

УДК 581.143:6+633.11

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

М. Н. ПРОХОРОВ, Л. К. ЧЕРКОВА, Б. В. ФИЛИН-КОЛДАКОВ

ВЫРАЩИВАНИЕ ТКАНИ ПШЕНИЦЫ НА КУЛЬТУРЕ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЦЕЛОСТНОГО РАСТЕНИЯ

(Представлено академиком М. Х. Чайлазяном 22 VIII 1973)

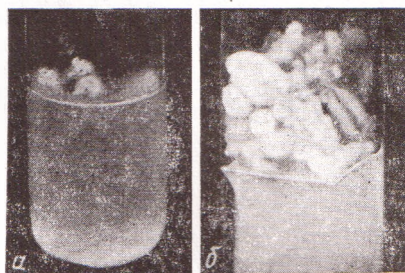
Метод культивирования растительных тканей *in vitro* в настоящее время широко применяется для решения важнейших задач биологии (^{1, 2}). Однако исследования по культивированию пшеницы пока еще очень малочисленны. Первые публикации о получении каллусной и суспендиальной культур пшеницы появились в 1968 г. (³⁻⁵). Затем были опубликованы сообщения об успешных попытках реконструкции целостных растений из полученных тканей (^{6, 7}). Проведенный при этом хромосомный анализ показал отклонение числа хромосом от нормы в каллусных клетках и возвращение к норме в восстановленных растениях. Авторы исследовали также действие 2,4-Д, ИУК и кинетина на индукцию каллуса, его рост и редифференциацию органов. Из указанных и последующих сообщений (⁸⁻¹⁰) следует, что данные о воздействии ростовых стимуляторов на ткани пшеницы и рекомендации по методике культивирования достаточно противоречивы. Согласно существует лишь в вопросе о необходимости использования 2,4-Д в качестве стимулятора каллусообразования. Из этих же работ следует, что хорошо растущие каллусы удается получить только у небольшой части эксплантатов, а случаи успешного восстановления целостных растений единичны.

В 1971 г. нами начата работа, связанная с получением каллуса пшеницы. Для получения каллусной ткани первоначально использовались почки, выделенные из стерилизованных обычным способом (¹¹) семян, проращиваемых стерильно; зародыши, выделенные с каплей эндосперма из семян в стадии молочной спелости; зародыши зрелых семян. Испытывался ряд сортов, видов и родов пшениц, а также ржано-пшеничных амфидиплоидов и диких форм (Аврора, Безостая-1, Степная-135, Кубанка-3, Кюу, Капли, линии *Tr. aestivum* v. *Lutescens* Э-521 и Э-526, Гексаплоид «Грузия» К-050560, Тритикале АД 5/1 и АД-20, *Tr. Timopheevi*, *Aegilops*). Питательные среды, используемые для получения каллуса и при дальнейших пересадках, включали во всех случаях минеральные соли и витамины по Мурасиге и Скугу (¹²), а также 2% сахарозы (основной состав). Эти среды различались ростовыми веществами (ИУК, кинетин или аденин — не более 1 мг/л) в сочетании с 2,4-Д (2–6 мг/л) и другими добавками (дрожжевой экстракт, гидролизированный казеин, лиофилизированный эндосперм из семян пшеницы и автоклавированный эндосперм из семян кукурузы, взятых в молочной спелости).

После переноса эксплантатов на питательную среду каллусообразование начиналось через несколько дней в среднем в 20% случаев. Внутри каждого варианта отмечалось наличие каллусов (рис. 1а), достигших за 1 мес. различной величины (табл. 1.). Последующие пересадки приводили, как правило, к замедлению и остановке роста каллуса. Замедление наблюдали чаще всего после первой пересадки, а остановку в росте после второй или третьей пересадок. Этой остановки не было лишь у больших каллусов, которые хорошо росли в течение 3–5 мес. При этом, как и в работах (^{6, 7}), не обнаружили существенной разницы между вариантами,

отличавшимися содержанием в среде ростовых веществ и источников органического питания (кроме сахарозы). Часть крупных каллусов сортов Аврора и Кубанка-3 была использована для получения суспендиальной культуры. Размножение клеток в жидкой питательной среде Гамборга ⁽¹⁰⁾ оказалось удовлетворительным. В связи со слабым ростом каллусной ткани пшеницы на агаризованной среде в дальнейшей работе возникла

Рис. 1. Образование каллусной ткани изолированными зародышами (а) и зародышем целой зерновки (б) на полной питательной среде, пересадка на которую проведена через 1 мес. после закладки



необходимость модифицировать методику получения каллуса и его культивирования. Согласно этому в качестве материала для каллусообразования используются зародыши, взятые с частью эндосперма в стадии молочно-восковой спелости, и зрелые семена пшеницы. Стерильные эксплантаты помещаются на среду, содержащую только минеральные соли по Мурасиге и Скугу, 2% сахарозы и 2,4-Д в качестве дедифференциатора. На такой среде у эксплантатов в 80—90% случаев образуется хорошо растущий каллус, причем оптимальная концентрация 2,4-Д, определяемая по интенсивности каллусообразования, для отдельных сортов варьирует от 10 (сорт Кубанка-3) до 20 (сорт Капли) мг/л. Различным для каждого сорта оказывается и оптимальный срок пребывания на такой среде, определяемый по замедлению каллусообразования. Этот срок варьирует от

Таблица 1

Оценка величины каллусов

Сорт	Общее число каллусов	В том числе			Сорт	Общее число каллусов	В том числе		
		мелких	средних	крупных			мелких	средних	крупных
Бозостая-1	32	18	8	6	Тр. Timopheevi	50	35	10	5
Аврора	46	25	9	12	Тритикале АД-20	8	2	3	3
Коу	7	7	0	0	Aegilops	7	5	2	0

10 до 30 суток, после чего эксплантаты переносятся на аналогичную среду, но обогащенную уже витаминами по Мурасиге и Скугу и гидролизатом казеина (200 мг/л). Пересадка вызывает увеличение прироста каллуса. Через некоторое время рост каллуса снова замедляется. Тогда ткани переносят на аналогичные среды, в которых 2,4-Д заменяется кинетином и ИУК в концентрации от 0,5 до 3 мг/л (вариации в соотношении этих веществ не дали достоверных различий по росту и дифференцировке каллуса). Так же среды используются и при последующих ежемесячных пересадках. Зерновка отделяется от каллуса только после третьей пересадки, когда ткань расчленяется из-за большого объема (рис. 1б). В некоторых случаях на среде с кинетином и ИУК в таких тканях при культивировании на свету наблюдалось появление стеблевых почек, образующих затем побеги и корешки. Их помещали на среду Уайта ⁽¹¹⁾, содержащую ИУК (2 мг/л), кинетин (0,5 мг/л), сахарозу (0,5%) и гидролизат

казеина (500 мг/л). Сформировавшиеся молодые растения пересаживали в грунт.

Из каллусной ткани Тритикале АД-20, полученной в 1971 г., по описанной основной методике были восстановлены 3 растения. Подсчет хромосом в точках роста корешков показал, что 2 растения являются 41-хромосомными, а третье растение (рис. 2а) 42-хромосомным. Внешних различий между растениями в период кущения не было. К сожалению, нам не удалось обеспечить необходимую для Тритикале длительность ярови-

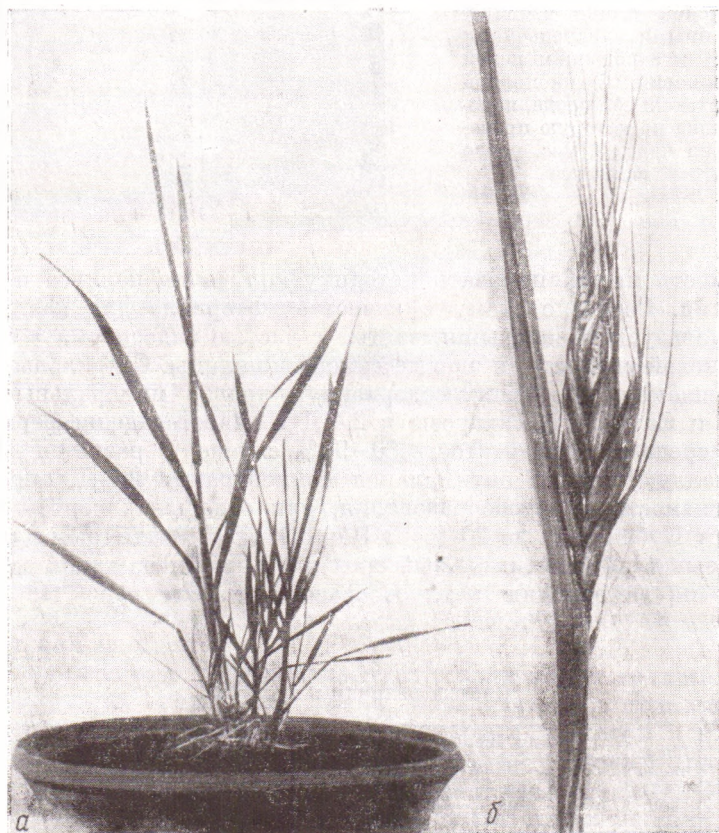


Рис. 2. Восстановленные из каллусной ткани 42-хромосомное растение (а) и колос (б)

зации (20 суток вместо 60). В связи с этим прохождение последующих фаз развития оказалось растянутым, у растений появились признаки вирусных заболеваний. Вскоре 41-хромосомные растения погибли. У 42-хромосомного растения появился колос (рис. 2б). Он остался недоразвитым и после цветения дал лишь зачатки семян.

Таким образом, проведенная работа показала возможность получения каллусной ткани из семян указанных форм и восстановления из такой ткани целостных растений. Дальнейшее изучение условий культивирования тканей пшеницы и их дифференцировки позволит применить этот метод для решения ряда практических задач.

Пользуемся случаем выразить благодарность проф. Р. Г. Бутенко за помощь в работе и полезное обсуждение.

Северо-Кавказский научно-исследовательский
институт фитопатологии
Краснодар

Поступило
15 VIII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Культура изолированных органов, тканей и клеток растений, Тр. I Всесоюзной конфер., М., 1970. ² Les cultures de tissus de plantes, Colloques Internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique, 193, Paris, 1971. ³ R. P. Warick, W. H. Fuchs, Naturwiss., 55, 10, 448 (1968). ⁴ E. J. Trione, L. E. Jones, R. J. Metzger, Am. J. Bot., 55, 5, 529 (1968). ⁵ O. L. Gamborg, C. D. La Rue, Nature, 220, 5167, 604 (1968). ⁶ T. Adashi, Y. Katayama, Bull. Fac. Agric. Univ. Miyazaki, 16, 1, 77 (1969). ⁷ T. Shimada, T. Sasakuma, K. Tsunewaki, Canad. J. Gen. and Cytol., 11, 2, 294 (1969). ⁸ A. F. Mascarenhas, R. R. Hendre et al., Indian J. Exp. Biol., 7, 1, 65 (1969). ⁹ R. Caramiello, J. Bot. Ital., 104, 1, 49 (1970). ¹⁰ O. L. Gamborg, Plant. Physiol., 45, 4, 372 (1970). ¹¹ Р. Т. Бутенко, Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений, М., 1964. ¹² T. Murashige, F. Skoog, Physiol. Plantarum, 15, 473 (1962).