

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің Ғылым жаршысы (пәнаралық) = Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный). - 2018. - №4 (99). - С.71-77

МЕТОД ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ В СОЗДАНИИ ГИБРИДНЫХ ФОРМ РАСТЕНИЙ ПРИ ОТДАЛЕННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С СОРТАМИ ЯРОВОЕ ТРИТИКАЛЕ

В.К. Швидченко¹, к.с-х.н, доцент

С.А. Джатаев¹, к.б.н.

В.С. Киян¹, PhD

А.М. Гаджимурадова¹, магистр

А.Х. Жумалин¹, магистр

Ә.И. Тасанбиева², студент

¹АО «Казахский агротехнический университет

²РГП на ПХВ «Евразийский национальный университет

Аннотация

Метод культуры ткани, клеток и органов растений в современной селекции широко используется при получении межвидовых и межродовых гибридных форм растений злаковых культур. В данной работе представлены результаты создания на основе метода эмбриокультуры гибридных растений между сортами яровой мягкой пшеницы (Пиротрикс 28, Целинная юбилейная, Карагандинская 22) и ярового тритикале (Россика, Кармен, Норман). В результате проведенных исследований было установлено, что зародыши незрелых гибридных зерновок, более раннего возраста (12-14-е сутки после опыления) характеризовались низкой отзывчивостью на прорастание в условиях их культивирования *in vitro*, а зародыши более позднего возраста (18-22 и 22-24 сутки после опыления) характеризовались более высокой отзывчивостью на прорастание условия культивирования. В результате экспериментов выход растений от зародышей гибридных зерновок на искусственной питательной среде *in vitro* составил: Пиротрикс 28 (*Tr. Aestivum*) × Кармен (*Triticale*) (53,0 %), Карагандинская 22 (*Tr. Aestivum*) × Россика (*Triticale*) (51,0 %), Целинная юбилейная (*Tr. Aestivum*) × Норман (*Triticale*) (48,0 %).

Ключевые слова: пшеница *Triticum Aestivum*, яровое тритикале *Triticale*, межвидовые и межродовые гибриды, гибридизация, метод эмбриокультуры.

Введение

В настоящее время области селекции растений можно современную биотехнологию в рассматривать как сочетание метода

культуры ткани, клеток и органов растений с методами традиционной селекции, молекулярной биологии и генетики. При этом следует отметить, что данный метод открывает не только возможности изучения селекционного материала в плане фундаментальных исследований, но и имеет конкретный выход в селекционную практику. Метод культуры ткани, клеток и органов растений широко используется в селекционно-генетической работе с целью качественного и количественного расширения генетической изменчивости. Данный метод позволяет получать штаммы культивируемых растительных клеток, изменять их наследственный аппарат, управлять прогрессией пloidности культивируемых клеток, получать полноценные растения-регенеранты с измененными признаками и свойствами [1-4].

В совокупности возможности метода культуры ткани, клеток и органов растений уже в первом экспериментальном приближении очерчивают основные направления в селекции сортов различных сельскохозяйственных культур. Следует отметить, что при помощи метода культуры ткани, клеток и органов растений можно решить не только сложнейшую и важную проблему в селекции растений – расширения спектра наследственной изменчивости, но и другие немаловажные задачи, которые сегодня стоят перед практической селекцией. Например, селекционеру не всегда удается зафиксировать стабильное сочетание свойств и признаков во вновь созданной

форме. При этом, если речь идет о морфологических и некоторых других признаках, имеющих моногенную детерминацию, эту проблему можно решить, используя обычные методы генетики. Однако современные методы генетики бессильны, когда селекционеру приходится стабилизировать признак, контролируемый большим числом генов. Известно, что большинство важнейших хозяйственно-полезных признаков у растений являются полигенными – урожайность, белковость, масличность и т. д. В настоящее время в мировой селекционной практике не существует генетических методов, которые бы дали возможность селекционеру перевести в гомозиготное состояние сотню или тысячу генов, не имеющих к тому же видимого проявления на фенотипе растения. Такую возможность представляет метод культуры ткани, основанный на культивировании пыльников и пыльцы растений *in vitro*. Получение гаплоидного растения и последующий перевод его на диплоидный уровень – единственный на сегодняшний день способ, дающий возможность в течение исключительно короткого срока с точки зрения селекционного процесса получать гомозиготное растение практически по всем его генам [5-7]. Большое значение метод культуры ткани, клеток и органов растений приобретает при создании гибридных форм растений злаковых культур на основе межвидовой и отдаленной гибридизации. В данном случае в работе используется метод эмбриокультуры, сущность которого

заключается в культивировании на искусственной среде незрелых зародышей гибридных растений, полученных при отдаленной гибридизации. В настоящее время метод эмбриокультуры (культура зародышей *in vitro*) широко используется в селекционной практике при создании межвидовых и межродовых гибридных форм растений различных сельскохозяйственных культур. Однако до настоящего времени

Объекты и методы исследований.

Объектами для проведения исследований послужили гибридные формы растений сортов яровой мягкой пшеницы и сортов яровое тритикале: Пиротрикс 28 (*Tr. Aestivum*) × Кармен (*Triticale*), Карагандинская 22 (*Tr. Aestivum*) × Россия (*Triticale*), Целинная юбилейная (*Tr. Aestivum*) × Норман (*Triticale*). Для создания гибридных форм растений между сортами яровой мягкой пшеницы и сортами яровое тритикале использовали метод половой гибридизации. Кастрацию и опыление растений яровой пшеницы проводили согласно методическому пособию Мережко А.Ф., Эзрохина Л.В., Юдина А.Е. [8]. Перед стерилизацией зерновки вычленили из колосковых чешуй гибридных растений. Стерилизацию зерновок проводили раствором белизны, с последующей трехкратной промывкой стерильной водой. Экспозиция в стерилизующем растворе – 15-20 минут. Зародыши вычленили в асептических условиях. Выделенные из зерновок зародыши помещали на питательные среды щитком вниз. Инокуляцию и

данный метод в региональной селекции Северного и Центрального Казахстана по ряду объективных и субъективных причин при селекции сортов яровой мягкой пшеницы не получил своего применения.

Цель исследований – адаптация технологии и протоколов получения на основе метода эмбриокультуры гибридных форм растений при отдаленной гибридизации растений сортов яровой мягкой пшеницы с сортами яровое тритикале.

культивирование зародышей в культуре *in vitro* проводили методом прямой регенерации согласно Катасоновой А.А., Кругловой Н.Н. [9, 10]. Среды стерилизовали автоклавированием в течение 20-25 минут при 0,7-0,8 атмосфер. Незрелые зародыши зерновок гибридных растений культивировали в кондиционной комнате при температуре 24-26 °С и 70 %-ной относительной влажности воздуха [11,12]. Культивирование зародышей пшеницы *in vitro* осуществляли при температуре 24-26°С на рассеянном свете при круглосуточном освещении 3000 люкс и 70 % относительной влажностью воздуха. Полученные растения *in vitro* извлекали вместе с агаризированной средой из стеклянных стаканчиков или пробирок. Далее, их отмывали от агара и переносили в горшочки (кюветы) с перлитовым песком, которые помещали в условия – камеры искусственного климата. Растения поливали раствором Кнопа и закрывали на 7-9 дней полиэтиленовой пленкой, с целью создания влажной камеры. После

чего пленка снималась, и растения 10-15 дней культивировались на перлите и далее их пересаживали в почву. Для этого растения вместе с перлитом помещали в вегетационные сосуды с почвенной смесью (3 части почвы + одна часть песка) и выращивали до

Результаты исследований.

Метод эмбриокультуры (культура зародышей *in vitro*) широко используется в селекционной практике при создании межвидовых и межродовых гибридных форм растений различных злаковых культур. Метод эмбриокультуры использовался нами на зародышах незрелых зерновок, которые были получены от скрещивания сортов яровой пшеницы с сортами яровое тритикале (F_1) путем прямого их доращивания *in vitro* на искусственной питательной среде. Полученные методом эмбриокультуры на искусственной питательной среде *in vitro* гибридные растения F_1 от зародышей незрелых зерновок относительно неплохо укоренялись в почвенном грунте. Это позволило нам получить *in vivo* гибридные формы с полноценным зерновым потомством в F_2 (рисунок 1).

Выбор ярового тритикале для скрещиваний был обусловлен рядом причин. Например, для зернового сортотипа яровое тритикале характерна высокая масса растения и его составляющих частей. Потенциал продуктивности колоса у данной культуры огромен. Кроме

Таблица 1 – Результаты культивирования зародышей незрелых зерновок гибридных растений (пшеница х яровое тритикале) на питательной среде Гамбурга (B5)

полной спелости семян. Перед цветением гибридных растений на каждый колос растения пшеницы одевался изолятор. Уборку урожая проводили, когда зерновое потомство гибридных растений достигало полной спелости.

того культура тритикале имеет разное число доминантных и рецессивных генов, которые обладают устойчивостью к грибным заболеваниям – бурой и стеблевой ржавчинам, пыльной головне [13]. Стеблевая и бурая ржавчины, пыльная головня в условиях естественного полевого фона практически не поражают растения ярового тритикале.

Из литературных источников известно, что состав питательной среды в значительной степени влияет на развитие зародышей гибридных зерновок пшеницы *in vitro*. В проводимом нами эксперименте для получения жизнеспособных растений из зародышей незрелых гибридных зерновок (пшеница × яровое тритикале) мы использовали питательную среду Гамбурга (B5) [14]. Результаты культивирования зародышей незрелых зерновок из гибридных растений, полученных от скрещивания сортов яровой мягкой пшеницы и сортов яровое тритикале представлены в таблицах 1-2, рисунок 1. Вычленение данных зародышей проводилось на 22-24 сутки после опыления.

№ п/п	Название гибридной комбинации	Всего эксплантов, шт.	Получено растений	
			Штук	В процентах
1.	Пиротрикс 28 (<i>Tr. Aestivum</i>) × Кармен (<i>Triticale</i>)	30	30	53,0
2.	Карагандинская 22 (<i>Tr. Aestivum</i>) (<i>Triticale</i>) × Россияка (<i>Triticale</i>)	45	23,0	51,0
2.	Целинная юбилейная (<i>Tr. Aestivum</i>) (<i>Triticale</i>) × Норман (<i>Triticale</i>)	40	19,0	48,0
3.	Астана (<i>Tr. Aestivum</i>) × Амиго (<i>Triticale</i>)	20	8,0	40,0
4.	Пиротрикс 28 (<i>Tr. Aestivum</i>) × Даурен (<i>Triticale</i>)	45	17,0	37,0
5.	Целинная юбилейная (<i>Tr. Aestivum</i>) (<i>Triticale</i>) × Россияка (<i>Triticale</i>)	20	7,0	35,0

Согласно экспериментальным данным, представленным в таблице 1 выход растений *in vitro* из зародышей незрелых зерновок у гибридных комбинаций находился в пределах от 53,0 % Пиротрикс 28 (*Tr. Aestivum*) × Кармен (*Triticale*) до 35 % Целинная юбилейная (*Tr. Aestivum*) × Россияка (*Triticale*). При этом в проводимом эксперименте

наибольший выход растений *in vitro* отмечен у гибридных комбинаций: Пиротрикс 28 (*Tr. Aestivum*) × Кармен (*Triticale*) (53,0 %), Карагандинская 22 *Tr. Aestivum*) × Россияка (*Triticale*) (51,0 %), Целинная юбилейная (*Tr. Aestivum*) × Норман (*Triticale*) (48,0 %).



Рисунок 1 - Растения гибридных комбинаций, полученные *in vitro* и укорененные в почвенный грунт: 1 - Пиротрикс 28 (*Tr. Aestivum*) x Кармен (*Triticale*); 2 - Астана (*Tr. Aestivum*) x Амиго (*Triticale*); Карагандинская 22 (*Tr. Aestivum*) x Россияка (*Triticale*).

Таблица 2 – Зависимость прорастания *in vitro* зародышей незрелых зерновок гибридных растений от их возрастных особенностей.

Возраст зародышей после опыления, дней	Кол-во зародышей введенных <i>in vitro</i> , шт.	Кол-во проростков <i>in vitro</i>			
		Получено		Выживших	
		штук	процент	штук	процент
1	2	3	4	5	6
Гибридная комбинация Пиротрикс 28 (<i>Tr. Aestivum</i>) × Кармен (<i>Triticale</i>)					
12-14	24	5	20,8	3	12,5
18-22	28	12	42,9	9	32,4
22-24	22	11	50,0	8	36,6
Гибридная комбинация Целинная юбилейная (<i>Tr. Aestivum</i>) × Норман (<i>Triticale</i>)					
12-14	20	3	15,0	2	10,0
18-22	25	9	36,0	7	28,0
22-24	23	12	52,2	10	43,5

Гибридная комбинация Карагандинская 22 (<i>Tr. Aestivum</i>) × Россияка (<i>Triticale</i>)					
12-14	16	2	12,5	1	6,3
18-22	18	8	44,4	8	44,4
22-24	17	10	58,8	9	52,9

В результате проведенных исследований нами было установлено, что зародыши, незрелых гибридных зерновок, более раннего возраста (12-14-е сутки после опыления) характеризовались низкой

отзывчивостью на условия культивирования *in vitro*. Высокой отзывчивостью на условия культивирования характеризовались зародыши незрелых зерновок более позднего возраста (18-22 и 22-24 сутки после опыления).

Выводы

При изучении метода эмбриокультуры на гибридных растениях, полученных от скрещивания различных сортов яровой мягкой пшеницы с сортами ярового тритикале было установлено, что высокой

отзывчивостью на прорастание зародышей незрелых зерновок на искусственной питательной среде в условиях *invitro* обладали зародыши незрелых зерновок более позднего возраста от 18 до 24 суток после опыления.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М., – С. 1964
2. Бутенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений: 35-е Тимиряз. чтен. М.: Наука, – 1975, – С. 59
3. Wenzel C., Foroughi-Wehr B. // Cell Culture and Somatic cell Genetics Plant. – 1984. – Vol. 1. – P. 311-327
4. Лукьянюк С.Ф., Шерер Н.В., Махновская М.Л., Игнатова С.А. // Биология культивируемых клеток и биотехнология: Тез. докл. Новосибирск, – 1988. – С. 209-210.
5. Дьячук Т.И., Дьячук П.А. // Биология культивируемых клеток и биотехнология: Тез. докл. Новосибирск, – 1988. – С. 207-208
6. Гапоненко А.П., Мунтян М.А., Марикова Н.И., Созинов А.А. Регенерация растения различных генотипов пшеницы *Triticumaestivum*L. *invitro* // Докл. АН СССР. –1984. – Т. 278. № 5. – С. 1231-1235
7. Бондаренко А.И. Кинетика митоза растительных клеток в миксоплоидной культуре при факторных изменениях среды; Автореф. дис... канд. биол. наук. М., –1985. – С. 22
8. Мережко А.Ф., Эзрохин Л.В., Юдин А.Е. Эффективный метод опыления зерновых культур: метод. указание. – Л.: ВИР, –1973. – С. 12.
9. Катасонова А.А. Оптимизация технологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы в каллусной культуре *in vitro* :

автореф.канд. биол. наук : 03.00.23; 03.00.12 / А.А. Катасонова. – Уфа, 2007. – С. 19

10. Круглова Н.Н. Периодизация развития зародыша пшеницы для биотехнологических исследований / Н.Н. Круглова // Аграрная Россия. – 2008. – № 3. – С. 20-22.

11. Murachige T., Skoog F.A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Flantarum*. – 1962, – P. 473.

12. Бутенко Р.Г., Никифорова И.Д., Швидченко В.К. Использование потенциала культивируемых клеток незрелых зародышей: метод. указания. – Целиноград, 1987. – С. 45

13. Абдуллаев К.М. Иммунологическое изучение мировой коллекции тритикале

к возбудителям твердой головки и бурой ржавчины: дис.канд. с.-х. наук / К.М. Абдуллаев. – Л., 1984. – С. 234

14. Получение растений-регенерантов озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в культуре *in vitro* / Г.Г. Голева, Ю.А. Батлук, Т.Г. Ващенко, Н.Н. Черкасова, А. Д. Голев // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2014. – Вып. 3 (42). – С. 17-22.

References

1. Butenko R.G. Culture of isolated tissues and physiology of plant morphogenesis. M., - S. 1964

2. Butenko R.G. Experimental morphogenesis and differentiation in plant cell culture: 35th Timiryaz. read M. : Science, - 1975, - p. 59

3. Wenzel S., Foroughi-Wehr V. // Cell Culture and Somatic cell Genetics Plant. - 1984. - Vol. 1. - p. 311-327

4. Lukyanuk S.F., Scherer N.V., Makhnovskaya M.L., Ignatova S.A. // Biology of cultured cells and biotechnology: Proc. report Novosibirsk, - 1988. - С. 209-210.

5. Dyachuk T.I., Dyachuk P.A. // Biology of cultured cells and biotechnology: Proc. report Novosibirsk, - 1988. - p. 207-208

6. Gaponenko A.P., Muntian M.A., Marikova N.I., Sozinov A.A. Regeneration of plants of different genotypes of wheat *Triticum aestivum* L. *in vitro* // Proc. Academy of Sciences of the USSR. –1984. - Т. 278. № 5. - p. 1231-1235

7. Bondarenko, AI, Kinetics of mitosis of plant cells in mixoploid culture with factor changes in the environment; Author. dis ... cand. biol. sciences. M., –1985. - P. 22

8. Merezhko A.F., Ezrokhin L.V., Yudin A.E. Effective method of pollination of grain crops: method. an indication. - L. : VIR, –1973. - p. 12.

9. Katasonova A.A. Optimization of the technology for the production of regenerated plants of spring wheat in the callus culture *in vitro*: author abstract. biol. Sciences: 03.00.23; 03.00.12 / A.A. Katasonov. - Ufa, 2007. - p. 19

10. Kruglov N.N. Periodization of wheat germ development for biotechnological research / N.N. Kruglov // Agrarian Russia. - 2008. - № 3. - p. 20-22.

11. Murachige T., Skoog F.A. Revised medium for rapid growth. Flantarum. - 1962, - P. 473.

12. Butenko RG, Nikiforova I. D., Shvidchenko V.K. Using the potential of cultured cells of immature embryos: method. instructions. - Tselinograd, 1987. - p. 45

13. Abdullaev K.M. Immunological study of the world collection of triticale to pathogens of smut and brown rust: dis.kand. S.-H. Sciences / K.M. Abdullaev. - L., 1984. - p. 234

14. Obtaining plants regenerated winter soft wheat (*Triticum aestivum* L.) in vitro culture / GG Goleva, Yu.A. Batluk, T.G. Vashchenko, N.N. Cherkasov, A. D. Golev // Bulletin of the Voronezh State Agrarian University. - 2014. - Vol. 3 (42). - p. 17-22.

ЖАЗДЫҚ БИДАЙМЕН ЖАЗДЫҚ ТРИТИКАЛЕ СОРТТАРЫ АРАСЫНДА АЛШАҚ ГИБРИДИЗАЦИЯ БАРЫСЫНДА ӨСІМДІКТЕРДІҢ ЖАҢА ГИБРИДТІК ФОРМАЛАРЫН ЖАСАУҒА АРНАЛҒАН ЭМБРИОКУЛЬТУРА ӘДІСІ

В.К. Швидченко¹, а-ш.ғ.к., доцент

В.С. Киян¹, PhD

А.М. Гаджимурадова¹, магистр

А.Х. Жумалин¹, магистр

Ә.И. Тасанбиева², студент

¹АҚ «С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті»,
“Л.Н.Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті», Қазжымұқан

ТҮЙІН

Заманауи сұрыптауда өсімдіктердің тіндері мен жасушаларын пайдалану, өсірілетін өсімдіктердің жасушаларының штамдарын және өзгертілген қасиеттері бар толыққанды регенерант өсімдіктерін алуға мүмкіндік береді. Бұл мақалада эмбриокультура әдісін қолданып, бидай (Пиротрикс 28, Целинная юбилейная, Карагандинская 22) мен жаздық тритикале (Россика, Кармен, Норман) гибридтерінің регенерант-өсімдіктерін алу нәтижелері көрсетілген. Зерттеулердің нәтижесінде, *in vitro* жағдайында өсіруге ерте жастағы гибридті жетілмеген дәндерінің ұрықтары (тозанданудан 12-14 күн өткеннен кейін) төмен жауап берумен сипатталды, ал кеш жастағы гибридті жетілмеген дәндерінің ұрықтары (тозанданудан 18-22 және 22-24 күн өткеннен кейін) өсіру жағдайларына жоғары жауап береді. Регенерацияланған өсімдіктердің өнімділігі: Пиротрикс 28 (*Tr. Aestivum*) × Кармен (*Triticale*) (53,0 %), Карагандинская 22 (*Tr. Aestivum*) × Россика (*Triticale*) (51,0 %), Целинная юбилейная (*Tr. Aestivum*) × Норман (*Triticale*) (48,0 %).

Түйін сөздер: бидай *Triticum Aestivum*, жаздық тритикале *Triticale*, аралық және тұраралық гибридтер, будандастыру, эмбриокультура әдісі.

EMBRYO CULTURE METHOD FOR CREATING HYBRID FORMS OF PLANTS DURING A REMOTE HYBRIDIZATION OF SPRING WHEAT VARIETY WITH SPRING TRITICALE SPECIES

*V.K. Shvidchenko¹, candidate of agricultural sciences,
assistant professor*

S.A. Jatayev, candidate of biological sciences

V.S. Kiyan¹, PhD

A.M. Gajimuradova¹, master

A.Kh. Zhumalin¹, master

A.I. Tasanbiyeva², student

¹ *JSC «S.Seifullin Agrotechnical University», Zhenys av., 62,*

² *“L.N.Gumilyov Eurasian National University”, Kazhymukan street, 13*

SUMMARY

The method of plants tissue, cells and organs culture in modern breeding is widely used in the production of interspecific and intergeneric hybrid forms of plants of cereals. This article presents the results of obtaining regenerated plants of wheat hybrids (Pyrotriks 28, Tselinnaya Jubilee, Karaganda 22) and spring triticale (Russia, Carmen, Norman) using embryo culture. As a result of the research, it was found that embryos of immature hybrid kernels of earlier age (12-14th day after pollination) were characterized by low responsiveness to germination under conditions of their cultivation in vitro, and embryos of later age (18-22 and 22-24 days after pollination) were characterized by a higher responsiveness to germination of the cultivation conditions. As a result of the experiments, the yield of plants from embryos of hybrid kernels on an artificial in vitro nutrient medium was: Pirotrix 28 (*Tr. Aestivum*) × Carmen (*Triticale*) (53.0%), Karaganda 22 (*Tr. Aestivum*) × Rossika (*Triticale*) (51.0%), Tselinnaya yubileinaya (*Tr. Aestivum*) × Norman (*Triticale*) (48.0 %).

Key words: *Triticum Aestivum* wheat, *Triticale* spring triticale, interspecific and intergeneric hybrids, hybridization, embryo culture method.