

SUMMARY

New approaches to estimating the difference and resemblance in ecological-ontogenetic variability of genotypes by growth quantitative characters, as well as corresponding methodical practices of comparative genetic-mathematical analysis are suggested. On the base of the data obtained in combined testing of 22 varieties of soft winter wheat conducted for three years the suggested approaches were checked, and the hypothesis about resemblance of relative variability of quantitative character in ecological gradients and ontogenesis (Smiryayev, 1985) was confirmed, besides, faint correlative connection between parameters of resemblance in the form of ontogenetic response of growth characters in the varieties and indicators of resemblance in their allelic composition was established.

Известия ТСХА, выпуск 4, 1995 год

УДК 631.222:58.083.5:631.527

СОХРАНЕНИЕ И КЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ОТДАЛЕННЫХ ГИБРИДОВ ПШЕНИЦЫ

В.С. ГИРКО

(Кафедра селекции и семеноводства полевых культур)

Обсуждается эффективность клонального размножения отдаленных гибридов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с некоторыми близкими видами (*T. timopheevii* Zhuk., *T. monosocum* L. и *Aegilops juvenalis*) путем регенерации растений из каллусной ткани при культивировании незрелых зародышей. Доказано существование генетического контроля процессов каллусогенеза, эмбриогенеза и регенерации, а также их зависимость от генотипов обоих родителей.

У ранних репродуктивных поколений отдаленных гибридов в мейозе наблюдается большое количество нарушений, что обуславливает их стерильность. Такие растения нуждаются в повторном опылении,

как правило, одним из родителей, что трудно осуществить, поскольку даже при наличии искусственного климата сложно добиться одновременного цветения гибридов и растений-опылителей, а кроме того, бек-

кроссы не всегда удаются. В итоге множество с трудом полученных растений погибает, исследовательская программа прерывается и нуждается в повторении, что связано со значительными дополнительными затратами.

Имеется также настоятельная необходимость создания максимального количества копий обычно численно ограниченных уникальных генотипов, которые нужны для проведения эффективной селекционной работы. Помимо этого, эмбриокультура из-за видоспецифичности в определенных комбинациях скрещивания не выполняет своих функций спасения абортивных зародышей. Воспроизводство через каллусообразование, соматический эмбриогенез и регенерацию оказывается более продуктивным.

Известно, что ткани из генеративной сферы, особенно эмбрионального происхождения, способны к каллусообразованию, а затем к дифференциации и соматическому эмбриогенезу. В связи с этим незрелые зародыши или соцветия отдаленных гибридов злаков с успехом могут быть использованы как объекты для массового получения гибридных растений-регенерантов, хотя их незаслуженно редко применяют при отдаленной гибридизации. Эта технология микроклонального размножения отдаленных гибридов F_1 , без значительных затрат увеличивая популяцию растений, позволяет неограниченно долго поддерживать определенные комбинации скрещивания путем повторения цикла: растение → незрелые зародыши (соцветия) → каллус → растение. Несмотря на значительные отклонения от нормы в процессе развития [1], наиболее удачным эксплантом для индук-

ции каллусогенеза у отдаленных гибридов злаков признаются незрелые зародыши, что обусловлено, вероятно, лучшей по сравнению с эксплантами иного происхождения способностью к дифференциации и последующему росту *in vitro*. В свою очередь каллусные культуры, иницированные из тканей щитка незрелого зародыша, обладают высокой регенерационной способностью [3] в течение длительного времени [2].

Методика

Нами были применены технологии регенерации растений из каллусных тканей, полученных в культуре незрелых зародышей, для клонального размножения гибридов F_1 от скрещивания различных эндемических и диких видов злаков (Т. *timopheevii* Zhuk., Т. *monococcum* L. и *Aegilops juvenalis*) с большим набором генотипов мягкой пшеницы (Т. *aestivum* L.).

Зерновки стерилизовали в течение 7 мин в 0,25% растворе гипохлорида натрия, в который добавляли по 2 капли Твина-80 на 100 мл. Затем их 3-кратно ополаскивали в стерильной дистиллированной воде. Зародыши вычленили на 16—18-й день после опыления в асептических условиях и помещали на среду для инициации тканевых культур щитком вверх (если он присутствовал) или на среду для получения проростков щитком вниз.

Питательная среда для культивирования тканей состояла из следующих компонентов: неорганических солей по прописи Мурасиге и Скуга [4], тиамин- HCl — 0,4 мг/л, витаминов — по прописи Стаба [5], сахарозы — 30 г/л; гидролизата казеина — 500 мг/л, агара Ser-

ва — 0,7%; рН среды доводили до 5,75 перед автоклавированием. Для инициации тканевых культур в указанную среду добавляли из расчета на 1 л 2 мг 2,4-Д и 150 мг L-аспарагина.

Через месяц культивирования тканевые культуры пересаживали на среду, в 1 л которой содержалось 0,75 мг 2,4-Д, 100 мг L-аспарагина, 100 мг L-глутамина. Тканевые культуры с эмбрионными зонами переносили на среду, содержащую 0,5 мг 2,4-Д, 50 мг L-аспарагина и 150 мг L-глутамина на 1 л. Культивирование проводили в темноте при 27° С. Для регенерации растений

калусные культуры переносили на среду с 0,25 мг 2,4-Д, 150 мг L-глутамина в 1 л. При укоренении растений и проращивании зародышей использовали ту же среду, но без 2,4-Д. В этом случае культивирование осуществляли при комнатной температуре на свету.

Результаты

Влияние генотипа на способность к калусообразованию у различных злаков в настоящее время уже не вызывает сомнения. Это нашло подтверждение и в наших экспериментах. На примере *T. timopheevii* (рис. 1) отмечено значительное варьиро-

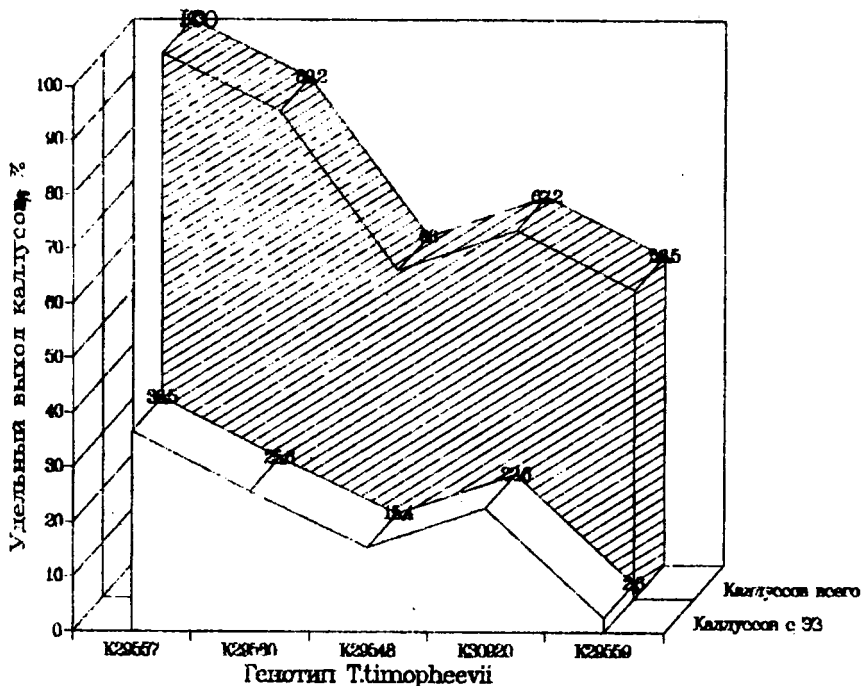


Рис. 1. Морфофизиологический потенциал генотипов *T. timopheevii* в культуре незрелых зародышей.

ЭЗ — эмбрионные зоны.

вание морфофизиологического потенциала зародышей по способности к каллусообразованию (от 56,5% для К29559 до 100% для К29557) и к эмбриогенезу (выход эмбрионных каллусов — соответственно 2,6 и 36,5%). Анализ дисперсий экспериментальных данных также подтвердил достоверность указанных различий на 5% уровне значимости как по каллусогенезу, так и эмбриогенезу.

Недостоверными по способности к каллусогенезу оказались различия между генотипами К29559, К9548, К30920 (группа гомогенности — а); К30920, К29560 (группа гомогенности — б) и К29560, К29557 (группа гомогенности — с). Высокосущественными были различия между генотипом К29557, с одной стороны, и К29548, К30920, К29559 — с другой, а также между К29560 и генотипами К29548, К29559.

Аналогичный анализ по способности формировать первичные зоны морфогенеза в каллусе указывает на недостоверность различий у генотипов К30920 и К29560. Во всех же остальных случаях различия между генотипами были высокосущественными.

Влияние этих же генотипов на морфофизиологический потенциал в чужеродной генотипической среде может быть неоднозначным, что, несомненно, сказывается на эффективности работы в прикладных селекционных программах и поэтому нуждается в специальном изучении. Так, при сравнении морфофизиологического потенциала генотипов Т. timopheevii (К29557, К29560, К29548) и склонности к каллусогенезу и эмбриогенезу у отдаленных гибридов, полученных с их участи-

ем, не удалось установить сколько-нибудь существенные линейные взаимозависимости в системе родители — потомки (коэффициенты корреляции 0,33—0,35).

При изучении влияния генотипов родителей на характеристики гибридов F₁ от скрещивания 2 сортообразцов Т. timopheevii (К29557 и К29560) с 5 сортами мягкой пшеницы (Полукарлик, Мироновская яровая, Янус, Лютеценс 211, Ленинградка крупнозерная) установлены значительные и достоверные генотипические (видовые и сортовые) различия для обоих компонентов скрещивания (рис. 2). Причем исходя из анализа дисперсий эффектов наибольшее влияние на каллусогенез у гибридов оказывали генотипы Т. timopheevii (вложенный дизайн 73,3%) и значительно меньшее — генотипы Т. aestivum (13,3%). Эффекты их взаимодействия оказались несущественными.

Несмотря на то, что влияние родительских форм на частоту образования эмбриоподобных структур было также несущественным (различия по выходу регенерантов высокосущественны), морфогенный потенциал каллусов здесь, судя по величине дисперсий (особенно для регенерационной способности), также находится под контролем обоих родителей. Причем в отличие от способности к каллусогенезу наиболее высокие эффекты были у генотипов Т. aestivum (вложенный дизайн эмбриогенеза — 13,1%, регенерационной способности — 59,6%), меньшие — у Т. timopheevii (0 и 37,9% соответственно).

Склонность к каллусогенезу и регенерационная способность у гибридов с участием К29557 (каллусо-

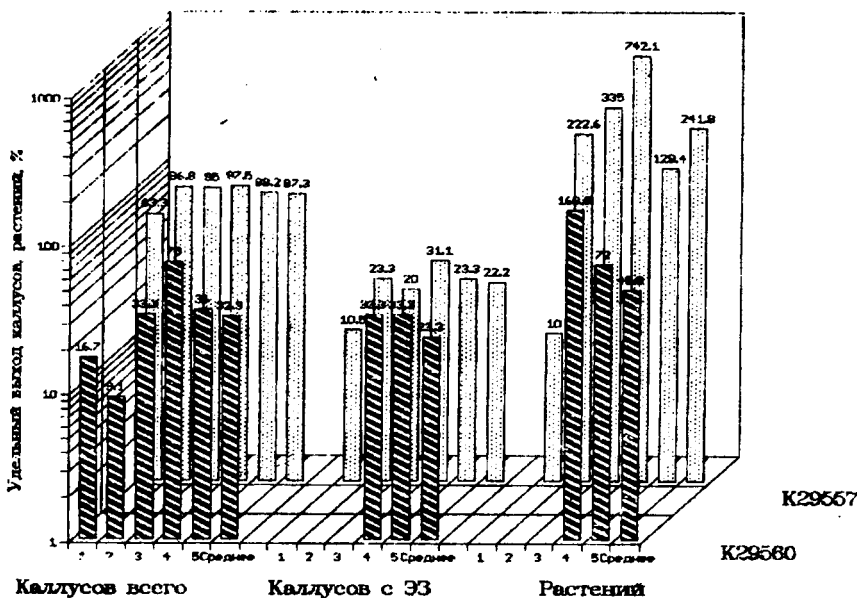


Рис. 2. Влияние генотипов родителей на морфогенетический потенциал гибридов F_1 от скрещивания *T. timopheevii* и *T. aestivum* в культуре незрелых зародышей.

1 — сорт Полукарлик; 2 — Мироновская яровая; 3 — Янус; 4 — линия 221; 5 — сорт Ленинградская крупнозерная.

генез 87,3%, регенерация 241,8%) оказались значительно выше, чем у гибридов с участием К29560 (32,3 и 44,8%). Эмбриогенный потенциал каллуса был сходным для гибридов обоих видов *T. timopheevii* (22,2 и 23,3% соответственно).

Среди сортообразцов мягкой пшеницы наиболее высокими морфофизиологическими потенциами отличались гибриды с участием Лютесценс 211 (средние уровни каллусогенеза — 86,2%, эмбриогенеза — 32,4%, коэффициент размножения при регенерации — 455,4%).

Наблюдаемые нами значительные количественные различия в частотах по каллусогенезу, с одной стороны, и морфогенетическому потенциалу каллусов — с другой, на ли-

нейном и на гибридном уровнях, возможно, указывают на их различный генетический контроль. Однако результаты проведения специального анализа не позволяют утверждать это однозначно, так как корреляционные зависимости между показателями каллусогенеза и эмбриогенеза (коэффициенты корреляции — 0,57, детерминации — 32,3), каллусогенеза и регенерационной способности (коэффициенты корреляции — 0,66, детерминации — 43,5) имеют средние уровни, несмотря на высокую достоверность корреляционно-регрессионной модели в целом. При этом взаимозависимости между каллусогенезом и эмбриогенезом определяются уравнением регрессии: удельный выход ЭПС = $-0,98 +$

0,32 х удельный выход каллусов, а между каллусогенезом и регенерационной способностью: удельный выход регенерантов = $-75,7 + 3,9$ х удельный выход каллусов.

Указанные закономерности находят подтверждение и в другом опыте на более широком видовом и сортовом фоне родительских компонентов отдаленных гибридов, где взаимозависимость между каллусогенезом и регенерационной способностью характеризовалась коэффициентом корреляции 0,51 (коэффициент детерминации — 26,0) и уравнением регрессии: удельный выход регенерантов = $9,8 + 3,0$ х удельный выход каллусов.

Здесь генотипы других видов также обладали преимуществом перед мягкой пшеницей (эффекты последней несущественны) по влиянию на каллусогенез, в то время как регенерационную способность определяли оба родителя (рис. 3).

Наибольший морфофизиологический потенциал в опыте оказался у гибридов с *T. timopheevii* (K29543), несколько меньший — у *Ae. juvenalis* (K681). Эмбриогенный потенциал каллусов гибридов с *T. monosocum* (K30090) был крайне низким, за исключением комбинаций с линией мягкой пшеницы Лютеценс 14662.

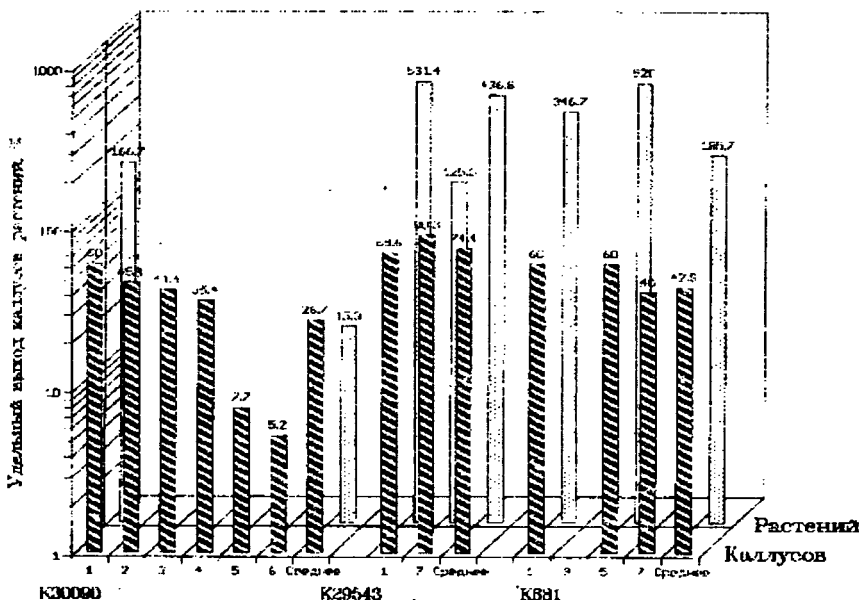


Рис. 3. Влияние генотипов родителей на эффективность клонального размножения отдаленных гибридов F_1 .

K30090, K29543 и K681 — гибриды F_1 от скрещивания соответственно *T. monosocum*, *T. timopheevii* и *Ae. juvenalis* с сортами *T. aestivum*: 1 — Лютеценс 14662; 2 — линия 39; 3 — Одесская 51; 4 — Мироновская 808; 5 — Одесская полукарликовая; 6 — Полукарлик; 7 — Лютеценс 14612.

На общем генетическом фоне линии мягкой пшеницы Лютесценс 14612 и Лютесценс 14662 средние значения степени каллусогенеза для гибридов с *T. timopheevii* составили 74,4%, коэффициенты размножения при регенерации — 436,8%, для *Ae. juvenalis* — соответственно 50,0 и 173,0%, для *T. moenchii* — 30,0 и 46,3%. Причем группировка по гомогенности в этом анализе выявила несущественность различий между *T. moenchii* и *Ae. juvenalis*, в то время как по регенерационной способности все дикие виды существенно различались.

Поскольку каллусогенез и эмбрионный потенциал у генотипов Лютесценс 14612 и Лютесценс 14662 оказались сходными, различия между ними по обоим параметрам были несущественными. При этом вклад указанных генотипов в морфогенный потенциал отдаленных гибридов оказался определяющим (каллусогенез 47,8, регенерация 90,5%), что несколько выходит за пределы установленных нами выше закономерностей. Это может указывать на то, что поиск генотипов с повышенным морфофизиологическим потенциалом в пределах обоих компонентов скрещивания весьма перспективен при создании рабочих коллекций для реализации эффективных программ по отдаленной гибридизации. Такие функции вполне могла бы выполнять линия Лютесценс 14662. В скрещиваниях с различными видами злаков она стабильно обеспечивает в культуре незрелых зародышей как повышенный уровень каллусогенеза, так и регенерационную способность гибридных потомств.

Кроме генотипов растений-доно-

ров, к факторам, определяющим возможность и интенсивность каллусогенеза и регенерации, относятся и соединения, входящие в состав питательных сред для культивирования. Как уже отмечалось, существование различных типов морфогенеза определяется концентрациями и варьированием соотношения веществ ауксиновой и цитокининовой природы. Указанная концепция оказалась справедливой и при работе с гибридными зародышами. При этом основным веществом, вызывающим каллусообразование, является известный ауксин 2,4-Д, репрессирующий морфологические процессы в клетке. Введение его в среду MS при культивировании незрелых зародышей гибридов, полученных от скрещивания *T. timopheevii* (K29559) с 5 генотипами мягкой пшеницы (Мироновская 25, TPR327, Балкан, Донская полукарликовая, Ильичовка) в концентрации 2 мг/л обеспечивало преимущественный каллусогенез (39,2%), значительно уменьшая способность зародышей к росту и развитию (рис. 4), а при отсутствии ауксина последняя усиливалась (50,2%). Причем в том и другом случае при прорастании зародышей имела место значительная сортоспецифичность, обеспечиваемая генетической способностью сортов к морфогенезу *in vitro*, а также сортовыми различиями в скорости включения ауксина в метаболизм иницируемых тканей экспланта.

Вычисленные с использованием дисперсионных комплексов взаимодействия генотип — гормон оказались малосущественными, равно как и эффекты других факторов в этом опыте.

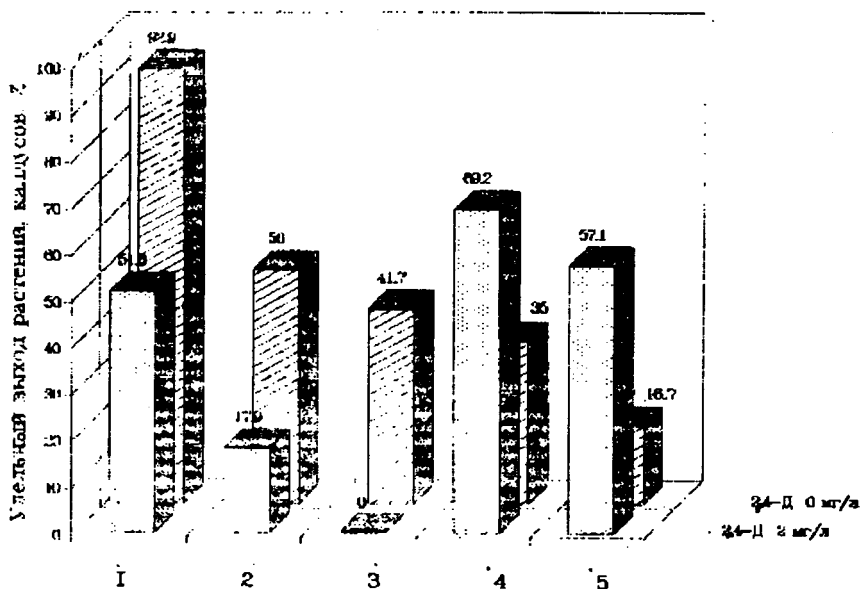


Рис. 4. Эффективность различных типов морфогенеза у отдаленных гибридов в зависимости от присутствия 2,4-Д в культуре незрелых зародышей.

K29559 — гибрид F_1 от скрещивания *T. timopheevii* с генотипами мягкой пшеницы: 1 — TPR327; 2 — Мироновская 25; 3 — Ильичовка; 4 — Балкан; 5 — Донская полухарликовая.

Заключение

Метод получения растений из тканей незрелых зародышей путем индукции у них каллусогенеза оказался более перспективным, чем прямое дорастивание, поскольку частота сохранения соответствующих гибридных комбинаций, а также удельный выход растений через соматический эмбриогенез были значительно выше, чем в эмбриокультуре. При этом существенных линейных взаимозависимостей между этими процессами установить не удалось (коэффициент корреляции 0,08), что может указывать на различную их физиологическую основу и генетический контроль.

Нашло подтверждение существо-

вание генетического контроля каллусогенеза, эмбриогенеза и регенерации, равно как и влияния на их выраженность у отдаленных гибридов генотипов обоих родителей: *T. aestivum* — на морфогенный потенциал каллусов, других видов — на каллусогенез.

Возможно выделение генотипов, являющихся донорами как повышенного каллусогенеза, так и морфофизиологического потенциала каллусов (Лютесценс 14662).

Каллусогенез, индукция эмбриогенных зон и регенерация из них растений вероятнее всего контролируются различными генетическими системами.

Введение в среду ауксина 2,4-Д

регулировало программу развития зародыша отдаленных гибридов по различным типам морфогенеза в зависимости от сортоспецифичности родительских компонентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лукьянюк С.Ф., Игнатова С.А., Максимов В.И., Максимова В.И., Шеремет А.М. Использование эмбриокультуры при отдаленных скрещиваниях пшеницы и ячменя с

рожью. — С.-х. биология, 1981, т. 16, № 7, с. 375—379. — 2. Hayser J.W., Nabors M.W., Ms Kinron C. *et al.* — Z.Pflanzenzucht, 1985, Bd 94, № 3, S. 218—233. — 3. Maddock S.E., Lancaster V.A., Risiott R., Franklin J. — J.Exp. Bot., 1983, vol. 34, p. 915—926. — 4. Muraschige T., Skoog F. — Physiol. Plant., 1962, vol. 15, № 13, p. 473—497. — 5. Staba J.E. — Recent Adv. Phytochem., 1969, vol. 2, p. 80.

Статья поступила 20 марта
1995 г.

SUMMARY

Efficiency of clonal reproduction of distant hybrids of soft wheat (*Triticum aestivum* L.) and some close species (*T. timopheevii* Zhuk., *T. monococcum* L., *Ae. juvenalis*) by means of plant regeneration from callused tissue initiated in cultured immature embryos is discussed.

Existence of genetic control of callusgeny, embryogenesis and regeneration processes, as well as their dependence on both parents genotypes has been proved.