

УДК 633.11:577.124

ВЫХОД ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ (TRITICUM AESTIVUM L.) В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ IN VITRO В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА САХАРОВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

О.И.МОЛКАНОВА, Т.В.ДАНИЛОВА

(Кафедра селекции и семеноводства полевых культур)

Изучалось влияние разных по составу углеводов и консистенции питательных сред на выход андрогенных структур в культуре пыльников яровой пшеницы. Исходным материалом служили межсортные гибриды первого поколения. В качестве источника углерода и энергии, кроме традиционной сахарозы, были использованы глюкоза и мальтоза (все в концентрации 0,25 моль/л). Сравнивались также жидкие и агаризированные среды. Исследовалась динамика гидролиза и поглощения сахаров жидких питательных сред. Рассматриваемые среды различались как режимами осмотического давления, так и химическим составом поглощаемых углеводов.

Необходимость разработки методов получения гаплоидных и гомозиготных дигаплоидных растений пшеницы обусловлена их ценностью для селекционного процесса и генетических исследований.

Основным способом получения гаплоидов пшеницы, как известно, является культура пыльников *in vitro* [5, 6]. При этом выход регенерантов зависит от генотипа донорных растений и условий культивирования пыльников.

Возможность значительного повышения эффективности андроген-

неза *in vitro* разных видов растений путем замены традиционного компонента питательной среды — сахарозы — другими углеводами установлена многими исследователями. Эксперименты проводились с ячменем [4, 7, 10, 13], пшеницей [8, 11, 12], картофелем, рисом, табаком, петунией, дурманом [7]. В опытах с пшеницей получены разноречивые результаты. Так, при сравнении сред, содержащих сахарозу, фруктозу, глюкозу и их смеси, установлено, что наилучшие результаты дает использование среды,

содержащей глюкозу, поскольку в этом случае выход эмбрионидов в 2—10 раз больше, чем в контроле, т.е. на среде с сахарозой. В других опытах [12] при изучении сред с сахарозой, мальтозой, целлобиозой, мелизитозой, трегалозой и мальтотриозой наиболее эффективным оказалось применение мальтозы. С ее помощью получены регенерантные гаплоидные растения от гибридов, которые в ранее изученных условиях не были способны к андрогенезу *in vitro*. Анализ эффективности сред, содержащих сахарозу, мальтозу, мелибиозу, глюкозу и их сочетания, показал, что лучшие результаты дает использование мальтозы, активизировавшее андрогенез в 3—4 раза (контроль — среда с сахарозой) [11].

Цель нашей работы на первом этапе оценить эффективность применения трех углеводов — глюкозы, сахарозы и мальтозы — в культуре пыльников яровой пшеницы. При этом сравнивали жидкие и агаризированные среды. На следующем этапе был проведен сравнительный анализ динамики гидролиза и утилизации сахаров тех же трех вариантов жидких питательных сред развивающимися андрогенными структурами. В опыте использовали пыльники растений наиболее отзывчивого на культуру *in vitro* генотипа.

Донорные растения — гибриды F_1 — были получены в лаборатории селекции и семеноводства полевых культур Тимирязевской академии: № 1 — Иволга × линия 65h—456T; № 2 — линия 294h—4 × линия 431h—10a—15г;

№ 3 — Приокская × линия 5663; № 4 — линия 6786 × линия 165h—10a; № 5 — линия 270h—1г × 1604h—60a.

Их выращивали в полевых условиях и в теплице. Побеги срезали в фазу выхода в трубку. Стадию развития микроспор оценивали микроскопированием непосредственно перед началом культивирования. Срезанные побеги 6—8 дней содержали в темноте при температуре $5+1^{\circ}\text{C}$. Колосья стерилизовали в 0,1% растворе диацетида 5—7 мин. Для культивирования пыльников использовали среду MN6 [9] с добавлением глюкозы, сахарозы («Реахим» чистый для аналитических исследований) или мальтозы («Реахим» чистый для бактериальных целей) в концентрации 0,25 моль/л (во 2-м опыте использовали мальтозу фирмы Sigma). Растворы витаминов, гормонов, аминокислот и мальтозы подвергали холодной стерилизации, растворы солей с глюкозой или сахарозой и агаром автоклавировали (1,0 атм, 120°C , 20 мин). Пыльники культивировали при 28—30°C в темноте (30 шт. в 5 мл среды). Учет андрогенных структур начинали через 3 нед. Сформировавшиеся андрогенные структуры переносили на среду «190—2» [14]. Общее количество культивируемых пыльников в 30 вариантах 1-го опыта (5 генотипов, 3 сахара, жидкие и агаризированные среды) изменялось от 54 до 1053.

Определение сахаров проводили 4 раза с интервалом в 10 дней. Для этого использовали следующие методики.

1. *Среда с сахарозой* (контроль): а) концентрацию свободной глюкозы определяли калориметрическим методом [3]; б) общее содержание глюкозы — при анализе гидролизованной пробы (к 1 мл среды добавляли 1 мл 1% HCl , смесь нагревали 15 мин на кипящей водяной бане); в) концентрацию негидролизованной сахарозы вычисляли как разность между общим содержанием глюкозы и концентрацией свободной глюкозы; г) концентрацию фруктозы устанавливали по реакции с резорцином [2].

2. *Среда с мальтозой*: а) общее содержание глюкозы определяли, как указано выше, для среды с сахарозой; б) измеряли оптическую плотность негидролизованного раствора (после реакции с глицератом меди [3]). О наличии в нем негидролизованной мальтозы и свободной глюкозы можно было судить по градуировочным кривым, построенным для стандартных растворов мальтозы, глюкозы и их смесей.

В каждую пробирку помещали 15 мл среды, на которую высаживали 30 пыльников.

Результаты

Использованные в опыте генотипы существенно различались по способности к андрогенезу (рис.1). Наиболее отзывчивым оказался № 2 (до 25,7 эмбриоида на 100 культивируемых пыльников), наименее отзывчивым — № 5.

Генотипы № 1, 2, 4 образовали

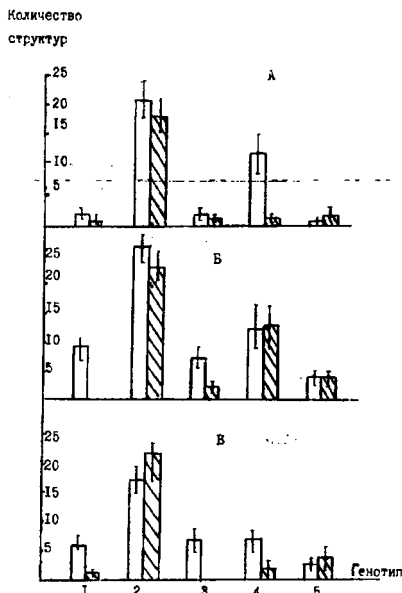


Рис.1. Выход андрогенных структур в пересчете на 100 пыльников на жидких (столбик незаштрихованный) и агаризированных (заштрихованный) средах, содержащих сахарозу (А), глюкозу (Б) и мальтозу (Б). При вычислении доверительного интервала выход эмбриоидов рассматривался как доля признака в выборке (т.е. проводился анализ вариации качественного признака). О достоверности влияния факторов опыта на варьирование признака судили по F_0 , вычисленному в двухфакторном дисперсионном анализе небольшой группы данных [1]. Выяснилось, что влияние обоих факторов существенно.

наибольшее число эмбриоидов на среде (и агаризированной, и жидкой), содержащей глюкозу. Для генотипов № 1 и 3 лучше контроля была жидкая среда с мальтозой. В остальных случаях она либо не отличалась от контроля, либо была существенно хуже него (№ 4). Сахароза ока-

залась наихудшим углеводом для наименее отзывчивого генотипа № 5.

На агаризированных средах генотипы № 1, 3, 4 образовали значительно меньше эмбрионидов,

чем на жидких, независимо от углеводного состава сред.

Выход регенерантных растений во всех случаях был прямо пропорционален количеству сформированных эмбрионидов (таблица).

**Образование регенерантных растений и выход альбиносов
в зависимости от генотипа донорного растения, состава сахаров
и консистенции питательной среды***

Показатель	Жидкие среды			Агаризированные среды		
	сахара	глюкоза	мальтоза	сахара	глюкоза	мальтоза
№ 1						
Количество пыльников	756	459	621	378	189	513
Выход регенерантов**	1,20	2,00	0,50	0,50	0,0	0,0
Зеленые:альбиносы	0,13	1,25	0,0	—	—	—
№ 2						
Количество пыльников	729	729	459	297	486	270
Выход регенерантов	6,50	11,70	6,10	6,10	16,90	5,90
Зеленые:альбиносы	1,14	0,98	0,47	0,64	0,49	0,46
№ 3						
Количество пыльников	1053	621	756	351	486	270
Выход регенерантов	1,40	2,60	3,60	0,90	0,40	0,0
Зеленые:альбиносы	0,07	0,23	0,08	0,0	—	—
№ 4						
Количество пыльников	540	351	378	189	135	216
Выход регенерантов	4,30	6,80	0,30	0,0	3,00	0,0
Зеленые:альбиносы	0,15	1,00	—	—	0	—
№ 5						
Количество пыльников	297	486	405	54	189	54
Выход регенерантов	0,0	0,60	0,0	0,0	1,1	0,0
Зеленые:альбиносы	—	—	—	—	1	—

* По результатам двухфакторного дисперсионного анализа данных без повторностей [14] существенное влияние на варьирование количества регенерантов оказал генотип ($F_{\phi}=14,89$, $F_{\phi 05}=2,87$), влияние среды на 5% уровне значимости оказалось несущественным ($F_{\phi}=2,22$, $F_{\phi 05}=2,71$).

** В пересчете на 100 пыльников.

Хотя дисперсионный анализ не выявил существенного влияния типа питательной среды на количество сформировавшихся регенерантов, нужно отметить, что зеленые гаплоидные растения генотипа № 5 удалось получить только на средах, содержащих глюкозу.

Для оценки динамики гидролиза и утилизации сахаров жидких питательных сред андрогенными структурами использовали пыльники растений генотипа № 2. Пробы брали в течение 40 дней. За этот срок успевали сформироваться эмбриоподобные структуры диаметром 1—3 мм, которые при пересадке на регенерационную среду способны были дать начало гаплоидным растениям.

Из результатов анализа проб (рис.2) следует, что гидролиз сахарозы опережал ее утилизацию. Так, уже через 15 дней половина этого дисахарида была гидролизована, тогда как уменьшения концентрации фруктозы к этому сроку выявить не удалось, а содержание глюкозы снизилось не более чем на 10%. К концу культивирования сахароза в среде не обнаруживалась, а концентрация и глюкозы, и фруктозы уменьшилась примерно на 20%. В среде без пыльников, находящейся в тех же условиях, что и с пыльниками, гидролиза сахарозы не наблюдали.

Поглощение глюкозы из жидкой среды отражено на рис.2 (генотип № 1). На 15-й день культивирования концентрация глюкозы уменьшилась на 10%, а к 30-му дню — на 16%. В контроле также происходило некоторое ее снижение.

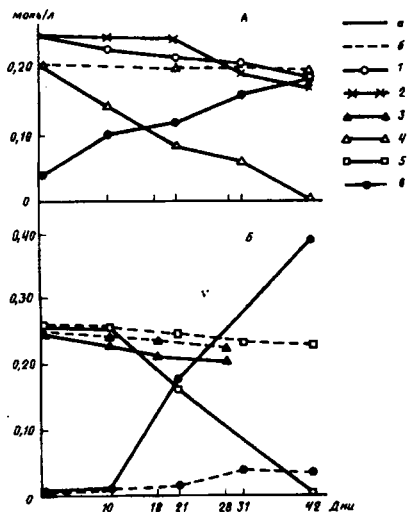


Рис.2. Изменение состава питательной среды, исходно содержащей сахарозу (А) и мальтозу или глюкозу (Б) при культивировании пыльников. О достоверности изменения концентраций в опытных (б) вариантах по сравнению с контролем (а) судили по F_{ϕ} , сравнивая его с F_{05} . Для вычисления данные преобразовывали с помощью $\arcsin x$. Потребление углеводов: 1 — глюкозы, 2 — фруктозы, 3 — глюкозы в опыте с генотипом № 1 (среда с глюкозой). Гидролиз дисахаридов: 4 — сахарозы, 5 — мальтозы, 6 — концентрация свободной глюкозы.

Мальтоза (рис.2) гидролизировалась медленнее сахарозы.

По мере гидролиза дисахаридов и поглощения углеводных компонентов сред происходило изменение их осмотического давления (рис.3). В среде, содержащей глюкозу, оно плавно уменьшалось, тогда как в двух других средах к концу культивирования возросло в 1,3—1,7 раза.

Таким образом, рассмотренные варианты сред различались по динамике гидролиза и утилизации

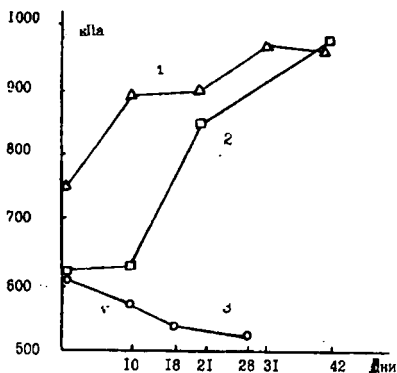


Рис.3. Изменение осмотического давления в жидких средах с сахарозой (1), мальтозой (2), глюкозой (3, для генотипа № 1) при культивировании пыльников. За точку отсчета взято осмотическое давление среды, не содержащей сахаров, осмотическое давление вычисляли по формуле $P=RTci$.

сахаров, химическому составу утилизируемых углеводов и режиму осмотического давления.

Как известно, сахара питательной среды служат источником энергии и углерода для культивируемых тканей и именно их концентрация определяет осмотическое давление среды, так как превосходит концентрации всех остальных растворимых компонентов вместе взятых в 2—3 раза. Для гидролиза и поглощения рассматриваемых сахаров растительные клетки вынуждены использовать разные ферментные системы. В итоге концентрация и состав сахаров питательной среды влияют как на количественные, так и на качественные показатели роста андрогенных структур: степень их дифференциации и способность к морфогенезу [7, 12,

13], образование альбиносных регенерантов [13].

Следовательно, сахар определяет несколько параметров питательной среды. И то, какая из его функций влияет в большей степени на активность андрогенеза, предстоит выяснить в последующих исследованиях.

Результаты этой работы позволяют рекомендовать глюкозу в качестве компонента жидкой питательной среды вместо традиционной сахарозы, что повысит эффективность получения гомозиготных (дигаплоидных) растений *Triticum aestivum*.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Зайцев Г.Н.* Математический анализ биологических данных. М.: Наука, 1991.
2. Малый практикум по биохимии. Ч. I/Под ред. Юркевича В.В. М.: Изд-во МГУ, 1979.
3. Методы биохимического исследования растений/Под ред. Ермакова А.И. Л.: Агропромиздат, 1987.
4. *Тивари Ш.* Морфогенез в культуре пыльников и изолированных микроспор ячменя. — Автореф. канд. дис. 03.00.12. М., 1989.
5. Эмбриология растений: использование в генетике, селекции, биотехнологии. Т.2. М.: Агропромиздат, 1990, с.355—366.
6. *Biotechnology in Agriculture and Forestry/ed. by Y.P.S. Bajaj.* 1990, vol. 13, Wheat.
7. *Botty N., Dunwell J.* — Plant cell, tissue and organ culture, 1989, vol. 18, № 2, p. 221—226.
8. *Chu C.C., Hill R.D., Brule-Babel A.L.* — Plant Sci., 1990, vol. 66, № 2, p. 255—262.
9. *Chu C.C., Hill R.D.* — Plant Sci., 1988, vol. 55, N 2, p.

- 175—181. — **10.** *Finnie S.J., Powell W., Dyer A.F.* — Plant breeding, 1989, N 103 (2), p. 110—118. — **11.** *Last D.I., Brettell R.I.S.* — Plant cell reports, 1990, vol. 9, N 1, p. 14—16. — **12.** *Orshinsky B.R., McGregor L.J., Johnson G.I.E., Hud P., Karthia K.K.* — Plant cell reports, 1990, vol. 9, N 7, p. 365—369. — **13.** *Sorvari S., Schieder O.* — Plant breeding, 1987, N 99, p. 164—171. — **14.** *Zuang J.J., Jia X.* Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Sci. Press, Beijing, China, 1983, p. 431—432.

*Статья поступила 29 апреля
1994 г.*

SUMMARY

Practical application of androgenetic haploids is still limited by a small number of haploid individuals recovered from others. We compared 6 mediums (with sucrose, maltose and glucose, liquid and solid ones and 5 genotypes of spring wheat (F_1 hybrids). In the following experiment we studied the dynamics of hydrolysis and utilization of carbohydrates in 3 liquid mediums in a more responsive genotype. The liquid glucose medium was best. Using this medium we obtained greed haploid plants from breeding material which was initially nonresponsive. Liquid mediums contained 3 different carbohydrates, they differed in their osmotic regimes and in composition of utilized carbohydrates.