

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 581.4:633.11

H. A. АЛТАЕВА

ИЗУЧЕНИЕ КАЛЛУСОГЕНЕЗА У ВИДОВ, СОРТОВ И МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ПШЕНИЦЫ

(ДГП «Институт биологии и биотехнологии растений РГП «НЦБ РК»
Комитета науки МОН РК, г. Алматы)

На искусственную питательную среду были посажены незрелые 15–18-суточные зародыши видов *T.aethiopicum*, *T.kiharae*, *T.compactum*, *T.aestivum*, а также гибридные зерновки F_0 , полученные от 10 комбинаций межвидовых скрещиваний. Всего было посажено около 1000 незрелых зародышей. Рост и развитие каллусов был удовлетворительным на всем протяжении опыта. Самым интенсивным был рост каллусов у растений комбинации №1374 × *T.compactum* и у сорта Саратовская-29, а самым низким оставался у вида *T.kiharae* и растений комбинации *T.kiharae* × Саратовская-29.

Введение. Пшеница является важнейшей зерновой культурой Северного полушария, выращивают ее в странах с умеренным климатом. В настоящее время, для выведения новых высокоурожайных сортов, используют различные виды скрещиваний, в основном межсортовые, которые, однако, можно использовать лишь до определенных пределов. Необходимо вести поиск более прогрессивных методов создания сортов. Одним из таких классических методов по-прежнему является отдаленная гибридизация растений и, в частности, межвидовая и межродовая гибридизация.

Селекцию с использованием межвидовой и межродовой гибридизации обычно проводят по нескольким схемам: классической – скрещивание, многократный отбор до желаемых результатов; с помощью мутагенеза – обработка потомства различными химическими и природными мутагенами или же радиацией, затем многократный отбор до желаемых результатов; полиплоидии – скрещивание, обработка потомства определенными химическими веществами, дающими эффекты удвоения количества хромосом, затем отбор потомства по интересующим признакам; создание гибридных растений с признаком цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) – скрещивание с видами-носителями этого признака, получение стерильных аналогов сортов-закрепителей стерильности, получение восстановителей fertильности, опыление восстановителя-

ми fertильности и отбор до достижения цели; создание гибридных растений с признаками генной мужской стерильности (ГМС) – скрещивание с видами-носителями этого признака, отбор по желательным признакам до F_6 ; создание аллоплазматических линий – скрещивание, многократное насыщение отцовским сортом, в результате чего идет замена ядра материнского сорта отцовским, с последующим отбором желательных генотипов; сочетание нескольких схем для решения ряда проблем генетики и селекции и т. д. В последнее время все чаще начинают использовать и методы биотехнологии, в частности, метод эмбриокультуры, для достижения конечной целей селекции – создания новых линий или сортов сельскохозяйственных культур [1].

В результате проведения такой работы накапливается генетический и селекционный материал, который и используют для создания новых сортов сельскохозяйственных культур, с применением разнообразных генетических, цитогенетических, цитоэмбриологических, биохимических, физиологических, биотехнологических методов исследований.

Целью исследований являлось изучение способности роста незрелых зародышей видов, сортов и межвидовых гибридов на искусственных питательных средах, для дальнейшего получения гибридных растений с различными хозяйственными-ценными признаками.

Материал и методы исследований

На искусственную питательную среду были посажены незрелые 15–18-суточные зародыши видов *T.aethiopicum*, *T.turgidum*, *T.polonicum*, *T.timopheevii*, *T.kiharae*, *T.compactum*, *T.macha*, *T.spelta*, Мироновская-808, Саратовская-29, Ленинградка, №1301 МХ 103-04 MF5YCINT-4, №1322 МХ 103-04 MF5YCINT-68, №1332 МХ 103-04 MF5YCINT-96, №1383 МХ 103-04 MF5YCINT-228, №1385 МХ 103-04 MF5YCINT-230, а также гибриды F₁ №1374 × *T.compactum*, *T.com-pactum* × №1374, Саратовская-29 × *T.compactum*, *T.kiharae* × Саратовская-29, *T.turgidum* × Ленинградка, *T.aethiopicum* × Ленинградка, *T.spelta* × × *T.timopheevii*, Саратовская-29 × *T.timopheevii*, *T.timopheevii* × Саратовская-29, *T.timopheevii* × × *T.spelta*, *T.macha* × Саратовская-29. Всего было посажено около 1000 незрелых зародышей.

В результате эксперимента подтверждено, что метод стерилизации зерновок (обработка семян 70% этиловым спиртом – экспозиция 10 минут) является оптимальным для дальнейшей работы.

Каллусы получали из зародышей, изолированных на 15-й день и 18-й день после опыления. Посадка эксплантов из незрелых зародышей проводили в ламинарном боксе. Зерновки освобождали от цветковых и колосковых чешуй, зародыши изолировали в стерильных чашках Петри с помощью препаровальных игл под бинокулярной лупой МС-9. Выделенные зародыши помещали щитком вверх на питательную среду Мурасиге/Скуга, содержащую 2 мг/л 2,4-D, в стерильных условиях ламинарного бокса. До появления каллусов и побегов экспланты выдерживались в термостате – в темноте при 25°C, затем переносились на свет в условия светокультуральной комнаты, обеспечивающей температуру 25°C, 16-часовой фотопериод с интенсивностью освещения 5–10 тыс. люкс и влажность 75–80%. Через 4–5 недель каллусы были пересажены на свежую питательную среду МС, только с разными фитогормонами, и другой концентрацией некоторых компонентов питательной среды, то есть часть каллусов пересадили на среду содержащий 2,4-D – 5 мг/л для определения динамики роста каллусов, а часть – на среду, содержащую хелат железа – 5 мл/л (маточного раствора), сахарозу 20 г/л и ИУК – 5 мг/л для интенсивного роста

проростков, а затем проростки переносили на среду без фитогормонов и культивировали на свету при 16–18 часовом фотопериоде.

Исследования по росту и развитию каллусной ткани проводили с помощью микроскопа МБС-10, при увеличении окуляров ×8, с помощью специальной линейки с делениями. Через неделю после посадки на питательную среду МС были начаты промеры каллусов.

Состав питательной среды Мурасиге/Скуга

	Концентрация (мг/л)
Макроэлементы	
KNO ₃	1900
MgSO ₄ × 7H ₂ O	370
NaH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ PO ₄	170
Микроэлементы	
MnSO ₄ × H ₂ O	22,3
H ₃ BO ₃	6,2
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	8,6
KJ	0,83
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,025
Отдельно добавить	
CaCl ₂ × 2H ₂ O	320
FeSO ₄ × 7H ₂ O	27,8
Na ₂ ЭДТА × 2H ₂ O	37,3
Мезоинозит	100
Сахароза	30 г/л
Глицин	2
Витамины	
Тиамин В ₁	0,1
Пиридоксин В ₆	0,5
РР	0,5
pH	5,6-5,8
Агар-агар	8 г/л
2,4D	2 мг/л

Результаты и обсуждение

В решении проблемы получения гетеро- и гомозиготных линий из гибридных комбинаций для ускорения селекционного процесса основную роль играет разработка методов оптимизации компонентов питательных сред и изучение образования каллусов и растений-регенерантов при культивировании незрелых зародышей пшеницы.

Однако не все виды и гибридные комбинации одинаково хорошо растут на питательных средах [2].

В 2009 г. был проведен опыт по выращиванию незрелых зародышей видов, сортов и межвидовых гибридов пшеницы на искусственных питательных средах, с дальнейшей целью получения как можно большего количества гибридных растений с различными хозяйствственно-ценными признаками, для проведения генетико-селекционных анализов полученного в результате отдаленной гибридизации материала, в частности, стерильных и фертильных растений.

Нами были изучены рост и развитие каллусной ткани у следующих видов, сортов, линий и межвидовых гибридов пшеницы (табл., рис. 1, 2). Рост и развитие каллусов был удовлетворительным на всем протяжении опыта (рис. 2). В первую неделю после посадки каллусы интенсивно увеличивались в диаметре и у видов пшеницы и у межвидовых гибридов, за исключением вида *T.kiharae* и растений из комбинации *T.kiharae* × Саратовская-29. В последующие недели диаметр каллусов продолжал увеличиваться, самым интенсивным был рост каллусов у

Таблица 1. Динамика роста каллусов видов, сортов и межвидовых гибридов пшеницы F_0

Генотип	Дата посадки	Размеры каллусов			
		1 неделя	2 недели	3 недели	4 недели
<i>T.aethiopicum</i>	30.06.09	0,79×0,29	0,89×0,34	0,89×0,38	1,02×0,5
№1383 *	22.06.09	0,82×0,43	0,89×0,49	0,94×0,55	1,05×0,64
<i>C-29** × T.compactum</i>	24.06.09	0,72×0,22	0,82×0,28	0,83×0,31	0,88×0,34
<i>T.compactum</i> × №1374***	23.06.09	0,84×0,24	0,91×0,34	0,94×0,37	1,04×0,43
№1374 × <i>T.compactum</i>	23.06.09	0,81×0,28	0,99×0,43	1,18×0,57	1,26×0,65
<i>T.kiharae</i> × C-29	23.06.09	0,51×0,3	0,59×0,33	0,66×0,35	0,68×0,43
<i>T.kiharae</i>	10.07.09	0,52×0,18	0,56×0,25	0,59×0,33	0,62×0,37
C-29	10.07.09	0,95×0,33	1,03×0,42	1,07×0,57	1,17×0,66
Ленинградка	09.07.09	0,64×0,24	0,73×0,35	0,79×0,48	0,85×0,51

* , *** Линии из коллекции СИММИТ, ** Саратовская-29.

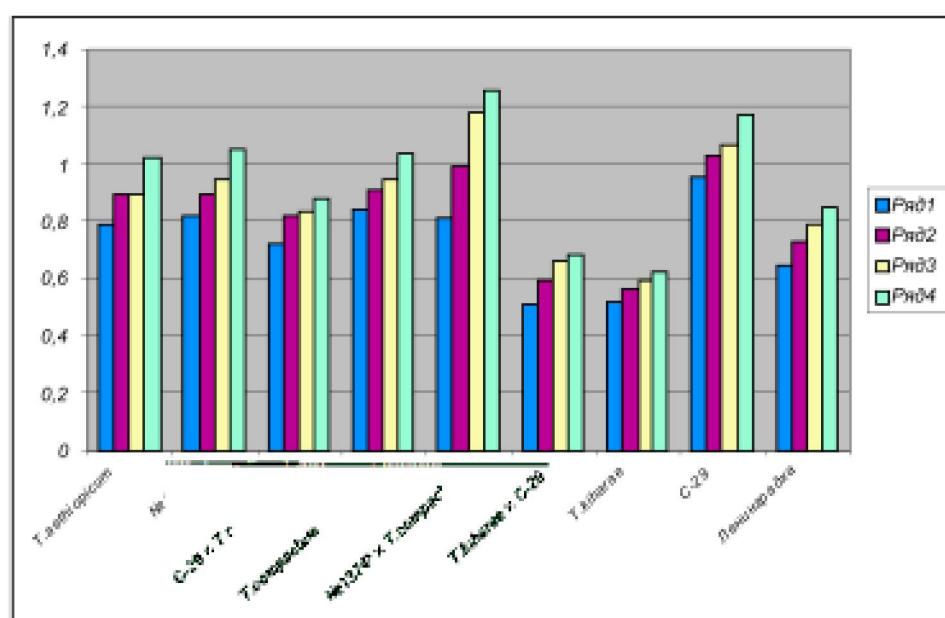


Рис. 1. Динамика роста и развития каллусов видов, сортов и межвидовых гибридов пшеницы F_0 . Диаметр каллусов.

Ряд 1 – первая неделя после посадки на питательную среду МС; ряд 2 – вторая неделя; ряд 3 – третья неделя; ряд 4 – четвертая неделя

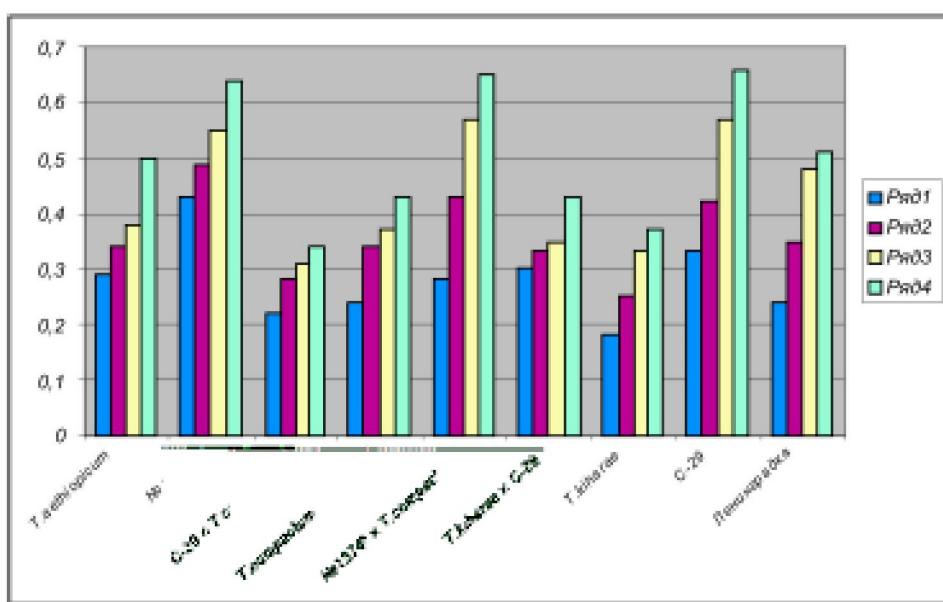


Рис. 2. Динамика роста и развития каллусов видов, сортов и межвидовых гибридов пшеницы F_0 . Высота каллусов.
Ряд 1 – первая неделя после посадки на питательную среду МС; ряд 2 – вторая неделя;
ряд 3 – третья неделя; ряд 4 – четвертая неделя

растений комбинации №1374 × *T. compactum* и у сорта Саратовская-29, а самым низким оставался у вида *T. kiharae* и растений комбинации *T. kiharae* × Саратовская-29. Рост и развитие каллусов в высоту также был вполне удовлетворительным (рис. 3). Особенно хорошо росли каллусы у линии №1383 (СИММИТ), а плохо росли опять же у вида *T. kiharae* и гибридных комбинаций Саратовская-29 × *T. compactum*, №1374 × *T. compactum*, *T. kiharae* × Саратовская-29, у сорта – Ленинградка. В дальнейшем высота

каллусов постепенно возрастала у растений всех видов, сортов и комбинаций скрещивания и максимальный рост наблюдали через 4 недели после посадки на среду МС – особенно у линии № 1383 (СИММИТ), у растений комбинации 1374 × *T. compactum* и сорта Саратовская-29. Самым низким был рост каллусов в высоту у вида *T. kiharae* и у растений из комбинации Саратовская-29 × *T. compactum*, а у растений из комбинации *T. kiharae* × Саратовская-29 рост каллусов в высоту был вполне удовлетворительным (рис. 3).



Рис. 3. Каллус из комбинации Саратовская-29 × *T. compactum* (Д-1-С × Д-13-С) через четыре недели после посадки на среду МС с добавлением 2,4-Д (5 мг/л)

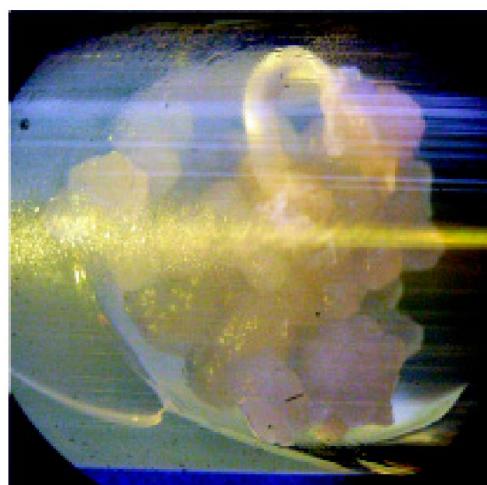


Рис. 4. Каллус из линии №1383 (СИММИТ) (Д-59) через четыре недели после посадки на среду МС с добавлением 2,4-Д (5 мг/л). Начинающийся рост растения-регенеранта

По-видимому, у вида *T.kiharae* в генотипе присутствуют гены, блокирующие рост и развитие каллусов на искусственных питательных средах, либо же есть гены, отрицательно реагирующие на фитогормоны, добавляемые в среды.

На рис. 3 и 4 представлены каллусы из гибридной комбинации Саратовская-29 × *T.com pactum* и линии №1383 (СИММИТ).

Таким образом, в результате исследований установлено, что:

- незрелые 15–18-суточные зародыши видов *T.aethiopicum*, *T.kiharae*, *T.compactum*, *T.aestivum* не только дают жизнеспособные каллусы, но и хорошо растут на искусственной питательной среде Мурасиге/Скуга с некоторыми модификациями;

- незрелые 15–18-суточные зародыши из гибридных зерновок F_0 , полученные от 10 комбинаций межвидовых скрещиваний, варьируют по темпам роста и каллусов и гибридных растений-регенерантов;

- биотехнологические методы исследования, в частности, метод эмбриокультуры является перспективным для получения гибридных растений, полученных при межвидовой гибридизации пшеницы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хайлеко Н.А. Цитоплазматическая мужская стерильность у некоторых гибридов тетра- и гексапloidной пшеницы // Вестник КазНУ. Серия биол. 2008. № 2(37). С. 69-74.

2. Иванов Г.И. Биотехнологические аспекты создания исходного материала для селекции зерновых колосовых культур: Автoreф. доктор. диссерт. Краснодар, Россия, 2006. 45 с.

Резюме

Коректік ортаға бидайың *T.aethiopicum*, *T.kiharae*, *T.compactum*, *T.aestivum* түрлерінің жетілмеген дәнектері және сонымен қатар гибридті дәнектер F_0 тұраалық будандастырумен алынған 10 киыстырулары отырызылған. Орта есептен 1000-ға жуық жетілмеген дәнектер отырызылды. Тәжірибе барысында каллустың өсу және даму карқындылығы орташа болды. Каллустың өсу карқындылығының ен жоғарғы көрсеткіші *T.compactum* x №1374 киыстыруында және Саратовская-29 сортында, ал ен тәменгі қарқындылық *T.kiharae* түрінде және *T.kiharae* x Саратовская-29 киыстыруында байқалды.

Summary

In an artificial culture medium were planting unripe 15–18-th daily embryos of species of *T.aethiopicum*, *T.kiharae*, *T.compactum*, *T.aestivum*, also hybrid grain F_0 , which has being from 10-th of combination of interspecific crossing. About 1000 unripened embryos were planting. Growth and development of calluses was satisfied along the whole length of experience. The most intensive was the growth of calluses of the plant combinations №1374 × *T.compactum* and in the species of *T.kiharae* and plant combinations *T.kiharae* x Saratovskaya-29.