

УДК 631.527:633.111

КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ДЕЙСТВИЮ УФ-Б РАДИАЦИИ

П. В. ЛАПШИН, Р. Г. БУТЕНКО*, В. С. ШЕВЕЛУХА

(Кафедра с.-х. биотехнологии)

На примере двух генотипов яровой мягкой пшеницы *T. aestivum* (сорт Таежная и линия Фотос) изучали возможность получения с помощью методов *in vitro* культуры клеток, обладающих повышенной устойчивостью к средневолновому ультрафиолетовому излучению в диапазоне длин волн от 280 до 320 нм (УФ-Б). В результате индивидуального отбора по признаку интенсивности прироста ткани из выборки каллусных агрегатов было выделено несколько клеточных линий, способных сохранять высокий уровень прироста каллусной массы в присутствии УФ-Б облучения. Показано, что у генотипа Фотос облучение в большей степени влияло на инициацию каллусов, тогда как у генотипа Таежная — на их рост. Жизнеспособность каллусов в значительной степени зависит от интенсивности и длительности действия этого стрессового фактора.

Изменение состояния озонового слоя Земли, являющееся следствием техногенных воздействий, привлекает пристальное внимание ученых. Отмечено снижение концентрации озона над Южным и Северным полюсами [9,

10]. Значительное утоньшение озонового слоя характерно также для тропиков Африки, Южной Америки и экваториального пояса [10, 13]. В результате этих изменений на поверхности планеты увеличивается уровень ультра-

* Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН.

фиолетового (УФ-Б) излучения, особенно в диапазоне длин волн от 280 до 320 нм, который относится к его «среднему» или «Б»-участку и обозначается как «УФ-Б радиация» [10, 13].

Известно, что УФ-Б радиация является одним из сильных стрессовых факторов окружающей среды [1]. Под ее влиянием происходят значительные изменения в морфофизиологических характеристиках растений. Например, у пшеницы замедляется линейный рост стебля, уменьшаются коэффициент кущения и число колосоносных побегов [8], а у проростков картофеля снижаются высота стебля и площадь листьев [11]. Причиной образования в условиях действия УФ-Б радиации растений с заторможенным ростом, плохой пигментацией и нарушениями формирования листового аппарата являются повреждения в структуре ДНК, изменения гормонального статуса растений и функционирования их фотосинтетического аппарата [12, 15]. Эффекты действия УФ-Б радиации зависят и от стадии роста растений. В большей степени они проявляются при переходе от вегетативной к репродуктивной стадии их развития [14].

Основной зерновой культурой сельского хозяйства

России является пшеница, с которой давно ведется селекционная работа с использованием традиционных подходов. В последнее время для этих целей все более широкое применение находят и биотехнологические приемы, основанные на селекции растительных клеток в условиях *in vitro* [3, 4]. Такой подход существенно ускоряет селекционный процесс в силу реализации свойственной растительной клетке тотипотентности.

Целью настоящего исследования являлась селекция каллусных культур пшеницы, обладающих повышенной устойчивостью к действию УФ-Б радиации.

Методика

Объектом исследования были каллусные культуры, инициированные из двух генотипов яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* — сорта Таежная и линии Фотос. Работу выполняли на базе отдела биологии клетки и биотехнологии Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева под руководством проф. Р. Г. Бутенко.

Сорт Таежная выведен в Красноярском НИИСХ методом индивидуального отбора из третьего поколения гибридной комбинации К-441 (Л-330 x М-341). Разновид-

ность лютеценс. Достоинством сорта являются скороспелость (созревает раньше стандарта на 2-11 дней), устойчивость к полеганию (оценивается в 4,9 балла, выше стандарта на 1,3 балла) и прорастию на корню и в валках. Для семян этого сорта характерна высокая послеуборочная всхожесть.

Линия Фотос (Л40959) была получена индивидуальным отбором из гибридной популяции от скрещивания сортов Московская 35 и Жница в Башкирском НИИЗиС. Разновидность мильтурум. По качеству зерна относится к ценным пшеницам. Линия устойчива к полеганию, среднеранняя — созревает одновременно с сортом Жница (вегетационный период — 85—90 дней). Проявляет высокую устойчивость к поражению мучнистой росой и бурой ржавчиной, слабо поражается пыльной головней. Обладает хорошей комбинационной способностью.

Для инициации каллусной ткани семена пшеницы стерилизовали 0,1% водным раствором сулемы в течение 10 мин, заливали небольшим количеством стерильной воды и через 16-24 ч вычленили из них зародыши. Материал помещали в чашки Петри диаметром 9 см по 12-18 шт., щитком вниз, на

поверхность модифицированной агаризованной питательной среды по Murashige и Scoog (1962), содержащей в расчете на 1 л 2,5 мг 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, 20 мг аскорбиновой кислоты и 10 мг AgNO_3 , и культивировали при температуре 20-22°C и фотопериоде 16 ч (интенсивность освещения 4000 лк). Длительность пассажа составляла 28 дней.

Для селекции клеточных линий пшеницы, устойчивых к действию УФ-Б радиации, растительный материал культивировали в стеклянных чашках фирмы «Anumbra» (Германия), не пропускающих излучение ниже 280 нм. В качестве источника УФ-Б радиации использовали лампу ДРЛФ-400 с удаленной внешней колбой, являющейся эквивалентом бактерицидной ртутной лампы высокого давления типа ПРК-2 (ДРТ). Интенсивность облучения (1,66; 1,11; 0,74; 0,55; 0,46 или 0,39 Вт/м² по УФ-Б) регулировали изменением расстояния чашек от лампы ДРЛФ. Длительность облучения составляла 2 ч каждый день (с 16 до 18 ч). Контрольные варианты изолировали от лампы обычным стеклом, не пропускающим ультрафиолет.

Прирост ткани анализировали путем индивидуально-

го взвешивания каллусных агрегатов в стерильных условиях на торсионных весах в момент очередного пассирования. Результаты оценивали в конце каждого пассажа по количеству образовавшихся каллусов из первичного экспланта и по их массе, которую учитывали индивидуально для каждого экспланта, что позволило выделить клеточные линии, происходящие от одного первичного экспланта.

Опыты проводили в 2 биологических повторностях. Повторяемость в опытах 50–70-кратная. Статистическую обработку данных проводили по методу малых выборок [2].

Результаты

Каллусные культуры, инициированные из двух генотипов яровой мягкой пшеницы, не различались по морфофизиологическим характеристикам и представляли собой плотные агрегаты светло-желтого цвета, часто с выраженной внутренней структурой, которая зависела от условий культивирования, возраста культуры, частоты пассирования и индивидуальной массы каллусных агрегатов (рис. 1-3).

УФ-Б радиация приводила к снижению способности к каллусообразованию у эксплантов и уменьшению ин-



Рис. 1. Первичный каллус яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum*, линия Фотос, возраст 15 дней, контроль: 1 — ткани зародыша; 2 — ткани щитка.

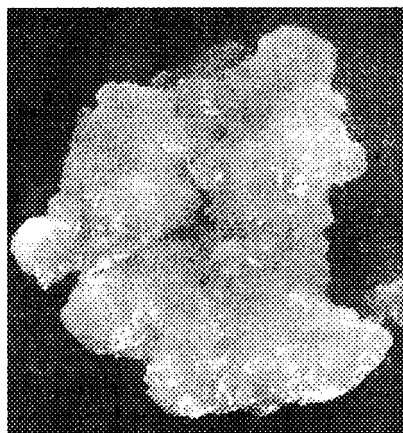


Рис. 2. Неморфогенный каллус яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum*, линия Фотос, возраст 50 дней, контроль.

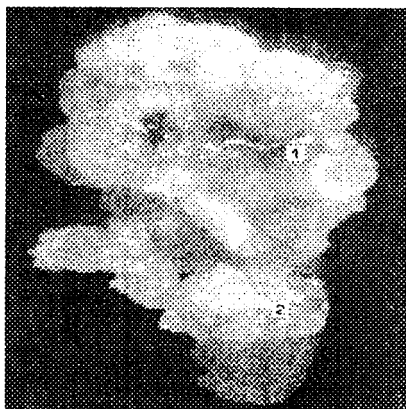


Рис. 3. Каллусный агрегат яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum*, линия Фотос, возраст 70 дней, с морфогенными зонами (1, 2), контроль.

тенсивности прироста биомассы каллусов у обоих генотипов, особенно иницированных из линии Фотос (табл. 1).

Негативное воздействие УФ-Б радиации хорошо прослеживается в отношении прироста ткани: чем выше доза радиации, тем меньше масса каллуса. Так, при интенсивности облучения $1,66 \text{ Вт/м}^2$ прирост массы каллуса Фотос составлял в среднем 51% прироста ткани в контрольном варианте, тогда как у Таежной — 45%. При более низкой дозе облучения ($0,74 \text{ Вт/м}^2$) эти показатели

Т а б л и ц а 1

Формирование каллусов на эксплантах пшеницы в условиях действия УФ-Б радиации и их рост
(числитель — Фотос, знаменатель — Таежная)

Условия культивирования	Количество эксплантов на вариант, шт.	Количество каллусов в чашке, шт.	Интенсивность каллусообразования, %	Общая масса каллусов, г	Средняя масса каллуса, г
Контроль	$\frac{42}{35}$	$\frac{42}{32}$	$\frac{100}{94,3}$	$\frac{5,080}{3,960}$	$\frac{0,121}{0,120}$
УФ-Б $1,66 \text{ Вт/м}^2$	$\frac{55}{37}$	$\frac{21}{34}$	$\frac{38,2}{91,9}$	$\frac{1,659}{2,618}$	$\frac{0,079}{0,077}$
УФ-Б $0,74 \text{ Вт/м}^2$	$\frac{54}{43}$	$\frac{19}{33}$	$\frac{35,2}{76,7}$	$\frac{1,178}{1,782}$	$\frac{0,062}{0,054}$

составляли соответственно 65 и 64%. Отрицательное воздействие УФ-радиации на растения отмечается и в других публикациях [5-8, 12-14].

Таким образом, клетки двух генотипов пшеницы,

культивируемые в условиях *in vitro*, различались по реакции на действие УФ-Б радиации. У генотипа Фотос облучение в большей степени влияло на инициацию каллусов, тогда как у geno-

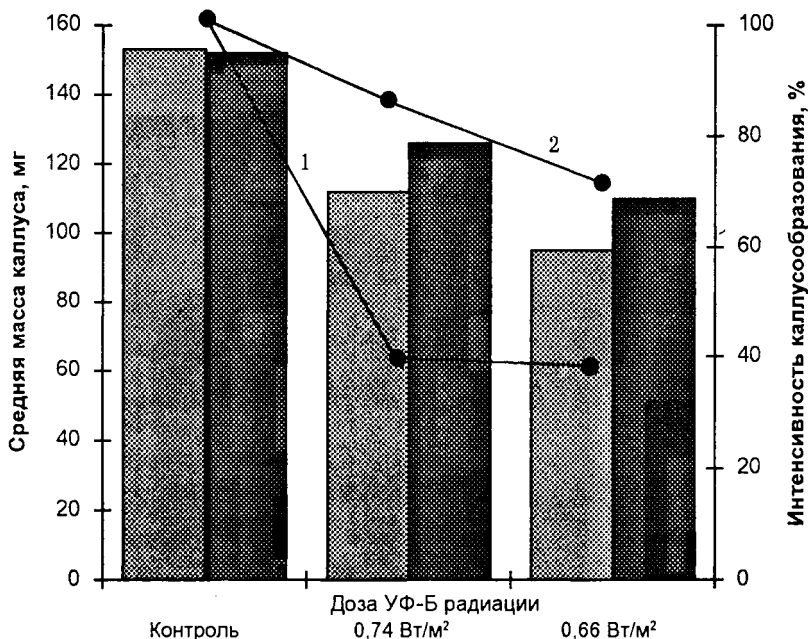


Рис. 4. Интенсивность каллусообразования и прирост массы у каллусов яровой мягкой пшеницы при облучении УФ-Б.
1 — генотип Фотос, 2 — Таежная.

типа Таежная — на их рост (рис. 4). При этом высокие дозы УФ-Б радиации (1,66 и 0,74 Вт/м²) оказались летальными для обоих генотипов (рис. 5). Так, у каллуса, иницированного из сорта Таежная, после месяца культивирования в условиях облучения сохранили рост только 23% тканей, а после второго месяца культивирования они все погибли. При перенесении иницированного в условиях УФ-Б радиации каллуса в обычные (контрольные) условия прироста биомассы

также не происходило, хотя по внешнему виду каллусы сохраняли характерный для живой ткани светло-желтый цвет и рыхлую консистенцию.

В последующем условия селекции были несколько изменены: уменьшена общая доза УФ-Б радиации и введена более дифференцированная шкала воздействия (1,11; 0,74; 0,55; 0,46 и 0,39 Вт/м²; рис. 5). В этом случае после 2 субкультивирований в условиях УФ-Б радиации (0,55 Вт/м²) получили жизнеспособные колонии (11%), которые име-

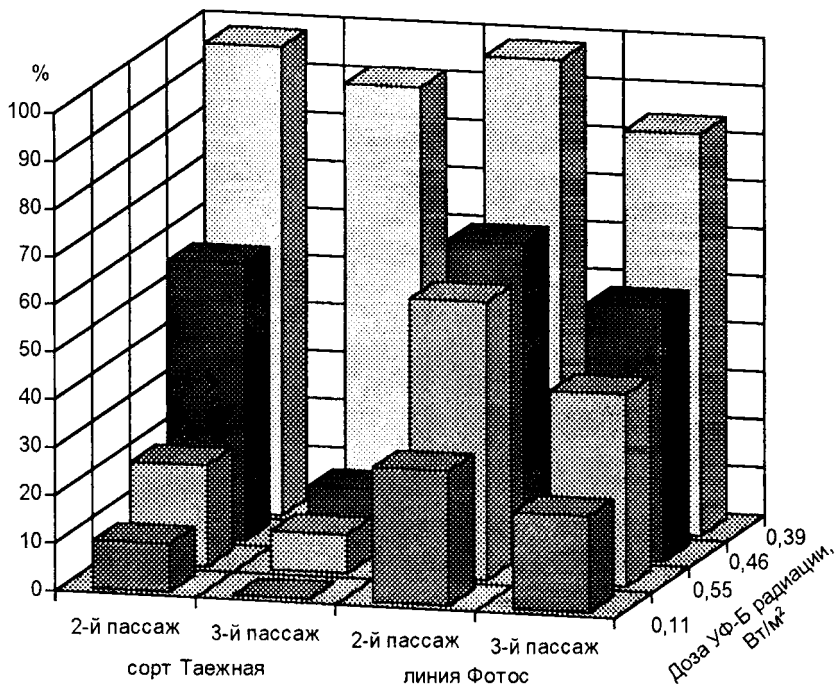


Рис. 5. Влияние воздействия различных доз УФ-Б радиации на способность к сохранению роста каллусных культур пшеницы сорта Таежная и линии Фотос.

ли значительный прирост клеточной массы. Каллусные культуры генотипа Фотос оказались более устойчивыми к действию УФ-Б радиации, чем каллусные культуры генотипа Таежная. Даже при дозе 1,11 Вт/м² у первых отмечался некоторый прирост массы (27,6 и 18,9% соответственно после 1-го и 2-го месяцев). Все это свидетельствует о возможности получения устойчивых к дей-

ствию УФ-Б радиации каллусных культур, инициированных из двух генотипов пшеницы. Однако их жизнеспособность в значительной степени зависит от интенсивности и длительности действия этого стрессового фактора. Зависимость отклика биологической системы от интенсивности действия исследуемого фактора показана и другими авторами [1, 5, 7, 14, 15].

Выводы

1. Разработана схема клеточной селекции пшеницы на устойчивость к действию УФ-Б радиации с использованием искусственного источника излучения.

2. Показана возможность получения клеточных культур пшеницы, сохраняющих способность к росту в присутствии УФ-Б радиации.

3. Установлена зависимость роста клеточных культур пшеницы от интенсивности и длительности действия УФ-Б радиации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акназаров О. Активность эндогенных регуляторов роста у растений высокогорий Памира. Автореф. канд. дис. Душанбе, 1976. — 2. Ашмарин И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирования экспериментов. JL: Университет, 1975. — 3. Бутенко Р. Г. Биология культивируемых клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. — Монография. М.: ФБК-Пресс, 1999. — 4. Бутенко Р. Г. Клеточные и молекулярные аспекты морфогенеза растений *in vitro*. М.: 1994. — 5. Жалилова Ф. Х. Влияние УФ-Б радиации на

содержание фитогормонов и рост мутантных линий арабидопсиса. Автореф. канд. дис. М., 1993. — 6. Жалилова Ф. Х., Ракипина Т. Л., Леасое П. В. и др. Действие ультрафиолетовой радиации (УФ-Б) на рост и выделение этилена из трех генетических линий *Araabodopsis thaliana*. — Физиол. раст., вып. 40 (8), с. 764-769. — 7. Канаши Е. В. Изменение продуктивности и содержания пигментов у растений фасоли при ультрафиолетовом стрессе. — В кн.: Фо-тосинтез и продуктивность растений. Саратов: ВАСХ-НИЛ, 1990, с: 86—89. — 8. Шульгин И. А. Забиров Р. Г., Щербина И. П. и др. О роли ультрафиолетовой радиации высокогорных районов в строении побега и продуктивности пшеницы. — Биол. науки, № 7, с. 107-118. — 9. Forman J. C., Gardiner B. G., Shanklin. — Nature, 1985, vol. 315, p. 207-210. — 10. Frederick J. E., Snell H. E., Hayward C. — Photochem. Photobiol., 1989, vol. 50, N 8, p. 443-450. — 11. Green A. E. S., Cross K. K., Smith L. A. — Photochem. Photobiol., 1980, vol. 31, N 1, p. 59-65. — 12. Iwanzik W., Tevini M. — Phys. Plant., 1983, vol. 58, N 3. — 13. Sisson W. B., Caldwell M. M. Exp. Bot., 1977, vol. 28, p. 691-697. — 14. Teramura A. H., Silivan J. H. — Am. J. Bot., 1987,

Статья поступила
18 декабря 2000 г.

SUMMARY

On an example of two genotypes of summer soft wheat *T. aestivum* (the Tazhnaya variety and the Fotos line) studied possibility of obtaining (with the help of an *in vitro* culture methods) of crates having boosted stability to a medium ultra-violet radiation in a range of lengths of waves from 280 up to 320 нм (UV-B). As a result of individual selection to characteristic of intensity of increase of a grown, from sampling of callus aggregates were selected a some cell lines, capable to save a high level of increase callus mass in presence UV-B irradiation. Is exhibited, that for a Fotos genotype the irradiation in the greater degree influenced on callus formation, whereas for a Tazhnaya genotype — on their propagation. However callus viability substantially depends on intensity and duration of operation of this stressful factor.