

«Сейфуллин окулары – 18(2): «XXI ғасыр ғылыми - трансформация дәуірі» халықаралық ғылыми - практикалық конференция материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения - 18(2): «Наука XXI века - эпоха трансформации». - 2022.- Т.І, Ч.ІІ.- С. 144-148.

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ИНДУКЦИЮ КАЛЛУСОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ПШЕНИЦЫ *TRITICUMAESTIVUM*

Жәумітова Н. Н., м.е.н.,

Әжит , Г. Е. б.т.н.,

Гаджимурадова А. М., м.т.н.,

Казахский агротехнический университет им.С.Сейфуллина, г. Астана

Введение. Ущерб от изменения климата в ближайшем будущем значительно усилится, и сорта пшеницы должны иметь достаточный уровень засухо- и жароустойчивости, чтобы избежать значительного сокращения мирового производства пшеницы. Гаплоидная технология является одной из таких технологий, позволяющих справиться с этими трудностями. Селекция пшеницы с использованием методов удвоения гаплоидов имеет преимущества в виде получения полностью гомозиготных линий в одном поколении и необходимости в меньших размерах популяции. Удвоенные гаплоиды также часто используются при картировании генома растений, а микроспоровые эмбрионы могут быть мишенью для генетической трансформации [1].

В целом, для получения гаплоидов пшеницы *in vitro* требуется многоступенчатая процедура: (1) индукция эмбрионов или каллуса, полученных из микроспор или пыльников, (2) регенерация растений из эмбрионов (эмбриогенез); или (2b) инициирование и рост побегов с последующим развитием корней (органогенез), и (3) удвоение хромосом регенерированных растений, если это необходимо. Хотя было показано, что реакция культуры пыльника контролируется генотипическими факторами, на него также влияют условия окружающей среды и физиологический статус растений-доноров, предварительная обработка донорского материала, химический состав питательной среды, включая регуляторы роста, условия инкубации, включая температуру и свет, и продолжительность индукции. Ключевая предпосылка для создания эффективной системы размножения удвоенных гаплоидов - это крупномасштабное производство удвоенных гаплоидных растений [2].

Наибольший потенциал имеют культура пыльников и микроспор, поскольку другие методы, включая культуру семян и широкую гибридизацию, ограничены одним гаплоидным растением на цветок. У пшеницы практическая полезность культуры пыльников или микроспор в селекционных программах была ограничена низким выходом эмбриогенных

каллусов или зародышей, зеленых растений испонтанных удвоенных гаплоидов. Генотипические ограничения также являются серьезным препятствием. Несмотря на длительные исследования на сегодняшний день не существует оптимизированного протокола по получению гаплоидов для различных сортов пшеницы [3].

Таким образом, целью исследования была оптимизация протоколов состава питательной среды (фитогормоны углеводов) для введения пыльников пшеницы в культуру *invitro* индукции каллусогенеза.

Материалы и методы. В качестве объектов исследований были использованы 10 гибридных линий пшеницы (таблица 1).

Таблица 1. Гибридные линии мягкой пшеницы для гаплоидной технологии

НПЦ зернового хозяйства им. А.И. Бараева	
1.	W 57-2021 11 21/11 Катюша x Саратовская 42
2.	W 63-2021 17 229/10 Дуэт x Астана
ТОО «Карагандинская СХОС им.А.Ф.Христенко»	
3.	W 83-2021 7-44 Лютесценс 2205 Лютесценс 517 x Фитон 27
4.	W 80-2021 4-41 Лютесценс 1519 (Карабалык 90 x Караганд 21) x Карагандинская 21
5.	W 91-2021 15-54 Лютесценс 2222 Саратовская 29 x Терция
6.	W 84-2021 8-45 Лютесценс 2207 Саратовская 70 x Карагандинская 31
ТОО «Северо-Казахстанская СХОС»	
7.	W 102-2021 1206 218/10 Шортандинская юбилейная x Саратовская 70
8.	W 103-2021 1207 Эрит 42/12 Павлодарская 93 x Омская 31
ТОО «Актюбинская СХОС»	
9.	W 10-2021 10 Лин. 201 / 21г. 43 2021
10.	W 11-2021 11 Лин. 205 / 21г. 41 2021

После выхода в трубку, колосья, находящиеся во влагалище листа, срезали и далее проводили работу в лабораторных условиях. Проводили холодную обработку колосьев от 7 до 25 дней в условиях высокой влажности при температуре +4°C. Оценка стадии развития микроспор определялась по общепринятой методике временных давленных препаратов при увеличении 1000X на микроскопе OlimpusBX40.

Далее, стерилизацию колосьев проводили с использованием Domestos, 70% спирта и Твин 20 или только с использованием спирта на каждом этапе трижды промывали стерильной дистиллированной водой.

Для индукции каллуса пыльники вычленили в асептических условиях на поверхность среды или в раствор мальтозы. В таблице 2 представлены составы питательных сред для каллусогенеза.

Таблица 2 – Состав питательных сред для индукции каллуса

Компоненты	МС	№6	Р-4mf	МС+гумат	W14
2,4-D, мг/л	0,5-2,5	0,5-1,5	1,5	1	1,5
Кинетин, мг/л	0,01-0,5	0,1-0,5			
Сахароза, г/л	60-90	90	90		
Мальтоза, г/л	60-90			90	90
Агар-агар, г/л	6-7		7	7	

Автоклавирование проводили 20 мин при температуре 110°C и давлении 1,0 амт. Гормоны и витамины подвергали холодной фильтрации и вносили в стерильную среду, охлажденную до температуры 50-60°.

Чашки Петри, инкубированы при (24±1)°С в темноте в течение 2 недель. Культуры пассировали на свежую среду после появления каллусной ткани и переносили в климокамеру с 16-часовым фотопериодом и освещением 1500 лк. Для стимуляции эмбрио- и каллусагенеза: после холодной предобработки колосьев при температуре +2-4°С в течение 20-25 дней пыльники были выделены из колоса в асептических условиях и помещены в чашки Петри (150-200 пыльников/чашка Петри). В течение трех дней пыльники подвергали высокотемпературному шоку (30-35°С), после чего они были перенесены в термостат с температурой 25°С до появления новообразований.

Результаты исследований.

В результате проведения исследований по оптимизации состава питательной среды по таким параметрам как источник углеводов (сахароза, мальтоза), концентрация фитогормонов (2,4-Д, кинетин), среда МС, с,Р-4mf, модифицированная среда МС с добавлением в качестве стимулятора роста гумата калия, а также среда W14 была отмечена высокая индукция каллуса на средах МС (0,2-1,5%) и №6 (0,5-2%). На среде с добавлением картофельного экстракта Р-4mf индукция каллуса была на уровне 0,3-0,8%, на среде W14 – 0,1-0,5%. Данные среды не применяли при исследовании концентраций гормонов и углеводов, так как выход каллуса был наиболее низким по сравнению с другими средами. На питательной среде МС с добавлением гумата калия отмечался активный рост зародышей пшеницы, которые помещали в качестве индукторов роста пыльников. Однако развития каллусной ткани было наименьшим до 0-0,2%.

Таким образом, в экспериментах по изучению влияния гормонов и источника углеводов использовали только среду МС и №6. В качестве источников углеводов использовали сахарозу и мальтозу в концентрации 30-90 г/л среды. В качестве ауксинов использовали 2,4-Д в концентрации 0,5-2,5 мг/л и кинетин 0,05-0,5 мг/л. Кинетин добавляли для стимуляции спонтанного эмбриогенеза в культуре. Так как при переносе со среды для каллусогенеза на среду для регенерации кинетин имеет решающее значение в стимуляции регенерации.

При помещении пыльников на среду для индукции каллусогенеза помещали в термостат и через 5-6 недель на ПС образовывался каллус из пыльников, который переносили на свежую ПС.

Эксперименты проводили согласно нижеследующей схеме.

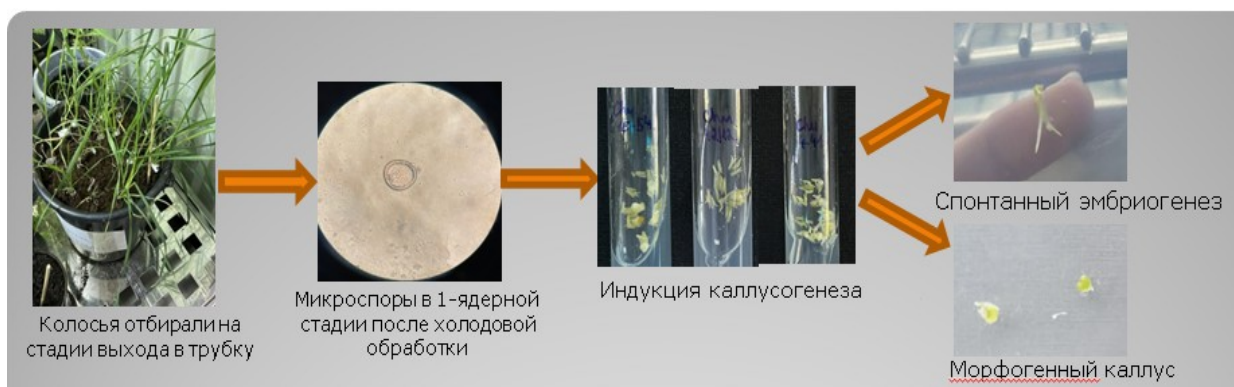


Рисунок 1 – Схема проведения исследований

Концентрация гормонов имела значительное влияние на рост каллусной ткани в культуре пыльников. На среде МС и N6 при концентрации гормонов 2,4-Д – 0,5-1,5 мг/л – каллусогенез был в пределах 0,5-2,5%. При добавлении кинетина индукция каллусогенеза была значительно выше в обеих средах. Так при добавлении 0,05-0,1 мг/л кинетина каллусогенез увеличивался на 0,1%. При повышении концентрации до 0,5 мг/л индукция каллуса была на уровне 3,5-5% на обоих типах сред. Далее исследовали уровень углеводов в средах с концентрацией гормонов равной 2,4-Д – 2-2,5 мг/л, кинетин – 0,5 мг/л.

Согласно результатам на индукцию каллусогенеза не оказало влияние источник углеводов. Так, на среде МС с добавлением мальтозы 90 г/л отмечен каллусогенез – 0,5-1,5%, при более низких концентрациях мальтозы значение было на уровне 0,8%. На питательной среде N6 наблюдалась идентичная корреляция с уровнем мальтозы в среде. При добавлении 90 г/л сахарозы как в случае среды МС, так и среды N6 уровень каллусогенеза достигал 3,5-5%. В нижеследующей таблице указан уровень каллусогенеза на средах с оптимальными концентрациями углеводов и гормонов.

Таблица 3. Индукция каллусогенеза в культуре пыльников 10 гибридных линий пшеницы

№ п/п	Наименование гибридных линий	Каллусогенез, %
НПЦ зернового хозяйства им. А.И. Бараева		
1.	W 57-2021 11 21/11 Катюша х Саратовская 42	1,5
2.	W 63-2021 17 229/10 Дуэт х Астана	0,8

ТОО «Карагандинская СХОС им.А.Ф.Христенко»		
3.	W 83-2021 7-44 Лютесценс 2205 Лютесценс 517 х Фитон 27	2,0
4.	W 80-2021 4-41 Лютесценс 1519 (Карабалык 90 х Караганд 21) х Карагандинская 21	1,0
5.	W 91-2021 15-54 Лютесценс 2222 Саратовская 29 х Терция	4,5
6.	W 84-2021 8-45 Лютесценс 2207 Саратовская 70 х Карагандинская 31	5,0
ТОО «Северо-Казахстанская СХОС»		
7.	W 102-2021 1206 218/10 Шортандинская юбилейная х Саратовская 70	0,2
8.	W 103-2021 1207 Эрит 42/12 Павлодарская 93 х Омская 31	0,5
ТОО «Актюбинская СХОС»		
9.	W 10-2021 10 Лин. 201 / 21г. 43 2021	2,0
10.	W 11-2021 11 Лин. 205 / 21г. 41 2021	1,0

Наименее отзывчивыми к условиям культивирования отмечались гибриды W 63-2021 17 229/10 Дуэт х Астана, W 102-2021 1206 218/10 Шортандинская юбилейная х Саратовская 70, W 102-2021 1206 218/10 Шортандинская юбилейная х Саратовская 70, W 103-2021 1207 Эрит 42/12 Павлодарская 93 х Омская 31. Наиболее отзывчивы к условиям были гибридные линии ТОО «Карагандинская СХОС им. А.Ф. Христенко»: W 91-2021 15-54 Лютесценс 2222 Саратовская 29 х Терция, W 84-2021 8-45 Лютесценс 2207 Саратовская 70 х Карагандинская 31. Спонтанный эмбриогенез был отмечен только у W 84-2021 8-45 Лютесценс 2207 Саратовская 70 х Карагандинская 31 – 0,1%.

Таким образом, показана важная роль синтетического гормона ауксинового типа 2,4-Д в индукции путей морфогенеза (а именно, эмбриоидогенеза и каллусогенеза) в культуре *in vitro* пыльников пшеницы. Так, влияние концентрации экзогенного 2,4-Д на индукцию конкретного пути морфогенеза изучено в культуре пыльников пшеницы повышенные концентрации этого гормона увеличивают каллусогенез. Добавление кинетина заметно увеличивает индукцию каллуса.

Таким образом, используя культуру зрелых зародышей пшеницы *invitro* можно в краткие сроки определить устойчивость линий к стрессовым факторам, таким как засоление, засуха, тяжелые металлы, пестициды и др. на клеточном уровне. Этот метод позволяет проводить эффективную работу по

селекции линий пшеницы на первичном этапе получения устойчивых линий и сортов.

Исследование проведено в рамках научно-технической программы BR10765056 «Создание высокопродуктивных сортов и гибридов зерновых культур на основе достижений биотехнологии-генетики-физиологии-биохимии растений для устойчивого их производства в различных почвенно-климатических зонах Казахстана» на 2021-2023 годы. Руководитель Савин Т.В.

Список использованной литературы

1. Huiyun Liu, Efficient induction of haploid plants in wheat by editing of *TaMTL* using an optimized *Agrobacterium*-mediated CRISPR system [Text] / Ke Wang, Zimiao Jia, Qiang Gong, Zhishan Lin, Lipu Du, Xinwu Pei, Xingguo Ye, // *Journal of Experimental Botany*. - 2020. - Vol.71. Issue 4. – P. 1337–1349. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz529>
2. Kyung-Moon Kim; P. Stephen Baenziger. A simple wheat haploid and doubled haploid production system using anther culture. - 2005. -№41(1).- P.22–27. doi:10.1079/ivp2004594.
3. Saikat Kumar Basu, Madhuleema Datta, Manorma Sharma, and Ashwani Kumar Haploid production technology in wheat and some selected higher plants AJCS. -2011. -№5(9). - P. 1087-1093.