

УДК 633.11: 581.17

Л.П. Григорьева, И.А. Шлецер

Скрининг сортов пшеницы по способности к морфогенезу в культуре незрелых зародышей in vitro

Перспективным направлением селекции новых сортов является их введение в культуру с целью индукции соматоклональных вариантов. Соматоклональные вариации возникают вследствие цитогенетической изменчивости клеток, а их частота на несколько порядков превышает частоту спонтанных мутаций. Регенеранты, полученные из таких соматоклонов, отличаются от исходного растения не только качественными моногенными, но и количественными полигенными признаками [1–3]. Наиболее подходящими эксплантами для индукции каллусов у злаков, в частности пшеницы, являются зрелые и незрелые зародыши. Вероятно, этот тип экспланта обладает наибольшей тотипотентностью, так как состоит преимущественно из меристематических тканей [4–6]. Способность к каллусогенезу, регенерации растений, а также степень разнообразия среди соматоклонов в значительной степени зависят от генотипа исходной формы [7–8]. В связи с этим идентификация и скрининг генотипов, обладающих высокой частотой морфогенетических процессов in vitro, является необходимой предпосылкой для получения соматоклональных вариантов и их применения в селекции. Это и обусловило цель и выбор объекта настоящего исследования – оценка разнообразия различных сортов яровой пшеницы по способности к морфогенезу в культуре незрелых зародышей.

В качестве источников получения соматоклонов использовали незрелые зародыши 17 сортов яровой пшеницы из различных эколого-географических групп. Экспланты культивировали в темноте при температуре +26 °С на среде Линсмайер–Скуга, содержащей 2,0 мг/л 2,4-Д. Через 3–4 недели индуцированные каллусные культуры переносили на дифференцирующую среду, отличающуюся другим гормональным составом: 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Затем каллус либо его плотные участки пересаживали на среду для регенерации и культивировали на свету при температуре +26 °С и фотопериоде 16 часов. В этих условиях из плотных участков, представляющих собой кластер эмбриональных клеток, развиваются зеленые листообразные структуры, а спустя 2–3 недели – проростки.

В ходе эксперимента определяли следующие показатели: частоту каллусогенеза, морфогене-

за (от числа каллусов), гемморизогенеза и ризогенеза (от числа морфогенных клеточных линий), а также частоту регенерации (от числа каллусов, морфогенных и гемморизогенных линий). Статистическую обработку данных проводили методом дисперсионного анализа [9]. Пассировано около 1200 эксплантов, получено 940 растений-регенерантов.

Данные исследования свидетельствуют, что при выращивании растений-доноров в теплице все генотипы обладали достаточно высокой частотой каллусогенеза в культуре незрелых зародышей (табл.). В среднем частота образования клеточных линий составила 89,8%. Сорта *Kitt* и *Olaf* характеризовались максимальным проявлением признака – 97,1%. Наименее интенсивное каллусообразование наблюдалось у сорта *Chinese Spring* – 82,9%.

Важным показателем для характеристики морфогенетических свойств растений, вводимых в культуру in vitro, является частота образования морфогенных линий, т.е. линий, потенциально способных регенерировать растения. В среднем частота таких линий составила 59,7%, варьируя от 26,1 до 77,9%. Наибольшей морфогенной способностью отличались сорта *Снектор*, *Olaf* и *Chinese Spring*. У других сортов преобладал гомогенный рыхлый незэмбриогенный каллус.

Воспроизведение растений в культуре незрелых зародышей может идти двумя путями: эмбриоидогенез и органогенез. Органогенез, в свою очередь, может протекать при сопряженном развитии почек и корней (гемморизогенез) либо независимом формировании стеблей (геммогенез) или корней (ризогенез). В результате наряду с нормальными растениями могут формироваться либо особи без корневой системы, либо одна корневая система без побега. Низкая частота выхода растений-регенерантов в нашем эксперименте обусловлена тем, что часть перенесенного на регенерационную среду каллуса была способна только к ризогенезу. Так, у сорта *Омская 9* все морфогенетические линии дали ризогенный каллус, а у сортов *Kitt*, *Olaf* и *Саратовская 29* лишь 10,4, т.е. 20,6% морфогенного каллуса индуцировали растения. Поэтому несмотря на относительно высокий уровень морфогенеза, у большинства сортов получено незна-

Скрининг сортов пшеницы по способности к морфогенезу в культуре...

Характеристика сортов яровой пшеницы в культуре незрелых зародышей, %

Сорт	Частота					
	каллусогенеза	морфогенеза	ризогенеза	регенерации от числа		
				каллусов	морфогенных линий	гемморизо-генных линий
Зимне-весенняя вегетация в теплице						
<i>Chinese Spring</i>	82,9	70,7	63,4	198,3	280,5	766,7
<i>Бурятская 34</i>	83,3	66,7	70,0	63,3	95,0	316,7
<i>Kitt</i>	97,1	52,9	86,1	7,4	13,9	100,0
<i>Olaf</i>	97,1	71,6	89,6	73,1	102,1	980,0
<i>Омская 9</i>	87,3	26,1	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>Саратовская 29</i>	86,7	52,3	79,4	61,5	117,6	571,4
<i>Спектр</i>	94,5	77,9	61,2	183,7	235,8	607,7
Среднее	89,8	59,7	78,5	83,9	120,7	477,5
Полевая вегетация						
<i>Скала</i>	100,0	100,0	33,8	100,3	100,3	153,2
<i>Ботаническая 2</i>	100,0	100,0	28,4	153,8	153,8	213,6
<i>Целинная 60</i>	100,0	100,0	33,3	74,3	74,3	111,6
<i>Новосибирская 67</i>	100,0	68,2	64,3	18,7	28,1	67,5
<i>Chinese Spring</i>	100,0	62,1	12,8	162,4	261,5	301,4
<i>Вега</i>	100,0	100,0	19,4	135,1	135,1	168,1
<i>Алтайская 88</i>	100,0	100,0	32,0	102,2	102,2	149,3
<i>Алтайская 50</i>	100,0	84,0	69,3	18,2	23,0	69,4
<i>Алтайская Нива</i>	100,0	8,03	83,0	11,7	16,4	87,5
<i>Алтайка</i>	100,0	18,4	40,0	18,7	100,0	220,0
Среднее	100,0	81,3	46,1	79,5	99,5	154,2

чительное количество регенерантов (от 5 до 49 растений). Средняя частота гемморизо-генных линий составила 21,5% от числа морфогенных. Лучшие результаты получены у сортов *Chinese Spring* и *Спектр*. Именно они и дали максимальное количество регенерантов (115 и 158 растений). В большинстве случаев из одного морфогенного каллуса формировалось от двух до 10 растений. У сорта *Olaf* в среднем на один эксплант приходится около 10 регенерантов, а у сортов *Chinese Spring* и *Спектр* – 6–7 регенерантов. В результате уровень регенерации сортов составил, соответственно: 980,0; 766,7 и 607,6% относительно числа гемморизо-генных линий.

При выращивании доноров незрелых зародышей в полевых условиях все сорта обладали максимальной способностью к индукции каллуса – 100% (табл.). Способность каллусов формировать эмбриоидо- или органогенные участки составила 89,3% у мягкой пшеницы и 49,4% у твердой. Лучшими по данному признаку оказались *Скала*, *Ботаническая 2*, *Целинная 60*, *Вега* и *Алтайская 88*. Наименьшая частота морфогенеза наблюдалась у сорта *Алтайка* (твердая пшеница) – 18,4%, где преобладал рыхлый неэмбриогенный каллус. Морфогенные потенции второго сорта твердой пшеницы (*Алтайская Нива*) проявились на уровне мягкой – 80,3%.

Все изученные генотипы дали начало растениям-регенерантам. Однако их частота суще-

ственно различалась. Низкий выход регенерантов относительно числа каллусов отмечен среди сортов как мягкой, так и твердой пшеницы: *Алтайка*, *Алтайская Нива*, *Алтайская 50* и *Новосибирская 67*. В большинстве случаев это обусловлено индукцией большого числа ризо-генных линий и низкой регенерационной способностью каллусов. Регенерация соматоклонов из эмбриоидо- и гемморизо-генных клеточных линий этих сортов не достигала уровня 100%. Это означает, что каллусы формировали лишь единичные эмбриогенные участки, что позволило получить из каждого не более одного растения. Твердая пшеница *Алтайка* также выделена в группу генотипов с низкой регенерацией. Однако невысокий показатель этого признака обусловлен не превалированием ризо-генных процессов над гемморизо-генными, а слабой способностью каллусов к морфогенезу как таковому (18,4%). Выход регенерантов от числа гемморизо-генных культур составил 220,0%. Таким образом, получено более двух соматоклонов от каждого каллуса.

Дисперсионный анализ результатов разных вегетаций показал, что различия между сортами по всем изучаемым показателям, за исключением каллусогенеза (полевая вегетация), достоверны. Это позволяет заключить, что морфообразовательные процессы в культуре незрелых зародышей пшеницы определяются генотипом сорта.

Сравнение реакции сортов на культивирование *in vitro* в зависимости от условий выращивания исходного материала свидетельствует, что условия второй вегетации были более благоприятны для большинства культуральных процессов. Так, например, частота каллусогенеза составила 100%, морфогенеза – 81,3%, эмбриоидогенеза – 60,4%. Значения признаков предыдущей вегетации оказались несколько ниже: 89,8; 59,7 и 21,5% соответственно. Вероятно, это можно объяснить как генотипическими особенностями сортов, так и их специфической реакцией на изменение условий выращивания донорных растений. Так, частота каллусогенеза сорта *Chinese Spring* увеличилась на 17%, а частота

ризогенеза снизилась на 50%. Регенерационные способности гемморизогенных каллусов, напротив, оказались выше при выращивании исходного материала в теплице. Это позволило получить в среднем 5 регенерантов от одного каллуса, а у некоторых сортов – до 10 растений на каллус.

Таким образом, мы можем сделать вывод, что морфогенез и регенерация растений в культуре незрелых зародышей *in vitro* определяются генотипом сорта пшеницы. Фактором, лимитирующим регенерацию растений из морфогенного каллуса, является ризогенез. Сорта, характеризующиеся наиболее высокой частотой регенерации растений, могут быть использованы для массового получения соматклонов.

Литература

1. Larkin P. Heritable somaclonal variation in wheat / P. Larkin, S. Ryan, R. Dretted // TAG. – 1994. – V. 13. – №2.
2. Mochmand A. Somaclonal variant plant of wheat derived from mature embryo explants of three genotypes / A. Mochmand, M. Nabors // Plant Cell Rep. – 1990. – №9.
3. Цзю В. Генетическая изменчивость потомства растений, полученных из незрелых зародышей после обработки гамма-излучением // Генетика. – 2000. – №1.
4. Ежова Т.А. Генетический контроль тотипотентности растительных клеток в культуре *in vitro* // Онтогенез. – 2003. – №4.
5. Дьячук П.А. Особенности каллусообразования и регенерации растений в культуре соматических тканей растений сортов мягкой и твердой яровой пшеницы / П.А. Дьячук, Н.Н. Носова, С.И. Тучин // Сельскохозяйственная биология. – 1990. – №3.
6. Гапоненко А. Получение соматоклональных линий у злаков / А. Гапоненко, Н. Маликов, Г. Охрименко и др. // Доклады АН СССР. – 1985. – Т. 283. – №6.
7. Калашникова Е.А. Влияние генотипа и условий культивирования зародышей яровой пшеницы на процессы каллусогенеза и морфогенеза // Изв. ТСХА. – 1999. – №3.
8. Шаяхметов И.Ф. Роль генотипа и состава среды в формировании морфогенного каллуса пшеницы // Вестник Башкирского университета. – 2001. – №2.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М., 1990.