

УДК 575.633.11.

К.К. Шулембаева, Ж.Ж. Чунетова, С.Б. Даулетбаева, А.А. Токубаева

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

### Индукцированный мутагенез, отдаленная и внутривидовая гибридизация в селекции мягкой пшеницы

**Аннотация.** Повышение урожайности пшеницы путем улучшения ее генотипа – одна из актуальных проблем сельского хозяйства. В настоящее время с использованием традиционных методов селекционно-генетических исследований, таких, как беккроссная селекция, отдаленная гибридизация, экспериментальный мутагенез, повышается результативность получения генетически измененных и улучшенных форм пшеницы. Высокое содержание моно фосфора ( $H_3PO_4$  5%) приводит к слабому мутагенному эффекту, а его 0,1% концентрация способствует развитию биомассы растений. Уровень фертильности гибридов мягкой пшеницы с дикими видами (*t. timopheevii*, *t. dicoccum* и *t. kiharae*) зависит от направления скрещиваний и генотипа сорта. Дикие виды в качестве материнского компонента благоприятно влияют на высокий процент завязывания зерен. Геном сорта «Надежда» совместим с геномами диких видов.

**Ключевые слова:** Мутагенез, Изогенные линии, замещенные линии пшеницы, селекция, отдаленная гибридизация, сорт.

#### Введение

Использование индуцированного мутагенеза показало высокую эффективность по получению форм с измененной высотой растений: карликов, низкорослых и высокорослых мутантов [1]. Известно, что при оптимальном сочетании мутагена, его доз и исходного сорта мягкой озимой пшеницы, было выделено значительное количество мутантов, устойчивых к бурой ржавчине до 12% по отношению ко всем выделенным мутантам. Эти мутантные формы, устойчивые к двум или нескольким фитопатогенам. На этом фоне обнаружены другие ценные мутантные признаки: высокое адаптивное свойство, высокий урожай, высокое хлебопекарное качество, устойчивость к полеганию [2].

Одним из основных методов создания новых сортов обладающими хозяйственно-ценными признаками, и в первую очередь, в направлении селекции на устойчивость к болезням ржавчины пшеницы, является отдаленная гибридизация. При межвидовой гибридизации, в селекции пшеницы на устойчивости к листовой ржавчине, активно используют полбу, тургидум, пшеницу

рода *T. Timopheevii* [3]. Для устранения эффекта стерильности гибридов, к настоящему времени разработаны методы, облегчающие перенос генов от отдаленных видов пшеницы. Одни из них основаны на методах хромосомной инженерии, другие – на методах генетического контроля мейотической рекомбинации, третьи – на методах генной инженерии.

Целью работы является получение мутантов с хозяйственно-ценными признаками, отдаленных и внутривидовых гибридов пшеницы и их селекционно-генетический анализ.

#### Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили сорт яровой мягкой пшеницы Казахстанская 126 (*Triticum aestivum* L. var. *ferrugineum* Al.) и серия моносомных линий сорта Казахстанская 126. Сорта Надежда, Казахстанская 4 и Шагала.

Сорт Казахстанская 126 выведен в Казахском научно-исследовательском институте земледелия Н.Л. Удольской путем скрещивания мягкой пшеницы Лютеценс 47 с местным сортом карликовой пшеницы Кожебидай и последующего

двукратного отбора. Также, изогенные линии сорта Avocet по *Yr* генам, вид *T. timopheevi*.

### Результаты исследований и их обсуждение

В ходе данного исследования произведена обработка семян пшеницы районированных сортов Надежда и Казахстанская 126 химическим соединением – фосфорной кислотой ( $H_3PO_4$ ) в 5-10% концентрациях водного вещества. Для этого выбраны различные концентрации раствора фосфорной кислоты: 0,01; 0,1 и 0,5 %. Затем семена пшеницы сортов выдерживались в растворе соответ-

ствующих концентраций. Сравнительное изучение влияния различных концентрации фосфорной кислоты показало, что высокое содержание химического соединения – 5% установлена как оптимальная концентрация данного вещества по изучению онтогенеза и активности деления клеток корневой зародышевой меристемы пшеницы. Влияние химических соединений изучалось ранее в исследованиях различного направления. Однако генетические основы изменения и реакция растений на действие этих соединений не изучены. Ниже приводятся данные по изучению реакции обработанных семян в лабораторных условиях (таблица 1).

**Таблица 1** – Изучение активности деления клеток и абберации в анафазе митоза

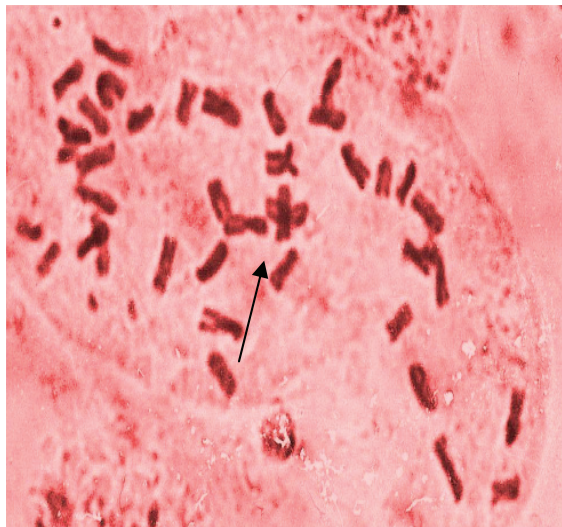
| Мутаген и его концентрация, % | Всего просмотренных клеток | Абберации | Средний процент нарушенных клеток |
|-------------------------------|----------------------------|-----------|-----------------------------------|
| Казахстанская 126             |                            |           |                                   |
| Контроль                      | 750                        | 5         | 0,66±0,01                         |
| $H_3PO_4$ 0,1%                | 750                        | 8         | 1,00±0,01                         |
| $H_3PO_4$ 0,01%               | 750                        | 11        | 1,40±0,01                         |
| $H_3PO_4$ 0,5%                | 750                        | 29        | 3,80±0,40                         |
| Надежда                       |                            |           |                                   |
| Контроль                      | 750                        | 3         | 0,40±0,01                         |
| $H_3PO_4$ 0,1%                | 750                        | 14        | 1,86±0,02                         |
| $H_3PO_4$ 0,01%               | 750                        | 17        | 2,26±0,01                         |
| $H_3PO_4$ 0,5%                | 750                        | 37        | 4,9±0,04                          |

Обработанные семена высевались в посевах опытных участков. Фенологическое наблюдение показало, что высокое содержание моно фосфора (5%) приводит к слабому мутагенному эффекту, а его 0,1% концентрация способствует развитию биомассы. Слабый мутагенный эффект 5% концентрации, по-видимому, связан с сильным подкислением реакции pH среды. Это доказано некоторыми абберациями хромосом в митозе и нарушениями мейоза у растений, обработанных  $H_3PO_4$  (рисунок 1). Митоз у мутантных растений сопровождалось массовым слипанием хромосом (пикноз), смещением веретена деления метафазной пластинки (рисунок 2).

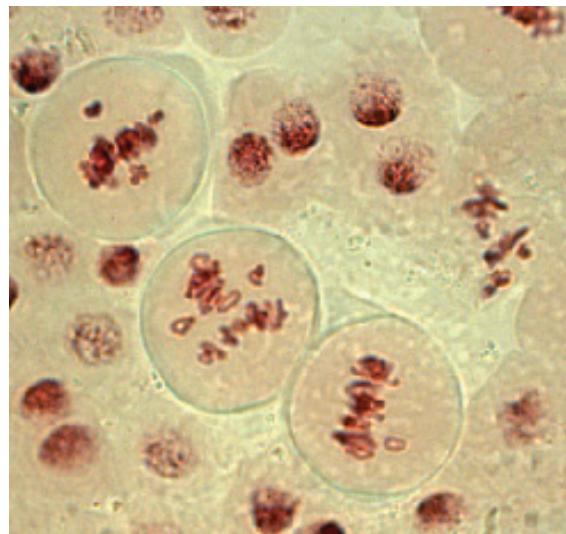
Мутагенный эффект и его важность в селекции определяются результатами митотической

активности и характера аббераций в делении клетки. Они позволяют определить степень изменчивости у растений, полученных действием химических и физических факторов. Изучена индукция определенной концентрации фосфорной кислоты (5%) на всхожесть семян, активность деления клеток и абберации в митозе меристематической клетки опытных вариантов по сравнению с контрольным вариантом, полученным с помощью действия  $H_3PO_4$ .

Действие различной концентрации химического соединения ( $H_3PO_4$ ) наблюдали в онтогенезе растений. Так, 0,1% концентрации  $H_3PO_4$  оказывает незначительное отклонение (1,00±0,01) на нормальный ход митоза в сравнении с контролем (0,66±0,01).



**Рис. 1** – Митоз мутантных растений (дителиоцентрики указаны стрелкой)



**Рис.2** – Слипание хромосом у растений, обработанных фосфорной кислотой

Проведенный структурный анализ элементов продуктивности изогенных линий позволил выделить три линии – ИЛ-Нг, ИЛ-ВгНг и ИЛ-Рс, отличающиеся достоверным превышением показателей продуктивности колоса и массы 1000 зерен в сравнении с контрольным сортом Казахстанская 126 и другими линиями (таблица 2).

Изогенная линия ИЛ-Нг с опушенным колосом, морфологически хорошо тестируется в период колошения и имеет более насыщенный

цвет колосковой чешуи по сравнению с контролем. Показатели продуктивности колоса и масса 1000 зерен линии ИЛ-Нг достоверно превышают значения контрольного сорта (таблица 2). Длина колоса в среднем составила  $13,0 \pm 0,2$  см. с числом колосков  $20,0 \pm 0,4$ . Количество зерен в главном колосе  $63,2 \pm 1,0$  шт. с массой  $2,9 \pm 0,1$  г. Зерно средней крупности, овальное с неглубокой бороздкой. Среднее значение массы 1000 зерен составило  $48,1 \pm 1,4$  г. в сравнении с контролем –  $44,7 \pm 0,7$  г.

**Таблица 2** – Элементы продуктивности колоса морфологически маркированных изогенных линий

| Сорт / линии | Продуктивность главного колоса |                      |                      |                     |                      |
|--------------|--------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
|              | длина колоса, см.              | число колосков, шт.  | число зерен, шт.     | масса зерна, г.     | масса 1000 зерен, г. |
| К. 126       | $12,2 \pm 0,1$                 | $19,0 \pm 0,3$       | $51,7 \pm 1,6$       | $2,4 \pm 0,1$       | $44,7 \pm 0,7$       |
| ИЛ-Нг        | $13,0 \pm 0,2^{***}$           | $20,0 \pm 0,4^{**}$  | $63,2 \pm 1,0^{***}$ | $2,9 \pm 0,1^{***}$ | $48,1 \pm 1,4^{**}$  |
| ИЛ-Рс        | $12,5 \pm 0,5$                 | $19,6 \pm 0,2$       | $63,2 \pm 1,0^{***}$ | $2,7 \pm 0,1^*$     | $48,4 \pm 0,6^{***}$ |
| ИЛ-ВгНг      | $13,1 \pm 0,1^{***}$           | $20,0 \pm 0,1^{***}$ | $65,4 \pm 0,2^{***}$ | $3,0 \pm 0,1^{***}$ | $49,7 \pm 0,3^{***}$ |

Отличие от контроля достоверно при \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$  \*\*\*  $P < 0,001$

Изогенная линия ИЛ-ВгНг имеет опушенный, черный колос. Средний показатель длины колоса линии ИЛ-ВгНг составил  $13,1 \pm 0,1$  см. Количество колосков в среднем  $20,0 \pm 0,1$  шт. с числом зерен  $65,4 \pm 0,2$  шт., что достоверно пре-

вышает контроль. Зерно средней крупности, бороздка не глубокая. Масса 1000 зерен линии ИЛ-ВгНг значительно превысила показатели контроля и составила  $49,7 \pm 0,3$  г ( $P < 0,001$ ).

Наблюдаемое превышение показателей про-

дуктивности колоса у линий ИЛ-VgHg и ИЛ-Hg возможно обусловлено наличием доминантного аллеля опушения колосковой чешуи *Hg* у этих линий.

Изогенная линия ИЛ-Рс характеризуется пурпурной окраской соломины. Длина колоса линии ИЛ-Рс в среднем –  $12,5 \pm 0,5$  см. Количество колосков составило  $19,6 \pm 0,2$  шт., число зерен –  $63,2 \pm 1,0$  шт. Вес зерна с главного колоса в среднем –  $2,7 \pm 0,1$  г. Зерно крупное с выполненной бороздкой. Масса 1000 зерен у линии ИЛ-Рс составила  $48,4 \pm 0,6$  г, различие достоверно при  $P < 0,001$ .

Увеличение среднего веса зерна у изогенной линии ИЛ-Рс подтверждается улучшением налива зерна. Это, возможно, связано с повышением продуктивности фотосинтеза, обусловленного интенсификацией этого процесса у антоцианосодержащих растений.

Ранее нами с использованием в качестве мутагена 0,01% водного раствора хлористого кадмия на сорта Казахстанская 3 и Шагала отобраны мутантные линии – Л1, Л2 и Л3. Мутантные формы обладают длинными колосьями, удлиненной колосковой чешуей, стекловидным крупным зерном, антоциановой окраской стебля и ушек пазухи листьев, а также высокой массой 1000 зерен. Ряд линий были более высокой и толстой соломиной, утолщением и удлинением стеблевых узлов, повышенной продуктивной кустистостью. Перечисленные селекционно-важные признаки мутантных форм, стойко наследовались от поколения в поколение (М1-М6). В связи с этим, одним из задач данного исследования является локализация генов, ответственных за хозяйственно-ценные признаки мутантных форм. Известно, что удлинение колосковой чешуи колоса положительно коррелирует с удлинением зерна. Это обстоятельство является прямым доказательством высокой продуктивности колоса мутантной формы Л1. В естественных условиях при внутривидовой гибридизации получить такие формы удастся редко. Поэтому прежде чем использовать мутанта в целях гибридизации необходимо была генетически изучить это свойство пшеницы с использованием метода хромосомной инженерии. Для осуществления данной работы получены семена гибридов  $F_1$  с использованием моносомных линий сорта Казахстанская 126 в количестве 22 комбинации скрещивания. Сравнительный моносомный

анализ гибридов по признаку удлинения колосковой чешуи будет проведена, исследованием потомства  $F_1$  при получении урожая 2013 года. В процессе выполнения этой работы необходимым условием было идентификация моносомных и дисомных растений сорта Казахстанская 126. Для этого был проведен цитологический анализ мейоза у 410 растений и проанализировано 10050 клеток моносомных гибридов. В результате, которого отобраны подлинные моносомы и были использованы для гибридизации.

*Межвидовая гибридизация.* Тетраплоидный эндемичный вид *Triticum timopheevii* Zhuk. (геномная формула  $A^1A^1GG$ ) характеризуется уникальным пулом генов, контролирующей устойчивость ко многим заболеваниям пшеницы. Создание и интенсивное вовлечение в селекционный процесс доноров мягкой пшеницы с эффективными Lg-генами устойчивости, переданными от дикорастущих сородичей, могло бы значительно расширить ее генетическую основу по тем или другим хозяйственно-ценным признакам. Однако, несмотря на определенные трудности (стерильность гибридов и цитологическая нестабильность), в литературе имеются сведения о переносе ряда генов устойчивых к бурой стеблевой ржавчине, мучнистой росе от *T. timopheevii* к мягкой пшенице. Имеющиеся в литературе сведения о совместимости видов *T. aestivum* и *T. timopheevii* противоречивы. В различных почвенно-климатических условиях России и за рубежом в гибридизацию вовлекался разнообразный материал исходных родительских видов. Противоречивость результатов объясняли как генетическими особенностями родительских форм, так и своеобразием конкретных экологических зон [3, 4].

Использование твелл-метода способствовало резкому увеличению объемов и повышению качества опыления, а в целом – гибридизации. Высокая производительность опыления (до 90 колосьев в час) нативной пылью обусловила возможность анализа собственно совместимости исходных родительских форм. В скрещивание привлекались дикие сородичи зерновых культур. В таблице 3 приведены результаты межвидовой гибридизации.

*Гибриды с t. timopheevii.* Приведенные в таблице 3 экспериментальные данные, говорит о том, что скрещивание мягкой пшеницы с различными видами диких культур были результа-

тивными. Однако, завязывание зерен в разных комбинациях варьирует от 0 до 64,18%. По-видимому, процент удачи зависит от генотипа сортообразцов, взятых для скрещивания, а также от направления скрещивания.

Так, процент удачи *t. timopheevii* с мягкой пшеницы относительно высок в том случае, когда в качестве материнской формой берется дикая форма.

В зависимости от числа опыленных колосьев завязываемость гибридных зерен в потомстве были различными. Уровень совместимости *t. timopheevii* с мягкой пшеницы сорта Надежда относительно высок и в среднем составляет около 62,63%, к-2780 – 40,67%, а в обратном скрещивании процент удачи в гибридном потомстве резко падает 15,28% и 10% соответственно.

Таблица 3 – Фертильность реципрокных гибридов отдаленной гибридизации

| №                                    | Комбинация скрещивания                              | Количество        |                    | Процент, завязывания зерен, % |
|--------------------------------------|---|-------------------|--------------------|-------------------------------|
|                                      |   | опыленных цветков | завязавшихся зерен |                               |
| <i>Мягкая пшеница x T.timopheevi</i> |   |                   |                    |                               |
| 1                                    | F <sub>0</sub> ( <i>t.timopheevi</i> x Надежда)     | 190               | 119                | 62,63                         |
| 2                                    | F <sub>0</sub> (Надежда x <i>t.timopheevi</i> )     | 72                | 11                 | 15,28                         |
| 3                                    | F <sub>0</sub> ( <i>t.timopheevi</i> x к-2780)      | 150               | 61                 | 40,67                         |
| 4                                    | F <sub>0</sub> (к-2780 x <i>t.timopheevi</i> )      | 56                | 6                  | 10                            |
| 5                                    | F <sub>0</sub> (32 коротст. x <i>t.timopheevi</i> ) | 56                | 0                  | 0                             |
| <i>Мягкая пшеница x T.dicocum</i>    |   |                   |                    |                               |
| 1                                    | F <sub>0</sub> ( <i>t.dicocum</i> x Надежда)        | 282               | 181                | 64,18                         |
| 2                                    | F <sub>0</sub> (Надежда. x <i>t.dicocum</i> )       | 156               | 41                 | 26,28                         |
| 3                                    | F <sub>0</sub> ( <i>t.dicocum</i> x к-2780 )        | 150               | 71                 | 47,33                         |
| 4                                    | F <sub>0</sub> (к-2780 x <i>t.dicocum</i> )         | 130               | 14                 | 10,77                         |
| 5                                    | F <sub>0</sub> ( <i>t.dicocum</i> x 32 коротст.)    | 32                | 17                 | 53,12                         |
| 6                                    | F <sub>0</sub> (32 коротст. x <i>t.kiharae</i> )    | 33                | 0                  | 0                             |
| <i>Мягкая пшеница x T.kiharae</i>    |   |                   |                    |                               |
| 1                                    | F <sub>0</sub> ( <i>t.kiharae</i> x Иммунная1498)   | 84                | 34                 | 40,47                         |
| 2                                    | F <sub>0</sub> (Иммунная1498 x <i>t.kiharae</i> )   | 108               | 12                 | 11,11                         |
| 3                                    | F <sub>0</sub> ( <i>t.kiharae</i> x к-2780)         | 32                | 17                 | 53,12                         |
| 4                                    | F <sub>0</sub> (к-2780 x <i>t.kiharae</i> )         | 102               | 17                 | 16,66                         |
| 5                                    | F <sub>0</sub> ( <i>t.kiharae</i> x 15/20977)       | 18                | 8                  | 44,44                         |
| 6                                    | F <sub>0</sub> (15/20977 x <i>t.kiharae</i> )       | 118               | 14                 | 11,86                         |
| 7                                    | F <sub>0</sub> ( <i>t.kiharae</i> x Надежда)        | 50                | 29                 | 58                            |
| 8                                    | F <sub>0</sub> (Надежда x <i>t.kiharae</i> )        | 52                | 10                 | 19,23                         |
| 9                                    | F <sub>0</sub> (USA18 x <i>t.kiharae</i> )          | 48                | 4                  | 8,33                          |
| 10                                   | F <sub>0</sub> ( <i>t.kiharae</i> x USA18)          | 22                | 12                 | 54,54                         |
| 11                                   | F <sub>0</sub> ( <i>t.kiharae</i> x USA19)          | 24                | 12                 | 50                            |
| 12                                   | F <sub>0</sub> (USA19 x <i>t.kiharae</i> )          | 82                | 23                 | 28,05                         |

У гибридов F<sub>1</sub> (*t. timopheevi* x к-2780) из 150 – 61%, а в реципрокном скрещивании из 56 опыленных цветков завязалось всего 10% зерна.

**Гибриды с *t. dicocum*.** Результаты скрещи-

ваемости гибридных потомств F<sub>1</sub> с участием дикого вида *t.dicocum* с мягкой пшеницей была аналогична результатами предыдущих комбинаций, выполненных с *t. timopheevi*. Интересно

отметить, что и в этом случае процент удаchi намного превысило, у тех комбинации, где в качестве отца служил сорт Надежда. Так, из 282 опыленных цветков процент удаchi составил 64,18%, а в реципрокном скрещивании из 156 опыленных цветков процент завязавшихся зерен оказался 26,28%. Процент удаchi при прямом (*t.dicocum* x к-2780) скрещивании с образцом к-2780 составило 47,33%, а в обратном -10,77%.

**Гибриды с *t. kiharae*.** Гибриды мягкой пшеницы с *t.kiharae*, менее результативные, чем гибриды с предыдущими комбинациями. Однако и в этом случае наблюдается резкое падение процента удаchi по сравнению с теми комбинациями, где материнской формой взята *t.kiharae*. Так например, процент удаchi в прямом скрещивании варьировало от 54,54% до 40,47%, а в обратном от 28,05% до 8,33%. Такое разнообразие показателей, можно объяснить генотип – средовыми условиями выращивания растений.

Таким образом, при изучении реципрокных гибридов F<sub>1</sub>, полученных от скрещивания мягкой пшеницы с дикими видами – *t. timopheevi*, *t. dicocum*, обнаружены четкие различия по проценту завязываемости зерен. У растений гибридной комбинации с *t. timopheevi*, *t. dicocum* и *t. kiharae* с цитоплазмой пшеница, т.е. при которых в качестве материнских растений была использована мягкая пшеница, процент удаchi несколько занижены по сравнению гибридами, где материн-

ской формой служили дикие виды. Отсюда, четко можно утвердить о том, что использование дикого вида в качестве материнской формой увеличивает совместимость геномов, нежели в обратном скрещивании. Для гибридов, полученных от скрещивания *t.timopheevi* с мягкой пшеницей характерно гетероплазматическое состояние: одновременно присутствуют копии дикого (материнского) и пшеничного (отцовского) типов.

## Литература

- 1 Чунетова Ж.Ж. Радиациялық және химиялық мутацияны қолданудың әдістері. – Алматы, 2010. – С. 119.
- 2 Дунаева М.В., Клячко Н.Л. Сравнительное исследование влияния ПАВ на пшеницу // Физиология растений. – 2002. – Т. 39. – Вып.1. – С. 151-156.
- 3 Тимонова Е.М., Леонова И.Н., Белан И.А., Россеева Л.П., Салина Е.А. Влияние отдельных участков хромосом *Triticum Timopheevii* формирование устойчивости к болезням и количественные признаки // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Том 16. – № 1. – С. 142-159.
- 4 Aksyonova E., Sinyavskaya M., Danilenko N. *et al.* Heteroplasmy and paternally oriented shift of the organellar DNA composition in barley-wheat hybrids during backcrosses with wheat parents // Genome. – 2005. – Vol. 48. – P. 761–769.

К.К. Шулембаева, Ж.Ж. Чунетова, С.Б. Даулетбаева, А.А. Токубаева  
**Жұмсақ бидай селекциясындағы индукциялық мутагенез,  
 алшақ және түршілік будандастырулар**

Бидайдың өнімділігін жоғарылатудың бірден бір жолы оның генотипін жақсарту – селекция үшін өзекті мәселелердің бірі. Қазіргі кезде әдеттегі селекциялық-генетикалық әдістермен қатар, беккросы селекция, алшақ будандастыру, эксперименталды мутагенез әдістерін бірге қолдану арқылы бидайдың құнды формаларын сұрыптап алуға мүмкіндік береді.

Жұмыста моно фосфордың (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0,1% жоғарғы концентрациясы өсімдіктердің биомассасының жоғарылауына әкеліп, әлсіз мутагендік әсер көрсетті; жұмсақ бидайды *t. timopheevii*, *t. dicocum*, *t. kiharae* түрлерімен будандастырған кездегі гибридтердің фертильділігі шағылыстыру бағытына және сорттың генотипіне тәуелді екендігі анықталды; Надежда сортының геномы жабайы түрлердің геномдарына сәйкес келеді.

К.К. Shulembaeva, Zh.Zh. Chunetova, S.B. Dauletbaeva, A.A. Tokubaeva  
**Induced mutagenesis, distant and intraspecific hybridization in soft bread wheat**

Increase wheat yields by improving its genotype – one of the most urgent problems of the rural economy. At present, using traditional methods of selection and genetic studies, such as backcross selection, distant hybridization, experimental mutagenesis, increased efficiency of obtaining genetically modified and improved forms of wheat.

The high content of mono phosphorus (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>5%) leads to a weak mutagenic effect, and its 0.1% concentration promotes the development of plants biomass. Fertility rates of soft wheat hybrids with wild species (*T. timopheevii*, *T. dicocum* and *T. kiharae*) depends on the direction of crossing and genotypes of varieties. Wild species as the parent component positively affect the high percentage of grain fertility. Genome of Nadezhda variety is compatible with genomes of wild species.