

УДК 58.085: 633.11

Сомаклональная изменчивость в культуре незрелых зародышей *Triticum aestivum* L.

Somaclonal variation in immature embryo culture of *Triticum aestivum* L.

Л. П. Хлебова¹, Е. Д. Никитина², Р. Д. Пронина¹

L. P. Khlebova, E. D. Nikitina, R. D. Pronina

¹Алтайский государственный университет, пр. Ленина, 61, г. Барнаул, 656049,
e-mail: hlebova61@mail.ru, margoscha20002013@mail.ru

²Алтайский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Научный городок, 35, г. Барнаул, 656910,
e-mail: aniizis@ab.ru

Реферат. В полевых условиях лесостепной зоны Алтайского края изучены морфобиологические свойства регенерантов первого поколения, полученных от 11 сортов *T. aestivum* в культуре незрелых зародышей. Установлены фенотипические отклонения от родительских форм у 28,7 % растений. Показано, что частота измененных форм и спектр изменчивости специфичны для регенерантов каждого сорта. Установлены существенные различия среди соматклонов, полученных из одного каллуса. Выделены генотипы с широким спектром варьирования признаков, представляющие наибольший интерес для получения измененных форм ('Скала', 'Спектр', 'Жница').

Summary. The morphological and biological characteristics of the first generation regenerants derived from immature embryo culture of 11 spring bread wheat varieties were studied in the field of forest-steppe zone of the Altai Territory. Phenotypic differences in 28.7 % of plants compared with their donor parents were found. It is shown that the frequency of the changed forms and spectrum of variation were specific to each cultivar. Significant differences among somaclones derived from a callus were stated. The genotypes with a wide spectrum of variable features which could be of great interest for producing new forms were revealed ('Skala', 'Spektr', 'Zhntsya').

Алтайский край является крупнейшим производителем высококачественного зерна мягкой пшеницы. Разнообразие агроэкологических условий региона делает невозможным создание универсального сорта с широким ареалом распространения. Наиболее рациональный путь стабилизации и повышения урожайности – селекция морфобиологически разнообразных сортов в рамках того или иного агроэкоотипа. Успешное осуществление генетико-селекционных программ по созданию высоко адаптивных генотипов с зональной агроэкологической специализацией будущего сорта во многом определяется генетическим разнообразием исходных популяций. Вместе с тем, гибридизация в течение длительного времени довольно ограниченного числа исходных форм привела к эрозии их генофонда, в результате чего потеряно около половины местных и стародавних генотипов. Генетическое сходство сортов, созданных в рамках региональных селекционных программ, значительно выше рекомендованного, что вызывает обоснованную тревогу (Мартынов и др., 2006).

Биотехнологические подходы, базирующиеся на возможностях культивирования растительных клеток в условиях *in vitro*, предлагают новый инструмент расширения генетической variability, что позволяет сочетать классические и инновационные методы в селекции растений (Rai et al., 2011). С разработкой техники регенерации растений из каллусной ткани появилась возможность получать новые формы, отличающиеся по различным признакам от исходных сортов (Скапцов и др., 2015). Такое разнообразие среди клеточных линий и растений-регенерантов получило название «соматклоны», а само явление «сомаклональная изменчивость» (Larkin, Scowcroft, 1981). К настоящему моменту доказано, что соматклональные варианты могут существовать как генетически стабильные формы и передавать по наследству определенные признаки (Hussain et al., 2001). Высокая степень изменчивости растений-регенерантов, имеющая важное селекционное значение, установлена у пшеницы (Никитина и др., 2013а, б; 2014), кукурузы (Долгих, 2005), проса (Баер и др., 2007) и др. культур. Соматклональная изменчивость выявлена и у генетически модифицированных (трансгенных) растений. В ряде случаев такие растения обнаруживают изменения в фенотипе, не свя-

занные с экспрессией перенесенных генов. Причинами дополнительной изменчивости могут быть стрессы, связанные с методикой проведения трансформации, встраивание переносимых генов, а также других нецелевых последовательностей ДНК (вставочный мутагенез) (Labra et al., 2001). Для использования соматических клонов в создании сортов необходима информация о спектре и размахе variability измененных хозяйственно-ценных признаков.

Цель исследования – анализ количественной и качественной изменчивости растений-регенерантов первого поколения (R_1) яровой мягкой пшеницы, полученных в культуре незрелых зародышей.

Материалом исследования служили 11 сортов яровой мягкой пшеницы различного эколого-географического происхождения: 'Алтайская 50', 'Целинная 20', 'Скала', 'Зарница', 'Жница', 'Тулунская', 'Ботаническая 2', 'Спектр', 'Целинная 60', 'Вега', 'Leones'. В качестве эксплантов использовали незрелые зародыши размером 1,3–1,5 мм, пассированные на среду Линсмайер и Скуга, дополненную 0,8 % агара, 3 % сахарозы и 2 мг/л 2, 4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д). Каллусные культуры выращивали в темноте при температуре 26 ± 1 °С, пересаживая через 30–35 дней на дифференцирующую среду, содержащую 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетин. Проростки, достигшие 5–7 см, высаживали в сосуды с почвой и доращивали до созревания в климатической камере Memmert. Семена, полученные от регенерантов R_0 , высевали в полевых условиях стационара Алтайского НИИСХ. Растения и линии R_1 сравнивали с исходными формами по ряду морфобиологических признаков и основным элементам структуры урожая. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Excel 2010.

При пассировании на искусственную питательную среду 8800 незрелых зародышей были получены каллусные ткани, из которых в дальнейшем регенерировало 24800 растений (R_0). Около 5,5 тыс. регенерантов (22,0 %) не прошли адаптацию к условиям *in vivo* и погибли вследствие плохой приживаемости при пересадке в почву. У 37,3 % растений R_0 не удалось получить семена из-за отсутствия в онтогенезе генеративной фазы или полной стерильности. Столь сильные отклонения от нормального развития связаны, по-видимому, с различными геномными и хромосомными аномалиями, индуцируемыми *in vitro*, что не дает им шанса пройти через сито отбора (Скапцов, Куцев, 2012). Семенное потомство дали 10100 регенерантов (40,7 %). Уровень фертильности этих растений варьировал от 0,2 до 100,0 %, что позволило получить как единичные зерна, так и достаточно большой объем семян, необходимый для выполнения полевых исследований.

Фенологическая оценка протяженности различных этапов онтогенеза показала, что регенеранты первого поколения характеризовались замедленным ростом на начальных стадиях развития. Растянутый период «всходы – кущение» обусловил формирование большого числа побегов. Часть изученных линий в дальнейшем нивелировала отставание по скорости развития. В результате у 43,1 % генотипов вариабельность длины вегетационного периода находилась в пределах фенотипической изменчивости исходных сортов. Наиболее широким разнообразием отличались линии сорта 'Скала', среди которых обнаружены формы как превосходящие, так и уступающие исходному генотипу по длине периода «всходы – восковая спелость».

Регенеранты R_1 отличались от сортов-доноров эксплантов по ряду морфобиологических признаков. Выполнено подробное описание 2233 растений. Около трети (28,7 %) имели фенотипические отклонения от исходных форм по одному или более признаков, что позволяет рассматривать их в качестве соматических вариантов (SC_1). Среди них более 46 % растений формировали стерильные колосья или очень щуплое зерно, 17 % соматических клонов отличались повышенной кустистостью (до 8–17 побегов), что приводило к образованию большого числа продуктивных стеблей. Изменение окраски колоса характеризовало десятую часть изученных растений. Приблизительно в равных долях (6,0–7,8%) встречались регенеранты-карлики, безостые формы и растения с укороченным колосом, содержащим редуцированные колоски. С минимальной частотой – не превышающей 2,8 % – выщеплялись фенотипы с изогнутым стеблем, измененной окраской стебля и скверхедной формой колоса (рис.). Частота измененных признаков варьировала в зависимости от генотипа сорта от 20,0 ('Целинная 20') до 56,7% ('Ботаническая 2'), а их количество составило от 2 ('Целинная 60') до 8 ('Спектр').

Таким образом, сравнительный анализ морфобиологических признаков растений R_1 выявил достаточно большое разнообразие фенотипов, позволяющее рассматривать их в качестве соматических клонов донорных сортов. Изложенные результаты подтверждают тезис, что каллусная культура имеет большое значение для получения высокого уровня генетической изменчивости *in vitro*. Это объясняется тем, что в процессе дедифференциации тканей накапливается значительное количество генетических и эпигенетических изменений. При получении регенерантов из каллусной культуры эти изменения реализуются на организменном уровне и приводят к появ-

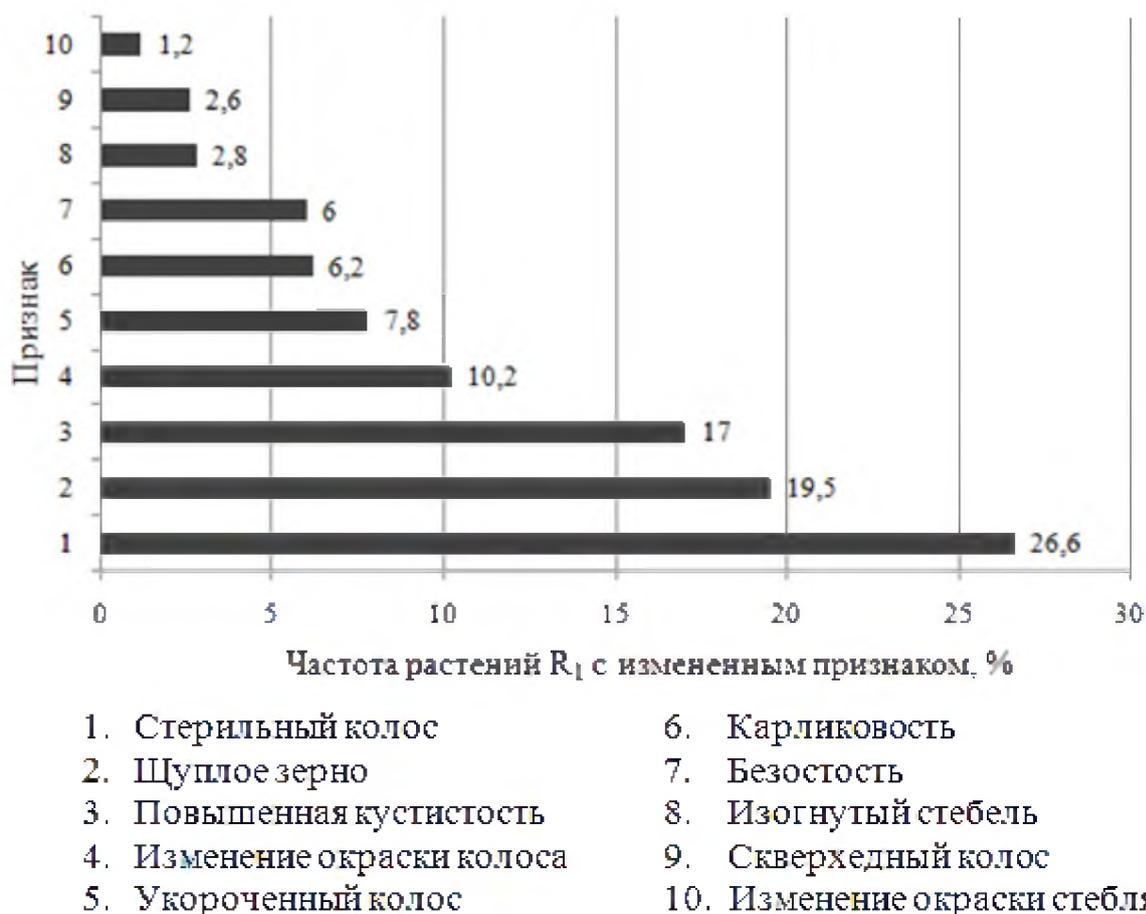


Рис. Спектр и частота измененных признаков у растений-регенерантов SC₁ яровой мягкой пшеницы, %.

лению генетически измененных растений. Причем частота таких изменений зачастую даже выше, чем при действии искусственных мутагенных факторов.

Линии 5-ти исходных сортов, включающие не менее 30 сохранившихся к уборке растений, были проанализированы по основным хозяйственно-биологическим признакам, составляющим структуру урожая. Установлено, что соматклоны, полученные из незрелых зародышей сортов ‘Ботаническая 2’ и ‘Зарница’, менее вариабельны по всем тестируемым признакам, за исключением числа зерен главного колоса. В связи с этим, вероятно, наибольший интерес для получения измененных форм будут представлять генотипы с широким спектром варьирования, такие как ‘Скала’, ‘Спектр’ и ‘Жница’. Выделены формы, существенно превосходящие донорные сорта по таким признакам как продуктивная кустистость, озерненность главного колоса, масса зерна главного колоса, масса 1000 зерен.

Следует отметить, что на проявление признаков у регенерантов влияет не только исходный генотип, но и собственно изменения, происходящие на клеточном уровне в процессе культивирования *in vitro*. Об этом свидетельствуют различия среди соматклонов, полученных из одного каллуса. Так у сорта ‘Скала’, среди регенерантов одного каллуса, встречаются растения высотой от 29 до 75 см. То есть из одного зародыша можно получить как длинностебельные, так и карликовые формы. Кроме того, уровень вариабельности растений меняется в зависимости от каллуса. Так коэффициент вариации высоты растений у регенерантов сорта ‘Скала’ составил от 7,2 (слабая вариация) до 29,7 % (сильная вариация).

При изучении хозяйственно-ценных признаков особое внимание уделялось показателю «масса 1000 зерен». Этот признак используют в селекции на продуктивность в силу тесного сопряжения с ней. Кроме того, он обладает невысокой модификационной изменчивостью. Установлено, что размах варьирования признака между сортами уже, чем в пределах сорта. Средние значения показателя в зависимости от исходного генотипа составили от 30,0 (‘Скала’) до 42,5 г (‘Алтайская 50’), тогда как у ‘Спектра’ встречаются рас-

тения с массой 1000 зерен от 7 до 66 г. У других сортов различия между экстремумами менее выражены, о чем свидетельствуют коэффициенты вариации, значения которых изменяются в зависимости от сорта от 14,4 ('Целинная 20') до 38,5 % ('Вега'). Анализ изменчивости признака среди регенерантов одного каллуса показал значительное его варьирование. Размах изменчивости составил от 23,2 до 40,3 % у сорта 'Спектр' и от 14,2 до 45,0 % у сорта 'Скала'.

Таким образом, разнообразие среди регенерантов SC₁ свидетельствует о возможности получения в культуре *in vitro* форм, измененных по морфологическим и хозяйственно-биологическим признакам, что позволяет рассматривать их в качестве исходного материала для селекции мягкой пшеницы.

ЛИТЕРАТУРА

Баер Г. Я., Емец А. И., Стадничук Н. А., Рахметов Д. Б., Блюм Я. Б. Соматоклональная вариабельность как источник для создания новых сортов пальчатого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. // Цитология и генетика, 2007. – № 4. – С. 9–14.

Долгих Ю. И. Соматоклональная изменчивость растений и возможности ее практического использования (на примере кукурузы): автореф. ... д-ра биол. наук. – М., 2005. – 45 с.

Мартынов С. П., Добротворская Т. В., Пухальский В. А. Динамика генетического разнообразия сортов озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), районированных на территории России в 1929–2005 гг. // Генетика, 2006. – Т. 42, № 10. – С. 1359–1371.

Никитина Е. Д., Хлебова Л. П., Ерещенко О. В. Разработка отдельных элементов технологии клеточной селекции яровой пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессам // Известия Алтайского государственного университета, 2014. – № 3-2 (83). – С. 50–54.

Никитина Е. Д., Хлебова Л. П., Соколова Г. Г. Создание источников устойчивости яровой пшеницы к воздействию никеля методами клеточной селекции *in vitro* // Известия Алтайского государственного университета, 2013а. – № 3-1(79). – С. 88–90.

Никитина Е. Д., Хлебова Л. П., Соколова Г. Г., Ерещенко О. В. Создание стрессоустойчивого материала яровой мягкой пшеницы с использованием клеточной селекции *in vitro* // Известия Алтайского государственного университета, 2013б. – № 3-2 (79). – С. 95–98.

Скапцов М. В., Белкин Д. Л., Смирнов С. В., Куцев М. Г. Соматоклональная изменчивость девясила британского – *Inula britannica* L. в культуре *in vitro* // Turczaninowia, 2015. – Т. 18, № 4. – С. 41–48.

Скапцов М. В., Куцев М. Г. Изменения кариотипа *Rumex acetosa* L. в культуре *in vitro* на фоне явления соматоклональной изменчивости // Известия Алтайского государственного университета, 2012. – № 3-1(79). – С. 57–59.

Hussain M., Khan G. S., Shaheen M. S., Ahmad M. Somaclonal variation in regenerated plants of ten wheat genotypes // J. Agric. Res., 2001. – Vol. 39, No. 1. – P. 1–7.

Labra M., Savini C., Bracale M. Genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced by infecting calli with *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell Reports, 2001. – Vol. 20. – P. 325–330.

Larkin P. J., Scowcroft W. R. A novel source of variability from cell cultures for plant improvement // TAG, 1981. – Vol. 60, No. 4. – P. 97–214.

Rai M. K., Kalia R. K., Singh R., Gangola M. P., Dhawan A. K. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress // Environ. Exp. Bot., 2011. – Vol. 71. – P. 89–98.