

## СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ *IN VITRO* – ИСТОЧНИК ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ СОРТОВ РАСТЕНИЙ

Гвасалия М. В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур»,  
г. Сочи, Россия, e-mail: m.v.gvasaliya@mail.ru

Традиционная селекция обогатилась новым высокотехнологичным методом создания исходного материала, основанном на использовании культивируемых *in vitro* тканей и органов растений. Генетические изменения, происходящие в культивируемых *in vitro* клетках и регенерировавших из них растений, позволяют улучшить существующие сорта. Культивирование соматических клеток *in vitro* расширяет возможность увеличения частоты и спектра мутаций. Сомаклональная изменчивость, являющаяся источником полезных генетических вариаций, позволит провести отбор в культуре *in vitro* новых форм растений, характеризующихся такими ценными хозяйственными признаками, как повышенная продуктивность, высокое содержание полезных веществ, устойчивость к стресс факторам.

**Ключевые слова:** соматические мутации, сомаклональная изменчивость *in vitro*, соматклоны, сомаклональные варианты, каллус, геммогенез, селективные среды.

Интенсификация сельского хозяйства ставит перед селекционерами сложные задачи по созданию новых сортов, отличающихся высокой урожайностью, устойчивостью к болезням и вредителям, высокой пластичностью к стрессовым факторам внешней среды. Для создания таких сортов необходим поиск и привлечение современных достижений науки, ускоряющих и повышающих результативность селекционного процесса. Методы биотехнологии, располагают новым уникальным инструментом расширения генетической variability – сомаклональной изменчивостью, основанную на культивировании растительных клеток в условиях *in vitro* [2, 3].

В нашей стране первые работы по сомаклональной изменчивости растений в культуре ткани были проведены Загорской и Шаминой в начале 1970-х годов в институте физиологии растений, где были получены сомаклональные варианты табака. Научный интерес к возможности получения сомаклональных вариантов в культуре ткани возник позже,

после публикации статьи австралийских исследователей Ларкина и Скоукрофта [20, 21].

Соматоклональная изменчивость – это фенотипическое выражение непостоянства ядерного и органельного цитоплазматических геномов, возникающее у растений, полученных путём регенерации из культивируемых *in vitro* клеток. Соматоклоны, у которых проявляется изменчивость на генетическом уровне, называются соматоклональными вариантами. Учёные рассматривают соматоклональную изменчивость как источник генетического разнообразия при создании новых форм растений [1, 14].

Получены соматоклональные варианты таких ценных сельскохозяйственных культур, как пшеница, рис, кукуруза, картофель, люцерна, лён, томаты и др. Было установлено, что соматоклональные варианты могут существовать как генетически стабильные формы и передавать по наследству хозяйственно-ценные признаки [13, 15–18].

Условия культивирования, в частности нарушение гормонального баланса питательной среды, одна из причин возникновения генетического разнообразия культивируемых клеток. От соотношения фитогормонов, входящих в состав питательных сред, во многом зависит цитогенетическая структура клеточных популяций. Высокие концентрации БАП, 2,4-Д, кинетин, НУК способствуют полиплоидизации клеток, в частности увеличению доли тетраплоидных и октоплоидных, а также появлению триплоидных и анеуплоидных форм растений [12, 19]. В лаборатории Р. Г. Бутенко в течение двух лет культивировались меристематические клетки растения гаплопаппуса, пассажи проводились раз в месяц. В итоге, исходные диплоидные клетки на 95 % приобрели разные уровни плоидности.

Морфологическая и цитогенетическая разнокачественность клеточных популяций может возникнуть вследствие видовых и возрастных особенностей эксплантов, а также влияния отдельных компонентов питательной среды: минеральных солей, сахарозы или другого источника углеродного питания, витаминов, растительных экстрактов и режимов выращивания. Изолирование от исходного растения тканей и органов, их длительное культивирование *in vitro* является стрессом для растений и способствует повышению генетического разнообразия соматических клонов растений [24].

Цитологические исследования показывают, что варибельность, индуцируемая условиями культивирования *in vitro*, обусловлена генетическими изменениями, в частности изменениям в программе считки генов. Эти изменения носят наследственный характер. В настоящее время предложено несколько гипотез относительно генетических механизмов возникновения соматоклональной изменчивости: изменения

кариотипа, микроперестройки хромосом, изменения генома, вызванные перемещением мобильных генетических элементов, соматический кроссинговер, генные перестройки, обусловленные дифференцировкой и т. д. Основным источником проявления фенотипических изменений, являются различные кариологические изменения и хромосомные перестройки. Однако выявить, какие из них будут иметь фенотипический эффект и наследоваться как стабильная мутация генов – сложно. Как грубые, так и тонкие хромосомные aberrации – мелкие делеции, дупликации, транслокации, инверсии могут вызывать существенные фенотипические изменения как в растениях-регенерантах, так и в последующем потомстве. Соматическая изменчивость проявляется на кариотипическом, морфологическом, биохимическом и молекулярном уровнях [10, 11, 23].

Любая соматическая клетка при её введении в культуру *in vitro*, вследствие процессов «соматической» изменчивости, происходящей в рамках закона Н. И. Вавилова о гомологических рядах в наследственной изменчивости, может восстановить в растениях-регенерантах весь генетический полиморфизм свойственный данному виду и даже роду растений. Это открывает широкие возможности для восстановления природного полиморфизма, утерянного в процессе эволюции растений, и его сохранения в культуре клеток и тканей *in vitro* [7]. Вместе с тем, соматическая изменчивость является серьезной помехой при размножении ценных генотипов и длительном их хранении, когда требуется получить полную идентичность регенерированных клонов. Поэтому важной задачей как для повышения, так и снижения соматической изменчивости является изучение факторов, индуцирующих вариабельность [9].

Для расширения спектра изменчивости культивируемых *in vitro* растений используются длительно пассируемые каллусные ткани. Каллусная ткань представляет собой легко доступный материал, поэтому наиболее часто используется в клеточной селекции. По определению каллус – один из типов тканей, участвующих в заживлении механических повреждений растений, который присущ всем высшим растениям. Каллусная культура *in vitro* – это неорганизованная пролиферирующая ткань, которая состоит из дедифференцированных клеток, её можно получить практически из любой живой ткани растения. Как правило, работу проводят на первичной или пересадочной каллусной ткани, которая не утрачивает способности к регенерации на протяжении ряда субкультивирований [4].

Неорганизованно растущая каллусная ткань содержит три типа клеток: мелкие, средние и крупные. При пассировании ткани на

среду, содержащую индукторы органогенеза, мелкие клетки приступают к делению и формируют меристематические очаги. Деление клеток меристематического очага приводит либо к формированию почек и последующему развитию из них побегов (геммогенезу), либо к ризогенезу. Каллусы с высоким морфогенетическим потенциалом обычно компактные, структурированные, имеют зелёные хлорофиллсодержащие участки. При культивировании каллуса и индукции из него геммогенеза в клетках происходят структурные изменения хромосом, анеуплоидия, полиплоидия, что увеличивает вероятность получения форм, изменённых по многим морфологическим, биохимическим и физиологическим признакам. Любой фрагмент растения представляет собой мозаику различных тканей, и в зависимости от того, какая ткань даст начало каллусу, возникшие даже из одинаковых эксплантов каллусы будут гетерогенными и отличаться друг от друга. Одинаковых, в полном смысле, эксплантов в природе быть не может, следовательно, неоднородность исходного материала (видовая, возрастная, физиологическая) предопределяет разнородность клеток в культуре *in vitro* [19, 22, 25].

Соматоклональная вариабельность – это уникальное явление, частота её возникновения в популяции клеток превосходит на три порядка частоту спонтанных мутаций, возникающих в природе. В настоящее время гибридизация и индуцированный мутагенез не может в полной мере удовлетворить потребности практической селекции. Так, многие гены, даже при высоких дозах мутагенного воздействия «молчат». При изолировании клетки из целого организма и её переноса в искусственные условия культивирования *in vitro* практически полностью устраняется влияние тканевых и организменных регуляторных систем, которые обеспечивают стабильность генома. Отключение всех этих систем приводит к увеличению цитогенетической вариабельности культивируемых клеток. Таким образом, не привнося в питательную среду сильных мутагенов, а только переведя клетки в состояние культуры, можно получить широкий спектр генетической изменчивости [5].

Соматоклональные варианты отличаются от прототипа не только моногенными качественными признаками, но и полигенными количественными признаками, такими как, интенсивность роста, продуктивность, толерантность к стресс-факторам среды. Использование соматоклональных вариантов в селекции ускоряет в 2 раза процесс создания нового сорта. Можно выделить соматоклональные варианты, которые сочетают в себе признаки, трудно соединяемые в одном генотипе традиционным селекционным путём, например, урожайность, высокие биохимические показатели и устойчивость к стресс-факторам. Для

обнаружения соматоклональных изменений применяются различные методы: морфологическая оценка, цитологические исследования (кариотипирование, проточная цитометрия), анализы с использованием молекулярных маркеров. Следует знать, что исследований *in vitro* недостаточно для полного выявления отклонений, требуется проверка в полевых условиях [6, 8, 27].

Соматоклональные мутанты могут быть отобраны в культуре *in vitro*, по устойчивости к патотоксинам, гербицидам и стресс-факторам. Важную роль при этом играет правильный выбор селективного агента. Использование селективных сред значительно экономит время и площадь, т. к. в одной чашке Петри можно разместить до 2 млн отдельных клеток – родоначальников клонов, а затем и растений-регенерантов, что по своей значимости эквивалентно использованию 33 га земельной площади.

Для выделения форм, устойчивых к грибным болезням, в питательную среду вводят очищенный токсин гриба или культуральную жидкость, на которой развивался патоген. Затем проводят отбор выживших регенерантов и получают соматоклоны, устойчивые к данному виду инфекции. Для получения растений толерантных к водному дефициту, необходимо подобрать селективный фактор, адекватно моделирующий в условиях *in vitro* действие засухи на целые растения. Обезвоживание клеток, сопровождающее засуху в природе можно имитировать, применяя осмотики: хлорид натрия, пролин, полиэтиленгликоль. Обезвоживание тканей растений в результате засухи или воздействия низких температур вызывает повышение уровня абсцизовой кислоты, которая в свою очередь запускает механизмы выживания клеток. Устойчивость к стресс-факторам зависит от способности быстро накапливать абсцизовую кислоту (АБК), она может быть использована в качестве агента, для отбора *in vitro*-растений, устойчивых к высокой температуре и засухе [26].

Таким образом, использование соматоклональной изменчивости имеет следующие преимущества: прежде всего – это богатый источник генетической вариабельности, 15–20 % регенерантов отличаются от исходных форм; технология клеточной селекции относительно проста по сравнению с технологией геной инженерии; методы регенерации *in vitro* совершенствуются, а значит, все большее число видов растений становится доступным для этой технологии; использование соматоклонов не ограничивается законодательными рамками, в отличие от использования растений, полученных методами геной инженерии. Основным недостатком данного метода связан прежде всего с созданием селективных условий для клеточной селекции – не хватает знаний механизмов устойчивости к стрессам, ключевых реакций, определяющих адаптации. Такие признаки, как урожайность, сроки цветения и созревания,

высота растения, интенсивность фотосинтеза и продуктивность, не проявляются на клеточном уровне. Соматоклональная изменчивость по этим признакам может быть полезной только в том случае, если она сопровождается эффективной оценкой целых растений.

#### Библиографический список

1. Баер Г.Я., Емец А.И., Стадничук Н.А. и др. Соматоклональная вариабельность как источник для создания новых сортов пальчатого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. // Цитология и генетика, 2007. – № 4. – С. 9-14. – ISSN: 0564-3783.
2. Гвасалия М.В. Биотехнологические приёмы в селекции чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования: мат. XII междунар. конф., 6-10 июня 2016, Ялта. – М.: Изд-во РУДН, 2016. – С. 308-311. – ISBN: 978-5-209-07269-0.
3. Гвасалия М.В. Сохранение уникальных сортов растений чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) методами биотехнологии // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2016. – Вып. 59. – С. 100-106. – ISSN: 2225-3068.
4. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений. – Минск: БГУ, 2007. – 102 с. – ISBN: 985-485-574-0.
5. Долгих Ю.И., Осипова Е.С., Соловьева А.И. и др. Влияние стрессов на генетическую изменчивость культивируемых тканей растений // «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология сбор. тез. X междунар. конф. «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология, Казань, 14-18 октября 2013. – Казань, 2013. – С. 64. – ISBN: 978-5-93962-626-2.
6. Долгих Ю.И. Соматоклональная изменчивость растений и возможности ее практического использования (на примере кукурузы): автореф. дис. ...д-ра биол. наук. – М., 2005. – 45 с.
7. Кунах В.А. Эволюция клеточных популяций *in vitro*: особенности, механизмы, движущие силы и следствия// Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: сбор. тез. X междунар. конф., Казань, 14-18 октября. – Казань, 2013. – С. 47. – ISBN: 978-5-93962-626-2.
8. Лебедев В.Г., Азарова А.Б., Шестибратов К.А., Деменко В.И. Проявление соматоклональной изменчивости у микроразмноженных и трансгенных растений // Известия ТСХА. – 2012. – Вып. 1. – С. 153-163. – ISSN: 0021-342X.
9. Леонова Н.С. Изменчивость в культуре картофеля (*Solanum tuberosum* (L.) *in vitro* и возможности её использования в селекции и семеноводстве: автореф. дис. ...д-ра биол. наук. – Улан-Удэ, 2010. – 32 с.
10. Осипова Е.С. Вариабельность ДНК-маркеров (RAPD, ISSR) при соматоклональной изменчивости у кукурузы: автореф. дис. ...канд. биол. наук. – М., 2003. – 26 с.
11. Скапцов М.В., Куцев М.Г. Изменения кариотипа *Rumex acetosa* L. в культуре *in vitro* на фоне явления соматоклональной изменчивости // Известия Алтайского ГУ. – 2012. – № 3-1(79). – С. 57-59. – ISSN: 1561-9443.
12. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Воронин Е.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. – М.: Высш. шк., 2003. – 469 с. – ISBN: 5-06-003535-2.
13. Arun B., Joshi A.K., Chand R., Singh B.D. Wheat somaclonal variants showing earliness, improved spotblotch resistance and higher yield // Euphytica. – 2003. – Vol. 132. – P. 235-241. – ISSN: 0014-2336.

14. Bairu M., Aremu A., Van Staden J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods [Electronic resource] – URL: [http://www.academia.edu/6075181/Somaclonal variation in plants causes and detection methods](http://www.academia.edu/6075181/Somaclonal_variation_in_plants_causes_and_detection_methods).
15. Bordallo P., Silva Derly, Maria J., Cruz C., Fontes E. Somaclonal variation on *in vitro* callus culture potato cultivars [Electronic resource] – URL: [http://www.academia.edu/13366422/Somaclonal variation on in vitro callus culture potato cultivars](http://www.academia.edu/13366422/Somaclonal_variation_on_in_vitro_callus_culture_potato_cultivars)
16. Clarindo W.R., de Carvalho C.R., Araujo F.S. et al. Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry // *Plant Cell Tissue Organ Culture*. – 2008. – Vol. 92. – P. 207-214. – ISSN: 0167-6857.
17. Hussain M., Khan G.S., Shaheen M.S., Ahmad M. Somaclonal variation in regenerated plants of ten wheat genotypes // *J. Agric. Res.* – 2001. – Vol. 39. – № 1. – P. 1-7. – ISSN: 1695-971X.
18. Jain S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement // *Euphytica*. – 2001. – Vol. 118. – P. 153-166. – ISSN: 0014-2336.
19. Kumar P.S., Mathur V.L. Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum* // *Plant Cell Tissue Organ Culture*. – 2004. – Vol. 78. – P. 267-271. – ISSN: 0167-6857.
20. Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1981. – Vol. 60. – № 4. – P. 97-214. – ISSN: 0040-5752.
21. Larkin P.J. Somaclonal variation history method and meaning // *Iowa State Journal of Reseach*. – 1987. – Vol. 61. – P. 393-434. – ISSN: 0092-6345.
22. Mishiba K.I., Tawada K.I., Mii M. Ploidy distribution in the explant tissue and the calluses induced during the initial stage of internode segment culture of *Asparagus officinalis* (L.) // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. – 2006. – Vol. 42. – P. 83-88. – ISSN: 1054-5476.
23. Nayak S., Kaur T., Mohanty S. et al. *In vitro* and ex vitro evaluation of long-term micro-propagated turmeric as analyzed through cytophotometry, phytoconstituents, biochemical and molecular markers // *Plant Growth Regulation*. – 2011. – Vol. 64. – P. 91-98. – ISSN: 0167-6903.
24. Nehra N.S., Kartha K.K., Stushnott C., Giles K.L. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry // *Plant Cell Tissue Organ Culture*. – 1992. – Vol. 29. – P. 257-268. – ISSN: 0167-6857.
25. Nontaswatsri C., Fukai S. Regenerative callus of *Dianthus* ‘Telstar Scarlet’ showing mixoploidy produce diploid plants // *Plant Cell Tissue Organ Culture*. – 2005. – Vol. 83. – P. 351-355. – ISSN: 0167-6857.
26. Rai M.K., Kalia R.K., Singh R., Gangola M. P., Dhawan A.K. Developing stress tolerant plants through in vitro selection – An overview of the recent progress // *Environ. Exp. Bot.* – 2011. – Vol. 71. – P. 89-98. – ISSN: 0098-8472.
27. Rakoczy Trojanowska M. The effect of growth regulators on somaclonal variation in rye *Secale cereal* (L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits // *Cell Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 7. – P. 1111-1120. – ISSN: 0145-5680.

## SOMACLONAL VARIABILITY IN VITRO – SOURCE FOR CREATING NEW VARIETIES OF PLANTS

**Gvasaliya M. V.**

*Federal State Budgetary Scientific Institution  
«Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops»,  
c. Sochi, Russia, e-mail: m.v.gvasaliya@mail.ru*

Traditional selection enriched with a new high-tech method of creating raw material, based on tissues and plants organs cultivated *in vitro*. Genetic changes occurring in cultured *in vitro* cells and regenerated from them plants allow improving existing varieties. Cultivating somatic cells *in vitro* extends the possibility of increasing the frequency and spectrum of mutations. Somaclonal variability, which is the source of useful genetic variations, will allow selecting *in vitro* new plant forms, with such valuable economic characteristics, as increased yield, high content of useful substances, resistance to stress factors.

**Key words:** somatic mutations, somaclonal variability *in vitro*, somaclones, somaclonal variants, callus, gemogenesis, selective media.

УДК 635.9:578:58.5

doi: 10.31360/2225-3068-2018-66-120-125

## ОСОБЕННОСТИ АДАПТАЦИИ *LILIUM CAUCASICUM* (MISCZ.) GROSSH. К УСЛОВИЯМ *EX VITRO*

Маляровская В. И., Самарина Л. С.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур»,  
г. Сочи, Россия, e-mail: malyarovskaya@yandex.ru

Изучено влияние биопрепаратов нового поколения (НВ-101, циркона, эпина, планта) на этапе адаптации к условиям *ex vitro* луковиц *Lilium caucasicum* (Miscz.) Grossh. (= *Lilium martagon* L.). Установлено, что наилучшее развитие луковичек по таким биометрическим показателям, как длина и количество корней, длина листьев, размер и масса луковичек, а также приживаемость растений отмечена на субстратах, обработанных плантом (2,5 г/л) – 92,1 % и эпином (0,5 мл/л) – 94,6 %. Наименьшие биометрические показатели, на уровне контроля, были получены на субстрате, обработанном биопрепаратом НВ-101, приживаемость растений на нем была на 2,2 % ниже, чем в контроле.

**Ключевые слова:** *Lilium caucasicum*, культура *in vitro*, биопрепараты, адаптация растений, биометрические показатели, приживаемость.

Метод биотехнологии, базирующийся на культивировании изолированных органов, тканей и клеток растений является одним из эффективных способов решения вопросов сохранения биологического разнообразия, поскольку имеет преимущества перед традиционно используемыми подходами. В ФГБНУ ВНИИЦиСК большое внимание уделяется вопросу разработки приёмов микроразмножения и сохранения редких и исчезающих видов Западного Кавказа методами биотехнологии [1–3, 5–8, 10].