

ББК 28.5+42.112.1

УДК 58:633.11

*Е. Д. Никитина, Л. П. Хлебова, Г. Г. Соколова, О. В. Ерещенко*

### **Создание стрессоустойчивого материала яровой мягкой пшеницы с использованием клеточной селекции *in vitro***

*E. D. Nikitina, L. P. Khlebova, G. G. Sokolova, O. V. Ereschenko*

### **The Development of Stress-resistant Stock of Spring Bread Wheat by *in Vitro* Cell Selection**

Изучено влияние различных концентраций хлорида натрия на процессы индукции каллуса и регенерации растений в культуре незрелых зародышей пяти сортов мягкой яровой пшеницы. Отбор клеточных линий *in vitro*, пролиферирующих на солевой среде и сохраняющих регенерационные способности, следует проводить при концентрации хлорида натрия до 1,2–1,3%.

**Ключевые слова:** мягкая пшеница, незрелые зародыши, селективная среда, селективный агент, каллус, отбор, регенерант, солеустойчивость.

DOI 10.14258/izvasu(2013)3.2-20

Регулярно наблюдаемые острозасушливые периоды в степных и лесостепных зонах Западной Сибири, включая Алтайский край, приводят к существенному снижению продуктивности зерновых культур, в том числе мягкой яровой пшеницы. Классические селекционно-генетические методы создания стрессоустойчивого материала, основанные на традиционных скрещиваниях, ограничены полигенным контролем признака и зачастую малоэффективны.

Устойчивость растений к неблагоприятным факторам генетически детерминирована и проявляется на различных уровнях организации, в том числе на уровне клетки. Это позволяет использовать биотехнологические подходы, основанные на клеточных технологиях *in vitro*, что, с одной стороны, дает возможность расширить генетическое разнообразие растений, непосредственно воздействуя на генетический аппарат, а с другой стороны, создать системы прямого отбора устойчивых генотипов. Одним из биотехнологических методов создания стрессоустойчивого материала является проведение первоначального отбора линий в культуре клеток *in vitro*.

В настоящее время в России и в мире достигнуты определенные успехи по клеточной селекции различных культур: созданы линии пшеницы, моркови, картофеля, устойчивые к фитопатогенам [1; 2], кукурузы, ячменя, полевицы и других растений — к засухе и засолению [3–5]. Серьезные успехи достигнуты в изучении теоретических основ развития зародышей, кал-

The effect of different concentration of sodium chloride on the process of callus induction and plantlet regeneration in immature embryo cultures of 5 spring bread wheat varieties was studied. The selection of cell lines proliferating on the salt medium and preserving the regeneration ability *in vitro* at doses of sodium chloride to 1,2–1,3% should be carried out.

**Key words:** bread wheat, immature embryos, a selection medium, a selection agent, callus cultures, selection, regenerant, salt resistance.

лусо- и морфогенеза в культуре злаков в нормальных условиях и условиях стресса [6; 7]. Однако до сих пор остаются проблемы, связанные с правильным выбором селективного агента, идентификацией резистентных к селективному фактору клеточных клонов, потерей способности к регенерации, эпигенетической изменчивостью, низким выходом регенерантов, сохраняющих искомым признак [8].

Перспективным направлением клеточной селекции является отбор стрессоустойчивого материала на селективных средах, имитирующих засуху, например, содержащих компоненты природного засоления почв.

Целью настоящего исследования являлась отработка отдельных элементов технологии отбора солеустойчивых клеточных линий и регенерантов на селективных средах в культуре ткани мягкой яровой пшеницы. В частности, представляло интерес определить концентрацию селективного агента, эффективного для отбора резистентного морфогенного каллуса, сохраняющего способность к регенерации.

Исходным материалом служили незрелые зародыши пяти сортов яровой мягкой пшеницы, с известной реакцией на условия *in vitro* и обладающих разной степенью засухоустойчивости: средней — Ботаническая 2, выше средней — Вега, Целинная 20, Алтайская 88 и ниже средней — Скала. В качестве селективной системы использовали среду Линсмайер-Скуга, содержащую различные концентрации хлорида

натрия. Определение сублетальных доз селективного агента проводили при концентрации от 0 до 2,0% с интервалом 0,5% и от 1,0 до 1,5% — с шагом различия 0,1%. Опыт выполнен в четырех повторениях, объемом пассирования составил 2500 эксплантов. Оценку образующихся клеточных линий проводили через 7–8 недель культивирования. Определяли следующие показатели: число каллусов на эксплант (частота каллусогенеза), вес сырого каллуса, число регенерантов на эксплант (частота регенерации). Статистическую обработку данных проводили методом двухфактор-

ного дисперсионного анализа с использованием пакета программ Excel.

Результаты испытания сортов на селективных средах *in vitro* показали, что в среднем по генотипам частота каллусогенеза варьировала от 59,7 до 95,55% в зависимости от концентрации NaCl (табл. 1). В контроле, в отсутствии селективного агента, наблюдали от 91,2 до 95,6 каллусов на 100 эксплантов. Среднее значение признака составило 93,5%, что близко результатам, полученным при дозах 0,5–1,5% и в 1,5 раза превышает данные при дозе 2,0%.

Таблица 1

Частота каллусогенеза и вес сырого каллуса в культуре незрелых зародышей сортов мягкой яровой пшеницы в зависимости от концентрации хлорида натрия (0,5–2,0%) в питательной среде

№ п/п	Сорт	Содержание в питательной среде NaCl, %					Среднее
		0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	
1	Скала	94,1	95,6	90,6	92,2	86,7	90,9
		232,5	98,7	116,4	17,2	9,5	94,9
2	Ботаническая 2	91,2	100,0	97,0	88,2	58,0	86,9
		235,7	71,7	41,2	21,0	8,1	75,5
3	Алтайская 88	93,5	92,3	95,1	91,5	51,7	84,8
		209,5	185,9	77,7	16,1	13,8	100,6
4	Вега	95,6	95,1	88,7	86,9	43,9	82,0
		229,9	86,5	46,0	26,3	8,8	79,5
5	Целинная 20	91,9	94,6	95,3	91,0	63,1	87,2
		204,3	136,4	51,1	10,4	6,7	81,8
Среднее		93,5	95,5	93,3	90,0	59,7	
		222,4	115,8	66,5	18,2	9,4	

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

Анализ сортов по группам засухоустойчивости показал, что в среднем по всем вариантам наиболее высокий процент каллусообразования (90,9%) обнаружен у сорта Скала, обладающего низкой засухоустойчивостью. Даже при 2,0% концентрации NaCl частота каллусогенеза оставалась достаточно высокой — 86,7%. Мы полагаем, что это связано с хорошей отзывчивостью данного сорта на культивирование *in vitro*. Результаты остальных сортов варьировали от 82,0 до 87,2%, не обнаруживая корреляции с уровнем их устойчивости к засухе. При этом наблюдали значительное снижение признака при дозе 2,0% и близкие значения в вариантах 0,5–1,5% (86,9–100%). Следовательно, на данном этапе клеточной селекции интенсивность каллусогенеза в большей степени определяется особенностями генотипов, связанными с их реакцией на условия культуры ткани как таковой.

Визуальная оценка каллусов свидетельствовала о сильном различии их по цвету, размерам, структуре. На средах с содержанием хлорида натрия до 1,0% формировались культуры морфогенного типа: плотной консистенции, желтоватого цвета, хорошо растущие, в то время как на средах с 1,5–2,0-процентной

концентрацией — рыхлые, бесцветные, мелких размеров. Последний тип, как правило, практически не обладает морфогенными свойствами, а следовательно, затрудняет возможность получения регенерантов.

Количественной характеристикой клеточных линий служил вес сырой массы. В среднем по сортам он менялся от 9,4 до 115,8 мг в зависимости от варианта (табл. 1). Контроль составил 222,4 мг, варьируя по генотипам от 204,3 до 235,7 мг. Взаимосвязь принадлежности сорта к определенной группе засухоустойчивости и нарастанием клеточной массы на разных дозах NaCl не установлена.

Сравнительный анализ данных по индукции каллусогенеза и весу сырой массы с визуальными характеристиками (консистенция, цвет) приводит к следующему заключению. Независимо от генотипических особенностей сортов существенное снижение частоты образования клеточных линий в культуре незрелых зародышей изученных образцов мягкой пшеницы происходило при добавлении в иницирующую среду хлорида натрия в диапазоне 1,5–2,0%. При этом последняя доза не является летальной, однако существенно замедляет скорость пролиферации клеток. Снижение

веса каллусной массы в сравнении с нулевым вариантом начинается с дозы 0,5%. Максимальные различия между соседними вариантами — 3,6 раза — наблюдали при переходе от 1,0 к 1,5%. Этот же интервал оказался критическим при формировании морфогенного каллуса. При дозах NaCl, превышающих 1,5%, образуются культуры, не способные к регенерации растений.

Для определения более точной концентрации хлорида натрия в системе отбора был выполнен дополнительный эксперимент в интервале 1,0–1,5% с шагом различий 0,1% (табл. 2). В среднем

по генотипам уровень каллусогенеза варьировал от 88,9 до 96,1% в зависимости от варианта. В контроле значение признака у всех сортов составило 100%. Существенное снижение частоты образования каллуса наблюдали в интервале 1,2–1,3%. Количественная характеристика культур показала, что вес сырой массы каллусов по вариантам постепенно снижался от 46,2 до 12,7 мг, контрольное значение составило 370,9 мг. Максимальные различия наблюдали при переходе концентраций селективного агента от 1,1 к 1,2%.

Таблица 2

Частота каллусогенеза и вес сырого каллуса в культуре незрелых зародышей сортов мягкой яровой пшеницы в зависимости от концентрации хлорида натрия (1,0–1,5%) в питательной среде

№ п/п	Сорт	Содержание в питательной среде NaCl, %							Среднее
		0,0	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	
1	Скала	<u>100</u> 389,8	<u>95,0</u> 92,1	<u>96,2</u> 84,8	<u>100</u> 48,0	<u>96,2</u> 60,8	<u>92,9</u> 24,7	<u>91,8</u> 24,9	96,0
2	Ботаническая 2	<u>100</u> 323,4	<u>92,6</u> 22,3	<u>97,5</u> 58,9	<u>95,8</u> 40,4	<u>90,6</u> 30,8	<u>85,3</u> 8,2	<u>80,3</u> 9,8	91,7
3	Алтайская 88	<u>100</u> 544,2	<u>98,6</u> 28,5	<u>97,3</u> 33,3	<u>98,5</u> 18,9	<u>94,1</u> 29,7	<u>88,0</u> 12,8	<u>88,6</u> 16,7	95,0
4	Вега	<u>100</u> 256,6	<u>98,7</u> 25,5	<u>100</u> 30,1	<u>94,3</u> 15,5	<u>91,2</u> 18,9	<u>89,9</u> 88,9	<u>91,1</u> 9,7	95,0
5	Целинная 20	<u>100</u> 340,3	<u>96,0</u> 23,9	<u>97,3</u> 24,3	<u>97,4</u> 12,5	<u>90,4</u> 13,5	<u>97,5</u> 9,4	<u>93,0</u> 10,2	95,9
Среднее		<u>100</u> 370,9	<u>96,1</u> 38,4	<u>97,6</u> 46,2	<u>97,2</u> 27,0	<u>92,5</u> 30,7	<u>97,0</u> 12,7	<u>88,9</u> 14,2	

Через шесть недель культивирования на иницирующей питательной среде каллусы пассировали на дифференцирующую среду для индукции органогенных участков. Образующиеся проростки переносили на среду для регенерации (табл. 3). При дозе NaCl 1,5% не удалось получить ни одного регенеранта. В остальных вариантах регенерировали единичные растения со средней частотой 0,9–4,8%. В контроле наблюдали интенсивное образование растений у всех сортов, что составило в среднем 109,7%, варьируя от 74,3 до 163,7%. Дисперсионный анализ

показал достоверность различий значений как по генотипам, так и концентрациям селективного агента. Кроме того, взаимодействие рассмотренных факторов также оказалось высокозначимым, что указывает на специфичность реакции определенного сорта на присутствие определенной концентрации хлорида натрия. В результате каллусы сорта Скала регенерировали растения на дозах до 1,4%; у сорта Вега не получено ни одного регенеранта; каллусы остальных сортов индуцировали растения при дозах 1,0–1,3%.

Таблица 3

Частота регенерации растений в культуре незрелых зародышей сортов мягкой яровой пшеницы в зависимости от концентрации хлорида натрия в питательной среде

№ п/п	Сорт	Содержание в питательной среде NaCl, %							Среднее
		0,0	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	
1	Скала	100,0	7,1	2,5	3,6	2,8	4,7	0,0	17,2
2	Ботаническая 2	163,7	0,0	11,4	0,0	4,3	0,0	0,0	25,6
3	Алтайская 88	74,3	4,4	5,2	6,3	7,5	0,0	0,0	13,9
4	Вега	102,2	2,2	5,0	0,0	8,6	0,0	0,0	16,8
5	Целинная 20	135,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	19,3
Среднее		109,7	2,7	4,8	1,9	4,6	0,9	0,0	

Таким образом, в результате проведенных исследований отработаны элементы технологии создания толерантных к засолению растений мягкой яровой пшеницы в культуре незрелых зародышей *in vitro*.

Отбор клеточных линий, пролиферирующих на солевой среде и сохраняющих регенерационные способности, следует проводить при концентрации хлорида натрия до 1,2–1,3%.

### 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 фильтрата 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 абиотическим стрессам // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. — М., 2008.
6. Круглова Н. Н. Каллус как модель для изучения формирования структуры высшего растения // Известия Уфимского научного центра РАН. — 2011. — № 3–4.
7. 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.
8. 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.