

ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЗАРОДЫШЕЙ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ НА ПРОЦЕССЫ КАЛЛУСОГЕНЕЗА И МОРФОГЕНЕЗА

ЛЕТИ ДЖОС, Е.А. КАЛАШНИКОВА

(Кафедра с.-х. биотехнологии)

В опытах использовали зародыши 8 генотипов яровой пшеницы, различающиеся по устойчивости к септориозу. Зрелые зародыши культивировали в среде МС с добавлением соединений ауксинного и цитокининового типа действия в разных концентрациях.

Установлено, что добавление в питательную среду 2,4-Д в концентрации 2—3 мг/л приводит к формированию хорошо пролиферирующей каллусной ткани из зрелых зародышей пшеницы. Показано положительное влияние 2,4-Д в концентрации 3 мг/л в сочетании с зеатином 0,5 мг/л на формирование морфогенной каллусной ткани. Среди изученных генотипов лучшей способностью к каллусообразованию характеризовались сорта Саратовская 29 и Московская 35, Fortuna.

Пшеница — одна из важнейших зерновых культур в мире. На ее долю приходится почти одна четверть мирового пищевого продукта. В основном культурные сорта пшеницы не обладают достаточной устойчивостью к болезням. Поэтому изучение механизмов повышения устойчивости пшеницы к болезням, особенно к септориозу, позволит более успешно проводить селекционную работу по созданию не только высокопродуктивных, но и устойчивых ее форм.

Одним из путей решения этой задачи может быть расширение арсенала методов увеличения ге-

нетического разнообразия за счет культивирования клеток растений в условиях *in vitro*. В настоящее время методами клеточной селекции уже созданы новые формы люцерны, риса, томатов, картофеля и других растений, устойчивых к болезням [1, 5]. Повышение устойчивости пшеницы к биотическим стрессам позволит сократить потери урожая от воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды.

Методы культуры клеток для пшеницы достаточно хорошо разработаны и уже применяются при получении исходных форм для селекции. Однако у некоторых со-

ртов пшеницы удается получить лишь такую каллусную ткань, которая через 3—4 мес культивирования теряет способность к морфогенезу [2, 3, 6]. Поэтому создание системы длительного культивирования клеток некоторых сортов пшениц и включение их в биотехнологический процесс является особенно актуальным.

Целью данной работы было изучение зависимости каллусогенеза и морфогенеза пшеницы от генотипа первичного экспланта, а также от условий его культивирования *in vitro*.

Методика

Объектом исследования служили 8 генотипов яровой пшеницы, различающихся по устойчивости к септориозу. Было выбрано 4 генотипа пшеницы, обладающих сильной устойчивостью (WW-15370, Gaterin temps, 81S-8, 91S-10), 2 — со средней устойчивостью (Московская 35, Энита) и 2 — со слабой устойчивостью (Фортуна, Саратовская 29). В качестве первичного экспланта для индукции каллуса использовали зрелые зародыши. Перед стерилизацией семена выдерживали в течение 18 ч в воде для набухания, после чего стерилизовали в ртуть-содержащем растворе (тимирозале) 0,1% концентрации 45 мин, а затем 3-кратно промывали стерильной дистиллированной водой. Изолировали зародыши с помощью стерильных металлических игл в ламинар-боксе и высаживали их в чашки Петри по 20 шт. в каждую. Культивацию проводили в климатической камере при температуре 25°С, 16-часовом

фотопериоде и 70% относительной влажности воздуха.

Для получения первичной и пересадочной каллусной ткани из изолированных зародышей пшеницы использовали модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС), содержащую дополнительно аспарагин (160 мг/л), нитрат серебра (10 мг/л), а также гормоны ауксинового и цитокининового типа действия. Изучали влияние на процесс каллусогенеза и морфогенеза 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-Д) в концентрациях 2, 3, 4, 5 мг/л, а также сочетания 2,4-Д в концентрациях 2 или 3 мг/л с кинетинном, либо с зеатином, либо с БАП в концентрации 0,5 мг/л.

Пересадку пролиферирующего каллуса на свежую питательную среду осуществляли раз в 4 нед, при этом учитывали следующие показатели: число морфогенных и неморфогенных каллусов (% к общему числу сформировавшихся каллусов), интенсивность каллусогенеза (визуально по 5-балльной шкале), а также сырую массу каллусов в начале и конце пассажа (мг).

Результаты

В первой серии экспериментов было изучено влияние различных концентраций 2,4-Д на процесс каллусогенеза. Полученные результаты показали (табл. 1), что все исследуемые генотипы пшеницы способны в той или иной степени образовывать каллус. При этом визуальные наблюдения позволили выявить ряд закономерностей, которые проявлялись в самом процессе формирования

каллусной ткани. Как правило, этот процесс начинался с дедифференцировки нижних клеточных слоев зародыша, которые непосредственно соприкасались с питательной средой. Спустя 14 дней клетки зародышей полностью дедифференцировались и во всех вариантах образовывалась рыхлая, оводненная каллусная ткань светло-желтого цвета. Одновременно можно было наблюдать рост меристематической части зародыша и формирование проростка. При этом была обнаружена обратная зависимость между образованием проростков и концентрацией 2,4-Д. Так, при увеличении последней до 5 мг/л резко снижалась способность изолированных зародышей различных генотипов давать начало развитию проростков, и наоборот. Наибольшее ее снижение отмечено у сорта Саратовская 29 — от 70 до 10%. Одновременно с этим у зародышей наблюдалось формирование каллуса либо по всей их поверхности, либо лишь в корневой части. Способность зародышей образовывать каллус и интенсивность его формирования также находились в прямой зависимости от концентрации 2,4-Д в питательной среде. Из табл. 1 видно, что с увеличением концентрации ауксина резко возрастала способность клеток зародыша к дедифференцировке. Причем установлена зависимость этого процесса от генотипа первичного экспланта. Так, зародыши сортов Московская 35, Саратовская 29, 81S, Gaterin, WW-15370 образовывали неморфогенную каллусную ткань во всех испытанных концентрациях 2,4-Д в 15—80%

случаев, в то время как у сортов Fortuna, Энита и 91S — всего лишь в 10—38% случаев.

Т а б л и ц а 1
Каллусогенез зрелых зародышей
пшеницы разных генотипов
при различных концентрациях 2,4-Д
в среде

Концентрация 2,4-Д, мг/л	Число зародышей (%), образующих		
	каллус	морфогенный каллус	проросток
<i>WW-15370</i>			
1	20	0	55
2	30	0	50
3	38	0	44
4	42	2	34
5	50	0	0
<i>Gaterin</i>			
1	25	0	55
2	32	0	52
3	40	0	44
4	42	2	38
5	60	10	0
<i>81S-8</i>			
1	15	0	45
2	28	0	52
3	32	0	50
4	40	0	42
5	80	10	0
<i>91S-10</i>			
1	10	0	65
2	18	0	56
3	26	0	50
4	28	2	44
<i>Московская 35</i>			
1	25	0	55
2	30	0	52
3	34	2	44
4	40	6	36
5	80	30	10

Продолжение табл. 1

Концентрация 2,4-Д, мг/л	Число зародышей (%), образующих		
	каллус	морфогенный каллус	проросток
<i>Энита</i>			
1	20	0	60
2	28	0	56
3	32	0	48
4	38	2	40
<i>Fortuna</i>			
1	15	0	50
2	20	0	52
3	32	2	40
4	34	4	34
5	30	10	0
<i>Саратовская 29</i>			
1	25	0	70
2	32	0	60
3	40	4	46
4	42	6	40
5	70	10	10

Наряду с формированием неморфогенной каллусной ткани в некоторых вариантах было отмечено образование морфогенных зон, дающих начало побегам. Значение этого показателя у сортов Энита, 91S, Gaterin, WW-15370 не превышало 2% при культивировании зародышей на питательной среде, содержащей 2,4-Д в концентрации 4 мг/л, а у сортов Саратовская 29, Московская 35, Fortuna, 81S и Gaterin — находилось в пределах 10—30% при культивировании на средах с 2,4-Д в концентрации 5 мг/л.

Таким образом, результаты экспериментов позволили заключить, что концентрации 2 и 3 мг/л для 2,4-Д являются оптимальными при культивировании изолированных зародышей с

целью получения хорошо пролиферирующей каллусной ткани. Эти данные полностью совпадают с результатами, полученными рядом авторов при изучении зависимости каллусогенеза картофеля, кукурузы и других культур от содержания 2,4-Д в питательной среде [1, 4, 7, 8].

Во второй серии эксперимента изучали влияние сочетания 2,4-Д с различными цитокининами на процесс каллусогенеза и морфогенеза изолированных зародышей пшеницы. Из табл. 2 и 3 видно, что на фоне постоянной концентрации цитокининов (0,5 мг/л) при повышении концентрации 2,4-Д с 2 до 3 мг/л во всех вариантах резко возрастала способность изолированных зародышей формировать морфогенную каллусную ткань. Причем по фону 2,4-Д 2 мг/л число морфогенных каллусов не превышало 2,5—10,6%, а по фону 2,4-Д 3 мг/л — изменялось в пределах 16,7—60,0%, т.е. было примерно в 6—8 раз выше. На наш взгляд, механизм такого стимулирования можно объяснить следующим образом. Под действием ауксина активизируется протонная помпа и происходит истончение клеточной стенки за счет эффекта «кислого роста», а также индуцируется синтез ряда ферментов, которые могут вызывать частичный гидролиз клеточной стенки. Все это, в свою очередь, способствует более интенсивному проникновению цитокининов в клетку, а значит, и оказывает непосредственное положительное влияние на процесс дифференциации.

Таблица 2

Морфогенетический потенциал зрелых зародышей пшеницы разных генотипов при содержании в среде 2,4-Д 2 мг/л с зеатином (вариант 1), кинетином (2) и БАП (3)

Вариант	Число зародышей (%), образующих			
	каллус	морфогенный каллус	про-росток	побег с одно-временным формированием каллуса
<i>WW-15370</i>				
1	35,7	7,1	26,1	38,0
2	35,8	5,1	33,3	36,7
3	27,0	2,7	40,5	32,4
<i>Gaterin</i>				
1	40,4	7,1	23,8	35,7
2	36,5	4,8	26,8	36,5
3	32,4	2,7	40,5	27,0
<i>81S-8</i>				
1	43,9	7,3	22,0	34,1
2	41,4	7,3	26,8	31,7
3	31,5	2,6	47,4	21,6
<i>91S-10</i>				
1	32,5	7,5	42,5	25,0
2	30,7	7,6	48,7	20,5
3	21,1	5,2	57,9	21,1
<i>Московская 35</i>				
1	33,3	10,4	27,0	39,5
2	31,9	8,5	29,7	38,2
3	31,7	7,3	34,1	34,1
<i>Энита</i>				
1	32,6	8,6	32,6	34,7
2	34,1	7,3	34,1	39,0
3	32,5	2,5	42,5	25,0
<i>Fortuna</i>				
1	32,4	5,4	35,1	32,4
2	29,7	5,4	43,2	27,0
3	27,2	3,0	51,5	21,2
<i>Саратовская 29</i>				
1	36,1	10,6	17,0	46,8
2	33,3	8,8	26,6	40,0
3	31,7	4,8	34,1	34,1

Таблица 3

Морфогенетический потенциал зрелых зародышей пшеницы разных генотипов при содержании в среде 2,4-Д 3 мг/л с зеатином (1), кинетином (2) и БАП (3)

Вариант	Число зародышей (%), образующих		
	каллус	морфогенный каллус	про-росток
<i>WW-15370</i>			
1	70,0	60,0	40,0
2	100	60,0	0,0
3	83,3	16,7	16,6
<i>81S-8</i>			
1	70,0	30,0	40,0
2	63,6	36,3	36,3
<i>Московская 35</i>			
1	57,1	42,8	42,8
2	60,0	40,0	40,0
<i>Энита</i>			
1	66,6	33,3	33,3
2	75,0	50,0	25,0
3	71,4	28,5	28,5
<i>Fortuna</i>			
1	83,3	33,3	16,6
2	80,0	60,0	20,0
<i>Саратовская 29</i>			
1	80,0	40,0	20,0
2	80,0	40,0	20,0

Из всех изученных цитокининов наибольшую активность проявили зеатин и кинетин. В этих вариантах наблюдалось формирование морфогенной каллусной ткани в 30—60% случаев, в то время как в варианте с БАП — всего в 16,7—28,5% случаев. Большая эффективность зеатина и кинетина связана с тем, что они являются природными цитокининами и

чувствительность клеток к их экзогенному присутствию значительно выше.

Таким образом, установлено положительное влияние 2,4-Д в концентрации 3 мг/л в сочетании с зеатином 0,5 мг/л на формирование морфогенной каллусной ткани. Поэтому такое сочетание гормонов целесообразно использовать в работах для получения каллуса, сохраняющего высокий морфогенетический потенциал на протяжении ряда субкультивирований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аветисов В.А.* Биотехнологические основы расширения генетического разнообразия картофеля. — Автореф. докт. дис. М., 1997. — 2. *Копертых Л.Г., Бутенко Р.Г.* Каллусогенез и морфогенез у различных генотипов *Triti-*

cum aestivum. — Тез. докл. 3-го съезда Всероссийского общества физиологов растений. СПб, 1993, с. 133. — 3. *Шаяхметов И.Ф., Иштерякова Ф.К., Хабирова М.М.* Особенности каллусообразования и регенерации растений в культуре незрелых зародышей яровой твердой пшеницы. — С.-х. биотехнол., 1988, № 4, с. 150—158. — 4. *Cai Tishu, Tian Huigin, Lin Shukahg.* — *Acta genet.sin.*, 1989, vol. 16, N 2, p. 81—82. — 5. *Chawla Harwinder S.* — *Arch. ruchturgsiorsch.*, 1987, Bd 17, N 6, S. 337—343. — 6. *Halpelin W.* — *Ann. Rev. plant physiol.*, 1970, N 20, p. 395—417. — 7. *Mathias R.J., Simpson E.S.* — *Plant cell, Tissue and organ culture.* 1986, vol. 7, N 1, p. 31—37. — 8. *O'Hara J.F., Street H.E.* — *Ann. Bot.*, 1978, N 42, p. 1029—1038.

Статья поступила 25 июня 1997 г.

SUMMARY

Embryos of 8 genotypes of spring wheat differing in resistance to septoria spot were used in experiments. The embryos were cultivated in MS medium with addition of compounds of auxin and cytokinin type of action in different concentrations. It has been found that addition of 2,4-D in concentration of 2—3 mg/l into nutrient medium results in formation of well proliferating callus tissue from mature wheat embryos. It is shown that 2,4-D in concentration of 3 mg/l in combination with zeatin in concentration of 0.5 mg/l produces beneficial effect on formation of morphogenic callus tissue. Among the investigated wheat genotypes Saratovskaya 29, Moscovskaya 35 Fortuna varieties had the highest ability to form callus.