

малины, черной смородины, яблони живые вегетативные и генеративные апексы меристемы и их кроющие листья окрашены красителем Brilliant blue R в сине-голубые тона, красителем Reactiv blue в зеленовато-голубые тона.

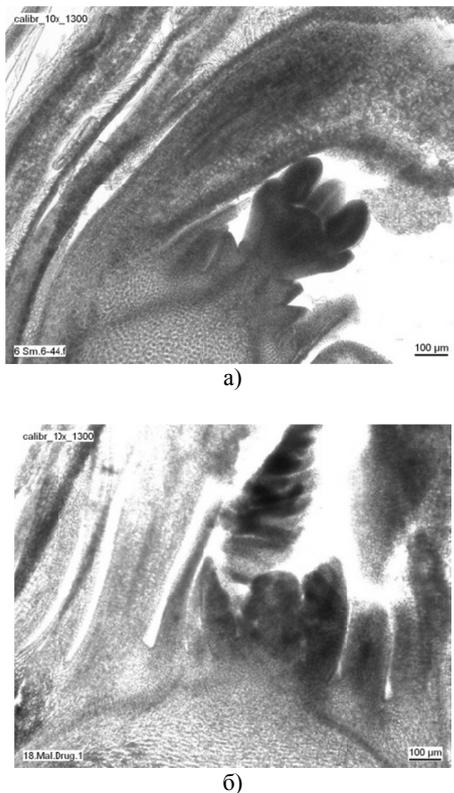


Рис. 3. Оценка жизнеспособности замороженных в жидком азоте почек чёрной смородины (а) и малины (б): окрашивание реактивом Brilliant blue R живых тканей после замораживания в жидком азоте

В результате проведенных исследований было выявлено, что окрашивание размороженных тканей может служить в качестве экспресс оценки всех проводимых экспериментов по криоконсервации почек в жидком азоте. Краси-

тели – ТТХ, Reactiv blue и Brilliant blue R. – эффективно окрашивают в различные цвета живые и погибшие ткани почек плодовых и ягодных культур, прошедших криоконсервацию в жидком азоте.

1. Грищенко В.И., Копейка Е.Ф., Петрушко М.П. Проблемы криобиологии и сохранение генетических ресурсов // Цитология. -2004.- Т. 46.- № 9.- С. 784-785.

2. Вержук В.Г., Филипенко Г.И., Тихонова Н.Г., Жестков А.С., Лупышева Ю.В. и др. Разработка методов криосохранения генетических ресурсов растений плодовых и ягодных культур // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – Санкт-Петербург. - 2009. - Т. 106. - С. 353-357.

3. Иванов В.Б. Активные красители в биологии. - М.: Наука, 1982. – 150 с.

4. Ivanov V.B. Reactive Dyes in Biology // Soviet Sci. Rev. Supl. Ser. Physicochemical Biol. 1987. - Harvard Acad. Publ.- Vol. 7.-С.65-69.

5. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г. и др. Справочник по ботанической микротехнике. – М.: Изд. Моск. Университета, 2004. – 312 с.

6. Towili L.E. Mazur P. Studies on Reduction of 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride as a Viability Assay for Plant Tissue Cultures // Can. J. Bot. 1975. - V. 53. - № 11. - P. 1097.

7. Verleysen H., Samyn G., Van Bockstaele E., Dehergh P. Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation // Plant Cell Tissue and Organ Cult. [ЭИ]. – 2004. – 77. №1. – С. 11-21.

Криоконсервация лаудан кейін өсімдік ұлпаларының өміршеңдігін тез анықтау үшін әртүрлі бояулардың көмегімен гистологиялық зерттеулер жүргізілді. Сұйық азотта криосақталған жеміс-жидек өсімдіктері бүршіктерінің тірі және өлі ұлпаларын айыруға бұл әдістің мүмкін екендігі анықталды.

Held histological studies to determine the different colors for the rapid viability diagnosis after cryopreservation. Revealed fundamental possibility of applying the method to detect living and dead kidney tissues of fruit and berry crops of cryopreservation in liquid nitrogen.

УДК 575.224.2:631.52:633.111

Н.Ж. Омирбекова

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ХИМИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА В СЕЛЕКЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Селекция на скороспелость, адаптивность к местным природно-климатическим факторам, устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, качество продукции зерновых культур являются приоритетными направлениями исследований, которые учитывают потребности и спрос производства.

В основе селекционного улучшения той или

иной культуры лежит исходное генетическое разнообразие и методы генетической реконструкции улучшаемых полезных признаков. В условиях интенсивного ведения сельского хозяйства с широким использованием в производстве монокультуры (генетически выровненных сортов) постепенно сокращаются масштабы генетической изменчивости сортов, что влечет за собой опасение вспышек эпифитотий, снижение про-

дуктивности [1]. В основе современных подходов в управлении генотипической изменчивостью в селекции растений лежат принципиально новые взгляды на роль мутаций и рекомбинаций, на генетическую природу структурной организации и проявление количественных признаков. Растение рассматривают как интегрированную систему генетических детерминантов ядра и цитоплазмы, учитывают роль абиотических и биотических условий внешней среды, выступающих в качестве факторов отбора и индукторов мутационной и рекомбинационной изменчивости [2]. Применение метода индуцированного мутагенеза позволяет, используя отбор, выполнять задачи, которые не могут быть решены другими селекционными методами. Важным моментом в мутационной селекции является изучение генетической природы мутаций – мутации морфологических признаков или признаках количественных, определяющих продуктивность и качество урожая. Важно знать, с чем связано появление мутации – с точковыми мутациями или перестройками хромосом (незначительные дупликации, нехватки). От решения этого вопроса зависит характер возникшего изменения – рецессивная эта мутация или доминантная. Поэтому проведение генетического анализа количественных признаков при мутагенезе важно, так как появляется возможность значительного повышения эффективности использования мутантных форм в селекции. Вместе с прямым использованием мутантов в селекции используется также сочетание экспериментального мутагенеза с гибридизацией. Использование этих методов, сочетающих комбинационную и мутационную изменчивость, позволяет значительно усилить вариабельность признаков, совместить в одном генотипе мутантные гены с генами другого сорта, изменить проявление действия мутантных генов в новой генотипической среде, получить рекомбинанты с новыми признаками.

В последние годы на кафедре молекулярной биологии и генетики КазНУ имени аль-Фараби развивается направление по использованию индуцированного мутагенеза с целью расширения спектра изменчивости мягкой пшеницы. Как показали результаты исследований, поверхностно-активные вещества (ПАВ – Тритон X-305, Тритон X-100, Твин 80, Твин 65, Твин 20) в концентрации 1% индуцируют хромосомные aberrации различных типов, цитоплазматические изменения в репродуктивных и соматических клетках пшеницы. Они влияют на физиологические и биохимические процессы в клетке, изменяют морфологические параметры растений, вызывают системные мутации в популяции. Это дает возможность применять слабые

мутагены при получении исходного материала для практической селекции и позволяет изучить генетическую природу видимых мутаций.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования служили семена мягкой пшеницы трех сортов местной селекции. Семена перед посевом обрабатывали водными растворами ПАВ в концентрации 1% в течение 5 часов при $t\ 25^{\circ}\text{C}$. После обработки семена промывали проточной водопроводной водой в течение 30 мин. Затем семена высевали в полевых условиях в рядки шириной 1 м по 20 семян. Контролем служили необработанные семена. В поколениях M_2 - M_3 проводили посев по семьям ($n = 100$). При этом в формировании семьи последующего поколения участвовали отдельные растения семьи предыдущего поколения. Процент измененных растений по разным признакам учитывали от общего количества высеянных растений.

Полевые оценки и структурный анализ растений проводили по стандартным методикам, применяемым для характеристики селекционного материала [3].

Результаты исследований и обсуждение

В исследованиях, начатых с 2000 года, изучалось влияние ПАВ на сорта мягкой пшеницы с целью получения мутантных форм по различным признакам. Показано, что 1% ПАВ существенно повышает частоту появления морфозов и видимых мутаций. Среди популяции «чувствительных» особей были отмечены модифицирующие изменения в первой генерации. Это растения с измененной морфологией вегетативных органов, искривленными остями, нарушением рядности в главном колосе, полустерильные, карликовые формы. Наряду с морфозами в первом поколении были выявлены доминантные и рецессивные мутации, т.е. макромутации и микромутации (рис. 1).

Высокая частота доминантных мутаций у мягкой пшеницы в результате воздействия ПАВ, по-видимому, обеспечивается специфическими механизмами их действия и сортовыми особенностями.

Среди изученных сортов по частоте встречаемости семей с макро- и микромутациями выделили сорт «Шагала», «Женис» и «Казахстанская 3». В потомстве сорта «Шагала» были отобраны 11 линий, по сорту «Казахстанская 3» было отобрано также 11 линий: по форме зерна – крупное удлиненное зерно, по форме колоса.

В потомстве сорта «Шагала» были отобраны 11 линий, по сорту «Казахстанская 3» было отобрано также 11 линий: по форме зерна – крупное удлиненное зерно, по форме колоса – спельтоидной; по длине стебля – коротко-

стебельные и высокостебельные; по отсутствию остей – безостые формы; по длине колоса – удлиненный колос, по цвету стебля – антоциановая и фиолетовая окраска стебля. По сорту

«Женис» было отобрано 2 линии: с удлиненным крупным зерном и остистой формы и линия с крупным зерном остистой формы (исходный сорт «Женис» – безостый).



Безостая форма с удлиненным открытоцветущим колосом



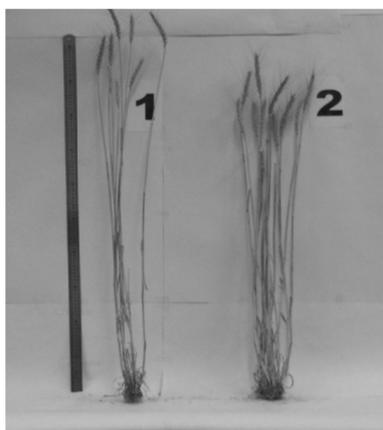
Антоциановая окраска стебля



Скверхедный тип колоса



Фиолетовая окраска стеблей и антоциановая окраска подколенных узлов



Безостая форма (контроль) и остистая, короткостебельная форма



Остистая форма (контроль) и безостая форма

Рис. 1. Мутантные формы мягкой пшеницы, полученные при действии ПАВ

Следует отметить, что линии несли несколько измененных признаков. Так, для растений со спельтоидным колосом было характерно отсутствие восковитости, растения с удлиненным колосом были безостой формы, высокостебельные растения были безостыми и имели узкие листья. Среди выявленных мутантных линий были формы с комплексом рецессивных признаков (удлиненный колос, удлиненное зерно и отсутствие остей) при действии Твин 65. Наряду с морфологическими изменениями были получены растения с изменением цвета стебля (антоциановая окраска стебля, антоциановая окраска листовой пазухи, антоциановая окраска подколенных узлов, фиолетовая окраска стебля, коленчатость стебля, опушение листовой пластинки, нарушение расположения листьев, восковидность стебля, листовой пластинки и др.). В необработанных ПАВ посевах

количество морфозов у растений составило $1,1 \pm 0,1\%$.

Появление мутаций в первой генерации объясняется тем, что в семени пшеницы есть 3-4 примордиальные детерминированные клетки, дающие начало колосьям. Эта особенность вместе со способностью растений гексаплоидной пшеницы выживать при наличии нехваток целых хромосом приводит к тому, что мутационные формы появляются в первой генерации.

Среди семей M_2 , выращенных на следующий год из семей с неизменными колосьями M_1 , не было обнаружено растений с измененными признаками, были отмечены фенотипы проявившиеся только в M_1 . В M_3 также не было отмечено фенотипической изменчивости. При пересеве отобранных линий M_1 измененные признаки были генетически детерминированы и наследовались

при переходе из поколения в поколение. Спектр полученных линий представлен в таблице 1.

Таким образом, при действии ПАВ на мягкую пшеницу были выявлены изменения с комплексом признаков. Наибольший размах генотипической изменчивости наблюдали по форме зерна, форме и длине колоса, длине стебля, отсутствию остей, цвету стебля. По частоте встречаемости семей с отклонениями признаков выделились сорта Шагала и Казахстанская 3. При пересеве отобранные линии в M_1 были генетически детерминированы и наследовались из поколения в поколение.

Значительный размах фенотипической изменчивости в зависимости от химического состава ПАВ наблюдали по признакам «число продуктивных стеблей», «число зерен в главном колосе», «масса зерна в главном колосе», «масса зерна с растения» по сравнению с контрольным опытом.

На основе комплексного использования цитологических, генетических, биохимических, анатомических и физиологических методов в результате многоэтапных лабораторных и полевых

исследований разработаны методические рекомендации при применении слабых мутагенов в селекции зерновых культур [4-8].

1-й этап

Определение оптимальной концентрации мутагенов:

- по выживаемости, %;
- по активности митотического индекса в меристематических клетках растительного организма, %.

2-й этап

Оценка уровня генотоксичности мутагена:

- по частоте хромосомных aberrаций в корневой зародышевой меристеме либо апикальной меристеме растений (анафазный либо метафазный метод);
- по частоте хромосомных нарушений в микроспороцитах растительного организма (диакinesis, профазы I, метафаза I, анафаза I, метафаза II, анафаза II, тетрада либо анафазно-тетрадным способом).

Таблица 1

Спектр измененных признаков, полученных при действии ПАВ на мягкую пшеницу в первой генерации

Мутантные линии	Мутаген	Признаки
Первая генерация		
Сорт Шагала		
Линия 1	Тритон X-305	Безостая форма, удлинненное зерно, опушенный лист
Линия 2	Тритон X-305	Короткостебельная форма, удлинненное зерно,
Линия 3	Тритон X-100	Растение с крупным зерном, антоциановая окраска листовой пазухи
Линия 4	Тритон X-100	Безостая форма с крупным зерном, антоциановая окраска стебля
Линия 5	Твин 85	Удлинненный колос, открытоцветущее растение, антоциановая окраска стебля, опушенный лист
Линия 6	Твин 85	Безостая, высокостебельная форма с узкими листьями
Линия 7	Твин 65	Безостая форма, фиолетовая окраска стебля
Линия 8	Твин 65	Безостая форма, удлинненный колос, антоциановая окраска подколennых узлов
Линия 9	Твин 65	Безостая, короткостебельная форма, антоциановая окраска листовой пазухи
Линия 10	Твин 65	Скверхедный колос, опушенный лист, восковидный стебель
Линия 11	Твин 20	Скороспелая форма, крупное зерно
Сорт Женне		
Линия 12	Тритон X-305	Остистая форма, удлинненное крупное зерно, опушенный лист
Линия 13	Тритон X-305	Остистая форма с удлинненным зерном, опушенный лист
Сорт Казахстанская 3		
Линия 14	Тритон X-305	Плотный короткий колос, антоциановая окраска листовой пазухи
Линия 15	Тритон X-305	Короткостебельная форма, антоциановая окраска листовой пазухи
Линия 16	Тритон X-100	Длинный колос, крупное зерно
Линия 17	Тритон X-100	Высокостебельная форма с удлинненным колосом
Линия 18	Твин 85	Скверхедный колос, короткостебельная форма
Линия 19	Твин 85	Безостая форма, удлинненный колос, открытоцветущее растение
Линия 20	Твин 65	Безостая, безвосковая форма с антоциановым подстеблевым узлом и удлинненным зерном
Линия 21	Твин 65	Спельтоидный колос, удлинненная форма колоса
Линия 22	Твин 65	Высокостебельная форма, удлинненное зерно,
Линия 23	Твин 65	Длинный колос, крупное зерно
Линия 24	Твин 20	Скороспелая форма, удлинненный колос

3-й этап

Зависимость мутагенного эффекта от концентрации мутагена:

- по частоте хромосомных aberrаций в корневой зародышевой меристеме либо апикальной меристеме растений (анафазный либо метафазный метод);

- по частоте хромосомных нарушений в микроспороцитах растительного организма (диакинез, профазы I, метафаза I, анафаза I, метафаза II, анафаза II, тетрада либо анафазно-тетрадным способом).

4-й этап

Оценка критериев чувствительности растительного организма к мутагену:

- по всхожести;

- по выживаемости;

- по количеству поврежденных растений в первой генерации;

- по количеству измененных растений в первой генерации.

5-й этап

Оценка фенотипической и генотипической изменчивости растительного организма:

- по морфологическим параметрам (высоте растений, общей и продуктивной кустистости, длине и плотности колоса, количеству и массе зерен в главном колосе, а также общей массе зерен с растения);

- по частоте и спектру морфологических, физиологических мутаций в первой, во-второй и третьей генерациях (микромутации и макромутации).

6-й этап

Изучение генетической природы мутантных форм:

- по анализу расщепления в потомстве измененных растений, выявленных в первом либо во втором поколении;

- по характеру наследования измененных признаков в результате гибридизации (анализирующее и реципрокное скрещивание);

- по частоте нарушений в микроспорогенезе мутантных линий;

- морфологии хромосом в меристематических клетках мутантных линий.

7-й этап

Изучение биохимических показателей у мутантных линий:

- по содержанию белка, мг/г;

- по активности ключевых ферментов азотного и энергетического метаболизма (ГДГ, МДГ-ГОАТ, АДГ и МДГ);

- по электрофоретическому анализу спектров запасных белков.

8-й этап

Оценка мутантных линий на засухоустойчивость, солеустойчивость и на иммунность к заболеваниям:

- по содержанию пролина в семенах мутантных линий;

- по выживаемости мутантных линий в условиях засоления;

- по высоте и длине корневой системы, см;

- по биомассе надземной и корневой системы, г;

- по оценке испытания исходных сортов и мутантных линий на иммунность на инфекционном фоне, балл / %.

9-й этап

Использование мутантных линий в селекции зерновых культур:

- в качестве нового сорта;

- в качестве донора при гибридизации;

- в качестве линий для частной селекции.

На рисунке 2 приведена схема методических рекомендаций по применению новых мутагенов для селекции зерновых культур.

Мутационная селекция продолжает развиваться, выявляются новые источники мутагенной активности, все это свидетельствует о высокой эффективности метода экспериментального мутагенеза и об актуальности исследований, направленных на расширение диапазона генетической изменчивости, создание для селекции нового исходного материала с уникальными признаками и свойствами. Применение мутационно-рекомбинационных методов имеет значение для повышения продовольственной безопасности нашей республики, которая обеспечивается существенным повышением адаптивности возделываемых сельскохозяйственных культур, особенно пшеницы. Первостепенную роль в решении этой задачи играют генетико-селекционные исследования. Прогресс таких исследований во многом определяется введением новых перспективных методов и технологий. В этом плане особую перспективу представляет применение методов воздействия на геном важнейших продовольственных культур, что позволит вскрыть новые генетические резервы изучаемой культуры и получить ценные генотипы мягкой пшеницы, отличающиеся хозяйственно-значимыми признаками.

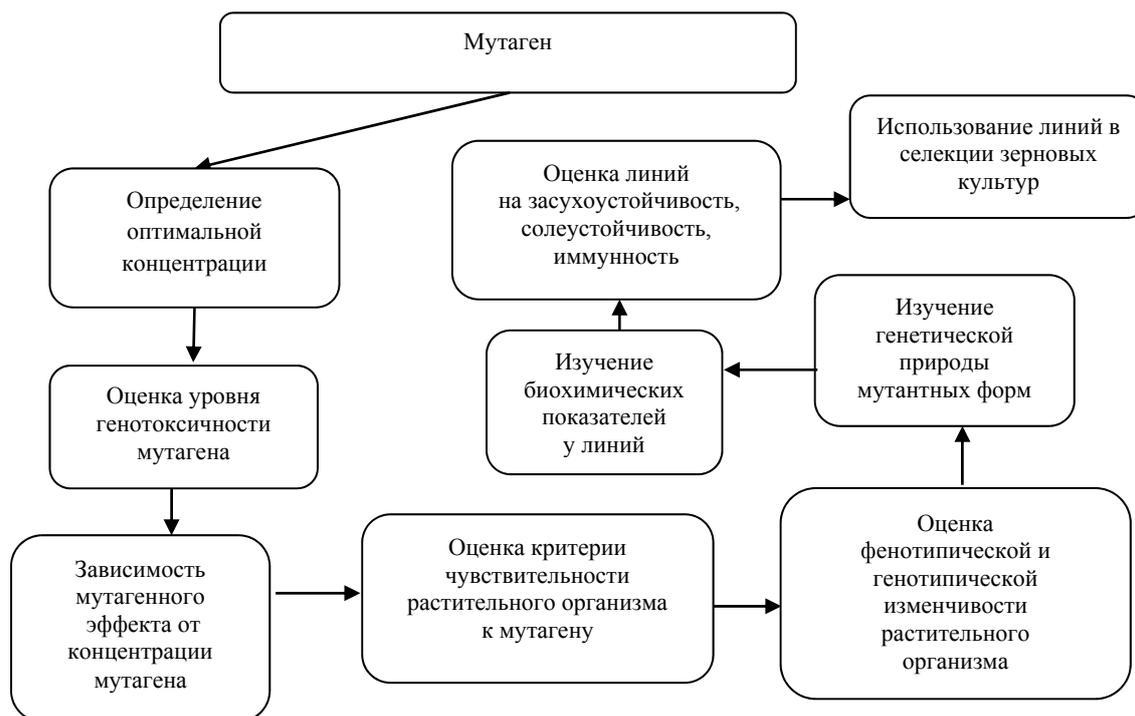


Рис. 2. Методические рекомендации по применению новых мутагенов для селекции зерновых культур

1. Добровольский Д.И., Филипченко Ю.А. Итоги исследований генетических коллекций // Вестник СИММИТ-ИКАРДА региональной сети по улучшению озимой пшеницы Центральной Азии и Казахстана. – 2009. – № 2. – С. 7-13.

2. Жученко А.А. Роль генетической инженерии в адаптивной системе селекции растений // Сельскохозяйственная биология. – 2003. – №1. – С. 3–33.

3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1985. – 351 с.

4. Омирбекова Н.Ж. Влияние поверхностно-активных веществ на мейоз мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Труды Межд. конф. «Фундаментальные и прикладные аспекты генетики». – Минск, 2008. – С. 136–140.

5. Омирбекова Н.Ж., Санкайбаева А., Даулетбаева С., Жунусбаева Ж., Чунетова Ж., Шулембаева К.К. Влияние поверхностно-активных веществ на митоз мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Исследования, результаты. – 2009. – № 4. – С. 98–102.

6. Омирбекова Н.Ж. Изучение активности ключевых ферментов азотного обмена у мутантных генотипов мягкой пшеницы // Материалы Межд. конференции «Состояние и перспективы развития биохимии в Таджикистане». – Душанбе. – 2009. – С. 129–134.

7. Омирбекова Н.Ж. Особенности энергетического метаболизма у мутантов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), индуцированных с помощью $CdCl_2$ // Исследования, результаты. – 2009. – № 4. – С. 102–106.

8. Омирбекова Н.Ж. Влияние поверхностно-активных веществ на биохимические и морфометрические показатели мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. – 2010. – №3. – С. 64–69.

Мақалада жұмсақ бидай селекциясында химиялық мутагенді қолданудағы жетістіктер қарастырылады. Әлсіз мутагендерге жоғары-белсенді заттарды қолдану кезіндегі тәжірибеде алынған нәтижелер келтірілген және дәнді дақылдар селекциясында жаңа мутагендерді тәжірибеде қолдану үшін әдістемелік ұсыныстар берілген.

The article considers the prospects of the application of chemical mutagenesis in wheat breeding. The experimental data on the use of weak mutagens – surface-active substances are showed and methodological guidelines for the practical application of the new mutagens in the crop breeding.