

**DEVELOPMENT OF SELF-POLLINATED LINES FOR WINTER RYE (*SECALE CEREALE* L.) HYBRID CULTIVARS BREEDING**  
**S.I. Hardzei, E.P. Urban, K.G. Melnichuk**

*In the article, the basic results of self-fertile winter rye lines development with the use of different methods are stated. The method of self-fertility genes introduction into rye populations, the method of inbred lines development with the use of  $F_1$  heterosis hybrids are described. The necessity of working out of anther technology culture in vitro for the development of rye double haploids is noted. The practical use of the developed inbred lines in rye breeding for heterosis is described.*

УДК 633.11»324»:631.523

**КАЛЛУСОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO НЕЗРЕЛЫХ СОЦВЕТИЙ  
ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ**

**Е.Н. Куликович**, канд. с.-х. наук, **С.Н. Куликович**, канд. с.-х. наук,  
**Н.Л. Ермоленко**, **Е.Ф. Барчевская**

*Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию*

*(Поступила 05.02.2016 г.)*

**Аннотация.** *Проведено изучение каллусогенеза в культуре in vitro незрелых соцветий озимой пшеницы. Установлено, что между длиной колоса и размером каллуса существует положительная взаимосвязь:  $r=0,46$  (Т-62) –  $r=0,78$  (Fenda). Размер каллуса у озимой пшеницы обусловлен не сортовыми различиями, а генетическими особенностями культуры, поскольку нет различий как между максимальной величиной каллуса (5,6-5,9 мм), так и по размаху варьирования данного признака внутри каждого изученного образца озимой пшеницы. Оптимальной длиной незрелого колоса, обеспечивающей максимальное и стабильное количество хорошо развитых, высокоморфогенных каллусов является диапазон 2,1-2,5 см.*

**Введение.** В настоящее время традиционными методами селекции не всегда удается успешно решать поставленные перед ней задачи. В связи с этим все более активно используются другие направления исследований – физиологические, биохимические, генетические и др. Применение биотехнологии, основанной на технологии рекомбинантной ДНК и культуре in vitro открывает возможности для решения самых разнообразных задач, таких как: отбор на селективных средах генотипов, устойчивых к биотическим и абиотическим факторам среды, стабилизация гибридных геномов, преодоление прогамной и постгамной несовместимости при межвидовой гибридизации и так далее. Несмотря на имеющиеся ограничения самого подхода на уровне клеток и, зачастую, недостаток фундаментальных знаний, перечень положительных примеров селекции in vitro с каждым годом увеличивается. Так, в культуре in vitro получены растения регенеранты с различной степенью устойчивости к болезням у картофеля

(Хромова, 1987; Behnke M., 1979, 1980 и др.), томатов (Иванова, 1991), сахарного тростника, люцерны, клевера лугового (Плащев, Высоцкая, 1988; Мазин и др., 1989) [1]. После выявления линий кукурузы с высокой регенерационной способностью (Green C.E., Philips R.L., 1975) были получены устойчивые к гельминтоспориозу регенеранты, полученные в результате длительного культивирования каллусной ткани из незрелых зародышей в селективной среде с токсинами гриба [1].

Одним из путей ускорения процессов создания и отбора перспективных генотипов в селекции озимой пшеницы может стать микроклональное размножение. Предварительный подбор высокоморфогенных генотипов донорных растений в сочетании с подходящим эксплантом и условиями культивирования позволит успешно осуществлять направленное изменение физиолого-биохимических свойств растений. У злаковых культур возможности использования селективных питательных сред и других биотехнологических методов ограничены из-за низкого выхода каллусной ткани, способной к морфогенезу среди массы неорганизованно растущих клеток. До сих пор не выяснено окончательно, чем определяется возможность получения культивируемой ткани пшеницы, сохраняющей морфогенетический потенциал – генетическими особенностями исходного сорта, характером дифференцировки клеток или условиями выращивания каллусной ткани. Возможно, что существуют оптимальные сочетания всех трех факторов, что и обеспечивает успех работы [2].

Таким образом, чрезвычайно важным представляется изучение реакции культуры каллуса из различных типов эксплантов у разных сортов озимой пшеницы на регенерационную способность каллусной ткани с целью получения высокоморфогенных каллусов. Известно, что размер и форма исходного экспланта до определенных пределов не оказывают влияния на пролиферацию каллуса, хотя существует минимальный критический размер, уменьшив который нельзя вызвать рост экспланта. Так, экспланты из флоремы корней моркови массой всего 3,8 мг вполне жизнеспособны для активного роста каллуса, тогда как экспланты такой же массы клубней земляной груши не жизнеспособны. Это зависит, очевидно, от размеров и, следовательно, числа клеток у этих двух эксплантов [2]. Между сортами одного вида также наблюдаются сильные различия по способности к соматическому эмбриогенезу и органогенезу *in vitro*. Отсутствие положительной корреляции между каллусообразующей и регенерационной способностью позволяет считать, что это два отдельных процесса, имеющих различную генетическую основу [2].

В нашей работе приведены результаты исследований с одним типом эксплантов – незрелыми соцветиями. В результате выполнения исследований планировалось решить следующие задачи: 1. Выявить взаимосвязи между размером незрелых соцветий пшеницы и количеством полученных из них эксплантов; 2. Исследовать взаимосвязи длины колоса и среднего размера каллуса; 3. Установить оптимальную длину незрелого колоса, обеспечивающую максимальное количество хорошо развитых, высокоморфогенных каллусов; 4. Выявить сортовую специфику в данном процессе.

**Материалы и методы исследования.** Исследования проводились в 2015-2016 гг. в лаборатории генетики и биотехнологии РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию». Для получения эксплантов использовали вегетирующие растения озимой пшеницы. Изучалось 3 сорта озимой пшеницы (Fenda, T-62, Bramante) и один селекционный образец 0318, переданные из лаборатории озимой пшеницы. В качестве доноров брали побеги в фазу начало выхода в трубку на этапе формирования колосовых бугорков. Выбор экспланта в эту фазу был обусловлен тем, что в этот момент своего развития незрелые соцветия у озимой пшеницы состоят из меристематических клеток и в них протекает активный процесс органогенеза. Из литературных источников известно, что экспланты, полученные на данной стадии развития растения, способны в культуре *in vitro* давать начало эмбрионному каллусу [1].

Участки побегов длиной 3-5 см с находящимися внутри незрелыми колосьями стерилизовали в 4% хлорамине 5-6 мин. Затем проводили трехкратную промывку стерильной дистиллированной водой и стерильными инструментами. На автоклавированной бумаге вынимали колос из листовой обертки и разрезали на сегменты по колоску и раскладывали в пробирки на питательную среду. Для каждого генотипа по всем вариантам исследований закладывали по 100 пробирок.

Известно, что обязательным условием дедифференцировки клетки растения и превращения ее в каллусную является присутствие в среде, кроме элементов питания, гормональных факторов или имитаторов их действия [1]. В наших экспериментах мы культивировали каллусы на среде Линдсмайера-Скуга с добавлением гормона 2,4-Д 2 мг/л в темноте при температуре 28 °С. После 4 недель культивирования проводили описание и анализ полученных каллусных культур. Затем полученные каллусы переносили на среду Блейдза для регенерации растений и культивировали в световой при освещенности 3-4 тыс. люкс при температуре 20 °С.

**Результаты исследований.** Изучение процессов каллусообразования при выращивании эксплантов, полученных из незрелых соцветий озимой пшеницы, выявило различия в интенсивности развития каллусов. Каллусообразующая способность (интенсивность роста) у сортов и селекционного образца пшеницы была не одинакова. Большинство каллусов имело средний размер 3,6-4,9 мм. Основная масса каллусов была представлена рыхлой, мелкозернистой, светлой тканью, в которой локально выделялись более плотные эмбрионные участки. На среде для каллусообразования у многих эксплантов среди клеток каллуса возникали корнеподобные выросты (трихомы), образованные паренхимоподобными клетками. Такие каллусы относят к группе нерегениерирующих и морфогенез у них идет только по пути ризогенеза [2].

Установлено, что интенсивнее всего процессы каллусообразования среди изученных образцов протекали у сорта озимой пшеницы Fenda. Средний размер каллуса у данного сорта составлял 4,9 мм, в то время как у сорта Bramante и сортообразца 0318 размеры каллуса были приблизительно на одном уровне – 4,2 мм и 4,3 мм соответственно (таблица). Минимальные размеры каллуса отмечены у сорта T-62 – 3,6 мм. Однако следует отметить, что при изучении раз-

маха варьирования данного признака установлено, что между изучаемым материалом нет каких-либо существенных различий.

**Таблица – Размер каллуса и длина колоса у незрелых соцветий озимой пшеницы в культуре in vitro**

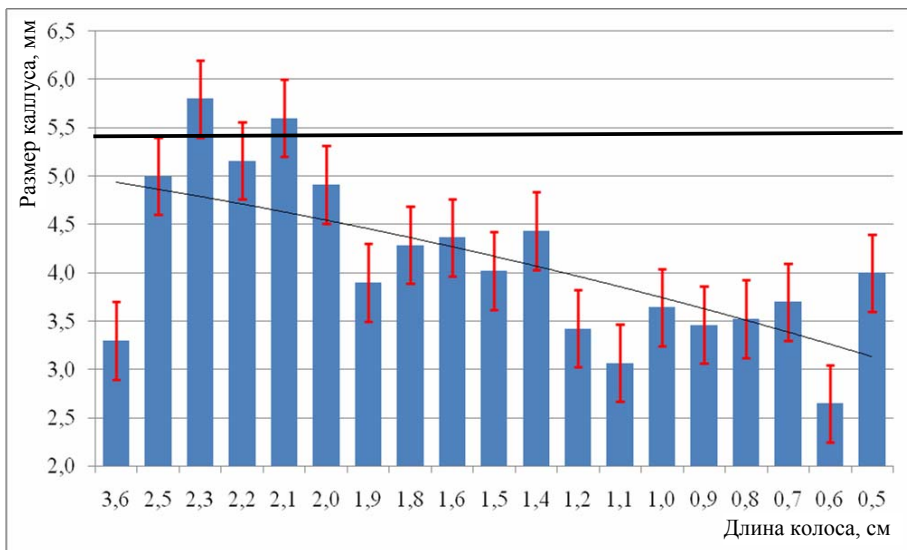
Показатель	T-62	Fenda	Bramante	0318
Размер каллуса, мм	$\frac{3,6}{1,9-5,8}$	$\frac{4,9}{3,5-6,5}$	$\frac{4,2}{3,1-5,6}$	$\frac{4,3}{2,9-5,9}$
Количество эксплантов в среднем, шт.	$\frac{13,8}{5-21}$	$\frac{12,3}{10-14}$	$\frac{13,3}{9-17}$	$\frac{17,6}{11-23}$
Длина колоса, см	$\frac{1,7}{0,6-3,6}$	$\frac{1,6}{1,0-2,2}$	$\frac{1,6}{0,5-2,5}$	$\frac{1,4}{0,7-2,2}$

Длина колоса, взятого для черенкования, у сортов озимой пшеницы Fenda и Bramante в среднем составила 1,6 см, в то время как у сорта T-62 – 1,7 см (таблица). Наименьший размер колоса в среднем был у сортообразца 0318 – 1,4 см. Однако именно у данного сортообразца количество эксплантов в среднем с одного колоса (17,6 шт.) было наибольшим. У прочих сортов количество полученных эксплантов с одного колоса было ниже: 13,8 штук (T-62), 13,3 шт. (Bramante) и 12,3 шт. (Fenda).

В результате изучения корреляционных взаимосвязей установлено, что между длиной колоса и размером каллуса имеется высокая положительная взаимосвязь. У сорта Fenda коэффициент корреляции между данными признаками составил  $r=0,78$ , у сорта Bramante  $r=0,65$ , у сорта T-62  $r=0,46$  и у сортообразца 0318  $r=0,62$ .

Если в селекционной работе основной выходной продукцией является сорт, то в биотехнологии – регенеранты, поэтому важным моментом является выявление оптимального размера незрелого колоса, обеспечивающего стабильное получение максимального количества хорошо развитых, высокоморфогенных каллусов. Для установления достоверности различий между изучаемыми вариантами нами были рассчитаны размеры доверительного интервала, а результаты исследований отображены в виде графика (рисунок).

У изученных объектов размер каллуса варьировал в интервале 1,4-5,9 мм. Наиболее высокие средние значения данного показателя были у сорта Fenda – 4,9 мм, при варьировании в интервале 3,5-5,8 мм. Максимальная величина каллуса (5,8 мм) была получена в варианте с длиной незрелого колоса 2,2 см. Расчет доверительных интервалов показал, что еще в трех вариантах размер каллуса недостоверно уступал лучшему варианту. В варианте с длиной колоса 2,0 см размер каллуса составил 5,3 мм, а в варианте с длиной колоса 1,8 см – 5,4 мм. Верхняя граница доверительного интервала в варианте с длиной колоса 1,5 см совпала с нижней границей доверительного интервала лучшего варианта, что также дало основание отнести этот вариант в группу вариантов, обеспечивающих высокое каллусообразование.



**Рисунок – Взаимосвязь размера каллуса и длины колоса у озимой пшеницы**

У сорта озимой пшеницы Bramante размер каллуса в среднем составил 4,2 мм, при варьировании данного признака в интервале 1,4-5,6 мм. Максимально высокие значения интенсивности процесса каллусообразования были в варианте с длиной колоса 2,1 см. Увеличение длины колоса до 2,5 см способствовало снижению размера каллуса, но недостоверно, в то время как во всех прочих вариантах размеры каллуса были существенно ниже в сравнении с лучшим вариантом.

Из изученного спектра сортов в среднем минимальный размер каллуса был у сорта Т-62 – 3,6 см, однако следует отметить, что в лучшем варианте размер каллуса был на уровне прочих сортов и составил 5,8 мм. У данного сорта увеличение длины колоса способствовало достоверному снижению размера каллуса до 4,7 мм в варианте с длиной колоса 2,5 мм и до 3,3 мм в варианте с длиной колоса 3,6 см. В трех вариантах размер каллуса был недостоверно ниже, чем в лучшем варианте. Так, в варианте с длиной колоса 1,6 см размер каллуса составил 5,2 мм, а в прочих двух вариантах 5,1 мм (2,0 см) и 4,8 мм (2,2 мм).

У селекционного сортообразца 0318 максимальный размер каллуса был отмечен в варианте с длиной колоса 1,9 см – 5,9 мм. Дальнейшее увеличение длины колоса привело к достоверному снижению размера каллуса до 4,3 мм (длина колоса 2,0 см) и 4,7 мм (длина колоса 2,2 см) соответственно. На уровне лучшего варианта оказались еще два варианта с длиной колоса 1,7 см (5,7 мм) и 1,3 см (5,4 мм).

В результате изучения трех сортов и одного селекционного образца озимой пшеницы не выявлено достоверных сортовых различий по интенсивности процессов каллусообразования, поскольку:

средние размеры каллуса у изученных объектов существенно не отличались – 3,6 мм (Т-62) – 4,9 мм (Fenda);

максимальная величина каллуса у всех изученных объектов была приблизительно на одном уровне – 5,6 мм (Bramante), 5,8 мм (Fenda и Т-62), 5,9 мм (0318);

по размаху варьирования признака «размер каллуса» между изучаемым материалом также нет каких-либо существенных различий.

Поскольку размер каллуса у озимой пшеницы обусловлен не сортовыми различиями, а генетическими особенностями культуры, на основании изученного материала нами были рассчитаны размеры доверительного интервала в среднем для озимой пшеницы. Установлено, что оптимальной длиной незрелого колоса, обеспечивающей максимальное и стабильное количество хорошо развитых, высокоморфогенных каллусов, является диапазон 2,1-2,5 см (рисунок).

### Выводы

1. Размер каллуса у озимой пшеницы обусловлен не сортовыми различиями, а генетическими особенностями культуры, поскольку нет различий как между максимальной величиной каллуса (5,6-5,9 мм), так и по размаху варьирования данного признака внутри каждого изученного образца озимой пшеницы.

2. Между длиной колоса и размером каллуса существует высоко положительная взаимосвязь. У сорта Fenda коэффициент корреляции между данными признаками составил  $r=0,78$ , у сорта Bramante  $r=0,65$ , у сорта Т-62  $r=0,46$  и у сортаобразца 0318  $r=0,62$ .

3. Оптимальной длиной незрелого колоса, обеспечивающей максимальное и стабильное количество хорошо развитых, высокоморфогенных каллусов, является диапазон 2,1-2,5 см.

### Литература

1. Мепаришвили, Г.В. Использование соматклональной изменчивости в создании форм пшеницы, устойчивых к фузариозу / Г.В. Мепаришвили: дис. ... канд. биол. наук. – Москва, 2003. – С. 22-33.

2. Тимофеева, О.А. Культура клеток и тканей растений: учебное пособие // О.А. Тимофеева, М.Н. Румянцева. – Казань, 2012. – С. 91.

### **STUDY OF CALLUS GENESIS IN IN VITRO CULTURE OF IMMATURE INFLORESCENCES OF WINTER WHEAT**

**E.N. Kulinkovich, S.N. Kulinkovich, N.L. Yermolenko, E.F. Barchevskaya**

*The study of callus genesis in in vitro culture of immature inflorescences of winter wheat was conducted. It was established that there was a highly significant positive interrelationship between ear size and callus size:  $r=0.46$  (T-62) –  $r=0.78$  (Fenda). There was a varietal response to ear length for the obtaining of regenerants with the maximum callus size. The optimum size of an immature ear providing maximum and stable number of well-developed, highly morphogenic calli was in the range of 1.9-2.3 cm.*