

## Разработка отдельных элементов технологии клеточной селекции яровой пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессам

Е.Д. Никитина<sup>1</sup>, Л.П. Хлебова<sup>2</sup>, О.В. Ерещенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Алтайский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии (Барнаул, Россия)

<sup>2</sup> Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

## The Development of Some Technology Elements of the Spring Wheat Cell Selection for Resistance to Abiotic Stresses

E.D. Nikitina<sup>1</sup>, L.P. Khlebova<sup>2</sup>, O.V. Ereschenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Altai Research Institute of Agriculture, RAAS (Barnaul, Russia)

<sup>2</sup> Altai State University (Barnaul, Russia)

Проведена оценка эффективности различных способов клеточной селекции в культуре незрелых зародышей *in vitro* 10-и сортов яровой мягкой и твердой пшеницы на устойчивость к осмотическому стрессу. Показано, что жесткая селекция с использованием сублетальной дозы хлорида натрия в качестве селективного агента для отбора стрессоустойчивых клеточных линий и регенерантов мягкой пшеницы возможна лишь для генотипов с высоким регенерационным потенциалом. Сорты с низким уровнем регенерации следует культивировать на умеренных адаптивных дозах осмотика, что позволяет получать необходимый объем материала для последующего тестирования на стрессоустойчивость в условиях *in vivo*.

Установлено, что регенерационные возможности клеточных культур сортов твердой пшеницы являются более высокими при ступенчатом способе селекции. В условиях жесткого отбора частота регенерации сократилась в 2 раза по сравнению с мягкой селекцией и составила в среднем 62,7% от общего числа пролиферирующих клеточных линий. Сравнительный анализ уровня полевой засухоустойчивости сорта и реакции на способ отбора показал, что успех регенерации при мягкой селекции определяется в большей степени регенерационным потенциалом генотипа *in vitro*, а не его устойчивостью к засухе. Для мягкой селекции рекомендуется использовать адаптивную концентрацию селективного агента — хлорида натрия (0,4%). Ступенчатую селекцию следует проводить по схеме 0,4 → 0,6 → 0,8 → 1,0% с чередованием через один пасаж селективных и неселективных условий.

**Ключевые слова:** яровая пшеница, клеточная селекция, осмотический стресс, ступенчатый отбор, мягкая и жесткая селекция, регенерант.

The efficiency of different methods *in vitro* cell selection in immature embryo culture of 10 spring soft and durum wheat varieties for resistance to osmotic stress was estimated. It is shown that the hard selection with a sublethal dose of sodium chloride as a selective agent for the selection of stress resistant cell lines and regenerants of soft wheat is possible only for genotypes with a high regenerative potential. Varieties with a low regeneration level should be cultured at moderate adaptive doses of the osmotic agent, which allows obtaining the necessary amount of material for subsequent testing on stress conditions *in vivo*. It was established that the cell cultures regeneration capabilities of durum wheat become higher while using the method of step selection. Under the conditions of hard selection regeneration frequency was reduced twice in comparison with soft selection and averaged 62,7% of the total number of proliferating cell lines. Comparative analysis of the field drought-resistance of varieties with responses to a method of selection showed that the success of regeneration at soft selection is mostly determined by the genotype regenerative potential *in vitro*, but not its resistance to the drought. For the soft selection an adaptive concentration (0,4%) of the selective agent such as sodium chloride was recommended. Step selection should be carried out according to the scheme 0,4 → 0,6 → 0,8 → 1,0% with alternating one passage through the selective and non-selective conditions.

**Key words:** spring wheat, cell selection, osmotic stress, step selection, soft and hard selection, regenerant.

DOI 10.14258/izvasu(2014)3.2-09

Алтайский край является наиболее крупным производителем зерна яровой пшеницы в Сибири — пашни занимают более 2 млн га. Основное распространение культура получила в степной и лесостепной равнинных зонах региона. Однако значительная часть данной территории характеризуется жесткими погодноклиматическими условиями, прежде всего по увлажнению, где сумма осадков за вегетационный период в среднем составляет 70–170 мм. Тем не менее в аридной зоне находится более половины посевных площадей пшеницы. Регулярно наблюдаемые остро засушливые периоды в степных и лесостепных районах приводят к снижению продуктивности культуры на 40–50%. В связи с этим создание и распространение засухоустойчивых сортов, способных обеспечить стабильное производство высококачественного зерна в Алтайском крае, является приоритетным направлением селекции.

Классические селекционно-генетические методы создания засухоустойчивых сортов, основанные на традиционных скрещиваниях, ограничены полигенным контролем признака, требуют проработки больших объемов исходного и селекционного материала, весьма затратны и зачастую малоэффективны. Вместе с тем генетическая детерминация признака и его проявление на различных уровнях организации, в том числе на уровне клетки, позволяет предложить биотехнологические подходы, основанные на клеточных технологиях *in vitro*. Это, с одной стороны, дает возможность использовать нетрадиционные инструменты расширения генетического разнообразия растений, непосредственно воздействуя на генетический аппарат соматической клетки, а с другой — создать эффективные системы оценки и прямого отбора устойчивых генотипов в лабораторных условиях на селективных средах *in vitro*.

Разработка технологии клеточной селекции *in vitro* позволит проводить испытание и отбор пшеницы на клеточном уровне в объемах, многократно превышающих традиционные (на уровне растений). Данный подход повышает вероятность сочетания большого числа генов в одном генотипе, а также создавать принципиально новый засухоустойчивый исходный и селекционный материал в более короткий период, тем самым сокращая сроки создания высокопродуктивных сортов, приспособленных к возделыванию в засушливых и полусушливых зонах Алтайского края.

В настоящее время в России и за рубежом достигнут определенный прогресс по клеточной селекции различных культур: созданы линии пшеницы, моркови, картофеля, устойчивые к фитопатогенам [1; 2], пшеницы, кукурузы, ячменя, полевицы — к засухе, засолению, тяжелым металлам [3–6]. Весьма успешно поведутся исследования по изучению теоретических основ развития зародышей, каллусо- и морфогенеза

в культуре злаков в нормальных условиях и условиях стресса [7–10]. Однако до сих пор остаются проблемы, связанные с идентификацией резистентных к селективному фактору клеточных клонов, потерей способности к регенерации, эпигенетической изменчивостью, низким выходом регенерантов, сохраняющих искомый признак [11]. Особенно это касается твердой пшеницы, обладающей более низким адаптивным потенциалом, по которой проводятся лишь единичные исследования.

Перспективным направлением клеточной селекции является отбор стрессоустойчивого материала на селективных средах, моделирующих засуху, например, содержащих компоненты природного засоления почв. В исследованиях, выполненных нами ранее, установлено, что отбор клеточных линий яровой мягкой и твердой пшеницы, пролиферирующих на солевой среде и сохраняющих регенерационные способности, следует проводить при концентрации хлорида натрия до 1,2–1,3% [12].

Существуют различные способы отбора стрессоустойчивых клеточных линий: 1) жесткая селекция с использованием сублетальных концентраций стрессового фактора; 2) мягкая — на адаптивных концентрациях селективного агента; 3) ступенчатая — с постепенным повышением концентрации стрессового фактора и чередованием селективных и неселективных условий [13]. Достоинством первого и третьего способов является достаточно полная элиминация чувствительных клеток, однако регенерация растений из таких культур затруднена, регенеранты обладают пониженной жизнеспособностью и часто стерильны. Второй способ позволяет получить фертильные регенеранты, но далеко не во всех случаях в дальнейшем такие растения демонстрируют стрессоустойчивость.

Целью настоящего исследования явилась разработка отдельных элементов технологии отбора солеустойчивых клеточных линий и регенерантов на селективных средах в культуре ткани пшеницы. В частности, представляло интерес оценить эффективность различных способов клеточной селекции *in vitro*, индуцирующих толерантные к осмотическому стрессу растения яровой мягкой и твердой пшеницы.

Исходным материалом служили незрелые зародыши размером 0,8–1,0 мм десяти сортов яровой мягкой (Ботаническая 2, Вега, Целинная 20, Алтайская 88, Скала) и твердой (Алтайка, Алтайская нива, Оренбургская 10, Гордеиформе 53, Леукурум 42) пшеницы с известной реакцией на условия *in vitro* [14], характеризующиеся различной полевой засухоустойчивостью.

В качестве селективной системы использовали среду Линсмайер — Скуга, содержащую 0,8% агара, 3% сахарозы, 2,0 мг/л 2,4-дихлорфеноуксусной кислоты (2,4-Д), дополненную различными концентрациями хлорида натрия, имитирующего осмотический

стресс. Для отбора солеустойчивых клеточных клонов и регенерантов использовали три способа селекции: жесткую, мягкую и ступенчатую. Жесткая селекция осуществлялась на среде с сублетальной концентрацией хлорида натрия (1,0%). Для мягкой селекции применяли адаптивную концентрацию селективного агента (0,4%). Ступенчатая селекция проведена по схеме: 0,4 → 0,6 → 0,8 → 1,0%. Селективные и неселективные условия чередовались через один пассаж. Отбор регенерантов твердой пшеницы вели по трем способам селекции, мягкой — по двум, за исключением ступенчатого. Контролем служила питательная среда без хлорида натрия.

Клеточные культуры выращивали в темноте при температуре 26±1 °С, пассируя каждые 30–35 дней на дифференцирующую среду с гормональным составом 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Выявленные зоны морфогенеза пересаживали на среду для регенерации, содержащую 0,2 мг/л индолилуксусной кислоты. Проростки, достигшие 5–7 см, пересаживали в сосуды с почвой и дорастивали до созревания в климатической камере Memmert при температуре 12 °С ночью, 17 °С днем с 16-часовым фотопери-

одом. Эксперимент выполнен в шести повторениях по 90 зародышей на генотип в каждом варианте, что позволило оценить 3600 эксплантов. Частоту регенерации оценивали как долю (%) проростков от числа сформировавшихся каллусов. Статистическую обработку данных проводили методом двухфакторного дисперсионного анализа с использованием пакета программ Excel.

В основе большинства существующих ныне технологий отбора стрессоустойчивых растений *in vitro* лежит принцип использования сублетальных доз селективного агента, когда фактор отбора в питательной среде убивает или препятствует росту и делению 95% клеток [3; 5; 6]. Вместе с тем известно, что реакция сортов пшеницы на культивирование в селективных условиях определяется в первую очередь генотипическими особенностями исходной формы [14]. Поэтому не всегда в присутствии сублетальной дозы селективного агента удается получить регенеранты от формы, представляющей интерес для селекции.

В таблице 1 представлена частота регенерации сортов мягкой пшеницы при различных способах отбора.

Таблица 1

Частота регенерации растений *T. aestivum* в зависимости от способа отбора *in vitro*, %

| № п/п | Сорт           | Контроль     | Способ отбора |            |
|-------|----------------|--------------|---------------|------------|
|       |                |              | мягкий        | жесткий    |
| 1.    | Скала          | 292,9        | 289,7         | 8,2        |
| 2.    | Ботаническая 2 | 100,0        | 62,5          | 3,8        |
| 3.    | Алтайская 88   | 33,3         | 8,3           | 0,4        |
| 4.    | Целинная 20    | 100,0        | 53,3          | 7,0        |
| 5.    | Вега           | 400,0        | 342,9         | 1,0        |
|       | <b>Среднее</b> | <b>185,2</b> | <b>151,3</b>  | <b>4,1</b> |

Дисперсионный анализ данных показал существенность влияния всех изучаемых факторов («генотип», «способ отбора» и их взаимодействие) на изменчивость изучаемого параметра. В отсутствие селективного фактора (контроль) средний уровень признака составил 185,2%, варьируя от 33,3% (Алтайская 88) до 400,0% (Вега). Введение в питательную среду адаптивной концентрации хлорида натрия (0,4%) обусловило снижение интенсивности регенерационных процессов в среднем на 18,3%. При этом индивидуальная реакция отдельного генотипа существенно различалась. Так, у сорта Алтайская 88 частота регенерации составила лишь 8,3% от числа сформированных каллусов, у сортов Целинная 20 и Ботаническая 2 индуцировано примерно вдвое меньше регенерантов по сравнению с контролем (55,3 и 62,5% соответственно), а у сорта Скала регенерационный потенциал практически не изменился, достигнув 289,7%.

Жесткий способ селекции на сублетальных дозах селективного фактора позволил получить лишь единичные растения. Средний уровень регенерации составил 4,1%, варьируя от 0,4 до 8,2%. Минимальный показатель по-прежнему наблюдали у сорта Алтайская 88, что объясняется, вероятно, его чрезвычайно низкой отзывчивостью на условия культивирования *in vitro*.

Сравнительный анализ уровня полевой засухоустойчивости сорта и реакции на способ отбора показал, что успех регенерации при мягкой селекции определяется в большей степени регенерационным потенциалом генотипа *in vitro*, а не его устойчивостью к засухе. Так, у сортов Алтайская 88, Целинная 20 и Вега, относящихся к группе высокозасухоустойчивых, доля регенерантов на адаптивной селективной среде (мягкая селекция) различалась многократно и соответствовала уровню морфогенеза в контроле. Вместе с тем сорт Скала, засухоустойчивость которо-

го характеризуется ниже средней, при умеренной дозе осмотика сохранил свой статус генотипа с высоким регенерационным потенциалом. Сорт Ботаническая 2 относится к сортам со средним уровнем устойчивости к засухе, но при этом регенерирует сходное с сортом Целинная 20 количество растений как в контроле, так и на селективной среде. Полученные данные соответствуют общепринятому мнению, что регенерация растений в культуре незрелых зародышей злаков определяется в первую очередь генотипическими особенностями сорта [14].

При использовании жесткого способа отбора на сублетальной дозе селективного агента (1,0%) указанные выше тенденции сохранились: у сорта Скала при низкой устойчивости к засухе сформировалось максимальное число регенерантов (8,2%), а в группе высокозасухоустойчивых генотипов наблюдались существенные различия по уровню регенерации.

Таким образом, использование сублетальной дозы хлорида натрия в качестве селективного агента для селекции стрессоустойчивых клеточных линий и регенерантов мягкой пшеницы представляется возможным лишь для генотипов с высоким регенерационным потенциалом. Сорта с низким уровнем регенерации следует культивировать на умеренных адаптивных дозах осмотика, что позволяет получать некоторый объем материала для последующего тестирования на стрессоустойчивость в условиях *in vivo*.

В таблице 2 представлен регенерационный потенциал сортов яровой твердой пшеницы. В контрольном варианте средний уровень признака равен 362,8%, изменяясь от 268,9% (Гордеиформе 53) до 521,0% (Оренбургская 10). Мягкая селекция привела в среднем к 3-кратному снижению показателя. Наиболее выраженное уменьшение признака отмечено у сортов Алтайская нива и Алтайка (на 78,6 и 72,0% соответственно), хотя его уровень остался достаточно высоким.

Таблица 2

Частота регенерации растений *T. durum* в зависимости от способа отбора *in vitro*, %

| № п/п | Сорт            | Контроль     | Способ отбора |             |             |
|-------|-----------------|--------------|---------------|-------------|-------------|
|       |                 |              | мягкий        | ступенчатый | жесткий     |
| 1.    | Алтайка         | 301,7        | 84,5          | 53,4        | 17,2        |
| 2.    | Алтайская нива  | 438,7        | 93,7          | 84,8        | 114,6       |
| 3.    | Леукурум 42     | 283,6        | 111,7         | 92,7        | 29,1        |
| 4.    | Гордеиформе 53  | 268,9        | 104,4         | 61,4        | 39,9        |
| 5.    | Оренбургская 10 | 521,0        | 204,5         | 121,3       | 112,8       |
|       | <b>Среднее</b>  | <b>362,8</b> | <b>119,7</b>  | <b>82,7</b> | <b>62,7</b> |

Примечание: НСР (наименьшая существенная разница) для сравнения средних показателей фактора «генотип» = 16,2; фактора «способ отбора» = 12,5.

В условиях жесткого отбора частота регенерации сократилась в 2 раза по сравнению с мягкой селекцией и составила в среднем 62,7% от общего числа пролиферирующих клеточных линий. Однако, в отличие от сортов *T. aestivum*, уровень признака не был чрезвычайно низким, что позволило получить несколько десятков растений. Результаты ступенчатого отбора с постепенным повышением концентрации селективного агента в питательной среде явились промежуточными с сохранением общей тенденции снижения признака относительно контрольных значений. Сравнительный анализ результатов жесткой и ступенчатой селекции показал, что, несмотря на один и тот же уровень итоговой концентрации хлорида натрия (1,0%), регенерационные возможности клеточных культур в последнем случае оказались более высокими. У некоторых сортов (Алтайка, Леукурум 42) частота регенерации

была выше в 2–3 раза. Исключением явился лишь сорт Алтайская нива, показатели регенерации которого ухудшились в процессе ступенчатой селекции на 26,0% по сравнению с жесткой.

Таким образом, мягкий (для *T. aestivum*) и ступенчатый (для *T. durum*) способы отбора *in vitro* оказались более благоприятными для регенерационных процессов в культуре незрелых зародышей. Использование данных приемов как составляющего элемента технологии клеточной селекции позволяет обеспечить достаточное число регенерантов, а в дальнейшем соматоклональных линий для последующего тестирования на стрессоустойчивость *in vivo*. Для мягкой селекции рекомендуется использовать адаптивную концентрацию селективного агента — хлорида натрия (0,4%). Ступенчатую селекцию следует проводить по схеме: 0,4 → 0,6 → 0,8 → 1,0% с чередованием через один пасаж селективных и неселективных условий.

### Библиографический список

1. Калашникова Е.А. Клеточная селекция растений на устойчивость к грибным болезням : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 2003.
2. Райзер О.Б., Созинова Л.Ф., Шеек Г.О. и др. Определение оптимальных концентраций культурального филтратта гриба *Septoria Nodorum Blotch* для проведения селекции *in vitro* // Биотехнология. Теория и практика. — 2011. — №1.
3. Аль-Холани Х.Ф.М., Тоайма В.И.М., Долгих Ю.И. Получение растений кукурузы с повышенной устойчивостью к засухе путем клеточной селекции на среде с маннитом // Биотехнология. — 2010. — №1.
4. Гладков Е.А. Получение растений полевицы побегоносной с комплексной устойчивостью к тяжелым металлам и засолению методами клеточной селекции // Сельскохозяйственная биотехнология. — 2009. — №6.
5. Щуплецова О.Н. Клеточная селекция ячменя на устойчивость к эдафическим стрессам // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. — М., 2008.
6. Никитина Е.Д., Хлебова Л.П., Соколова Г.Г. Создание источников устойчивости яровой пшеницы к воздействию никеля методами клеточной селекции *in vitro* // Известия Алт. гос. ун-та. — 2013. — №3/1.
7. Катасонова А.А., Круглова Н.Н. Зародыш пшеницы как компетентный эксплант для получения морфогенных каллусов *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. — 2011. — №2.
8. Круглова Н.Н. Каллус как модель для изучения формирования структуры высшего растения // Известия Уфимского научного центра РАН. — 2011. — №3.
9. Круглова Н.Н. Периодизация эмбриогенеза пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // Известия Уфимского научного центра РАН. — 2012. — №2.
10. Круглова Н.Н. Клеточное и тканевое воздействие ПЭГ 6000 как имитатора засухи на органы автономного зародыша пшеницы в условиях *in vitro* // Биотехнология. Взгляд в будущее. — Казань, 2012.
11. Дьячук Т.И., Тучин С.В., Столярова С.В. и др. Стратегия адаптивной селекции полевых культур в связи с глобальным изменением климата // Биотехнологические методы в селекции пшеницы, ячменя и тритикале в НИИСХ Юго-Востока. — Саратов, 2004.
12. 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 Алт. гос. ун-та. — 2013. — №3/2.
13. Долгих Ю.И. Принципы скрининга клеток *in vitro* с целью получения устойчивых к абиотическим стрессам форм растений // II Российский симпозиум. — Пущино, 1993.
12. Никитина Е.Д. Роль генотипа в реализации морфогенетических процессов в культуре незрелых зародышей у *Triticum aestivum* L. // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. — 2004. — №2 (152).