

8 Pechan M, Keller AW. 1989. Induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* by gamma irradiation and ethanol stress. *In vitro* 25, 1073–1074.

9 Knetsch ML, Wang M, Snaar-Jagalska BE, Heimovaara-Dijkstra S. 1996. Abscisic acid induced mitogen-activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts. *The Plant Cell* 8, 1061–1067.

10 Mordhorst AP, Toonen MAJ, de Vries SC. 1997. Plant embryogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16, 535–576.

11 Zeevaart JAD, Creelman RA. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39, 439–473.

12 Hoekstra S, van Bergen S, van Brouwershaven IR, Schilperoort RA, Heidekamp F. 1996. The interaction of 2,4-D application and mannitol pretreatment in anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. *Journal of Plant Physiology* 148, 696–700.

13 Kyo M, Miyatake H, Mamezuka K, Amagata K. 2000. Cloning of cDNA encoding NtPEc, a marker protein for the embryogenic differentiation of immature tobacco pollen grains cultured in vitro. *Plant and Cell Physiology* 41, 129–137

Богуспаев К.К.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ АНДРОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЫЛЬНИКОВ (МИКРОСПОР) У МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ПШЕНИЦЫ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан)

В настоящей работе приведены результаты исследования процессов андрогенеза в культуре изолированных пыльников у межвидовых гибридов пшеницы. Цитозмбриологические исследования показали различные пути образования морфогенных структур при культивировании на среде Блейдза.

Повышение устойчивости и урожайности хлебных злаков является предметом активных исследований. Удельный вес биотехнологических методов в этих исследованиях постоянно возрастает. Гаплоидная технология, т.е. получение гомозиготных растений путем культивирования репродуктивных органов растения, является одним из таких методов. Гаплоидные клетки и растения позволяют легче обнаружить рецессивные мутации, редкие рекомбинации, экспрессию введенного извне генетического материала. Изогенные линии для получения гетерозисных гибридов на основе удвоенных гаплоидов можно создать в течение одного года, тогда как метод инбридинга требует для этого 4-6 лет [1].

Известно, что одним из эффективных методов получения новых форм растений устойчивых к болезням, с высоким содержанием белка в зерне и ряда других ценных признаков, является отдаленная гибридизация. При правильном сочетании межвидовой гибридизации и гаплоидной технологии можно значительно ускорить процессы селекции необходимых новых форм злаков. [2,3] Однако, несмотря на успехи, достигнутые в выведении новых сортов злаков с помощью методов биотехнологии, в том числе и генной инженерии, до сих пор не достаточно разработаны условия культивирования и методики получения, гаплоидных растений-регенерантов в культуре изолированных пыльников и микроспор межвидовых гибридов пшеницы. В связи с этим целью работы, являлось определение морфогенетического потенциала в культуре изолированных пыльников у полученных межвидовых гибридов мягкой пшеницы.

Материалы и методы

Для культивирования пыльников *in vitro* отделом биотехнологии КазНИИ Земледелия и растениеводства МСХ РК предложены линии, представляющие интерес для селекционеров: 8 межвидовых гибридов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) с дикой формой (*Triticum timopheevi*). Гибриды получены в результате реципрокных скрещиваний их между собой и с перспективными селекционными линиями из рабочей коллекции КазНИИ ЗР. Линии и гибриды мягкой пшеницы: №50. Казахстанская-10 x *T. timopheevi* (F2), №66. Саратовская-29 x *T. timopheevi* (F3), №78. Казахстанская-15 x *T. timopheevi* (F2), №79. Казахст.ранняя x *T. timopheevi* (F2), №80. Казахстанская-17 x *T. timopheevi* (F2), №30. Омская рубиновая x Казахстанская-17 (F1), №31. Омская рубиновая x Казахстанская-15 (F1), №34. Алмаз x 190 (211) (F1).

Растения выращивали на опытных полях отдела биотехнологии КазНИИ ЗР. Для выделения пыльников растения срезали на одноядерной стадии развития микроспор, морфологическим показателем которой является расположение второго листа на середине колоса, находящегося в трубке [4]. Срезанные колосья твердой пшеницы подвергали холодной предобработке при +9 С⁰ в течение 3-10 суток. Для мягкой пшеницы использован один срок предобработки 7 суток, который был определен как оптимальный в работах, проведенных в нашей лаборатории ранее.

Для культивирования пыльников использована среда Блейдза [4] с 0,25 мг/л 2,4-Д. Пробирки с пыльниками культивировали в термостате при 26 С. По истечении 35-40 суток, определяли количество андрогенных структур, образовавшихся в культуре пыльников. На основании этих данных вычисляли частоту андрогенеза в % к общему количеству культивируемых пыльников.

Результаты и их обсуждение

В культуре изолированных пыльников злаков возможно образование трех типов андрогенных структур: каллусов, эмбриоидов и глобул из которых в дальнейшем возможна регенерация растений [5]. Разграничение этих структур очень важно для характеристики полученных при культивировании пыльников растений. При образовании растений из эмбриоидов (прямой андрогенез) можно ожидать получения истинных гаплоидов, тогда как из каллуса могут быть получены ди-, три-, тетра- и т.д. эуплоиды и анеуплоиды [6]. Глобулы, внешне похожие на эмбриоиды, через короткое время после возникновения приостанавливают свой рост и могут находиться в таком состоянии неограниченно долго.

Как показывают данные таблицы 1, у межвидовых гибридов мягкой пшеницы с *T.timopheevi* отзывчивость к каллусогенезу одинаково низкая, около нуля.

Таблица 1 - Влияние генотипа на частоту андрогенеза в культуре пыльников мягкой пшеницы

Вариант	Общее количество культивируемых пыльников	Андрогенные структуры				Частота андрогенеза % к общему
		каллусы	эмбриоиды	глобулы	Общее кол-во андрогенных структур	
50	150	-	-	-	0	0
66	480	-	-	-	0	0
78	420	4.0	12.0	-	16.0	3.81
79	780	1.0	2.0	-	3.0	0.38
80	570	1.0	3.0	-	4.0	0.70
30	210	-	1,0	-	1.0	0.48
31	630	-	-	-	0	0
34	360	-	-	-	0	0

Только линия 78 (Казахстанская-15 x *T.timopheevi*) дает более значительную величину частоты андрогенеза (3,81). Во всех других линиях эта величина колеблется около нуля. В данном случае можно лишь утверждать, что использованные линии оказались не отзывчивы к каллусогенезу при культивировании пыльников на среде Блейдза. Следовательно, среда Блейдза с 0,25 мг/л 2,4-Д не подходит для данных линий.

Цитологические исследования развития микроспор мягкой пшеницы показали, что в момент вычленения пыльников из колосьев от 77 до 99% микроспор находились на одноядерной стадии развития, а остальная часть (1-23%) - на двуядерной. Дальнейшее развитие микроспор в культуре определяется, как правило, первым и вторым митотическим делением. В процессе культивирования в условиях *in vitro* на 5-6-й после посадки пыльников у линии 78 наблюдалось до 30 % делящихся микроспор. На 12-й день после первого неравного деления наблюдалось преимущественно развитие вегетативных ядер по А-пути (по Сандерленду) [7]. На рис.1 представлены культивируемые пыльники линии 78 на среде Блейдза.

Считается, что процессы андрогенеза *in vitro* зависят от генотипа донорного растения и контролируются определенной комбинацией генов у пшеницы [8], ячменя [9] и кукурузы [10]. Эти выводы были сделаны после многочисленных экспериментов по отбору отзывчивых к андрогенезу генотипов на определенных средах и в экспериментах с использованием моносомных линий. В первую очередь было установлено, что процент зеленых растений, полученных в культуре изолированных пыльников и микроспор, варьировал в широких пределах в зависимости от генотипа и методов предварительной обработки. Регенерация зеленых растений регулируется группой аддитивных и неаддитивных ядерных генов. Однако, не исключается роль цитоплазматических генов, которые влияют на процессы андрогенеза *in vitro*, взаимодействуя с ядерными генами. Реципрокное скрещивание у ячменя между линиями с "высоким выходом зеленых растений" (30-40%) и линиями с "низким выходом зеленых растений" (5-8%) показали, что у гибридов преобладали в основном промежуточные формы.



Рисунок 1- Каллусогенез в культуре изолированных пыльников у межвидовых гибридов пшеницы.

Также существует мнение, что практически у любого сорта или гибрида возможно повысить процент каллусогенеза и выход гаплоидных растений-регенерантов, подобрав необходимые условия предобработки и условия культивирования. Если исходить из предпосылки, что изолирование пыльников и их дальнейшее культивирование является одним из стрессовых факторов, то возможно высокий уровень регенерации зеленых

растений зависит от адаптивных механизмов растений, которые включаются независимо от наличия генов контролирующих процессы морфогенеза *in vitro*.

Литература

- 1 Heberle-Bors E. *In vitro haploid formation from pollen: a critical review*//1985., *Theor. Appl. Genet.* N71., P.361-374
- 2 Уразалиев Р.А., Кожаметов К.К. Создание новых форм озимых зерновых культур путем отдаленной гибридизации для условий Казахстана//Сельхоз.биология. 1983, №6.С.46-50
- 3 Анель В.И. Создание исходного селекционного материала путем межвидовой гибридизации //Селекция сортов с-х. культур интенсивного типа. Горки, 1989г.С.51-54
- 4 Mejza S.J. Morgant V., DiBonna D.E. and Wong J.R.//1993. *Plant regeneration from isolated microspores of Triticum aestivum. Plant Cell Repp.* N 12, P.149-153
- 5 Sunderlend N. *Anther culture: a progress report*.//1971., *Sci Prog (London)*, N59., P.527-549
- 6 De Buyser J., Henry Y. And Taleb G. *Wheat androgenesis: Cytogenetical Analysis and agronomic performace of duobled haploids*//1985. *Z.Pflanzenzuchtg*, N95, P.24-33
- 7 Sanderland N. *The concept of morphogenic competence with referance to anther and pollen culture.* //1982., *Plant cell culture in crop improvement.*
- 8 Ekiz H., Konzak C.F. *Nuclear and citoplasmic control of anther culture responce in wheat. Analysis of alloplasmatic lines*.//1991a. *Crop Science*, N31, P.1421-1427.
- 9 Larsen E.T., Tuveesson K.D., Andersen S.B. *Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (Hordeum vulgare) antherculture*.//1991. *Theor. Appl. Genet.* N 82. P.417-420
- 10 Gai, X.W., Lal, S., Xing L.Q., Walbot V., *Gene discovery using the maize genome database ZmDB*//2000. *Nucleic Acid Research* 28(1), 94-96

Джангалина Э.Д., Хожамуратова С.Ш., Кукишева А.А. ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ ЛЮЦЕРНЫ

(Алматинский технологический университет, г. Алматы, Казахстан)

Кардинальным подходом к созданию новых исходных форм и сортов является обогащение генетического базиса селекции путем отдаленной гибридизации культурной люцерны с дикими сородичами. В этом отношении исключительный интерес представляет флора Казахстана, включающая 12 видов дикорастущей многолетней люцерны. Дикорастущие виды являются носителями зародышевой плазмы таких важных признаков, как зимостойкость, жаростойкость, устойчивость к затоплению, низким температурам, засухе, болезням, многоукосность, отзывчивость на орошение и внесение минеральных удобрений, высокобелковость [1]. Отбор перспективных форм из природных популяций и изучение процессов морфогенеза и регенерации этих видов в культуре *in vitro* позволит вовлекать их в селекционный процесс. Приемы культивирования растительных клеток и регенерации из них растений, разработанные для многих важных сельскохозяйственных культур, уже сейчас позволяют реализовать возможности клеточной селекции, то есть применять её для создания новых устойчивых и высокопродуктивных форм и сортов растений.

Значительным шагом в расширении областей применения метода культуры тканей для решения теоретических и прикладных задач явилась разработка техники выращивания из отдельной соматической клетки целого растения. Этот процесс получил название - соматический эмбриогенез.

При регенерации бобовых культур встречается много трудностей. Тем не менее, *Medicago sativa L.* и некоторые другие виды рода *Medicago* были первыми из бобовых, которые удалось регенерировать в культуре *in vitro*. В результате исследований, проводимых во многих лабораториях мира, разработаны методы регенерации растений путем соматического эмбриогенеза из каллусных и суспензионных культур люцерны [2, 3]. Следует отметить, что преобладающее большинство экспериментов по регенерации растений в культуре тканей люцерны проводилось с использованием в качестве объекта исследования, *Medicago sativa L.* - главного возделываемого вида этой сельскохозяйственной культуры [4, 5, 6]. Механизмы регенерации *in vitro* дикорастущих многолетних видов люцерны изучены слабо, поэтому эта проблема является весьма актуальной.

Одной из важных задач физиологии растений является познание процессов морфогенеза *in vitro* и способов его регуляции. В связи с этим целесообразно расширять теоретические исследования, связанные с изучением закономерностей процесса соматического эмбриогенеза в культуре тканей, в частности поиском новых регуляторов роста и разработкой высокоэффективных систем регенерации дикорастущих видов люцерны. В работах ряда авторов изучалось влияние естественных и синтетических регуляторов роста, а также сырья растительного происхождения на процесс соматического эмбриогенеза в культуре тканей *M. sativa L.* И было показано, что некоторые синтетические регуляторы роста также могут выступать индукторами соматического эмбриогенеза [7,8].

Цель наших исследований - изучение влияния новых синтетических регуляторов роста на морфогенетическую способность двух дикорастущих видов люцерны – *M. falcate L.* и *M. borealis Grossh.*

Материалы и методы