

## СРАВНЕНИЕ НА ИЗМЕНЕНИЯТА В РЕЗУЛТАТ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МУТАГЕНЕЗИС И НА СОМАКЛОНАЛНОТО ВАРИРАНЕ ПРИ СОРТОВЕ ЗИМЕН ЕЧЕМИК

Боряна Дюлгерова

Институт по земеделие – Карнобат

### Резюме

Целта на настоящето проучване е да се сравнят честотата и спектърът на измененията индуцирани в резултат на експериментален мутагенезис и на соматклоналното вариране при три сорта зимен ечемик. Изследването е проведено в Институт по земеделие – Карнобат през периода 2003-2008 година. Честотата на измененията получени във второ мутантно и регенерантно потомство се определя като процент изменени потомства от общия брой проучвани потомства след потвърждаването на тяхното наследяване в следващите поколение. Получените резултати показват, че соматклоналното вариране при ечемика води до значително вариране на полигенните признаци и е възможно създаване на нови високодобивни генотипове, с високо качество и устойчивост на биотични и абиотични стресови фактори.

**Ключови думи:** ечемик, соматклонално вариране, мутагенезис

### Abstract

*Dyulgerova, B., 2014. A comparison of changes result from induced mutagenesis and somaclonal variation of winter barley varieties*

The aim of this study was to compare the frequency and spectrum of changes induced as a result of experimental mutagenesis and somaclonal variation in three winter barley varieties. The study was conducted in the Institute of Agriculture – Karnobat during the period 2002/2003 – 2007/2008. Frequency of changes in the second mutant and regenerant generation was defined as the percentage of the total studied generations after confirmation of their inheritance to the next generation. Our results indicate that somaclonal variation was generated significantly variation in polygenic traits of barley and it is thus possible to develop a new high-yielding genotypes, with high quality and resistance to biotic and abiotic stress factors.

**Key words:** barley, somaclonal variation, mutagenesis

### УВОД

Досегашният селекционен напредък при подобряването на ечемика, както у нас така и в световен мащаб се основава предимно на използването на вътревидовата хибридизация и възникващите рекомбинации от кръстосването на сравнително ограничен набор от елитни сортове. Включването на малък брой от близкородствени линии ограничава генетичното разнообразие и води до повишаване на еднообразието, загубата на ценни алели и свързаното с това силно понижаване на адаптивните способности на генотиповете към променящите се климатични условия и подобряването на продуктивността в дългосрочен план.

Това налага използването и на други ефективни методи за създаване на генетично разнообразие в селекционния процес на ечемика. През последните 20-30 години със задълбочаване на познанията и увеличаване на технологичните възможности наред с доразвиването на традиционните методи се създават и нови. Включването им в селекционния процес е предпоставка за повишаване на изходното генетично разнообразие и по-успешно достигане до поставените цели.

Експерименталният мутагенезис е мощно средство за индуциране на генетично разнообразие. В зависимост от признака, който се цели да бъде подобрен и начина на отбор, той може да се превърне не само в полезен, но в определени случаи и в най-подходящия или единствено възможен селекционен метод.

Съвременните биотехнологични методи предлагат нови възможности за разширяване на генетичното разнообразие при растенията. Вариабилността на регенерантите, получена в резултат на процеса на *in vitro* култивиране е известна като соматклонално вариране, започва да допълва традиционните селекционни методи.

Предимството на прилагането на индуциран мутагенезис или на соматклонално вариране, пред това да се включват в хибридизационните програми неадаптирани или примитивни форми ечемик произтича от факта, че изменените алели възникват в генотипове, които вече са отбрани заради висок добив и ценни агрономически и качествени характеристики.

Целта на настоящето проучване е да се сравнят честотата и спектърът на измененията индуцирани в резултат на експериментален мутагенезис и на соматклоналното вариране при три сорта зимен ечемик.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването е проведено в Институт по земеделие – Карнобат през периода 2003-2008 година. За изходен материал са използвани сортовете: Веслец (Запрянов и кол., 1996), Перун (Навущанов и кол., 1997) и Емон (Мерсинков, 2003). Начина на получаване на мутантните и соматклоналните линии е обект на предишни публикации (Дюлгерова, 2009; 2010).

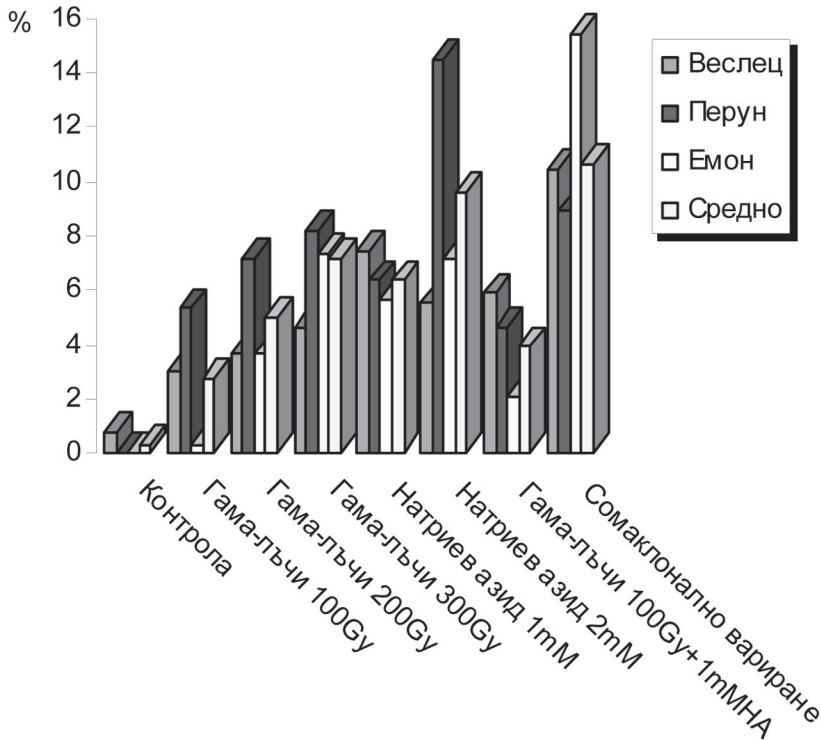
Честотата на измененията получени във второ мутантно и регенерантно потомство се определя като процент изменени потомства от общия брой проучвани потомства след потвърждаването на тяхното наследяване в следващите поколения.

През периода 2006-2008 година отбраните мутантни и соматклонални линии са проучвани в сравнителни опити в блокова схема в 4 повторения и размер на реколтната парцелка от 10 m<sup>2</sup>. Използвана е стандартната технология за отглеждане на селекционни материали, възприета в ИЗ – Карнобат.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Сравнението на общата честота на морфологичните изменения (хло-рофилните мутации са изключени) във второ мутантно и регенерантно потомство показва, че средната честота на соматклонално вариране при

трите сорта е по-висока от най-високата средна честота получена след мутагенно третиране (Фигура 1).



Фигура 1. Обща честота на видимите изменения във второ мутантно и регенерантно потомство (хлорофилните мутации са изключени)

Figure 1. Total frequency of visible changes in second mutant and regenerant generations (chlorophyll mutations was excluded)

При най-мутабилният от проучваните сортове – Перун е отчетена най-ниска честота на соматклонално вариране и обратно при сорт Емон, при който в почти всички варианти е отчетена най-ниска честота на мутиране е установена най-високата честота на соматклонални изменения. Различната честота на изменения в резултат на соматклонално вариране и на индуциран мутагенезис при един и същ сорт предполага, че при сортове с агрономическо значение, имащи ниска мутабилност, чрез соматклонално вариране може да се индуцира генетично разнообразие по представляващи интерес агрономически признаци.

Оценката на морфологичните изменения отбрани във второ регенерантно потомство показва, че повечето от получените изменения в резултат от *in vitro* култивирането нямат селекционна стойност. Единствените изменения отбрани във  $R_2$  поколение в нашето проучване, които могат да

имат селекционно приложение са нискостъблените соматклонове получени от сорт Веслец. При тези соматклонални варианти по-ниското стъбло е съчетано с къс, нископродуктивен клас. Възможността за използването им в селекцията зависи от това дали след включване в хибридизация ще се получат растения, съчетаващи ниско стъбло и продуктивен клас. От друга страна чрез индуцирания мутагенезис е получено голямо разнообразие от изменения, засягащи агрономически признаци. Индуцирани са мутанти, които се отличават по дължината и плътността на класа, по броя и масата на зърната в един клас. С висока селекционна стойност са получените голозърнести мутанти поради това, че признака “голо зърно” е индуциран в добре адаптирани към местните условия високопродуктивни съвременни сортове. Трите голозърнести мутанта отбрани в нашия експеримент са получени след третиране с натриев азид, поради което считаме, че този мутаген е подходящ за използване в мутационната селекция за получаване на голозърнести сортове ечемик. Според литературни данни получените типове морфологични мутации се наследяват монофакториално (Franckowiak, Lundqvistq, 2002). Следователно в нашето изследване чрез експериментален мутагенезис, за разлика от соматклоналното вариране, са се получили повече селекционно ценни изменения по признаци, които са моногенно наследяващи се.

При повечето макромутанти получени в настоящето проучване, наред с изменения в положителна посока селекционен признак по който са отбрани, се наблюдава влошаване спрямо изходните сортове на един или повече от селекционните признаци. Поради това те не могат директно да се използват като сортове. Окончателно селекционната им стойност като изходен материал, може да бъде оценена само след включването им в хибридизация и проверка на възможността за наследяване на желаните мутантен признак, без негативните изменения на останалите признаци. Независимо от селекционната стойност, получените макромутанти могат да бъдат използвани като изходен материал за прилагане на мутантен хетерозис при ечемика.

В литературата са описани случаи, когато в резултат на соматклонално вариране са наблюдавани „нови” изменения, каквито не са получавани при прилагане на индуциран мутагенезис (Orton 1985; Gavazzi et al., 1987; Ling 1987; Jain, Newton, 1989). Въпреки това според наблюденията на повечето автори (Cheng et al., 1990; van den Bulk et al., 1990; Bregitzer, Poulson, 1995; Bregitzer et al., 1998; Бешкова, 1999; Encheva et al., 2003; Cole, 2006) соматклоналното вариране генерира генотипове, които морфологично са аналогични на получените чрез експерименталния мутагенезис. Индуцираните чрез *in vitro* култивиране варианти в нашето проучване също не са нови форми, а са подобни на измененията, получени след мутагенно въздействие.

Биометричният анализ разкрива, че значителна част от регенерантните потомства се отличават от изходните сортове по проучваните количествени признаци. Наблюдава се вариране между регенерантните потомства по: продуктивна братимост, дължина на класа, брой класчета в клас, брой зърна в клас, тегло на зърното от клас и тегло на зърното от едно растение. В трето регенерантно потомство получено след култивиране на незрели

зародиши ечемик Cole (2006), също установява изменения на по-голяма част от проучваните от него признаци – височина на растенията, продуктивна братимост, площ на класа, брой класчета и брой зърна в клас, тегло на 100 зърна и тегло на зърната от едно растение. Според Evans и Sharp (1983) при около 20% от регенератните растения получени след тъканно култивиране при пшеницата са наблюдават изменения на един или повече признаци. Съобщения за висока честота на соматклонално вариране има при овеса 50.75% (Linacero, Vazquez, 1993) и при ориза – 52.4% (Chatterjee, Gupta, 1997).

Получените в нашият опит соматклонални линии, отличаващи се от изходните сортове с по-голям брой продуктивни братя, по-ниско стъбло, по-дълъг клас с повече класчета и зърна и по-високо тегло на зърното от централния клас и едно растение, висок и стабилен добив, потвърждават възможността на соматклоналното вариране, установена при различни култури в т. ч. и при ечемика да индуцира изменени форми със селекционна стойност (Bozhanova, Dechev, 2002; Rakoczy-Trojanowska, 2002; Arun et al., 2003; Devi et al., 2007; Grauda et al., 2007).

В резултат на приложения в това изследване индуциран мутагенезис и *in vitro* култивиране са създадени и отбрани линии с по-високо продуктивност от изходните сортове. Анализът показва, че за получаването на 11-те мутантни линии с висока продуктивност (добив над 5% средно за три години) в  $M_2$  са отгледани и проучени 5205 потомства, докато 14 соматклонални линии с по-висока продуктивност са отбрани от общо 134  $R_2$  потомства. Това предполага, че при соматклоналното вариране за откриването на генотипове с подобрена продуктивност е необходимо да се отглеждат и анализират по-малък брой потомства в сравнение с необходимия брой мутантни потомства, а от тук и намаляване на нужните в началните селекционни звена площ, средства и труд. От друга страна, прилагането на соматклоналното вариране като метод за създаване на генетично разнообразие е свързано с допълнителни разходи за получаване на първични регенеранти. За по-висока честота на изменения на агрономически признаци в следствие на соматклонално вариране в сравнение с тези получени след третиране с етил-метансулфонат и облъчване с гамалъчи при *Brassica juncea* докладват Anuradha et al. (1992).

Значителното вариране на количествените признаци установено в трето регенерантно потомство и високият процент на соматклонални линии с изменена продуктивност получени в нашето проучване показват, че соматклоналното вариране е генерирало повече изменения с агрономическа стойност, засягащи полигенно детерминирани признаци отколкото такива, които се наследяват моногенно. Тази констатация се присъединява към направените от Duncan (1997) и Veilleux и Johnson (1998) обобщения относно соматклоналното вариране при различни култури, демонстриращи че в регенерантните потомства се наблюдава вариране по количествени признаци с голяма честота, а проучванията по наследяване показват изменения в многобройни локуси. Според Micke, 1999 широк набор от изменения в ядрените и цитоплазмените генетични елементи са в основата на наблюдаваното голямо фенотипно вариране, като голяма част от тях имат епигенетична природа. Phillips et al. (1990) изказват предположението, че

метирането може да повиши варирането на количествени признаци, тъй като то влияе едновременно върху няколко различни гени. Макар и все още да се дебатира в научната литература за влиянието на ДНК – метирането върху генната експресия, вече има натрупани факти, че метирането на цитозина корелира с промяна на генната експресия при растенията. Многобройни по-нови изследвания на молекулярно ниво демонстрират, че голяма част от индуцираното соматклонално вариране се дължи и на епигенетични изменения в т.ч. и на метиране (Kaeppler et al., 2000; Li et al., 2007; Bednarek et al., 2007; Temel et al., 2008). Разбира се необходимо е да бъде натрупана и обобщена допълнителна информация, за да се потвърди ролята на епигенетичните процеси в индуцирането на соматклоналното вариране. Създадените чрез това изследване соматклонални линии могат да се използват в тази посока в бъдещи теоретични изследвания съвместно с молекулярни биолози.

## ИЗВОДИ

Независимо от неизяснените механизми, стоящи в основата на феномена соматклонално вариране, нашите резултати показват, че това е подходяща стратегия за генетично манипулиране на полигенно наследяващи се признаци и е алтернативен метод за създаване на нови по-високодобивни сортове, с по-високо качество и устойчивост на биотични и абиотични стресови въздействия.

## ЛИТЕРАТУРА

- Бешкова, Н., 1999.** Биологична и биохимична характеристика на линии от зимна обикновена пшеница *Triticum aestivum* L., получени след *in vitro* – култивиране, Автореферат на дисертация за присъждане на научна и образователна степен „Доктор“, Добрич.
- Дюлгерова, Б., 2009.** Мутагенна ефективност на гама-лъчите, натриевия азид и комбинираното им приложение при ечемика, Растениевъдни науки, Vol. XLVI, 243-246.
- Дюлгерова, Б., 2010.** Проучване на регенерационната способност на сортове зимен ечемик, Field Crops Studies, Vol.1, № 2, 43-48.
- Запрянов, С., И. Тодоров, Й. Бургазава, П. Атанасов, 1996.** Биологични и стопански особености на зимния многореден ечемик сорт Веслец, Научни трудове, Том VII, Селскостопанска академия, София, 69-71.
- Мерсинков, Н., 2003.** Зимен двуреден пивоварен ечемик сорт Емон, Растениевъдни науки, 40, 184-186.
- Навущанов, Ст., Д. Вълчева, Др. Вълчев, 1997.** Биологични и стопански особености на зимния двуреден ечемик сорт Перун, Растениевъдни науки, бр. 1, 38-39.
- Anuradha, G., S. B. Narasimhulu, V. Arunachalam, V. L. Chopra, 1992.** A Comparative Evaluation of Somaclonal, Gamma Ray and EMS Induced Variation in Brassica juncea. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, Vol. 1, Issue 2, 22-43.

- Arun, B., A. K. Josh, R. Chand, B. D. Singh, 2003.** Wheat somaclonal variants showing earliness, improved spot blotch resistance and higher yield, *Euphytica*, Vol. 132, 3, 235-241.
- Bednarek, P., R. Orłowska, R. Koebner, J. Zimny, 2007.** Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.) *BMC Plant Biology*, 7, 1-9.
- Bozhanova, V., D. Dechev, 2002.** Assessment of tissue culture-durum wheat lines for somaclonal variation, *Cereal Res. Commun*, Vol. 30, No 3-4, 277-285.
- Bregitzer, Ph., M. Poulson, 1995.** Agronomic Performance of Barley Lines Derived from Tissue Culture., *Crop Sci.*, 35, 1144-1148.
- Bregitzer, Ph., S. E. Halbert, P. G. Lemaux, 1998.** Somaclonal variation in the progeny of transgenic barley, *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 96, 421-425.
- Chang, X. Y., M. W. Gao, Z. Q. Lian, K. Z. Liu, 1990.** Effect of mutagenic treatments on somaclonal variation in wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant Breeding*, 105, 47-52.
- Chatterjee, B., P. D. Gupta, 1998.** Induction of somaclonal variation by tissue culture and cytogenetic analysis in *Oryza sativa* L. *Biologia Plantarum*, Vol. 40, 1, 25-32.
- Cole, P., 2006.** Variability, correlation and Regression Analysis in Third Somaclonal Generation of Barley, *Barley Genetic Newleter*, 36, 44-47.
- Devi, S. N., B. Daniel, S. K. Mathew, P. A. Nazeem, T. R. Gopalakrishan, 2007.** Exploitation of Somaclonal Variation in Breeding for Resistance to Tomato Leaf Curl Virus Disease in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), *Recent trends in Horticultural Biotrchnology*, Eds. Kashvachandran R. et al., New India Publishing Agency, 353-357.
- Duncan, R. R., 1997.** Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Adv. Agron.*, 58, 201-240.
- Encheva J., F. Tsvetkova, P. Ivanov, 2003.** A Comparison Between Somaclonal Variation And Induced Mutagenesis In Tissue Culture Of Sunflower Line Z-8-A (*Helianthus annuus* L.), *HELIA*, 26, 38, 91-98.
- Franckowiak, J. D., U. Lundqvist, 2002.** Descriptions of barley genetic stocks for 2001, *Barley Genetics Newsletter* 32, 49-137.
- Gavazzi G., C. Tonelli, G. Todesco, E. Arreghini, F. Raffaldi, F. Vecchio, G. Barbuzzi, M. Biasini, F. Sala, 1987.** Somaclonal variation versus chemically induced mutagenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 74, 733-738.
- Grauda D., L. Legzdina, I. Rashal, 2007.** Use of somaclonal variation for obtaining of barley breeding source matherial, *Agriculture*, vol. 94, 4, 105-110.
- Jain, S. M., R. J. Newton, 1989.** Evaluation of protoclonal variation versus chemically induced mutagenesis in *Brassica napus* L. *Current Sci.*, 58, 176-180.
- Kaeppler, S. M., H. F. Kaeppler, Y. Rhee, 2000.** Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants, *Plant Molecular Biology*, Vol. 43, 179-188.

- Li, X., X. Yu, N. Wang, Q. Feng, Z. Dong, L. Liu, J. Shen, B. Liu, 2007.** Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (*Hordeum brevisubulatum*), Plant cell, tissue and organ culture, Vol. 90, 2, 153-168.
- Linacero, R., A. M. Vázquez, 1993.** Somaclonal variation in rye. Mutation Research Letters, Vol. 302, Issue 4, 201-205.
- Ling, D. H., 1987.** A quintuple reciprocal translocation produced by somaclonal variation in rice, Cereal Res. Commun. 15, 5.
- Micke, A., 1999.** Mutations in plant breeding, In: B.A. Siddiqui & S. Khan (Eds.), Breeding in Crop Plants- Mutations and *in vitro* Mutation Breeding, 1-19, Kalyani Publishers, New Delhi, India.
- Phillips, R. L., S. M. Kaeppler, V. M. Peschke, 1990.** Do we understand somaclonal variation? In: H.J.J. Nijkamp, L.H.W. van der Plas & J. van Aartrijk (Eds.), Proceedings of the 7th International Congress on Plant Tissue Cell Culture, 131-141, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Rakoczy-Trojanowska, M., 2002.** The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits. Cellular & Molecular Biology Letters, Vol. 7, 1111-1120.
- Temel A., G. Kartal, N. Gozukirmizi, 2008.** Genetic and epigenetic variations in barley calli cultures, Biotechnol. & Biotechnol. Eq., 22, 4, 911-914.
- van den Bulk, R. W., H. J. M. Löffler, W. H. Lindhout, M. Koornneef, 1990.** Somaclonal variation in tomato: effect of explant source and a comparison with chemical mutagenesis. Theoretical and Applied Genetics, Vol. 80, 6, 817-825.
- Veilleux, R. E., A. T. Johnson, 1998.** Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization. Plant Breed. Rev., 16, 229-268.
- Avans, D. A., W. R. Sharp, 1983.** Singel gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture, Science 221, 949-951.