

П. П. Фисенко,
кандидат сельскохозяйственных наук

Приморский НИИСХ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕКУРРЕНТНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ В СЕЛЕКЦИИ СОИ

УДК 633.853.52:581.143.6

Соматоклонная изменчивость является разновидностью мутагенеза, причем эта разновидность имеет некоторые специфические и весьма ценные аспекты. Как и индуцированный мутагенез, соматоклонная изменчивость носит случайный, ненаправленный характер, то есть реализуются как полезные, так и вредные мутации. Однако *in vitro* выбраковка вредных и нежелательных форм происходит уже в процессе регенерации и начального отбора среди регенерантов R_0 в условиях культуральной комнаты. Поэтому испытываемая в поле популяция регенерантов (R_1) более продвинута в селекционном плане, что значительно сокращает объем [1, 2].

После получения нерасщепляющихся константных форм регенеранты могут быть снова переведены в культуру *in vitro* для второго этапа скрининга соматоклонов с целью улучшения их по каким-либо признакам. Таким путем были отобраны, например, томат с повышенным содержанием сухих веществ, высокоурожайный рис, раннеспелая кукуруза, устойчивые к низким температурам и к болезням пшеница, сахарный тростник, картофель, сельдерей, томаты [2]. Рожанская [3] подобную регенерацию назвала рекуррентной и осуществляла ее на эспарцете.

Материал и методика. В нашем эксперименте для введения *in vitro* регенеранта в популяции соматоклонов сорта Ходсон был отобран R_{86} . В качестве первичного экспланта использовали семядольные узлы. Стерилизацию материалов, приготовления питательных сред осуществляли согласно рекомендациям Бутенко [4]. В качестве основы регенерационной питательной среды использовали минеральные ингредиенты по прописи Murashige T., Scoog F. [5] (MS); витамины – Nitsch (B₅) [6], с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП) – 1,13 (среда А) и 0,23 мг/л (среда Б). Культивирование проходило на свету при освещенности 4-5 тыс. люкс, 16/8-часового фотопериода и температуры 23 ± 3 °С, укоренение пробирочных растений осуществляли на безгормональной среде с половинным составом минеральной основы MS (1/2 MS). Растения-регенеранты R_0 переводили в почву (горшечная культура) для дальнейшего развития в культуральной комнате. Первоначально создавали влажную камеру, затем проходили адаптацию регенерантов.

Выращивание соматоклонных линий, начиная с

R_1 (регенеранты первого поколения) проводили в полевых условиях в соответствии с принятой для Приморского края агротехникой.

Площадь делянки в гибридном и селекционном питомниках 1,8 м², контрольном – 9,0 м². Схема посева во всех питомниках – 45х5 см. Посев в первых двух осуществляли вручную, в контрольном питомнике – сеялкой СКС-6-10. Уборку в начальных питомниках проводили вручную, в контрольном – комбайном «Хеге».

Полевые испытания осуществляли в условиях муссонного климата Приморского края в агроклиматическом районе 1б₂. Данный район характеризуется как наиболее теплый, влажный, с суровой зимой. Сумма активных температур колеблется в пределах 2400-2600°, гидротермический коэффициент – 1,6-2,0.

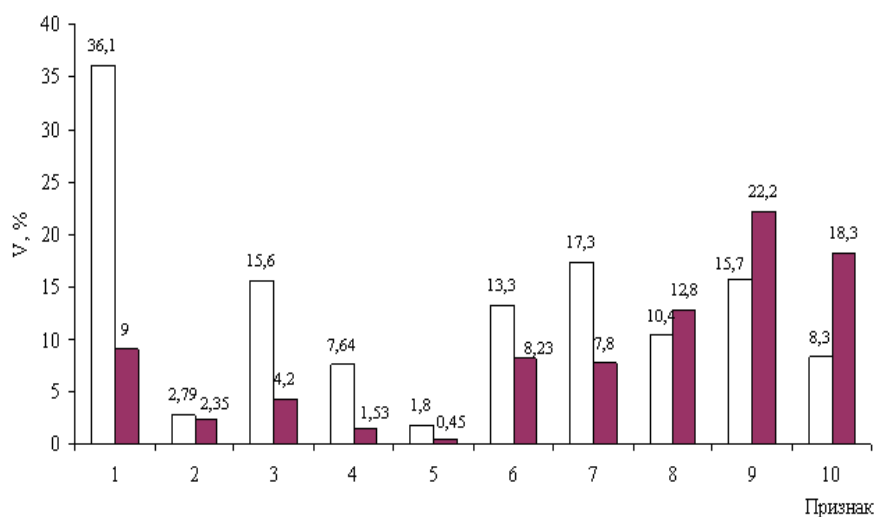
Оценка степени поражения исходных форм и соматоклонных линий сои грибными патогенами проведена старшим научным сотрудником лаборатории селекции сои Дегой Л. А. при искусственном заражении листовой поверхности на жестком инфекционном фоне по методике ВИР [7] и согласно Международному классификатору [8]. Биохимический состав семян выполнен сотрудниками ВНИИ сои на ИК-сканере Nir-42 по следующим показателям: аминокислоты, жирные кислоты, белок, масло, минеральные элементы.

Урожайные данные и другие показатели обрабатывали по методике Доспехова [9].

Результаты исследований и их обсуждение. Первоначально нами в результате изучения соматоклонов отмечено 10 признаков, по которым соматоклоны различаются большей или меньшей степенью между собой и с исходными формами: урожайность, содержание белка, гистидина, масла, линолевой, линоленовой, олеиновой кислот, степень поражения септориозом, церкоспорозом, пероноспорозом.

Сравнение двух популяций осуществляли по вышеперечисленным признакам. По другим анализируемым признакам: содержание аминокислот в белке (валин, пролин, глютамин, лизин, фенилаланин, тирозин, лейцин, изолейцин, аланин+глицин, треанин, аспарагиновая кислота), содержание в масле пальмитиновой и стеариновой жирных кислот, содержание минеральных элементов (К, Са, Р, Mg и др.) различий не обнаружено. Величины

перечисленных признаков оказались стабильными. Значительные и средние показатели variability регенерантных линий популяции Ходсон в сравнении с таковыми показателями популяции соматклонов R₈₆ отмечены по признакам: урожайность (36,1 %), содержание гистидина (15,6 %), линоленовой (13,3 %) и олеиновой (17,3 %) кислот (рисунок). В популяции R₈₆ преимущество перед популяцией сорта Ходсон выявлено по признакам: степень поражения септориозом (12,8 %), церкоспорозом (22,2 %), пероноспорозом (18,3 %) (см. рисунок).



□ CV популяции соматклональных линий сорта Ходсон, полученных методом культуры ткани путем органогенеза
 ■ CV популяции соматклональных линий R₈₆, полученных методом культуры ткани путем органогенеза

1 – урожайность, 2 – содержание белка, 3 – содержание гистидина, 4 – содержание масла, 5 – содержание линолевой кислоты, 6 – содержание линоленовой кислоты, 7 – содержание олеиновой кислоты, 8 – степень поражения септориозом, 9 – степень поражения церкоспорозом, 10 – степень поражения пероноспорозом.

Рисунок – Величина коэффициента вариации (V, %) десяти признаков в зависимости от генотипа

Величины коэффициентов вариации признаков содержания белка, масла, линолевой кислоты в обеих популяциях отнесены к числу несущественных (0,45-7,64%).

Средние арифметические значения двух популяций различались по семи из десяти изучаемых признаков (табл. 1). Исключение составили такие признаки: содержание олеиновой кислоты, степень поражения септориозом, церкоспорозом, средние арифметические значения которых у двух сравниваемых групп (популяции соматклонов сорта Ходсон и популяции соматклонов R₈₆) практически не различались.

Признаки урожайность (от 0,084 до 0,184 кг с-м²), содержание олеиновой кислоты (от 9,3 до 20 %), степень поражения церкоспорозом (от 69,4 до 38,3 %) улучшены в процессе регенерации сорта Ходсон, т. е. на первом этапе, без использования

второго этапа – регенерации регенеранта сорта Ходсон R₈₆ – рекуррентной регенерации.

В результате введения *in vitro* R₈₆ и его регенерации путем органогенеза удалось изменить в позитивном направлении еще шесть признаков сорта Ходсон:

- содержание масла от 20,38 до 21,23 % (R₄₅₆);
- содержание линолевой кислоты от 51,0 до 52,9 % (R₆₉₇);
- содержание линоленовой кислоты от 9,2 до 7,5 % (R₄₂₂);

- содержание гистидина от 9,0 до 10,8 % (R₄₂₂);

- степень поражения септориозом от 77,5 до 47,2 % (R₃₈₉);

- степень поражения пероноспорозом от 90,7 до 45,6 % (R₄₆₅);

Содержание белка в семенах повысить под действием условий регенерации *in vitro* не удалось ни при введении и регенерации сорта Ходсон, ни R₈₆, вероятно потому, что Ходсон относится к числу белковых сортов.

Введение *in vitro* регенеранта и.ф. Ходсон способствовало улучшению сорта Ходсон по содержанию гистидина на 1,8 %, масла – 0,85 %, линолевой кислоты – 1,9 %, снижению содержания линоленовой кислоты – 1,7 % и степени поражения септориозом – 30,3 %, пероноспорозом – 45,1 %.

– 45,1 %.

В каждой из двух изучаемых популяций выявлены линии, превосходящие исходные формы по ряду признаков. В популяции Ходсона это четыре соматклона, в популяции R₈₆ – пять (см. табл. 1).

В первом варианте достоверное превышение отмечено по 2-4 признакам, во втором – по 2-5 признакам. Лучшей соматклональной линией в популяции сорта Ходсон оказалась линия R₃₄₇, которая помимо урожайности превосходит исходный сорт по содержанию олеиновой кислоты, степени поражения церкоспорозом и пероноспорозом. В популяции R₈₆ таковых две линии – R₄₅₆ и R₄₂₂, пре-вышающие R₈₆ наряду с урожайностью по содержанию линоленовой кислоты, содержанию гистидина, степени поражения пероноспорозом (табл. 2).

Таблица 1 – Сравнительная характеристика двух популяций соматклонов органогенного происхождения

Признак	Соматклональная популяция и.ф. Ходсон					Соматклональная популяция и.ф. R ₈₆				
	и.ф. \bar{X}	популяция				и.ф. \bar{X}	популяция			
		\bar{X}	lim	V, %	выделив- шаяся линия		\bar{X}	lim	V, %	выделив- шаяся линия
1. Урожайность, кг/м ²	0,084	0,117	0,081-0,184	36,1	R ₃₄₇ – 0,184 R ₂₄₉ – 0,183 R ₃₁₂ – 0,139	0,118	0,135	0,118-0,151	9,0	R ₄₅₆ – 0,146 R ₄₆₅ – 0,144 R ₄₂₂ – 0,151
2. Содержание в семенах масла, %	20,38	19,37	15,49-20,63	7,64	–	20,23	20,72	20,17-21,23	1,53	R ₄₅₆ – 21,23 R ₄₆₅ – 21,0
3. Содержание, % от общего количества масла:										
линолевая к-та	51,0	50,9	48,6-52,1	1,8	–	51,9	52,48	52,1-52,9	0,45	R ₃₉₇ – 52,9
линоленовая к-та	9,2	10,5	9,1-14,3	13,3	–	10,4	8,78	7,5-9,3	8,28	R ₄₂₂ – 7,5 R ₄₅₆ – 8,4 R ₃₉₇ – 8,4 R ₃₈₉ – 8,4
олеиновая к-та	9,3	13,7	11,2-20,0	17,3	R ₃₅₂ – 20,0 R ₃₄₇ – 16,1 R ₃₀₄ – 14,4	13,8	13,1	11,7-14,6	7,8	R ₃₉₇ – 14,6
4. Содержание белка в семенах, %	40,2	35,9	37,6-40,28	2,79	–	40,03	39,7	39,44-40,14	2,35	–
5. Содержание гистидина, % от общего содержания аминокислот в семенах	9,0	8,3	5,5-9,9	15,6	–	9,1	10,14	9,6-10,8	4,2	R ₄₅₆ – 10,7 R ₄₂₂ – 10,8
6. Степень поражения, %: септориозом	77,5	67,85	57,5-78,5	10,4	R ₃₅₂ – 57,5 R ₂₄₉ – 59,6 R ₄₄₁ – 62,2	78,5	61,75	47,2-70,5	12,8	R ₃₈₉ – 47,2 R ₄₅₈ – 54,7 R ₃₉₇ – 58,2
церкоспорозом	69,4	52,4	38,4-65,7	15,7	R ₃₅₃ – 38,4 R ₃₄₇ – 43,8 R ₃₅₂ – 46,5	53,2	53,5	41,9-81,9	22,2	–
пероноспорозом	90,7	82,3	66,2-92,7	8,3	R ₃₄₇ – 66,2 R ₃₅₃ – 76,7 R ₂₅₁ – 80,6	87,2	68,8	45,6-79,1	18,3	R ₄₆₅ – 45,6 R ₃₉₁ – 54,7 R ₄₂₂ – 60,1

Таблица 2 – Выделившиеся по комплексу хозяйственно ценных признаков соматклональные линии из популяций органогенного происхождения (исходные формы – сорт Ходсон и регенерант R₈₆) (2004, 2005 гг.)

Признак	И.Ф. Ходсон					И.Ф. R ₈₆					
	\bar{X} и. ф.	R ₃₄₇	R ₂₄₉	R ₃₅₂	R ₃₅₃	\bar{X} и. ф.	R ₄₂₂	R ₄₅₆	R ₄₆₅	R ₃₉₇	R ₃₈₉
1. Урожайность, кг/м ²	0,0842	0,184	0,183	–	–	0,119	0,151	0,146	0,144	–	–
2. Содержание в семенах масла, %	20,38	–	–	–	–	20,23	–	21,23	21,0	–	–
3. Содержание орг. кислот, % от общего количества масла в семенах:											
линолевая	51,0	–	–	–	–	51,9	–	–	–	52,9	–
линоленовая	9,2	–	–	–	–	10,4	7,5	8,4	–	8,4	8,4
олеиновая	9,3	16,1	–	20,0	–	13,8	–	–	–	14,6	–
4. Содержание белка в семенах, %	40,2	–	–	–	–	40,03	–	–	–	–	–
5. Содержание гистидина, % от общего содержания аминокислот в семенах	9,0	–	–	–	–	10,1	10,8	10,7	–	–	–
6. Степень поражения, %:											
септориозом	77,5	–	59,6	57,5	–	78,5	–	–	–	58,2	47,2
церкоспорозом	69,4	43,8	–	46,5	38,4	53,2	–	–	–	–	–
пероноспорозом	90,7	66,2	–	–	76,7	87,2	60,1	45,6	–	–	–

Примечание: Выделившиеся соматклональные линии достоверно превышают исходную форму (и. ф.).

Выделившиеся соматоклональные линии R₃₄₇ и R₄₂₂ переданы в конкурсное сортоиспытание лаборатории селекции сои.

Заключение. Нашими исследованиями подтверждена необходимость проведения рекуррентной регенерации сои, которая в результате повторного скрининга дает возможность улучшения форм по ряду признаков.

Литература

1. *Evans D. A. Somaklonal variation / D. A. Evans // Plant Biology. – 1987. – Vol. 4. – P. 59-60.*
2. *Evans D. A. Somaklonal variation-genetic based breeding application / D. A. Evans // Trend in Genetics. – 1989. – Vol. 5. – № 2. – P. 46-50.*
3. *Рожанская О. А. Создание исходного материала для селекции кормовых культур в условиях Сибири с помощью методов биотехнологии / О. А. Рожанская // Автореф. дис.... д-ра биол. наук. – Новосибирск, 2007. – 34 с.*
4. *Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р. Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 272 с.*
5. *Murashige E. Scoog / E. Murashige // Phisiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – № 13. – P. 473-497.*
6. *Gamborg P. L. Nutrient requirement of suspension cultures soybean rod cells / P. L. Gamborg, R. A. Miller, K. Ojima // Experimental cell research. – 1969. – Vol. 59. – № 1. – P.151-158.*
7. Методические указания по изучению устойчивости сои к грибным болезням / [Сост. Н. И. Корсаков, А. М. Овчинникова, В. И. Мизеева]; ВАСХНИЛ, ВИР. – Л., 1979. – 46 с.
8. Международный классификатор СЭВ рода *Glicine Weld* / [Сост.: СССР – Л. Г. Щелко, Г. Седова, В. Корнейчук; ЧСФР – Л. Пастухова, Г. Синский, П. Гофирек и др.]; ВАСХНИЛ, ВИР. – Л., 1990. – 46 с.
9. *Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами стат. обраб. результ. исслед.). – 5-е изд., доп. и перераб. / Б. А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.*