Библиографический список

1. Батыгина Т.Б. Размножение растений : учебник для студентов вузов, обучающихся по биол. и с.-х. направлениям и специальностям / Т.Б. Батыгина, В.Е. Васильева. – Санкт-Петербург : Изд-во Санкт-Петербургского ун-та (ЦОП тип. изд-ва), 2002. – 229 с.
2. Беломыльцева Е.В. Получение морфогенного каллуса из зрелых зародышей ячменя / Е.В. Беломыльцева, В.Н. Тоцкий, С.А. Игнатова // Научно-техн. бюллетень ВСГИ. – Одесса, 1991. – С. 39-43.
3. Биотехнология зерновых культур / И.Р. Рахимбаев, Ш. Тивари, Н.К. Бишимбаева и др. – Алма-Ата : Гылым, 1992. – 240 с.
4. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе : учеб. пособие / Р.Г. Бутенко. – Москва : ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
5. Гапоненко А.К. Регенерация растений пшеницы *Triticum aestivum* L. *in vitro* / А.К. Гапоненко, М.А. Маликова, А.А. Созинов // Цитология и генетика. – 1985. – Т. 1. – № 5. – С. 331-342.
6. Катасонова А.А. Оптимизация технологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы в каллусной культуре *in vitro* : автореф. ... канд. биол. наук : 03.00.23; 03.00.12 / А.А. Катасонова. – Уфа, 2007. – 19 с.
7. Круглова Н.Н. Незрелый зародыш пшеницы как морфологически компетентный эксплантат / Н.Н. Круглова, А.А. Катасонова // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т. 41. – № 2. – С. 124-130.

8. Круглова Н.Н. Периодизация развития зародыша пшеницы для биотехнологических исследований / Н.Н. Круглова // *Аграрная Россия*. – 2008. – № 3. – С. 20-22.
9. Мирошниченко Д.Н. Генетическая трансформация пшеницы с использованием тканей зрелых семян / Д.Н. Мирошниченко, Г.Н. Порошин, С.В. Долгов // *Биотехнология*. – 2001. – № 6. – С. 34-41.
10. Особенности культивирования незрелых зародышей озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в культуре *in vitro* / Г.Г. Голева, Ю.А. Батлук, Т.Г. Ващенко, А.Д. Голев // *Вестник Воронежского государственного аграрного университета*. – 2013. – Вып. 2 (37). – С. 21-25.
11. Получение растений-регенерантов озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в культуре *in vitro* / Г.Г. Голева, Ю.А. Батлук, Т.Г. Ващенко, Н.Н. Черкасова, А. Д. Голев // *Вестник Воронежского государственного аграрного университета*. – 2014. – Вып. 3 (42). – С. 17-22.
12. Gamborg O.L. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley / O.L. Gamborg, D.E. Eveleigh // *Can. J. Biochem.* – 1968. – Vol. 46. – P. 417-421.
13. Heyser J.W. Long-term, high frequency plant regeneration and the induction of somatic embryogenesis in callus cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) / J.W. Heyser, M.W. Nabors, C. MacKinnon, T.A. Dykes, et. al. // *Z. Pflanzenzuchtg.* – 1985. – Vol. 94. – S. 218-233.
14. Lupotto E. Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos / E. Lupotto // *Annals of Bot. Company*. – 1984. – Vol. 54. – P. 523-529.
15. Wernicke W. Somatic embryogenesis from sorghum bicolor leaves / W. Wernicke, R. Brettell // *Nature*. – 1980. – Vol. 287. – P. 138-139.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ Принадлежность к организации

Галина Геннадьевна Голева – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры селекции и семеноводства, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Российская Федерация, г. Воронеж, тел. 8(473) 253-76-93 (доб. 1269), E-mail: selection@agronomy.vsau.ru.

Татьяна Григорьевна Ващенко – доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры селекции и семеноводства, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Российская Федерация, г. Воронеж, тел. 8(473) 253-76-93 (доб. 1269), E-mail: selection@agronomy.vsau.ru.

Ирина Васильевна Тростянская – магистрант кафедры селекции и семеноводства, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Российская Федерация, г. Воронеж, тел. 8(473) 253-76-93 (доб. 1269), E-mail: selection@agronomy.vsau.ru.

Наталья Николаевна Черкасова – старший научный сотрудник отдела биотехнологии, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, тел. 8(47340) 5-33-26, E-mail: vniiss@mail.ru.

Александр Дмитриевич Голев – кандидат технических наук, доцент кафедры безопасности жизнедеятельности и правовых отношений, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова», Российская Федерация, г. Воронеж, тел. 8(473) 253-77-38, E-mail: Golev.Alexandr2014@mail.ru.

Дата поступления в редакцию 13.11.2016

Дата принятия к печати 27.11.2016

AUTHOR CREDENTIALS Affiliations

Galina G. Goleva – Candidate of Agricultural Sciences, Docent, the Dept. of Plant and Seed Selection Breeding, Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Russian Federation, Voronezh, tel. 8(473) 253-71-81, E-mail: selection@agronomy.vsau.ru.

Tatiana G. Vashchenko – Doctor of Agricultural Sciences, Professor, the Dept. of Plant and Seed Selection Breeding, Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Russian Federation, Voronezh, tel. 8(473) 253-71-81, E-mail: selection@agronomy.vsau.ru.

Irina V. Trostyanskaya – Master's Degree Student, the Dept. of Plant and Seed Selection Breeding, Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Russian Federation, Voronezh, tel. 8(473) 253-71-81, E-mail: selection@agronomy.vsau.ru.

Nataliya N. Cherkasova – Senior Research Scientist, Biotechnology Division, A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Russian Federation, Voronezh Oblast, Ramonsky District, VNISS settlement, tel. 8(47340) 5-33-26, E-mail: vniiss@mail.ru.

Alexandr D. Golev – Candidate of Engineering Sciences, Docent, the Dept. of Life Safety and Legal Relations, Voronezh State University of Forestry and Technologies named after G.F. Morozov, Russian Federation, Voronezh, tel. 8(473) 253-77-38, E-mail: Golev.Alexandr2014@mail.ru.

Date of receipt 13.11.2016

Date of admittance 27.11.2016