

3. Дарвин Чарлз. Происхождение видов. – М.: ГИСХЛ, 1952. – 483 с.
4. Дарвин Чарлз. Изменения домашних животных и культурных растений. – М.: Изд. АН СССР, 1951. – 883 с.
5. Дзюбецький Б.В., Черчель В.Ю., Антонюк С.П. Селекція кукурудзи // Селекція і генетика в Україні на межі тисячоліть. Том 2. – К.: Логос, 2001. – С. 571-589.
6. Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. – Л.: Колос, 1971. – 750 с.
7. Лукьяненко П.П. Избранные труды. – М.: Колос, 1973. – 448 с.
8. Ригин Б.В., Гончаров Н.П. Генетика онтогенеза пшеницы // Итоги науки и техники ВИНИТИ. Сер. Генетика и селекция возделываемых растений, 1989. – 148 с.
9. Уэзероукс П., Рандольф Л.Ф. История и происхождение кукурузы // Кукуруза и ее улучшение. – М.: Иностранная литература, 1957. – С. 7-53.
10. Чайлахян М.Х. Регуляция цветения высших растений. – М.: Наука, 1988. – 559 с.
11. Hallauer A.R. Methods used in developing maize inbreds // Maydica. – 1990. – V. 5, N 1. – P. 1-16.
12. Stelmakh A.F. Genetic systems regulating flowering response in wheat // Euphytica. – 1998. – N 100. – P. 359-369.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В ПОЛУЧЕНИИ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ С МЯГКОЙ ПШЕНИЦЕЙ

Н.А. ХАЙЛЕНКО, доктор биологических наук

ДГП «Институт биологии и биотехнологии растений» РГП «НЦБ РК» КН МОН РК,
Алматы, Республика Казахстан

Введение

Повышение урожайности и устойчивости пшеницы к стрессам и болезням является главной задачей генетиков и селекционеров Казахстана, а создание гибридной пшеницы для одного из регионов республики на основе цитоплазматической или генной мужской стерильности помогло бы разрешить множество проблем, в том числе и проблему генетически чистого производства зерновой продукции. В последнее время в процессе выведения новых сортов для придания растениям полезных признаков начаты исследования эпигенетических изменений у мягкой пшеницы.

В целом эпигенетикой называют раздел биологии о причинных взаимодействиях между генами и их продуктами, образующими фенотип. Эпигенетическая теория предполагает, что эволюционное изменение начинается тогда, когда популяция попадает в непривычные условия существования, а далее реализуется онтогенезом вне зависимости от внешних условий. Сейчас эпигенетика – широкое понятие, отражающее онтогенетические, физиологические, молекулярные и эволюционные аспекты регуляции активности генов [1].

Эпигенетическая теория эволюции широко обсуждается во всех странах мира, однако конкретных законов наследования признаков, таких как в классической генетике, пока не выработано.

Большинство исследователей до сих пор считают, что у гибридных организмов, полученных при отдаленной гибридизации растений, наследование признаков определяется классическими законами генетики, но к настоящему времени часть исследователей склоняется к мысли о том, что у живых организмов, в частности у растений, существует система эпигенов, проявление которых не подчиняется общепризнанным законам генетики, а в результате их действия и проявляются явления различного типа стерильности гибридного материала, апомоксиса, пистиллоидности, нарушения в функционировании женского гаметофита [2].

На факты гибели гибридных зерновок на различных стадиях эмбриогенеза у растений F_1 - F_3 и беккроссов, полученных при межвидовых скрещиваниях пшеницы, ученые указывали еще в прошлом веке [2, 3].

Целью исследований являлось получение *in vitro* регенерантов, выращенных из незрелых и зрелых зародышей от межвидовых скрещиваний пшеницы с использованием видов – носителей мужской стерильности и полноценных растений из регенерантов; разработка способов выращивания растений с помощью метода эмбриокультуры.

Объекты и методы исследования

Объектами для исследований служили виды пшениц: *T. aestivum* L. (A^uA^uBBDD) (сорта Ленинградка и Саратовская-29), *T. compactum* L. (A^uA^uBBDD), гибриды F_1 *T. compactum* x Ленинградка.

Посев производили на полях КазНИИЗиР АО «Казагроинновация» МСХ РК. Все родительские формы, расщепляющиеся популяции гибридов, линии выращивали в поле с площадью питания растений 5 x 30 см. Во всех полевых опытах соблюдали режим агротехнических мероприятий, общепринятый для данного региона. Скрещивания всех видов и сортов проводили по общепринятым методам с некоторыми модификациями [2]. Кастраторы и опыляли по 5-10 колосьев каждой комбинации. Опрыскивали с помощью твердометода, с подрезанием или без подрезания чешуй колосьев материнских сортов. Опыление проводили по мере созревания рылец в цветках, 2-3 раза, в течение 10-15 суток. Перед опылением проверяли fertильность пыльцы в цветках гибридных растений.

В ходе эксперимента использовался следующий метод стерилизации зерновок: 70%-ный этиловый спирт – 10 мин.; 0,1%-ный раствор сулемы – 1 мин.; хлорка – 5 мин.; бидистиллированная H_2O – 15 мин.; промывали 3 раза, каждый раз в свежей порции. В результате эксперимента подтверждено, что метод стерилизации зерновок (обработка семян 70%-ным этиловым спиртом – экспозиция 10 мин.) является оптимальным для дальнейшей работы.

На искусственные питательные среды были посажены незрелые 15-суточные зародыши вида *T. compactum*, сортов Саратовская-29 и Ленинградка, а также гибридные 15-суточные зародыши комбинации *T. compactum* x Ленинградка. Каллусы получали из зародышей, изолированных на 15-ые сутки после опыления. Зерновки освобождали от цветковых и колосковых чешуй, зародыши изолировали в стерильных чашках Петри с помощью препаровальных игл под бинокулярной лупой МБС-9. Выделенные зародыши помещали щитком вверх на питательную среду Гамборга (B5) и на среду Мурасиге и Скуга (МС), содержащую 2 мг/л 2,4-Д, в стерильных условиях ламинарного бокса. До появления побегов экспланты выдерживались в термостате в темноте при 25°C, затем переносились на свет в условия культуральной комнаты, обеспечивающей температуру 25°C, 16-часовой фотопериод с интенсивностью освещения 5-10 кЛк и влажность 75-80%. Через каждые 4-5 недель каллусы пересаживали на свежую питательную среду. При появлении каллусов с зачатками побегов их переносили на среду без фитогормонов, а затем культивировали на свету при 16-18-часовом фотопериоде.

Результаты и обсуждение

Опыты по получению межвидовых гибридов пшеницы, в частности с использованием видов-носителей стерильности, а также видов-восстановителей fertильности, проводились нами в течение 1988-2008 гг. В связи с тем, что завязываемость гибридных зерновок, как правило, была недостаточно высокой, в 2006-2008 гг. нами были запланированы и проведены опыты по искусственноому выращиванию гибридных зародышей на питательных средах с помощью методов биотехнологии, прежде всего для того, чтобы снять эффект воздействия гибридного эндосперма на развитие зародыша, а также для восполнения гибридных растений F_1 с

целью их дальнейшего использования в генетических анализах. К настоящему времени нами получены как регенеранты видов и сортов пшеницы, так и гибридные растения.

Наблюдения за развитием зародышей на искусственных питательных средах в течение 2 месяцев показали, что зародыши родительских форм – вида *T. compactum*, сортов Саратовская-29 и Ленинградка, хорошо развиваются и растут – от каллусов до растенщиков с 2 - 3 листьями, а зародыши гибридных комбинаций отличаются друг от друга как по каллусогенезу, так и по росту и развитию регенерантов. В комбинации *T. compactum* x Ленинградка наблюдали образование каллусов (рис. 1) у 33% эксплантов (на 105 незрелых зародышей) и развитие регенерантов – у 28% (на 146 незрелых зародышей). У части каллусов отмечали появление проростков. Регенеранты пересаживали в горшки с почвой в условиях теплицы (зима 2006-2007 гг.). Весной 2007 г., во время кущения растения высаживали на экспериментальный участок института. Как показали наши исследования, процент выращенных растений на искусственных питательных средах был небольшим. В полевых условиях все растения развивались и были fertильными (рис. 2, 3).



Рис. 1. Каллусы из незрелых зародышей растений комбинации *T. compactum* x Ленинградка



Рис. 2. Регенеранты, полученные из незрелых зародышей растений вида *T. compactum*, на экспериментальном участке института



Рис. 3. Регенеранты, полученные из незрелых зародышей растений комбинации *T. compactum* x Ленинградка, на экспериментальном участке института

При фенологических наблюдениях за ростом и развитием пересаженных растений было отмечено, что все растения вида, сортов и гибридов развивались после пересадки нормально несмотря на то, что гибридные формы к моменту пересадки отставали в своем развитии – не столь активно кустились, как родительские формы. Выход в трубку, колошение и цветение растений были стандартными и регенеранты, полученные из 15-суточных зародышей, ничем не отличались от растений, выращенных из семян. Пыльники у всех растений имели нормальную форму, пыльцевые зерна были fertильными, выброс пыльцы происходил нормально.

Однако визуальные наблюдения во время цветения показали, что часть цветков имела пыльники, характерные для признака ЦМС, и цветки оставались неопыленными, особенно на верхушках колосьев. Созревание зерновок также было нормальным, созревшие зерновки были хорошо выполненными, имели развитый зародыш и эндосперм.

В таблице представлены результаты полевого эксперимента по выращиванию потомства незрелых зародышей, полученных от межвидовых скрещиваний. Процент завязавшихся зерен у всех без исключения регенерантов, полученных из незрелых зародышей, был удовлетворительным – он колебался от 39 до 59%. Растения вида *T. compactum* и сортов Ленинградка и Саратовская-29 на полях КазНИИЗиР завязывают 89-95% зерен. Гибридные же растения F₁ комбинации *T. compactum* x Ленинградка и на полях КазНИИЗиР завязывали в разные годы от 35 до 75% зерен, и, таким образом, растения, полученные из незрелых зародышей, ничем не отличались по данному признаку от обычных растений. Установить в этом эксперименте наследование признака мужской стерильности или фертильности не представилось возможным, поскольку опыт был заложен как модельный, с небольшим числом растений. Однако уже сейчас, сопоставляя полученные данные с результатами предыдущих лет по проценту образовавшихся зерновок у обычных растений, можно отметить, что, во-первых, качество сформированных зерен у регенерантов, полученных из незрелых зародышей вида *T. compactum* и сортов Ленинградка и Саратовская-29, немного отличается от качества образовавшихся зерен у обычных растений (по уровню накопления в зерне крахмала); во-вторых, маркерный признак ЦМС у данной гибридной комбинации не всегда проявляется в F₁ и на полях КазНИИЗиР.

Таблица

Формирование зерен у регенерантов, полученных из 15-суточных незрелых зародышей

Вид, сорт, комбинация скрещивания	Поко-ление	Коли-чество выживших растений, шт.	Количество, шт.		Процент сформиро-вавшихся зерен
			цветков	зерен	
<i>T. compactum</i>	-	2	140	74	52,9
Ленинградка	-	1	76	42	55,3
<i>T. compactum</i> x Ленинградка	F ₁	2	200	93	46,5
<i>T. compactum</i> x Ленинградка	F ₁	1	76	29	38,2
Саратовская-29	-	1	152	89	58,6

Семена контрольных и гибридных растений, полученные от регенерантов комбинаций Саратовская-29, Ленинградка, вида *T. compactum* и комбинации *T. compactum* x Ленинградка, выращенных на экспериментальном участке института в 2007 г., были высажены в озимом посеве на поле КазНИИЗиР. Фенологические наблюдения за растениями F₂ показали, что они прекрасно кустились и колосились, пыльники были нормальной формы, а формирование зерен у них колебалось в пределах от 45 до 55%. При анализе созревших растений отметили несколько интересных фактов: во-первых, растения не расщеплялись по морфологическим признакам; во-вторых, образование зерен у них осталась на уровне урожайности 2007 г. (табл.); в-третьих, изменился вид зерен – и гибридные, и контрольные зерновки были стекловидными, прозрачно-розовыми, имели гладкий эндосперм (в 2007 г. в зерне были крупные и мелкие крахмальные пятна, что снижало качество зерна).

Выводы

Получены *in vitro* регенеранты, выращенные из незрелых и зрелых зародышей от межвидовых скрещиваний пшеницы с использованием видов – носителей мужской

стерильности; получены полноценные фертильные и полуфертильные растения из регенерантов, пересаженных в условия *in situ*; получен семенной материал у всех растений, выращенных из регенерантов.

Способ выращивания растений с помощью эмбриокультуры оказался эффективным для межвидовых гибридов, созданных при скрещиваниях пшеницы, с использованием видов – носителей мужской стерильности.

Список литературы

1. Гродницкий Д.Л. Эпигенетическая теория эволюции как возможная основа нового эволюционного синтеза // Журнал общей биологии. – 2001. – Т. 62, № 2. – С. 99-109.
2. Хайленко Н.А. Цитогенетические и цитоэмбриологические закономерности формирования межвидовых и межсортовых гибридов пшеницы и риса: Автореф. дисс.... доктора биол. наук: 03.00.15 и 03.00.05. – Алматы, 2004. – 58 с.
3. Хайленко Н.А. Цитоплазматическая мужская стерильность у некоторых гибридов тетра- и гексаплоидной пшеницы // Вестник КазНУ. Серия биол. – 2008. – № 2 (37). – С. 69-74.

ПРИМЕНЕНИЕ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) С ПАТОГЕННЫМИ ГРИБАМИ В ИССЛЕДОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ ФИТОИММУНИТЕТА

Л.Г. ЯРУЛЛИНА, *доктор биологических наук*;
Н.Б. ТРОШИНА, *доктор биологических наук*;
О.Б. СУРИНА, *кандидат биологических наук*;
И.В. МАКСИМОВ, *доктор биологических наук*

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

Введение

Одной из первоочередных проблем современной биологии является выявление путей формирования устойчивости растений к фитопатогенам. Известно, что устойчивые растения ограничивают распространение фитопатогенов путем формирования зоны некроза, в которой происходит усиление продукции активных форм кислорода [13]. Пути образования активных форм кислорода в растениях многообразны и активно обсуждаются в научной литературе [9, 10]. Так, показано, что накопление перекиси водорода (H_2O_2) в растительных тканях возможно за счет окисления щавелевой кислоты оксалатоксидазой [7] в результате специфического ингибиования каталазы и пероксидазы салициловой кислотой (СК) [8], индукции экспрессии ряда генов окислительных ферментов под воздействием производных хитина.

Удобной моделью для изучения механизмов формирования защитных реакций растений к фитопатогенам могут служить совместные культуры растительных клеток с возбудителями болезней. Такая культура у нас была получена с использованием каллусов пшеницы и спор возбудителя твердой головни *Tilletia caries* Tul., причем обнаружены различия в степени инфицируемости грибом различных участков каллуса: гриб успешно развивался в межклеточном пространстве рыхло расположенных паренхимоподобных клеток и не инфицировал зоны организованного роста каллусов и ризоиды [3]. Нами также были выявлены морфологические различия между каллусами восприимчивого и устойчивого к возбудителю твердой головни образцов пшеницы. Если каллусы восприимчивых образцов характеризовались наличием небольшого количества плотных участков, то в каллусах устойчивых образцов плотных участков было значительно больше. Эти данные навели нас на мысль о сходстве некоторых механизмов