

**П. П. Фисенко,**  
кандидат сельскохозяйственных наук  
**Н. И. Хохлова,**  
научный сотрудник  
**О. С. Ефремова,**  
младший научный сотрудник, аспирант  
Приморский НИИСХ

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА КУЛЬТУРЫ ТКАНИ В СЕЛЕКЦИИ СОИ**

УДК 633.853.52:581.143.6

В селекции сои применяются различные методы создания исходного материала, но основным из них является гибридизация. Значительная возможность в селекции открылась с организацией биотехнологических методов.

Селекционеры многих стран мира (КНР, Индия, Австралия, США) используют клеточно-тканевые технологии при выведении сортов растений. В России также созданы сорта или селекционный материал риса, картофеля, клевера, сахарной свеклы, рапса, сои и других культур [1, 2, 3].

В Приморском НИИСХ коллективом двух лабораторий: биотехнологии и селекции сои – создан первый в России сорт сои Приморская 81 с использованием метода культуры ткани, который с 2004 г. районирован.

**Материалы и методика.** Исследования проводились в лаборатории биотехнологии на восьми

возделываемых в Приморье сортах сои.

Стерилизация сред, инструментов, посуды, растительного материала осуществлялась согласно опубликованным рекомендациям Бутенко [4], Калинина [5].

В качестве первичных эксплантов были использованы недоразвитые и зрелые семена без видимых внешних повреждений.

Порядок приготовления питательных сред и исследований осуществляли согласно опубликованным рекомендациям [4, 5, 8, 9].

В питательные среды (MS и B<sub>5</sub>) [6, 7] вводили фитогормоны в различных сочетаниях и концентрациях: ИМК, НУК, 6-БАП, ГК<sub>3</sub> от 0,1 до 1,0 мг/л, в зависимости от пути регенерации (эмбриогенез, органогенез).

Пробирочный материал инкубировали в культуральной комнате при температуре 24±2 °С, 16-часо-

вом фотопериоде и освещенности 4-5 тыс. лк.

Полученные адвентивные побеги изучаемых сортов укореняли на безгормональной среде  $\frac{1}{2}$  MS [10]. Микрорастения  $R_0$ , полученные путем органо-генеза и эмбриогенеза, переводили *in vivo*, где они дозревали и давали полноценное семенное потомство, которое высевали в поле. В последующие годы соматклоны изучали в селекционных и контрольном питомниках, конкурсном сортоиспытании лаборатории селекции сои.

**Результаты исследований.** Лаборатория биотехнологии ГНУ Приморский НИИСХ Россельхозакадемии была создана в 1989 г. по настоянию селекционеров с целью расширения генетического разнообразия сои и соматклонов, для выведения новых сортов. Одновременно рассматривался вопрос размножения растений-регенерантов в условиях *in vitro*, изучение соматклонов в поле. И в отдаленной перспективе – создание сортов нетрадиционным путем – методом культуры клеток и ткани, а также возможность изучения других видов сои для проведения межвидовой гибридизации.

Реакция генотипов на условия культивирования различна. Такие сорта, как Ходсон, Приморская 301, Венера отзывчивы как на условия регенерации путем эмбриогенеза, так и органо-генеза. Первичные экспланты сорта Приморская 529 успешно проходят регенерацию только путем органо-генеза. Для сортов Приморская 13 и Приморская 69 необходимы индивидуальные изменения в технологиях регенерации для успешного получения соматклонов. В результате многолетней работы нами отмечены некоторые закономерности:

- растения, регенерированные из клеточных и тканевых культур, как правило, отличаются от исходных форм, в чем мы убедились в результате анализа соматклональных линий. Такие растения несут генетическую изменчивость, накопленную в процессе культивирования *in vitro* [10];

- по вариабельности изучаемые признаки классифицированы на три группы: незначительно изменяющиеся, средне- и существенно изменяющиеся. К первой группе отнесены признаки: содержание белка, масла, линолевой кислоты в семенах. Другие – урожайность, содержание олеиновой кислоты, гистидина, степень поражения септориозом, пероноспорозом, церкоспорозом варьировали от средних значений до значительных в зависимости от генотипа и способа регенерации;

- жирно-кислотный состав семян регенерантов не зависит от их масличности, а содержание гистидина от белковости;

- чем выше показатель признака у исходной формы, тем меньше вероятность выделить в данной популяции линии, достоверно превышающие ее по этому признаку;

- условия регенерации путем эмбриогенеза, на примере изученной популяции соматклонов сорта Ходсон, способствуют чаще всего улучшению признаков, характеризующих качество семян (содер-

жание масла, белка, гистидина, линолевой и линоленовой кислот). Процесс регенерации соевых растений путем органо-генеза влияют на изменение содержания олеиновой кислоты, степень поражения септориозом, церкоспорозом, пероноспорозом;

- значительного преимущества одного пути регенерации над другим по количеству получаемых соматклональных вариантов нами не обнаружено.

Введение *in vitro* регенеранта  $R_{86}$  способствовало проведению повторного скрининга в популяции регенеранта для улучшения ряда признаков, таких как содержание масла, линолевой, линоленовой кислоты, гистидина, степень поражения септориозом, пероноспорозом. Методом культуры ткани и регенерации через эмбриогенез создан сорт сои Приморская 81.

Из 100 созданных соматклональных линий по хозяйственно ценным признакам отобрано 22 соматклона, которые вместе с их исходными формами проанализированы (БПИ ДВО РАН) методом маркирования межмикросателлитных последовательностей (ISSR). В ISSR-спектрах соматклональных линий детектировано 25 новых фрагментов, отсутствующих в спектрах сортовых генотипов [11].

В конкурсном сортоиспытании в 2006, 2007 годах среди изучаемых номеров выявлено пять соматклональных линий органо-генного происхождения, превосходящих исходные формы по нескольким признакам.

С целью расширения генетического разнообразия сои *in vitro* в последние годы нами использованы первичные экспланты мутантов, полученных в результате лазерного и гамма-облучения. Наиболее отзывчивыми на регенерацию оказались пять из восьми изучаемых сортов: Ходсон, Приморская 301, Приморская 13, Приморская 81, Приморская 51, мутанты которых были получены как лазерным, так и гамма-облучением.

В настоящее время начаты исследования по использованию в питательных средах мутагенного фактора – ионов  $Cu^{2+}$ . Повышение содержания ионов меди от 6 до 18 мг/л ингибировало регенерационную способность семядольного узла исходного сорта, увеличивало гибель адвентивных побегов и оказывало отрицательное последствие на рост и развитие  $R_0$ .

Проводятся эксперименты по созданию соматклонов сои, устойчивых к септориозу и церкоспорозу методом клеточно-тканевой селекции. В 2006-2007 гг. выявлено, что введение в питательную среду для органо-генеза 25-35% 10-дневного культурального фильтрата гриба *Septoria glycines* и 14-дневного культурального фильтрата патогена *Cercospora sojina* способствует сохранению регенерационной способности семядольного узла сои и получению адвентивных побегов в условиях *in vitro*.

Реакция генотипов на микрочеренкование в условиях *in vitro* различна. Регенеранты таких сортов, как Ходсон, Венера успешно размножаются на без-

гормональной среде  $\frac{1}{2}$  MS, Приморская 529 – на  $\frac{1}{2}$  MS + 1 мг/л ГК<sub>3</sub> + 0,1 мг/л ИМК, Приморская 301 – на комбинированной среде  $\frac{1}{2}$  MS +  $\frac{1}{2}$  B<sub>5</sub>. Коэффициент размножения 1:35; период размножения 30-35 дней в зависимости от генотипа.

Эксперименты, проведенные с недозрелыми эмбрионами диких австралийских видов сои: *G. tabacina*, *G. tamentella*, *G. clandestine*, *G. canescens* – показали, что в условиях *in vitro* дозревают зародыши, находящиеся в поздней сердцевидной и ранней семядольной стадии, что соответствует размерам от 0,5 до 3 мм и возрасту 5-10 дней после оплодотворения яйцеклетки.

**Выводы.** Использование метода создания соматоклональных линий с измененными признаками путем регенерации *in vitro* дает практические результаты – путем эмбриогенеза впервые в России создан сорт сои Приморская 81.

#### Литература

1. Атанасов А. Биотехнология в растениеводстве / А. Атанасов. – Новосибирск, 1993. – 243 с.
2. Родина Н. А. Достижения генетики, селекции и биотехнологии в растениеводстве / Н. А. Родина // Материалы годич. общего собрания, посвящ. 20-летнему юбилею со дня основания отделения по Нечерноземной зоне РФ Россельхозакадемии. – СПб., 1995. – С. 119-130.
3. Рожанская О. А. Особенности соматоклональной изменчивости количественных признаков сои / О. А. Рожанская // Повышение эффективности селекции и семеноводства сельскохозяйственных растений: докл. и сообщ. VIII генетико-селекционной школы, 11-16 ноября 2001 г. / РАСХН, Сиб. отделение, СибНИИРС, НГАУ. – Новосибирск, 2002. – С. 89-95.
4. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тка-

ней и физиология морфогенеза растений / Р. Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 272 с.

5. Калинин Ф. Л. Методы культуры ткани в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – Киев.: Наукова думка, 1980. – 489 с.

6. Murashige T. A. Reversed medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture / T. A. Murashige, F. Scoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – N 13. – P. 473-497.

7. Gamborg P. L. Nutrient requirement of suspension cultures soybean root cells / P. L. Gamborg, R. A. Miller, K. Ojima // *Experimental cell research.* – 1969. – Vol. 59, N 1. – P. 151-158.

8. Barwale U. B. Somaclonal variation in plant regenerated from cultured of soybean / U. B. Barwale, J. M. Widholm // *Plant Cell Repots.* – 1987. – Vol. 6. – N 5. – P. 365-368.

9. Wright M. S. Plant regeneration from Tissue Cultures of soybean by organogenesis / M. S. Wright, S. M. Kochler, M. A. Hinchee, M. G. Carnes // *Plant Cell Repots.* – 1986. – N 5. – P. 150-154.

10. Tilton V. R. *In vitro* culture of immature soybean embryos / V. R. Tilton, S. H. Russell // *J. of Plant Physiology* – 1984. – Vol. 115. – N 3. – P. 191-200.

11. Фисенко П. П. Регенерация растений сои из культуры семядольного узла / П. П. Фисенко, Г. Д. Галукия // Некоторые вопросы селекции и технологии возделывания сельскохозяйственных культур в Приморье: Сб. науч. тр. / РАСХН, Дальневост. отделение, ПримНИИСХ. – Новосибирск, 1994. – С. 17-22.

12. Козыренко М. М. Анализ генетического разнообразия сортов и соматоклональных линий культурной сои (*Glycine max* (L.) Merr.) методом маркирования межмикросателлитных последовательностей (ISSR) / М. М. Козыренко, П. П. Фисенко, Е. В. Артюкова // *Биотехнология.* – 2007. – № 1. – С. 3-13.