

ББК 28.585(253.7)я431+28.585(Мон)я431

УДК 58 (1-925.11/.16+517.3)

П 78

Ответственные редакторы:

д. б. н., проф. А.И. Шмаков
к. б. н., Т.М. Копытина

Редакционная коллегия:

д. б. н., проф. У. Бекет (Монголия), проф. Р. Виане (Бельгия),
проф. К. Кондо (Япония), к. б. н. М.Г. Куцев (Барнаул),
д. б. н., проф. Т.А. Терёхина (Барнаул), докт. Н.В. Фризен (Германия).

П 78 Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: сборник научных статей по материалам XV международной научно-практической конференции (23–26 мая 2016 г., Барнаул). – Барнаул: Концепт, 2016. – 524 с.

ISSN 2313-3929

Сборник содержит научные статьи по материалам пятнадцатой международной научно-практической конференции «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии» по следующим направлениям: геоботаника и ресурсоведение; изучение растительного покрова Алтая, Сибири и Монголии; молекулярные методы исследования растений и хемосистематика; морфология и биология отдельных видов; охрана растений; роль ботанических садов в изучении и сохранении биоразнообразия растений; флора Южной Сибири, Монголии и сопредельных государств; экология растений и фитоиндикация; систематика отдельных таксонов.

Для специалистов в области ботаники, экологии, охраны природы и всех интересующихся вопросами изучения, охраны и рационального использования растительного мира.

ББК 28.585(253.7)я431+28.585(Мон)я431

УДК 58 (1-925.11/.16+517.3)

ISSN 2313-3929

© Рекламно-производственная
фирма «Концепт», 2016

© Оформление. Алтайский
государственный университет, 2016

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: khlebova1@mail.ru, margooscha20002013@mail.ru

²Алтайский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Научный городок, 35, г. Барнаул, 656910,
e-mail: anilizis@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 сомаклонов, полученных из одного каллуса. Выделены генотипы с широким спектром вариабельности 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', 'Zhniça').

Алтайский край является крупнейшим производителем высококачественного зерна мягкой пшеницы. Разнообразие агрэкологических 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 агрокотипа. Успешное осуществление генетико-селекционных программ по созданию высоко адаптивных генотипов с зональной агрэкологической специализацией будущего сорта во многом определяется генетическим разнообразием исходных популяций. Вместе с тем, гибридизация в течение длительного времени довольно ограниченно 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 вариабельности, 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 (Скашков и др., 2015). Такое разнообразие среди клеточных линий и растений-регенерантов получило название «сомаклоны», а само явление «сомаклональная изменчивость» (Larkin, Scowcroft, 1981). К настоящему моменту доказано, что сомаклональные 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. Сомаклональная 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 сомаклонов в создании сортов необходима информация о спектре и размахе вариабельности измененных хозяйствственно-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 экологического-географического происхождения: 'Алтайская 50', 'Целинная 20', 'Скала', 'Зарница', 'Жнича', '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-дихлорфеноксикусусная кислота (2,4-Д). Каллусные культуры выращивали в темноте при температуре 26 ± 1 °C, пересаживая через 30–35 дней на дифференцирующую среду, содержащую 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Проростки, достигшие 5–7 см, высаживали в сосуды с почвой и доращивали до созревания в климатической камере Мешштет. Семена, полученные от регенерантов R_1 , 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_1). 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_1 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 (Скашков, Кучев, 2012). Семенное потомство дали 10100 регенерантов (40,7 %). Уровень fertilitati и 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. Растигнутый 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 сомаклональных вариантов (SC₁). Среди них более 46 % растений формировали стерильные колосья или очень шуплое зерно, 17 % сомаклонов 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 морфологических признаков растений R_1 выявил достаточно большое разнообразие фенотипов, позволяющее рассматривать их в качестве сомаклонов 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-

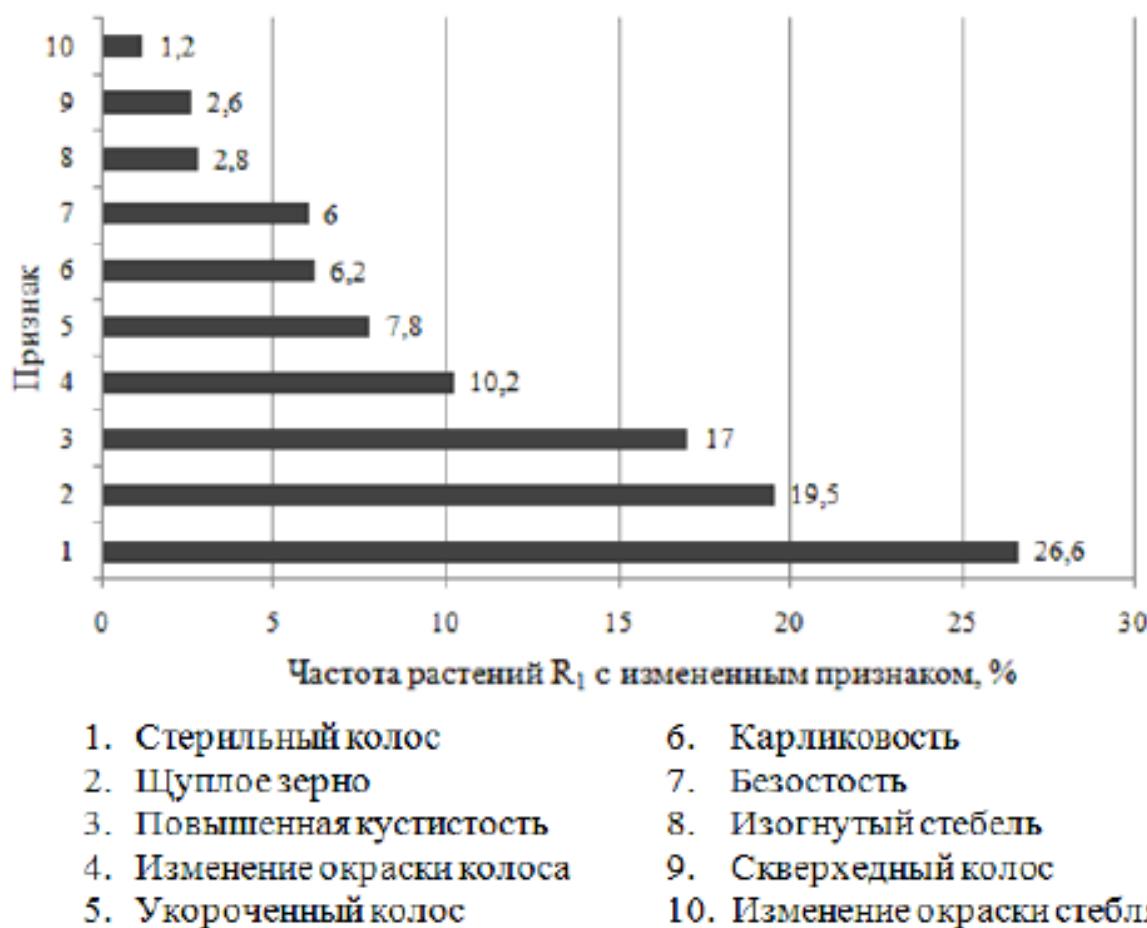


Рис. Спектр и частота измененных признаков у растений-регенерантов SC₁ яровой мягкой пшеницы, %.

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 хозяйствственно-биологическим признакам, составляющим структуру урожая. Установлено, что сомаклоны, 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 сомаклонов, 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 хозяйствственно-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 SC, свидетельствует о возможности получения в культуре *in vitro* форм, измененных по морфологическим и хозяйствственно-биологическим признакам, что позволяет рассматривать их в качестве исходного материала для селекции мягкой пшеницы.

ЛИТЕРАТУРА

- Баэр Г. Я., Емец А. И., Стадничук Н. А., Рахметов Д. Б., Блюм Я. Б.** Сомаклональная вариабельность как источник для создания новых сортов пальчатого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. // Цитология и генетика, 2007. – № 4. – С. 9–14.
- Долгих Ю. И.** Сомаклональная 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.
- Сканцов М. В., Белкин Д. Л., Смирнов С. В., Кущев М. Г.** Сомаклональная изменчивость девясила британского – *Inula britannica* L. в культуре *in vitro* // Тицзанюйвя, 2015. – Т. 18, № 4. – С. 41–48.
- Сканцов М. В., Кущев М. Г.** Изменения кариотипа *Rumex acetosa* L. в культуре *in vitro* на фоне явления сомаклональной 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.