

УДК 633.11: 581.17

Л.П. Хлебова, И.А. Шлецер

**Создание клеточных линий пшеницы,
устойчивых к воздействию ионов никеля**

Никель, относящийся к группе тяжелых металлов, является потенциальным токсикантом для человека и животных, а также одним из наиболее опасных загрязнителей растений, в том числе злаков [1]. Он способен накапливаться в зерновой биомассе, что сужает возможность получения экологически чистой продукции на территориях, загрязненных этим металлом. Плотные почвы Западной Сибири характеризуются широким диапазоном содержания никеля (12–100 мг/кг). Поступление его в почву с выбросами промышленных предприятий, при сгорании топлива, применении ряда агрохимикатов и т.д. имеет место в Алтайском крае [2].

Создание сортов, устойчивых к воздействию никеля, является слабо разработанным, но экологически и экономически безупречным способом решения данной проблемы. Открытие механизмов металлоустойчивости и наличие естественного полиморфизма по данному признаку позволяет надеяться на успех экспериментального конструирования толерантных генотипов, формирующих экологически чистую товарную часть продукции.

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 три порядка превышает частоту спонтанных мутаций. Регенеранты, полученные из таких соматоклонов, отличаются от исходного растения не только качественными моногенными, но и количественными полигенными признаками, в том числе по устойчивости к абиотическим факторам [3].

Добавление в питательные среды различных селективных агентов, имитирующих воздействие неблагоприятных факторов, создает провокационный фон и позволяет проводить целенаправленный отбор устойчивых клеточных клонов, а впоследствии – растений-регенерантов.

Практический интерес представляет получение и отбор в культуре ткани клеточных вариантов пшеницы, резистентных к воздействию ионов никеля. Целью настоящего исследования явилась отработка элементов технологии создания клеточных линий, резистентных к воздействию ионов никеля. В задачу входило определение дозы селективного агента (уксуснокислый никель), эффективной для отбора устойчивого каллуса в культуре незрелых зародышей пшеницы *in vitro*.

Донорами незрелых зародышей служили 2 сорта твердой (Алтайская Нива, Алтайка) и 3 сорта мягкой (Алтайская 50, Новосибирская 67, Chinese Spring) яровой пшеницы, характеризующиеся различным индексом устойчивости к изучаемому металлу на уровне взрослых растений. Индекс устойчивости рассчитывался через отношение воздушно-сухой массы растений в опыте (вносится ион металла) к массе растений на контроле (без внесения загрязнителя). Кроме того, изучаемые сорта характеризуются различным накоплением никеля в зерновой части продукции: Алтайская 50 – 3,10 мг/кг; Новосибирская 67 – 2,33 мг/кг; Алтайка – 1,47 мг/кг; Алтайская Нива – 1,45 мг/кг [4].

В качестве селективной системы использовали среду Линсмайер-Скуга, содержащую различные концентрации ионов никеля: 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10 мг/л в первом эксперименте и 0; 6; 8; 10; 12; 14; 20 мг/л во втором эксперименте. Таким образом, испытывалось 8 вариантов сред в первом опыте, 6 вариантов во втором опыте и контроль, не содержащий селективного агента. Поллютант вносили в иницирующую питательную среду в виде уксуснокислой соли. Объем пассирования эксплантов составил 4269 шт. Эксперимент выполнен в четырех повторностях. В ходе эксперимента определяли показатели: число каллусов на эксплант, вес сырого каллуса. Статистическую обработку данных проводили методом двухфакторного дисперсионного анализа [5].

В таблицах 1 и 2 представлены результаты эксперимента по отбору *in vitro* клеточных клонов пшеницы, устойчивых к воздействию ионов никеля. В первом эксперименте питательная среда содержала различные концентрации ионов никеля от 0 до 10 мг/л (табл. 1). Следует отметить высокую интенсивность процесса каллусогенеза независимо от генотипических особенностей сортов на всех дозах селективного агента. Наблюдалось лишь незначительное варьирование признака в пределах от 89,1 до 100%. Контрольные значения у всех сортов составили 100%.

Количественной характеристикой клеточных линий в данном эксперименте служил вес сырой массы каллуса. В среднем по сортам на средах, содержащих никель, он изменялся от 136,8 до 248,7 мг в зависимости от концентрации агента. Существенное снижение признака по сравнению с контролем на 75–115 мг наблюдали начиная с дозы 8–10 мг/л.

Таблица 1

Частота каллусогенеза и вес сырого каллуса сортов пшеницы в зависимости от концентрации ионов никеля в питательной среде

Сорт	Содержание ионов никеля в среде, мг/л								
	0	1	2	3	4	5	6	8	10
Алтайка	<u>100,0</u> 270,5	<u>100,0</u> 263,3	<u>100,0</u> 291,6	<u>100,0</u> 286,1	<u>100,0</u> 337,5	<u>100,0</u> 217,0	<u>100,0</u> 195,8	<u>96,4</u> 151,6	<u>96,4</u> 97,4
Алтайская Нива	<u>100,0</u> 266,3	<u>96,4</u> 302,0	<u>100,0</u> 260,3	<u>100,0</u> 301,1	<u>85,4</u> 320,8	<u>100,0</u> 373,2	<u>100,0</u> 287,8	<u>100,0</u> 262,0	<u>97,3</u> 255,4
Новосибирская 67	<u>100,0</u> 214,6	<u>88,9</u> 144,8	<u>86,7</u> 89,5	<u>94,4</u> 123,4	<u>100,0</u> 175,1	<u>100,0</u> 166,0	<u>100,0</u> 117,8	<u>95,9</u> 145,9	<u>100,0</u> 126,6
Алтайская 50	<u>100,0</u> 153,0	<u>100,0</u> 215,8	<u>70,4</u> 174,8	<u>66,7</u> 144,1	<u>70,8</u> 161,5	<u>80,5</u> 145,8	<u>97,6</u> 151,8	<u>100,0</u> 45,1	<u>90,6</u> 67,6
Среднее	<u>100,0</u> 226,1	<u>96,3</u> 235,5	<u>89,3</u> 204,1	<u>90,3</u> 238,7	<u>89,1</u> 248,7	<u>95,1</u> 225,5	<u>99,4</u> 188,3	<u>97,9</u> 151,2	<u>96,1</u> 136,8

Примечание. Здесь и далее: числитель – частота каллусогенеза, %; знаменатель – вес сырого каллуса, мг.

Таким образом, в данном эксперименте не удалось определить летальную дозу ионов никеля, полностью ингибирующую индукцию каллуса в культуре незрелых зародышей. Для ее уточнения был выполнен эксперимент с более высокими концентрациями поллютанта (табл. 2). Количественной характеристикой клеточных линий в данном эксперименте также служил вес сырой массы каллуса. В среднем по сортам на средах, содержащих никель, он изменился от 44,4 до 154,3 мг в зависимости от концентрации агента. Существенное снижение признака по сравнению с контрольным вариантом наблюдали также начиная с дозы 8–10 мг/л. Летальный эффект каллусообразования даже при столь высоких концентрациях поллютанта (20 мг/л) не был достигнут, однако на дозах выше 10 мг/л каллус представлял собой рыхлую обводненную массу клеток, что говорит о его неморфогенности, то есть неспособности дать растения-регенеранты.

Дисперсионный анализ свидетельствует о незначительной роли генотипа в реализации каллусообразова-

тельных потенций на различных дозах селективирующего фактора – уксуснокислой соли никеля. Фактическое значение **F-критерия по фактору «генотип»** оказалось статистически незначимым (табл. 1) либо значимым при уровне 5% (табл. 2). Данные дисперсионного анализа подтверждают достоверность наблюдаемых различий по признаку «вес сырого каллуса» как по генотипам, так и по концентрациям никеля.

Сравнение сортов, принадлежащих к разным группам устойчивости **in vivo, на уровне растений, и in vitro, на уровне клеток, показало взаимосвязь между** содержанием никеля в зерне и весом сырого каллуса. Сорта Алтайка и Алтайская Нива на уровне растений обладают низким накоплением никеля (1,47 мг/кг и 1,45 мг/кг соответственно) и на уровне клеток также проявляют высокую устойчивость к действию металла. Алтайская 50 характеризуется высоким накоплением никеля на уровне растений и низкой способностью к пролиферации каллуса **in vitro на средах, содержащих** высокие дозы данного металла. Это позволяет

Таблица 2

Частота каллусогенеза и вес сырого каллуса сортов пшеницы в зависимости от концентрации ионов никеля в питательной среде

Сорт	Содержание ионов никеля в среде, мг/л						
	0	6	8	10	12	14	20
Алтайка	<u>100,0</u> 209,3	<u>100,0</u> 79,3	<u>98,3</u> 37,9	<u>98,3</u> 39,5	<u>98,5</u> 46,2	<u>98,3</u> 33,9	<u>96,6</u> 35,1
Алтайская Нива	<u>100,0</u> 230,4	<u>100,0</u> 262,8	<u>100,0</u> 193,2	<u>100,0</u> 41,4	<u>100,0</u> 41,3	<u>100,0</u> 63,3	<u>98,3</u> 56,0
Новосибирская 67	<u>100,0</u> 197,4	<u>100,0</u> 161,9	<u>100,0</u> 110,2	<u>100,0</u> 130,3	<u>100,0</u> 105,9	<u>100,0</u> 95,2	<u>100,0</u> 75,7
Алтайская 50	<u>100,0</u> 156,9	<u>100,0</u> 120,0	<u>100,0</u> 73,6	<u>100,0</u> 47,4	<u>98,2</u> 52,1	<u>100,0</u> 63,2	<u>100,0</u> 28,4
Chinese Spring	<u>100,0</u> 124,4	<u>100,0</u> 147,3	<u>98,3</u> 121,2	<u>98,5</u> 76,8	<u>98,2</u> 51,7	<u>100,0</u> 9,8	<u>96,7</u> 26,7
Среднее	<u>100,0</u> 183,7	<u>100,0</u> 154,3	<u>99,3</u> 107,2	<u>99,4</u> 67,1	<u>99,0</u> 59,4	<u>99,7</u> 53,1	<u>98,3</u> 44,4

прогнозировать реакцию клеточных структур на содержание в питательной среде тяжелых металлов в зависимости от реакции исходного сорта *in vivo*.

Сравнение результатов воздействия никеля на изучаемые признаки показывает, что генетические факторы, ответственные за индукцию и пролиферацию каллуса, независимы. Определенная концентрация поллютанта может заблокировать работу одной системы, однако оказаться недостаточно жесткой для другой (например, сорта Алтайская Нива и Chinese Spring). В результате, не достигнув летального эф-

фекта каллусообразования, мы имеем возможность определить дозу ионов никеля, существенно ингибирующую пролиферацию клеточных линий.

Таким образом, можно сделать вывод, что доза селективного агента (уксуснокислый никель), эффективная для отбора резистентного каллуса в культуре незрелых зародышей пшеницы, находится в пределах не ниже 8–10 мг/л питательной среды. Рост каллусных клеток пшеницы *in vitro*, **на средах, содержащих ионы никеля**, зависит от способности сорта накапливать поллютант на уровне растения *in vivo*.

Библиографический список

1. Тихомиров, Ф.А. Действие никеля на растения на дерново-подзолистой почве / Ф.А. Тихомиров, Н.Н. Кузнецова, Л.Г. Малинина // *Агрохимия*. – 1987. – №8.
2. Гамзикова, О.И. Изменение устойчивости пшеницы к тяжелым металлам / О.И. Гамзикова, В.С. Барсукова // *Доклады РАСХН*. – 1996. – №2.
3. Егорова Т.А., Основы биотехнологии / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М., 2003.
4. Барсукова, В.С. Физиолого-генетические аспекты устойчивости растений к тяжелым металлам / В.С. Барсукова. – Новосибирск, 1997.
5. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М., 1990.