
ОЦЕНКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ

С.Е. Мохамед

Кафедра ботаники, физиологии, патологии растений и агробиотехнологии
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

А.И. Соловьева, Ю.И. Долгих

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия, 127276

С целью отбора генотипов, пригодных для биотехнологии, оценена способность ряда сортов мягкой и твердой яровой пшеницы египетской и российской селекции к образованию эмбрионного каллуса и регенерации растений. Каллус получали из зрелых зародышей, выделенных из сухих зерновок, и из незрелых зародышей, изолированных на 10—12-й день после опыления. Наибольшая частота образования эмбрионного каллуса отмечена для сорта Новосибирская-22 (71,4%), наименьшей способностью к эмбриогенезу обладал сорт Сидс-1 (4%). Для одних генотипов более высокая частота образования эмбрионного каллуса получена при использовании зрелых, а для других — незрелых зародышей. С увеличением возраста культуры доля эмбрионных каллусов сокращалась у всех сортов, после четырех месяцев культивирования она становилась близкой к нулю. Новосибирская-22, Сухадж-1, Геммиза-1 могут быть использованы в качестве объектов клеточной селекции или генетической инженерии.

Ключевые слова: пшеница мягкая, пшеница твердая, каллус, зародыш, эмбрионный каллус.

Введение. Культивируемые *in vitro* ткани активно используются в научных исследованиях и в практической работе. Культуры клеток применяются для повышения генетического разнообразия, проведения клеточной селекции. Большинство технологий генетической инженерии также включает этап культивирования тканей *in vitro*. Основным препятствием к широкому использованию культур клеток в селекции является низкая регенерационная способность многих линий и сортов.

Пшеница, важнейшая зерновая культура, является непростым объектом для культивирования в искусственных условиях. Каллус можно индуцировать из незрелых соцветий, пыльников, в некоторых случаях из молодых листьев, но надежным источником получения культивируемых тканей являются только зрелые и незрелые зародыши [1; 2]. Доля эмбрионных (способных к регенерации растений) каллусных тканей варьирует от 0 до 100% в зависимости от генотипа и условий культивирования, но у коммерческих сортов редко бывает высокой [3; 4]. Кроме того, морфогенетический потенциал каллусных тканей быстро понижается в условиях культивирования [5].

Задачей данной работы являлась оценка способности ряда сортов мягкой и твердой яровой пшеницы египетской и российской селекции к образованию эмбрионного каллуса и регенерации растений с целью отбора генотипов, пригодных для биотехнологии.

Материал и методы. В работе были использованы восемь сортов мягкой яровой пшеницы: 5 египетских (Гиммеза-1, Гиммеза-9, Гиза-167, Сидс-1, Саха-69) и три российских (Энита, Новосибирская-22, Кинельская-59), а также египетский сорт твердой пшеницы Сухадж-1. Образцы египетских сортов были получены от факультета сельского хозяйства Александрийского университета в Египте. Образец сорта Энита был предоставлен НИИСХ центральных районов нечерноземной зоны, а образцы сортов Новосибирская-22, Кинельская-59 — Институтом общей генетики им. Н.И. Вавилова.

Каллус получали из зрелых зародышей, выделенных из сухих зерновок, и незрелых зародышей, изолированных на 10—12-й день после опыления. Для поверхностной стерилизации зерновки помещали в марлевый мешочек и выдерживали в течение 30 мин в растворе коммерческого отбеливателя «Белизна», после чего их промывали стерильной дистиллированной водой 3 раза. Незрелые зародыши выделяли сразу после стерилизации зерновок. Для выделения зрелых зародышей сухие зерновки до стерилизации замачивали в воде на сутки.

Изолированные зародыши культивировали на среде Мурасиге-Скуга (МС), содержащей 120 мг/л аспарагина, 20 мг/л аскорбиновой кислоты, 100 мг/л мезоинозита, 30 мг/л сахарозы, 3 мг/л 2,4-D и 7 г/л агар-агара. На одну чашку Петри помещали 10 эксплантов. Чашки с зародышами культивировали при температуре 26 °С и влажности 70% на свету при интенсивности освещения 2000 лк и длине светового дня 16 ч. Через 30 дней культивирования получали первичный каллус, который пересаживали на среду для морфогенеза (среда МС без гормонов). После 1—2 месяцев культивирования определяли долю эксплантов, образовавших эмбриогенный каллус.

В каждом варианте опыта для каждого сорта было использовано не менее 25 зрелых и не менее 100 незрелых зародышей. Большая часть результатов получена на основании анализа нескольких сотен зародышей. В таблице и на диаграммах (рис. 2, 3) представлены средние значения со стандартной ошибкой.

Результаты и обсуждение. На инокулированных на питательную среду зародышах формировался каллус двух типов: либо рыхлый гомогенный, либо с плотными участками. Из плотных участков, представляющих собой кластеры эмбриогенных клеток, в дальнейшем развивались зеленые листообразные структуры, а спустя 2—3 недели — проростки (рис. 1).

Получение каллуса из зрелых зародышей. Зерновки пшеницы являются удобным источником эксплантов, так как имеются в наличии в течение всего года независимо от сезона. Анализ частоты образования эмбриогенного каллуса показал большие различия между сортами (рис. 2).

Среди исследуемого материала можно выделить сорта, которые в использованных стандартных условиях культивирования показали высокую (Новосибирская-22), среднюю (Энита, Гиза-167, Саха-69, Гиммеза-1, Гиммеза-9, Сухадж-1) и низкую (Кинельская-59, Сидс-1) способность к эмбриогенезу. Наибольшая частота образования эмбриогенного каллуса отмечена для сорта Новосибирская-22 (71,4%), наименьшей способностью к эмбриогенезу обладал сорт Сидс-1 (4%).

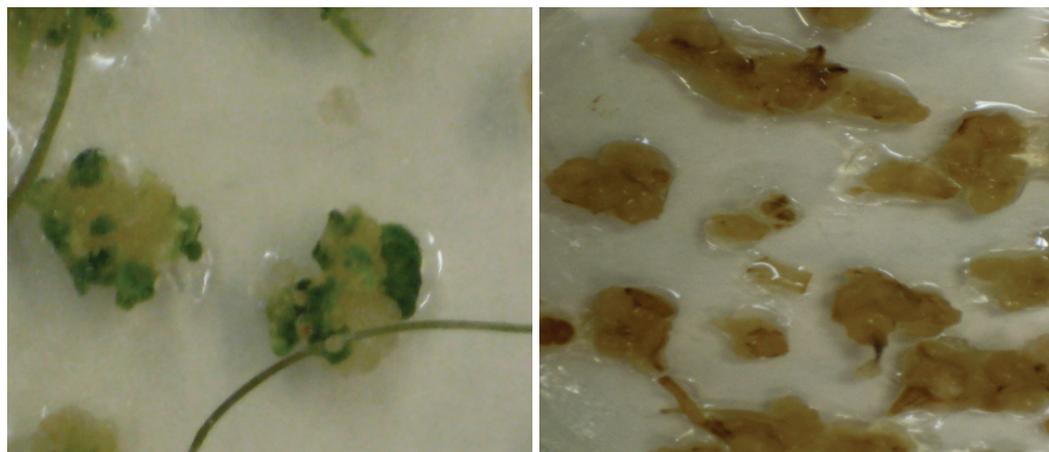


Рис. 1. Эмбриогенный (слева) и неэмбриогенный каллус пшеницы после двух месяцев культивирования

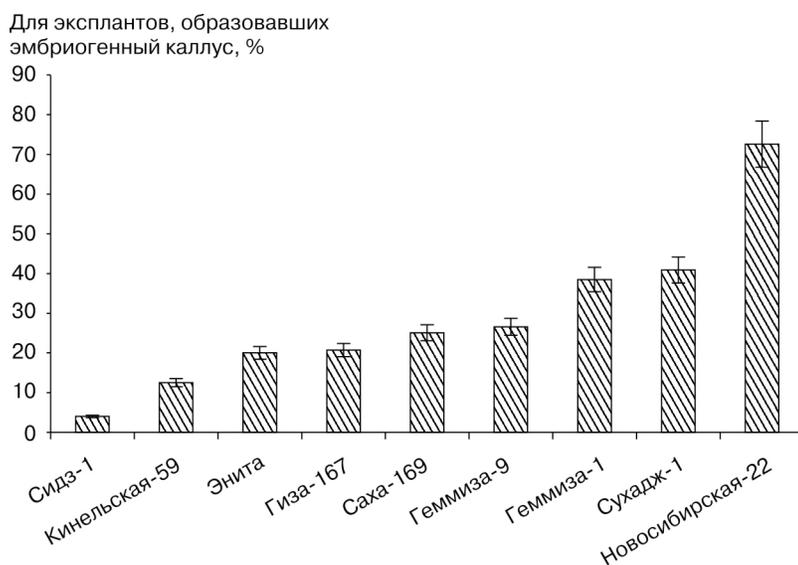


Рис. 2. Частота образования эмбриогенного каллуса зрелыми зародышами разных сортов пшеницы

Получение каллуса из незрелых зародышей. Считается, что каллус из незрелых зародышей обладает наибольшей способностью к морфогенезу [1; 6], поэтому для некоторых сортов пшеницы нами были введены в культуру незрелые зародыши. У сорта Энита частота образования эмбриогенного каллуса как зрелыми, так и незрелыми зародышами оказалась примерно одинаковой. Для Новосибирской-22, видимо, предпочтительно использовать зрелые зародыши. У пшеницы сорта Кинельская-59 частота образования эмбриогенного каллуса незрелыми зародышами оказалась в 2,5 раза более высокой, чем при использовании сухих семян (табл.). Вероятно, для этого сорта можно рекомендовать получение каллуса именно из незрелых зародышей.

Частота образования эмбрионного каллуса незрелыми зародышами

Сорт	Число эксплантов	Число эмбрионных каллусов	% эмбрионных каллусов
Энита	526	96	18,3 ± 1,7
Новосибирская-22	95	34	35,8 ± 4,9
Кинельская-59	238	69	29,0 ± 2,9

Сохранение способности к морфогенезу при культивировании каллуса.

Проведение клеточной селекции и отбор трансформированных каллусов требует продолжительного культивирования тканей. Однако известно, что в условиях *in vitro* регенерационный потенциал культивируемых клеток со временем ослабевает [5]. Не ведет к поддержанию способности к морфогенезу и инкубация каллусов в селективных условиях [7; 8]. Поэтому важно было оценить, у каких сортов каллус остается эмбрионным достаточно долго. Долю каллусов с эмбрионными секторами оценивали после одного, трех и четырех месяцев культивирования.

С увеличением возраста культуры доля эмбрионных каллусов сокращалась у всех сортов (рис. 3). Через три месяца частота каллусов с эмбрионными секторами сократилась у сорта Геммиза-1 примерно на 6%, у сорта Сухадж-1 — на 13%, у сорта Саха-69 — на 17% и у сорта Гиза-167 — на 19%. Каллус сортов пшеницы с большей частотой образования эмбрионного каллуса дольше сохранял способность к регенерации растений. После четырех месяцев культивирования эмбрионного каллуса почти не осталось. Видимо, культивировать ткани проанализированных сортов больше трех месяцев нецелесообразно.

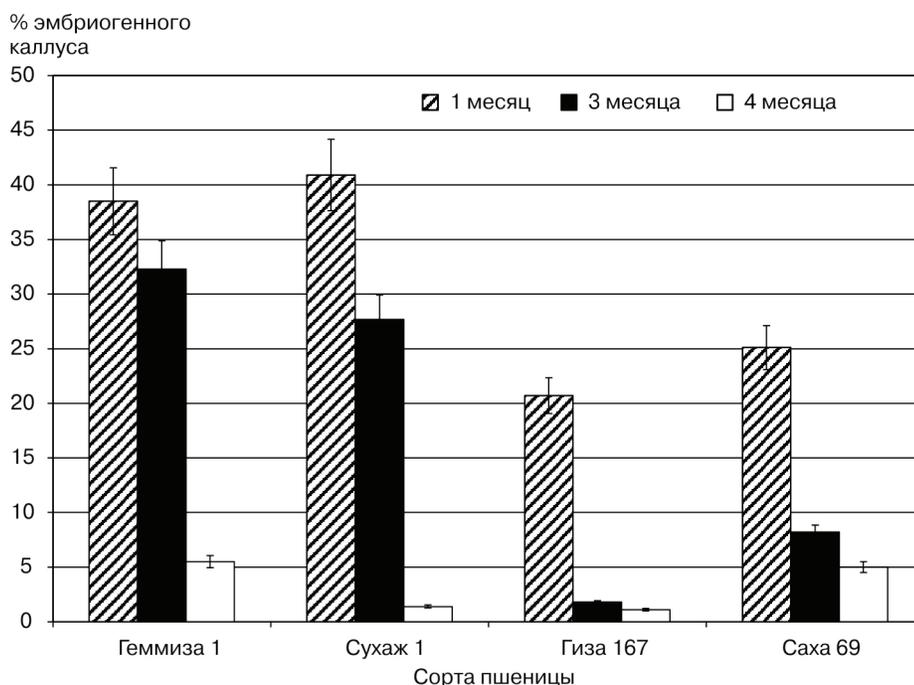


Рис. 3. Изменение морфогенетического потенциала каллуса разных сортов пшеницы в процессе культивирования

Проведенный анализ ряда российских и египетских сортов пшеницы показал, что по своей способности к морфогенезу они сходны с большинством коммерческих сортов. По данным литературы, у элитных сортов пшеницы доля зародышей, образующих эмбриогенные ткани *in vitro*, варьирует, как правило, от 13 до 40% [9; 10]. Наилучшие из проверенных нами сортов пшеницы (Новосибирская-22, Сухадж-1, Геммиза-1) могут быть использованы в качестве объектов клеточной селекции или генетической инженерии. Однако из-за быстрой потери регенерационного потенциала при субкультивировании следует ограничивать работу *in vitro* с этими сортами 3—4 месяцами.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Redway F.A., Vasil V., Lu D., Vasil I.K. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* — 1990. — V. 79. — P. 609—617.
- [2] Chawla H.S. Regeneration responses of callus from different explants and changes on isozymes during morphogenesis in wheat // *Biol. Plantarum.* — 1989. — V. 31. — P. 121—125.
- [3] Chowdhury S.H., Kato K., Yamamoto Y., Hayashi K. Varietal variation in plant regeneration capacity from immature embryos among common wheat cultivars // *Japan J. Breed.* — 1991. — V. 41. — P. 443—450.
- [4] Ozgen M., Turet M., Ozcan S., Sancak C. Callus induction and Plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes // *Plant Breed.* — 1996. — V. 115. — P. 455—458.
- [5] Bohorova N.E., Pfeiffer W.H., Mergoum M., Crossa J., Pacheco M., Estanol P. Regeneration potential of CIMMYT durum wheat and triticale varieties from immature embryos // *Plant Breed.* — 2001. — V. 120. — P. 291—295.
- [6] Haliloglu K. Wheat immature embryo culture for embryogenic callus induction // *J. Biol. Sci.* — 2002. — V. 2. — P. 520—521.
- [7] Ежова Т.А., Багрова А.М., Хартина Г.А., Гостимский С.А. Цитогенетический анализ длительно культивируемых каллусов и полученных из них регенерантов гороха (*Pisum sativum* L.) // *Цитология и генетика.* — 1988. — Т. 22. — С. 22—26.
- [8] Duncan D.R., Waskot R.M., Nabors M.W. In vitro screening and field evaluation of tissue-culture-regenerated sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) for soil stress tolerance // *Euphytica.* — 1995. — V. 85. — P. 373—380.
- [9] Zale J.V., Borchardt-Wier H., Kidwell K.K., Steber C.V. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 2004. — V. 76. — P. 277—281.
- [10] Yu Y., Wang J., Zhu M.L., Wey Z.M. Optimization of mature embryos based high frequency callus induction and plant regeneration from elite wheat cultivars grown in China // *Plant Breeding.* — 2008. — V. 127. — P. 249—255.

ASSESSMENT OF BIOTECHNOLOGY CAPACITY OF VARIOUS WHEAT VARIETIES

S.E. Mohamed

Department of botany, plant physiology, plant pathology and agrobiotechnology
Russian People's Friendship University
Miklucho-Maklay str., 8/2, Moscow, Russia, 117198

A.I. Solovjova, Yu.I. Dolgikh

Timirjazev Institute of Plant Physiology
Russian Academy of Science
Botanicheskaya str., 35, Moscow, Russia, 127276

Assess the ability to embryogenic callus formation and regeneration of plants of several varieties of soft and hard spring wheat breeding Egyptian and Russian in order to select genotypes suitable for biotechnology. Callus from mature embryos were isolated from dry seeds and immature embryos isolated from kernels at 10—12 days after pollination. The highest frequency of embryogenic callus production from mature embryos marked for cultivar Novosibirskaya-22 (71,4%), the lowest capacity for embryogenesis has the cultivar Sids-1 (4%). For some genotypes the higher frequency of production embryogenic callus obtained in the use of mature, but for others — immature embryos. For one genotypes higher frequency of embryogenic callus formation is received at use mature, and for others — immature embryos. With increase in age of culture the proportion of embryogenic calli was reduced at all cultivars, after four months of culturing it became close to zero. Novosibirskaya-22, Suhadzh-1, Gemmiza-1 can be used as sites of cell selection or genetic engineering.

Key words: soft wheat, hard wheat, callus, embryo, embryogenic callus.