

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»)

На правах рукописи

БЫЧКОВА Ольга Владимировна

**СОЗДАНИЕ СТРЕССОУСТОЙЧИВОГО МАТЕРИАЛА ТВЕРДОЙ
ПШЕНИЦЫ МЕТОДОМ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ**

Специальность 06.01.05 – селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор
Соколова Г.Г.

Барнаул – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	10
1.1. Механизмы устойчивости растений к засухе	10
1.1.1. Анатомо-морфологические механизмы засухоустойчивости	12
1.1.2. Физиолого-биохимические механизмы засухоустойчивости	17
1.2. Методы диагностики засухоустойчивости сельскохозяйственных растений	22
1.2.1. Классические методы оценки	22
1.2.2. Тестирование <i>in vitro</i>	27
1.2.3. Молекулярно-генетическое картирование.....	29
ГЛАВА 2. УСЛОВИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ	36
2.1. Объект исследования	36
2.2. Метеорологические условия	41
2.3. Методы исследования	43
ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ ФОРМООБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ ЯРОВОЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ <i>IN VITRO</i>	50
3.1. Оптимизация технологии получения растений-регенерантов яровой твердой пшеницы в культуре <i>in vitro</i>	50
3.1.1. Типы экспланта.....	50
3.1.2. Период культивирования	58

3.1.3. Селективный фактор	65
3.2. Отбор стрессоустойчивых клеточных линий и регенерантов яровой твердой пшеницы на селективных средах	76
3.2.1. Каллусогенез	76
3.2.2. Морфогенез	80
3.2.3. Регенерация	83
3.3. Влияние различных факторов на каллусогенез и морфогенетические процессы яровой твердой пшеницы	88
ГЛАВА 4. ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ СОМАКЛОНАЛЬНЫХ ЛИНИЙ ЯРОВОЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ	94
4.1. Влияние солевого и осмотического стрессов на показатели семян и проростков	94
4.2. Оценка осмотической адаптации методом пыльцевого анализа	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	121
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	125
ПРИЛОЖЕНИЯ	166

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота;

АБК – абсцизовая кислота;

ГБ – глицин-бетаин;

ИИ – интегративный индекс;

ИИУ – интегративный индекс устойчивости;

ИУ – индекс устойчивости;

МС – питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга;

ОА – осмотическая адаптация;

ПЭГ – полиэтиленгликоль;

ПЭГ-6000 – полиэтиленгликоль с молекулярной массой 6000;

AFLP маркер (*amplified fragment length polymorphism*) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов;

CAPS маркеры (*cleaved amplified polymorphic sequences*) – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности;

QTL – локус количественного признака;

RAPD маркеры (*random amplified polymorphic DNA*) – случайно амплифицированная полиморфная ДНК;

RFLP маркеры (*restriction fragment length polymorphism*) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов;

SNP маркер (*single-nucleotide polymorphism*) – однонуклеотидный полиморфизм;

SSRs маркер (*simple sequence repeats*) – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты).

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Твердая пшеница, зерно которой является особо ценным сырьем для производства высококачественных макаронных и крупяных изделий, диетического и детского питания, в России относится к остродефицитным культурам. Производство ее сокращается, составляя при этом 0,5–0,7 млн. т в год, что не позволяет удовлетворять даже внутренний рынок. Годовая потребность в зерне *Triticum durum* Desf. – около 2 млн. т, а с учетом мирового рынка – до 4 млн. т (Производство высококачественного зерна ..., 2010).

Одной из причин снижения зернового производства твердой пшеницы является ее низкая урожайность по сравнению с мягкой и даже яровым ячменем (Самофалова, Иличкин, Лещенко и др., 2015). Неконкурентоспособность данной культуры становится особенно очевидной в связи с глобальным потеплением климата, усилением его аридности, а также с увеличением посевных площадей с избыточным засолением.

Алтайский край – крупнейший производитель высококачественного зерна твердой пшеницы на востоке России. Однако ключевым агроэкологическим риском для зернового комплекса края является возможное ухудшение погодных-климатических условий в виде повторяющихся засух. Так, 2010 г. оказался типичным для нашего региона, где наблюдали раннелетнюю засуху средней интенсивности. В 2012 г. наблюдалась жесткая засуха на протяжении всего вегетационного периода (с кратковременной разрядкой дефицита влаги в конце первой декады июля), сопровождавшаяся высокими среднесуточными температурами, значительно превышавшими среднемноголетние величины. Снижение урожайности яровой твердой пшеницы составило 34 и 78%, соответственно (Розова, Зиборов, 2016).

Основные площади возделывания культуры значительно различаются по уровню увлажнения и плодородия почв. Кроме того, на этих территориях

распространены ареалы с избыточным засолением (Почвы Алтайского края, 1999; Панкова, Конюшкова, Горохова, 2017). В связи с этим направления селекции твердой пшеницы для этих районов носят многоплановый характер. Однако в качестве стратегической задачи, как правило, определялось создание генотипов, адаптивных к осмотическому стрессу.

Внедрение в производство новых сортов способствует росту урожайности на 30–40% (Васильчук, 2005). При этом роль генотипа, по мнению В.А. Кумакова (1985), возрастает по мере повышения уровня урожайности. Эффективность создания адаптированных к местным условиям сортов зависит от целого комплекса факторов, среди которых одним из ведущих является подбор исходного материала (Розова, Зиборов, 2016). Известно, что тетраплоидные виды, в том числе твёрдая пшеница имеют более узкий спектр генотипического разнообразия по реакции на стрессовое воздействие в сравнении с мягкой пшеницей (Гончаров, 2012).

Одним из динамично развивающихся направлений, ориентированных на создание нового исходного материала для селекции, являются биотехнологические методы, базирующиеся на возможностях культивирования растительных тканей и органов в условиях *in vitro*. Особенностью культуры соматических тканей растений является возможность регенерации полноценных организмов благодаря свойству тотипотентности растительной клетки. Известно, что пролиферация соматических клеток *in vitro* сопровождается генетическими и эпигенетическими изменениями, часть из которых реализуется в растениях-регенерантах. Возникающая таким образом генетическая вариабельность, названная соматклональной, расширяет спектр изменчивости исходного материала, повышая эффективность отбора, в том числе по устойчивости к стрессам (Долгих, 2005; Rai, Kalia, Singh et al., 2011). Идентификация генотипов с выраженной соле- и осмоустойчивостью на основе соматклональной изменчивости, а также оценка исходного материала на

клеточном и организменном уровне позволит выделить образцы, перспективные для селекции засухо- и солеустойчивых сортов.

Цель исследования: разработать селективную систему для создания исходного материала яровой твердой пшеницы, устойчивого к засолению и осмотическому стрессу, методом клеточной селекции в культуре *in vitro*.

Задачи исследования:

1. Провести оптимизацию технологии получения соматклонов яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro*.

2. Изучить особенности формирования стрессоустойчивых клеточных линий и регенерантов яровой твердой пшеницы на селективных средах *in vitro*.

3. Оценить влияние генотипа, условий выращивания доноров эксплантов и стресс-факторов в питательной среде на культуральные процессы в условиях *in vitro*.

4. Провести физиологическую оценку соматклональных линий яровой твердой пшеницы по устойчивости к солевому и осмотическому стрессу.

Научная новизна. Впервые определены закономерности формирования *in vitro* стрессоустойчивых клеточных линий и регенерантов яровой твердой пшеницы на селективных средах, содержащих осмотические компоненты. Проведена комплексная физиологическая оценка реакции полученных соматклональных линий по устойчивости к избыточному засолению и осмотическому стрессу. На основании частных и общих интегративных индексов устойчивости с помощью классификационных функций, предложенных автором, проведена классификация генотипов по устойчивости к засухе. Впервые методом пыльцевого анализа выполнено ранжирование образцов по наличию внутренней и индуцированной осмотической регуляции, выделены перспективные для селекции генотипы, обладающие высокой осмотической адаптацией.

Положения, выносимые на защиту:

- особенности формирования стрессоустойчивых клеточных линий и регенерантов яровой твердой пшеницы на селективных средах *in vitro*;
- соматональные линии яровой твердой пшеницы, устойчивые к солевому и осмотическому стрессу.

Теоретическая и практическая значимость. Разработана система отбора *in vitro* устойчивых к осмотическому и солевому стрессу соматональных вариантов яровой твердой пшеницы. Определен вклад различных факторов в реализацию каллусогенеза, морфогенеза и регенерационных процессов генотипов. Показана корреляция между полевой устойчивостью к засухе и регенерационным потенциалом образцов в селективных условиях в культуре зрелых и незрелых зародышей. Предложена система физиологической оценки засухо- и солеустойчивости семян и проростков яровой твердой пшеницы, которая может быть использована в научно-исследовательских лабораториях. На основе комплексной лабораторной оценки выделены перспективные линии для использования в селекции яровой твердой пшеницы на соле- и засухоустойчивость (прил. 1).

Результаты исследований используются при чтении лекционных курсов и проведении лабораторно-практических занятий по дисциплинам «Биотехнология», «Биотехнология растений», «Большой практикум» (профиль – биотехнология) по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (прил. 2).

Апробация работы. Результаты исследований были доложены на VII и VIII Всероссийской научно-практической конференции «Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности» (г. Бийск, 2014, 2015); XIII Международной научной конференции «Агроэкологические аспекты устойчивого развития АПК» (г. Брянск, 2016); Международной научно-практической конференции

«Биотехнология и общество в XXI веке» (г. Барнаул, 2015) и на I Международном форуме студентов и молодых ученых (г. Барнаул 2017).

Публикация материалов исследований. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в числе которых 2 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ, 1 статья в журнале, индексируемом в базе данных Web of Science.

Личный вклад соискателя. Работа выполнена автором самостоятельно на базе лабораторий кафедры экологии, биохимии и биотехнологии и Алтайского центра прикладной биотехнологии ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет». Все лабораторные исследования, анализ, интерпретация и представление информации проведены лично автором.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Работа изложена на 180 страницах машинописного текста, содержит 22 таблиц, 38 рисунков, 25 приложения. Список литературы включает 390 источника, в том числе 186 на иностранном языке.

Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность научному руководителю д.б.н., профессору Галине Геннадьевне Соколовой и к.б.н., доценту кафедры экологии, биохимии и биотехнологии Любови Петровне Хлебовой за помощь и поддержку, оказанные при подготовке и написании диссертационной работы, а также сотрудникам лаборатории селекции твердой пшеницы АНИИСХ Федерального Алтайского научного центра агробiotехнологий за предоставление семян исходных генотипов твердой пшеницы и методическую помощь в организации экспериментов.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Механизмы устойчивости растений к засухе

Засуха – комплексное явление, которое может рассматриваться с нескольких точек зрения. Центральное место в определениях засухи занимает понятие дефицита влаги, который наблюдается в различных климатических зонах и приносит не только большой экономический ущерб, но и приводит к усугублению проблем продовольственной безопасности из-за повышения цен на продукты питания.

Существуют разные подходы к классификации засух. Ряд исследователей в своих работах придерживаются классификации засухи по нескольким показателям:

- по количеству выпавших за месяц осадков;
- по степени снижения урожайности по сравнению с предыдущими годами;
- по продолжительности бездождевого периода;
- по сезону года;
- по интенсивности и охвату территорий и т.д. (Селянинов, 1958; Бучинский, 1976; Турманидзе, 1981; Головоченко, 1999; Семенов, 2012; Крупнов, 2013).

В зависимости от среды, в которой наблюдаются признаки дефицита влаги, выделяют атмосферные, почвенные и атмосферно-почвенные засухи (Бучинский, 1976; Логинов, Неушкин, Рочева, 1976; Оценочный доклад..., 2008; Ионова, 2011). Кроме того, при классификации засух их различают по народнохозяйственным или иным специальным признакам. Зачастую к почвенной и атмосферной засухе добавляют гидрологическую, сельскохозяйственную (Щербенко, 2007; Шихов, 2013), а также социально-

экономическую (Дмитринко, 1992). В зарубежной литературе распространение имеет более детальная классификация засух, учитывающая виды и выраженность их последствий (American Meteorological Society, 1997).

Засуха – самый сложный и разрушительный абиотический стрессор, который характеризуется не просто недостатком воды, а сложной комбинацией дефицита влаги, температурного стресса, сухого воздуха («суховей»), засоления почвы и других абиотических факторов. Ущерб от нее превышает ущерб от любого другого стрессора (Крупнов, 2013). На территории современной России сильные засухи наблюдали в 2010 и 2012 гг. Так, в 2010 году аномальная засуха привела к потерям 50 млн т зерновых. Экономический ущерб составил 250 млрд рублей (при ценах 2011 г.). В 2012 году, в связи с засухой, на территориях 20 регионов России было объявлено чрезвычайное положение. Были уничтожены сельскохозяйственные культуры, в том числе зерновые и бобовые, на 7,6% общих посевных площадей. Ущерб составил около 37 млрд рублей (Проблемы адаптации ..., 2012).

Засухоустойчивость растений – динамичный признак, развивающийся в онтогенезе под воздействием засухи благодаря наличию ряда свойств, возникших в филогенезе под влиянием естественного отбора (Максимов, 1925; Мамонов, 1987; Маймистов, 1988; Жученко, 1994; Ионова, Скворцова, 2013). В широком понимании это способность растения в условиях засухи с наименьшим ущербом осуществлять рост, развитие и воспроизведение. Как явление засухоустойчивость подразделяют на физиологическую, биологическую и агрономическую (Шаманин, Трущенко, 2006). С точки зрения селекционного процесса, засухоустойчивость лучше всего рассматривать как агрономическое понятие, которое связывается с продуктивностью и урожайностью растений. Таким образом, засухоустойчивость сельскохозяйственных растений – это комплексный признак, связанный с рядом их морфологических, физиологических и

биохимических приспособлений на различных уровнях организации. Такие растения способны переносить временное обезвоживание с наименьшим снижением ростовых процессов и урожайности (Третьяков, 2005).

Адаптация растений к засухе включает не только физиологические механизмы избегания стресса, но и саму устойчивость к дефициту влаги (Der Maris, Juenger, 2010). Часто засуха сопровождается высокой температурой и рядом других неблагоприятных факторов, что затрудняет выделение эффекта дефицита воды. В таких условиях о засухоустойчивости образца судят по урожайности (Blum, 2009; Richards, Rebetzke, Watt et al., 2010). Дефицит воды может снижать урожайность зерна в разные этапы вегетации за счет ухудшения формирования сплошного полога, сдвига сроков цветения и оплодотворения, снижения формирования и налива зерна и т.д. (Wardlaw, Willenbrink, 2000; Frederick, Camp, Bauer, 2001; Samarah, 2005; Estrada-Campuzano, Miralles, Slafer, 2008). Вместе с тем, не выявлено ни одного гена, который бы обеспечивал устойчивость ко всем типам засухи (Sinclair, 2011; Passioura, 2012).

Изучение адаптации растений к экстремальным условиям среды является одним из наиболее важных и интересных направлений в биологии. Различные типы засух и их комбинации обуславливают многообразие защитных свойств растений, которые реализуются на клеточном, организменном и популяционном уровнях (Удовенко, 1979; Альтергот, Мордокович, Фадеева 1998) и обеспечиваются комплексом анатомо-морфологических и физиолого-биохимических механизмов.

1.1.1. Анатомо-морфологические механизмы засухоустойчивости

Попытки связать устойчивость растений к недостатку воды с их анатомо-морфологическими особенностями были едва ли не первыми на пути создания теории засухоустойчивости. Ученые искали и находили определенную зависимость засухоустойчивости растений от величины

клеток, числа и размера устьиц, наличия воскового налета, опушения и размера листа. Увязывали засухоустойчивость с размером и характером жилкования листа, окраской колоса и его остистостью (Sandquist, Ehleringer, 2003; Ионова, 2011). Например, В.В. Колкунов (1905) считал, что засухоустойчивость растений тесно связана с их анатомическими коэффициентами, т. е. числами, выражающими величину и число анатомических элементов тканей. Автор пришел к выводу о большей целесообразности форм растений с мелкими клетками в сравнении с крупноклеточными, что обусловлено меньшей величиной межклетников и небольшими размерами устьиц (Колкунов, 1926). Мелкоклеточные формы обладают высокой водоудерживающей способностью за счет отрицательного тургорного давления, которое увеличивается при небольшой потере воды (Taiz, Zeiger, 2006). Мелкие клетки способны выдержать более сильный отрицательный тургор, чем большие, и это может быть важным фактором в адаптации к засухе. Данное положение подтверждают и более современные исследования (Холодова, Мещеряков, Александрова и др., 2001; Кошкин, Гатаулина, Дьяков и др., 2005; Ионова, 2011).

Однако существует мнение, что обнаружение корреляции между засухоустойчивостью и размером клеток часто объясняется оценкой выживания растения в полевых условиях (Маймистов, 2000), а не его истинной устойчивости.

Увеличение числа и размера клеток – это процесс, который находится под влиянием внешних раздражителей, в том числе водообеспеченности. Большинство исследователей признают, что недостаток влаги приводит к снижению роста клеток растяжением (Nonami, 1998; Kaaya, Okçub, Ataka et al., 2006; Hussain, Malik, Farooq et al., 2008), в то время как данные о влиянии дефицита влаги на пролиферацию противоречивы. Одни авторы (Петинов, 1959; Прусакова, 1963; Судачкова, Романова, Милютина, 2015) отмечают, что сокращение площади листовых пластинок вызвано не только мелкоклеточностью, но и уменьшением числа клеток в листе. Другие

(Слейчер, 1970) полагают, что засуха не влияет на процесс деления клеток. Изучение мезоструктуры первого листа проростков пшеницы, выращенных на питательных средах с различной жесткостью осмотического стресса, показало, что при умеренном стрессе число клеток в расчете на весь лист не изменилось при сокращении объема отдельной клетки на треть. При более жестком стрессе объем клетки уменьшился более чем в 2 раза, а число клеток в листе сократилось почти в 1,5 раза (Демченко, 1994). Таким образом, очевидно, что процесс пролиферации значительно устойчивее к обезвоживанию, чем рост клеток растяжением.

Умеренный осмотический стресс приводит к торможению роста листьев и стеблей растения, однако рост корней продолжает увеличиваться (Westgate, Boyer, 1985; Sharp, Hsiao, Silk, 1988; Nonami, Boyer, 1990). По этой причине ряд ученых связывают устойчивость к засухе с темпами нарастания и мощностью корневой системы (Лукина, Слушная, 1971; Price, Cairas, Horton et al., 2002; Xiong, Wang, Mao et al., 2006; Ткачев, Гуляев, 2010). Продолжение роста корней при воздействии осмотического стресса является адаптивным механизмом для облегчения поглощения влаги из более глубоких слоев почв (Bartels, Sunkar, 2005). Другие рассматривают сосущую силу клеток растений как фактор засухоустойчивости (Дорошенко, Захарчук, Рязанова, 2010).

Обезвоживание тканей, возникающее во время засухи, изменяет ход физиолого-биохимических процессов, что в свою очередь отражается на ростовых процессах, анатомии и морфологии растения. Даже кратковременное обезвоживание уменьшает интенсивность роста растений (Blanchet, Gelfi, 1978; Лыфенко, Данильчук, Ериняк, 1981; Лыфенко, 1981; Сох, Jolliff, 1986; Кошкин, Гатаулина, Дьяков, 2005; Дьяков, Васильева, 2008). Замедление роста можно рассматривать как возможность сохранения углеводов для поддержания обмена веществ и для лучшего восстановления после стресса. Ингибирование роста побегов в период водного дефицита способствует накоплению растворенных веществ (Osorio J., Osorio M., Chaves

et al., 1998). Например, накопление гексозы составляет большую долю осмотического потенциала в зоне удлинения клеток корневого чехлика кукурузы (Sharp, Hsiao, Silk, 1990). При этом у злаков уменьшается глубина зоны кушения и сокращается длительность этого процесса (Langer, Prasad, Laude, 1973; Горчакова, 2005; Лыкова, 2008; Горчакова, 2011), уменьшаются размеры колоса, длина листьев и междоузлий (Березина, 1989; Hall, 1992; Ismail, Hall, 1999). Установлено, что высота выноса колоса над последним листом является показателем водообеспеченности растений. Высоко вынесенный колос над верхним листом свидетельствует о достаточных запасах воды в почве (Агротехника озимой ..., 1967).

Нет сомнения в том, что водный дефицит приводит к развитию ксероморфизма (Vidal, 1984). Уровень ксероморфности влияет на ряд физиологических процессов. На субклеточном уровне основные изменения происходят в хлоропластах, что ведет к существенному изменению процесса фотосинтеза. Имеются данные, свидетельствующие о снижении интенсивности фотосинтеза при засухе (Антоненко, Гойса, 1985; Шматько, Григорюк, Шведова, 1989; Tezara, Mitchel, Driscoli et al., 1999; Lawlor, Cornic, 2002; Flexas, Bota, Loreto et al., 2004). Они связаны с различными изменениями структуры фотосинтетического аппарата растения, метаболизма углерода и энергетики фотосинтеза (Lawlor, Cornic, 2002). Например, высокие температуры снижают фотосинтез за счет изменения структуры организации тилакоидов (Тарчевский, 1980; Karim, Fracheboud, Stamp, 1997; Zhang, Huang, Liu et al., 2005). В работе О.В. Березиной (1989) отмечено, что содержание хлорофилла в листьях в сухие годы оказалось несколько выше в расчете как на единицу площади, так и на единицу массы листа. Однако отмечено, что ксероморфная структура листьев способствует более интенсивному фотосинтезу (Джиффорд, Дженкинс, 1987). Помимо этого, дефицит воды снижает содержание углеводов в листьях (Зеленые пластиды ..., 1981), подавляет синтез белков и хлорофилла, усиливает

накопление токсинов и продуктов их распада (Третьяков, 2005). В условиях засухи изменяется активность ферментов (Аджаосу, 1983).

Ксероморфная структура листьев более эффективна с точки зрения усвоения CO_2 и, очевидно, в определенной мере компенсирует отрицательное влияние обезвоживания и высоких температур на работу листьев (Schneider, Childers, 1941). Так Березина О.В. (1989), обобщая свои литературные данные, соглашается с мнением Мокроносова и Борзенковой (1987), что при засухе низкий газообмен является результатом высокого устьичного сопротивления диффузии CO_2 или депрессии и ингибирования основных ферментов фотосинтеза, но не качественного ухудшения самого ассимиляционного аппарата на уровне мезоструктуры листа или структуры хлоропластов.

Диагностика засухоустойчивости растений с применением признаков их ксероморфности (Маймистов, Мутовина, 1984) затрудняется тем, что происхождение ксероморфизма может быть различно (Михайловская, 1977), например, определяться недостатком или избытком химических элементов в почве (Генкель, 1968; Трапездников, Иванов, Тальвинская, 1999). Тем не менее, в работах П.А. Генкеля (1967) говорится о корреляции засухоустойчивости со степенью ксероморфизма, если он развивается под влиянием водного дефицита (Маймистов, 2000).

Таким образом, ксерофитизация растений за счет недостатка влаги подавляет их рост и продуктивность. Тем не менее, она является универсальным регуляторным механизмом, который обуславливает приспособление к самым различным неблагоприятным факторам. В работах Тюнина (2004), также указывается, что засуха способствует ксерофитизации растений, повышая, тем самым, неспецифическую устойчивость к альтернативной совокупности лимитирующих факторов.

Наблюдения за фенологическими изменениями у растений в ответ на стресс помогут понять, в чем заключается взаимодействие растений со средой. Разные фенологические этапы различаются по их чувствительности к

неблагоприятным факторам, однако, это зависит от вида и генотипа растений (Wollenweber, Porter, Schellberg, 2003). Тепловой стресс и недостаток воды являются основными факторами, влияющими на скорость развития, которая растет до определенного предела, а затем снижается (Hall, 1992; Marcum, 1998). Недостаток воды в критический период является причиной стерильности пыльцевых зерен и целых цветков, что отрицательно сказывается на урожае (O'Toole, Moya, 1981; O'Toole, Namuco, 1983; Ekanayake, De Datta, Steponkus, 1990; Альтергот, Мордкович, Фадеева, 1998). Однако, неизвестно, есть ли накопительный эффект от воздействия стресса на разных этапах развития. Тем не менее, все это приводит к снижению продуктивности растений, урожайности сельскохозяйственных культур, ухудшению качества зерна и произведенной из него продукции (Guilioni, Wery, Tardieu, 1997; Peet, Willits, 1998).

1.1.2. Физиолого-биохимические механизмы засухоустойчивости

В качестве адаптивных процессов, происходящих в растениях в ответ на действие неблагоприятных факторов, помимо анатомо-морфологических приспособлений, выделяют общие физиолого-биохимические механизмы защиты. К таким механизмам относят осмотическую регуляцию, стабилизацию клеточных мембран, перестройки в процессе дыхания, детоксикацию токсических продуктов обмена, изменение гормональной регуляции обмена веществ, перестройки в работе генетического аппарата, направленные на регуляцию синтеза стрессовых белков.

Реакции, возникающие на первых этапах воздействия стресса, являются универсальными и направлены на предотвращение повреждений клеток организма (Удовенко, 1979; Мелехов, 1985; Кузнецов, Кимпел, Гокджиян и др., 1987; Александров, Кислюк, 1994; Пахомова, 1995; Dixon, Palva, 1995; Пахомова, Чернов, 1996). Универсальность заключается в мобилизации неспецифических защитных реакций, участвующих в

формировании адаптивных реакции растений, способствующих повышению их устойчивости к неблагоприятным условиям среды, в том числе к недостатку влаги.

Сохранение водного баланса растений является основным параметром при изменении условий внешней среды (Mazorra, Nunez, Echerarria et al., 2002). Если влаги достаточно, то даже при высоких температурах наблюдается стабильность содержания воды в тканях. Однако засуха характеризуется повышенными температурами и дефицитом влаги (Machado, Paulsen, 2001; Simoes-Araujo, Rumjanek, Margis-Pinheiro, 2003). При таких условиях повышенная транспирация приводит к уменьшению водного потенциала растений, что, в свою очередь, приводит к изменению содержания осмолитов и активации других физиологических реакций (Tsukaguchi, Kawamitsu, Takeda et al., 2003).

Ключевым адаптивным механизмом для многих растений является накопление органических соединений с низкой молекулярной массой (Nare, Cress, Staden, 1998; Sakamoto, Murata, 2002, Ибрагимова, Горелова, Кочетов и др., 2010), в том числе низкомолекулярных гидрофильных белков, связывающих значительное количество воды. К таким веществам относят осмолиты – химически разнообразные низкомолекулярные органические соединения. Они хорошо растворяются в воде, нетоксичны и не вызывают изменений в метаболизме, поэтому получили название совместимых веществ. Осмолиты могут быть как конечными продуктами метаболических путей, так и их интермедиатами. Различные виды растений в условиях стресса могут накапливать разные виды осмолитов, такие как сахара и сахарные спирты (полиолы), некоторые аминокислоты, бетаины, третичные, четвертичные аммониевые и третичные сульфониевые соединения (Sakamoto, Murata, 2002; Sairam, Tyagi, 2004; Сергеева, Бронникова, Тищенко, 2011) и т.д. Накопление этих соединений может способствовать повышению стрессоустойчивости растений, а также

восстановлению нарушенных структур цитоплазмы при условии неповрежденности генетического аппарата клеток.

Особое значение в осморегуляции имеет свободный пролин – стрессовый метаболит, обладающий антиоксидантными (Lutts, Guerrier, 1995; Шевякова, 1983; Кузнецов, Шевякова, 1999; Matysik, Alia Bhalu et al., 2002; Kaul, Sharma, Mehta, 2008), антиденатурационными, мембранопротекторными (Kavi Kishor et al., 2005) и осморегуляторными свойствами (Huang, Cavalieri, 1979).

Увеличение его содержания может быть связано как с усилением синтеза, так и с активацией катаболического потока (Bates, Waldra, Teare, 1973; Erdei, Trivedi, Takeda et al., 1990). Данная аминокислота имеет собственную систему метаболизма. У высших растений пролин синтезируется из глутамата или орнитина. Глутаматный путь босинтеза пролина считается основным в условиях стресса (Deuschle, Funck, Hellmann et al., 2001; Szabados, Savouré, 2010; Verslues, Sharma, 2010).

Наиболее распространенным является мнение, что низкомолекулярные метаболиты, в том числе пролин, могут накапливаться в клетках в высоких концентрациях без ингибирования других клеточных компонентов. Однако, согласно некоторым исследованиям (Hellmann, Funk, Rentsch et al., 2000; Cooper, Pandhare, Donald et al., 2008; Verbruggen, Hermans, 2008), высокая концентрация внутриклеточного пролина может оказаться токсичной для клетки, и по этой причине его накопление должно строго контролироваться.

Глицин-бетаин (ГБ), амфотерный четвертичный амин, также выполняет важную функцию совместимого растворимого осмолита в растениях при воздействии различных стрессов, в том числе засоления или высокой температуры (Sakamoto, Murata, 2002). При этом способность синтезировать данное вещество в стрессовых условиях зависит от вида растения (Ashraf, Foolad, 2007). Так, например, в кукурузе (Quan, Shang, Zhang et al., 2004) и сахарном тростнике (Wahid, Close, 2007) обнаружен

высокий уровень содержания ГБ, а у риса (*Oryza sativa*), горчицы (*Brassica* spp.), арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) и табака (*Nicotiana tabacum*) (Sakamoto, Murata, 2002; Wahid, Close, 2007) не установлен синтез данного осмолита.

Важную роль в адаптации растений к осмотическому стрессу (Capell, Bassie, Christou, 2004), нарушениям минерального питания (Slocum, Kaur-Sawhney, Galston, 1984), засолению (Kuznetsov, Shevyakova, 2011), гипертермии, низким температурам (Shen, Jensen, Bohner, 1997), играют также маннитол и полиамины (Stoop, Williamson, Pharr, 1996; Shen, Jensen, Bohner, 1997).

Одним из метаболитов растений, контролирующих осмотический потенциал, является аминокислота цитруллин (Wada, 1930) – промежуточным продуктом биосинтеза аргинина, не входящий в состав природных белков. Хотя механизм его накопления до настоящего времени не установлен, известно, что среди совместных осмолитов данное вещество является самым сильным гасителем гидроксильных радикалов в присутствии яркого света и повышенной температуры.

Аминокислота орнитин – интермедиат метаболизма аргинина – является предшественником таких осмотиков, как пролин и полиамины. По данным С.С. Ибрагимовой с соавторами (2010), влияние орнитина на стрессоустойчивость может быть связано с его участием в синтезе нескольких совместных метаболитов (Kalamaki, Merkouropoulos, Kanellis, 2009).

Клеточные мембраны являются главными мишенями многих абиотических стрессов, однако, причины дестабилизации мембран мало изучены. Несмотря на это ясно, что уменьшение объема клетки приводит к увеличению вязкости цитоплазмы и сгущению ее компонентов. Это, в свою очередь, может привести к денатурации белков и слиянию мембран. Синтез и накопление некоторых веществ может предотвратить гибель клетки. К таким веществам относят пролин, глутамат, глицин-бетаин, карнитин, маннит,

сорбит, фруктаны, многоатомные спирты, трегалозу, сахарозу и олигосахариды (Folkert, Elena, Buitink, 2001). Считается, что поддержание целостности и стабильности мембран в условиях водного стресса является одним из основных компонентов устойчивости к засухе (Bajji, Kinet, Lutts, 2002). Один из физиологических индексов – отношение стабильных клеточных мембран к поврежденным – широко используется для оценки устойчивости к дефициту влаги (Premachandra, Saneoka, Kanaya et al., 1991). Также стабильность мембран необходима для поддержания таких энергетических процессов как аэробное дыхание и фотосинтез (Чиркова, 1997).

Действие абиотических факторов среды могут влиять на интенсивность дыхания растений. Так, в одних работах показано увеличение интенсивности дыхания в результате осмотического стресса (Касумов, 1982, Малышев, 1982), а в других – снижение (Горис, 1967). Поэтому изменения дыхания в зависимости от содержания воды в тканях в большинстве случаев графически могут быть представлены колоколообразной кривой, отражающей их двухфазный характер. При незначительном недостатке влаги наблюдается возрастание интенсивности дыхания, а при глубоком дефиците – понижение. Первоначальное повышение интенсивности дыхания связано с увеличением энергетических затрат на синтез осмотических веществ, защищающих белки при обезвоживании. При более продолжительном воздействии стресса происходит спад интенсивности дыхания и снижение его энергетической эффективности за счет повреждения дыхательных систем (Рахманкулова, 2009; Климачев, Кузнецова, Старикова, 2011).

Действие засухи приводит к адаптивному изменению гормональной системы, вследствие чего происходит торможение роста, при этом снижается потребность организма в воде. Обмен веществ переводится в режим покоя, энергетические процессы переключаются на поддержание целостности растения и репарацию его повреждений. Содержание гормонов – регуляторов

роста фенольной природы – уменьшается, а АБК и этилена возрастает (Jeks, Hasegawa, 2005; Kuznetsov, Shevyakova, 2007; Веденічева, 2009).

Защита молекул ДНК от губительного действия осмотического стресса обеспечивается частичным переводом их в пассивное состояние с помощью ядерных белков или, возможно, специальных стрессовых белков (Косаковская, 2008). Для синтеза стрессовых белков и восстановления обмена, после действия недостатка влаги, необходима целостность генетического аппарата клетки. Защита нуклеиновых кислот от засухи осуществляется различными стрессовыми белками – шаперонами (Ellis, Van der Veis, 1991; Morimoto, Kline, Vimston et al., 1997). Они в состоянии долгое время поддерживать целостность ДНК даже при абсолютном обезвоживании (у пойкилоксерофитов). Повреждение ДНК обнаруживается лишь при сильной и длительной засухе.

Таким образом, неблагоприятное действие засухи состоит, в первую очередь, в обезвоживании и нарушении метаболических процессов у растений (Красовская, 1935; Кушниренко, 1975; Ожерельева, Красова, Галашева, 2015), что приводит к распаду белков (Close, 1996; Косаковская, 2008; Абдуллаев, Касымова, Сабоиев, 2011), изменению коллоидно-химического состояния цитоплазмы (Bartels, Sunkar, 2005) и, в конечном итоге, к снижению количества накапливаемого растениями органического вещества (Эргашев, 1997). Кроме того, нужно иметь в виду, что в онтогенезе существуют наиболее чувствительные периоды к высокой температуре и дефициту влаги. Эти периоды совпадают с наиболее интенсивным ростом растений и образованием гамет.

1.2. Методы диагностики засухоустойчивости сельскохозяйственных растений

1.2.1. Классические методы оценки

Работа по созданию сортов и гибридов сельскохозяйственных культур

сопровождается, как правило, оценкой ряда свойств и показателей у создаваемых форм. Оценка новых селекционных линий довольно трудоемкое и длительное занятие, так как одновременно испытываются большие объемы материала в разных питомниках. При этом зачастую количество семян и время (например, период колошения) ограничено. В связи с этим для получения достоверных результатов необходимо применять различные методики исследования.

Классические методы, применяемые для оценки засухоустойчивости растений, условно можно разделить на 3 группы: прямые, провокационные и косвенные (Шелепов, Маласай, Пензев и др., 2004) (табл. 1).

Объективную оценку устойчивости растений к засухе дают **прямые методы**, в которых показателем устойчивости является урожай в условиях водного дефицита (Жученко, 2004). Для такой оценки опыты специально не закладываются. Оценка проводится в селекционных питомниках, фиксируя быстроту и степень увядания и отмирания нижних листьев и проводя учет урожая. К полевым методам можно добавить учет прироста сухого вещества или сырой массы. По этим параметрам можно судить о том, как изменение температуры и влажности действуют на исследуемый материал.

Таблица 1 – Методы оценки устойчивости сельскохозяйственных растений к дефициту влаги

Группа	Название	Характеристика
1	2	3
Прямые методы	Полевое испытание (традиционный метод)	Учитываются и оцениваются особенности роста и развития изучаемых форм растений в полевых условиях, требование к агрохимии, продуктивность, отношение к неблагоприятным условиям среды, болезням и т.д. Показателем устойчивости является урожай в условиях водного дефицита (Quarrie, Stojanovic, Pekic, 1999; Жученко, 2004)

1	2	3
Провокационные методы	<p>Метод завядания</p> <p>Испытания в засушнике</p> <p>Вегетационный метод</p>	<p>Метод увядания листьев для оценки сортов в лабораторных условиях путем выращивания нескольких сортов в сосудах (Туманов, 1940; Харанян, 1965; Хисамутдинов, 2009, Мурсалимова, Хардикова, 2012). Засухоустойчивость растений испытывают в вегетационных сосудах, которые перестают поливать.</p> <p>Создание искусственных условий засухи путем устройства специальных засушников (площадок с ограниченной водообеспеченностью) (Литвинов, 1933; Маймистов, 2000).</p> <p>На протяжении вегетационного периода несколько раз определяется влажность почвы и ежедневно отмечается относительная влажность воздуха. Сравнение урожая на таких площадках и на контроле показывает степень засухоустойчивости сорта.</p> <p>Применение данного метода позволяет не только испытывать жароустойчивость растений, а главное – изучать ее физиологические причины.</p> <p>Данный метод схож с методом завядания, заключается в выращивании растений в сосудах, помещенных в вегетационные домики. При помощи этого метода изучают физиологическую роль питательных веществ и их поступление в растение, значение реакции среды (рН), нормы полива, отношение различных растений к концентрации питательного раствора, к температуре (морозостойкость), влаге (засухоустойчивость), свету (фотопериодизм), к химическим средствам защиты растений, гербицидам и т. д. (Прянишников, 1963; Журбицкий, 1968).</p>
Косвенные методы	<p>Цветные реакции на белок</p> <p>Плазмолитический метод определения вязкости протоплазмы</p> <p>Определение засухоустойчивости растений по прорастанию семян на растворах сахарозы и т.д.</p>	<p>Эти методы основаны на использовании не самой устойчивости к недостатку влаги, а какого-либо другого биологического свойства, обуславливающего высокую засухоустойчивость, или базируются на сравнении морфо-физиологических характеристик либо биохимических показателей растений при помещении их в селективируемые условия (Терек, Яворська, Величко и др., 2005). Поэтому проводятся многочисленные исследования возможности отбора устойчивых форм растений к засухе по физиологическим признакам (Quamie, Stojanovic, Pekic, 1999; Landi, Sanguinetti, Liu et al., 2007; Lee, Tollenaar, 2007; Reynolds, Dreccer, Trethowan, 2007 Collins, Tardieu, Tuberosa, 2008;).</p>

Прямая оценка засухоустойчивости в поле требует многолетних наблюдений. В различные годы происходит варьирование благоприятных и

неблагоприятных климатических условий в период вегетации. Поэтому большое значение имеет оценка засухоустойчивости сортов различных культур в контролируемых условиях по различным признакам, в том числе морфологическим, биохимическим, физиологическим, цитологическим и др.

В последние годы для оценки засухоустойчивости материала чаще всего используют **косвенные** методы. Наиболее используемыми методами оценки растений к дефициту влаги являются: проращивание семян на высокоосмотических растворах (Олейникова, Осипов, 1976; Федулов, Маймистов, Голуб, 1990; TeKrony, Egly, 1991; Collaku, 1994; Боме, Колоколова, Белозерова и др., 2006; Аль-Холани, 2010; Варавкин, Таран, 2014), регистрация толщины листьев и определение в них относительного содержания воды (Haley, Quick, Morgan, 1993; Карманова, Карманов, 2010).

Для ускорения темпов селекционной работы при поиске генетических источников стрессоустойчивости используют такие методы оценки как гидролиз статолитного крахмала (Генкель, 1952; Генкель, 1968; Генкель, Баданова, Левина, 1970). Однако для сортов, в листьях которых содержится незначительное количество данного вещества, данный метод не приемлем (Генкель, Баданова, Левина, 1972). Помимо перечисленных выше методов, также проводят измерение электросопротивления в верхней части проростков пшеницы с помощью игольчатых электродов (Ляшок, Мусич, 1987) или регистрацию температуры и электропроводности листьев (Никитин, 1964; Reynolds, Dresser, Trethowan, 2007); колеоптильный биотест (Синельникова, Удовенко, 1976; Сартакова, Заушинцева, Петункина, 1997), определение интенсивности транспирации проростков и выноса с транспирационной влагой минеральных ионов в процессе засухи, а также оценку степени выхода электролитов из тканей листьев (Петинов, 1963; Кожушко, 1976). Нередко оценку образцов на засухоустойчивость проводят несколькими методами одновременно (Петункина, Свиркова, Маевская и др., 2012).

Не всегда использование предлагаемых методов для дифференцирования генотипов по отношению к засухе дает положительные результаты. Так, например, метод В.В. Колкунова (1905), основанный на определении структуры строения клеток (растения, имеющие мелкоклеточное строение, меньшее число устьиц на единицу площади листа и густое жилкование, обладают высокой устойчивостью к засухе), на практике не оправдал себя, так как существуют сорта пшеницы (Запорожская остистая и др.), устойчивые к недостатку влаги, с достаточно крупными клетками и большим количеством устьиц (Шелепов, Чебаков, Вергунов, 2009). Следует отметить, несмотря на кажущуюся простоту, вышеперечисленные методы диагностики растений на устойчивость к недостатку воды являются довольно трудоемкими.

Биохимический подход к оценке зерновых на устойчивость к неблагоприятным условиям, в том числе к недостатку влаги, представлен широкой группой методов: регистрация изменения активности нитратредуктазы или пероксидазы (Трифонова, Максютлова, Викторова и др., 2010; Гусейнова, Алиева, Маммадов и др., 2014); измерение концентрации свободного пролина (Bates, Waldrin, Ter, 1973; Судацкова, Милютина, Романова, 2007; Сергеева, Бронникова, Тищенко, 2011); определение содержания общего белка, гликолипидов и фосфолипидов во фракции мембран хлоропластов (Farooq, Wahid, Kobayashi et al., 2009); учет накопления растениями сахаров (Колодяжная, Куцоконь, Левенко и др., 2009; Живетьев, Граскова, Поморцев и др., 2011) и др.

Известно, что засушливый режим погоды существенно влияет на углеводный и азотный обмен в растениях яровой пшеницы (Генкель, 1975). Причем, ведущими элементами азотного метаболизма, определяющими засухоустойчивость пшеницы, являются свободные аминокислоты, в том числе и стресс-индуцированный пролин, который известен как хороший термопротектор, накапливающийся в листьях яровой пшеницы в условиях высокотемпературного стресса (Ткачук, 2006).

Большие успехи были достигнуты в исследовании роли абсцизовой кислоты (АБК) при водном дефиците и иных стрессовых воздействиях. Абсцизовую кислоту рассматривают как антистрессорный фактор, усиливающий адаптацию растений к различным неблагоприятным воздействиям (Milbrogow, 1974; Пустовойтова, 1981; Пустовойтова, Дроздова, Жданова и др., 2003). Этот фитогормон накапливается в растениях при дефиците воды и запускает ряд процессов, направленных как на ограничение испарения воды листьями за счет уменьшения их площади и закрытия устьиц (Davies, Kudoyarova, Hartung, 2005), так и повышение устойчивости растений к обезвоживанию (запуск антиоксидантных систем, синтез осмопротекторов и т.д. (Quarrie, 1991; Шакирова, 2001).

Большинство методов диагностики растений на устойчивость к почвенной засухе являются повреждающими, что затрудняет или делает невозможным проведение оценки другого признака в этом поколении, а также выращивание растений до получения потомства. Тем не менее, на начальных этапах селекции особый интерес представляют методы ранней диагностики на семенах и проростках (Петункина, 2008), поскольку они позволяют проводить оценку круглый год и анализировать большое количество селекционного материала (Россеев, 2001).

1.2.2. Тестирование *in vitro*

В течение последних десятилетий, наряду с морфо-анатомическими и физиолого-биохимическими методами оценки стрессоустойчивости растений, широкое распространение получили биотехнологические подходы. Особого внимания заслуживает клеточная селекция, которая облегчает и ускоряет традиционный селекционный процесс создания новых линий и сортов (Беккужина, 2011).

Культура растительных клеток и тканей представляет собой биологическую систему, в которой отсутствуют механизмы регуляции,

действующие на уровне целого организма. Исследования, проведенные на однородном клеточном материале, наряду с пониманием иерархии систем регуляции физиологических процессов, позволяют получить более определенные результаты по анализу действия абиотических и биотических стрессовых факторов на растительную клетку. Это отвечает требованиям современного селекционного процесса, где неотъемлемым элементом является повышение устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды (Шакирова, 2001).

Существующие методы культивирования изолированных клеток и тканей *in vitro* условно можно разделить на две группы: вспомогательные технологии и технологии создания генетического разнообразия (Дитченко, 2007) (рис. 1).



Рисунок 1 – Клеточные технологии в селекции растений

Биотехнологические методы культивирования *in vitro* различных эксплантов (незрелые пыльники, зрелые и незрелые зародыши, апикальные корни, листовые экспланты и т.д.) широко используют в селекционном процессе совместно с классическими методами для решения прикладных

задач, в частности, для создания устойчивых форм растений к неблагоприятным условиям конкретного региона и дальнейшей оценки таких соматклонов. Особый интерес для исследователей представляют работы по получению растений-регенерантов из каллусных и суспензионных культур, прошедших отбор в стрессовых условиях. В условиях *in vitro* можно задавать различные параметры, адекватные тем, в которых в дальнейшем придется жить взрослым растениям, в том числе и экстремальные условия выращивания. В культивируемых *in vitro* клеточных популяциях обнаружена тенденция к высокой наследственной изменчивости качественных и количественных свойств клеток.

На примере ряда работ показана возможность использования метода *in vitro* для тестирования селекционного материала на устойчивость к неблагоприятным факторам среды (Способ оценки ..., 2000). В частности, было выявлено наличие корреляционной связи между реакциями клеточных систем *in vitro* и засухоустойчивостью растений (Россеев, 2001; Аль-Холани, Тоайма, Долгих, 2010; Игнатова, 2011; Тагиманова, Ергалиева, Райзер и др., 2013), солеустойчивостью (Baier, Somers, Gustafson, 1995; Шуплецова, Широких, 2014), устойчивостью к тяжелым металлам (Hall, 2002) и т.д.

Таким образом, не смотря на то, что традиционная селекция ведется на уровне организмов, использование тканевых и клеточных культур способно эффективно ускорить данный процесс, в том числе при оценке и отборе стрессоустойчивого материала.

1.2.3. Молекулярно-генетическое картирование

На современном этапе селекции оценка генетического разнообразия происходит на основе анализа родословных, изучения морфологических и биохимических признаков, а также с помощью молекулярных маркеров (Сох, Lookhart, Walker at al., 1985; Vasil, 2007; Salem, El-Zanaty, Esmail, 2008). Результаты, полученные лишь на основе анализа родословных, зачастую, не

в полной мере отражают реальную картину (Fufa, Baenziger, Beecher et al., 2005), что побудило к использованию более современных методов, в том числе различных видов маркеров (Sing, Brewer, 1969; Губарева, Алпатьева, 2002; Лихенко, 2002; Берсимбаев, Шулембаева, 2005; Конарев, 2006; Anjum, Khan, Din et al., 2007; Mondini, Noorani, Pagnotta, 2009; Сельдимирова, Янбаев, Зайцев, 2009; Поляков, Левчук, Лях, 2011; Бишимбаева, Амирова, Парменова и др., 2012; Гикало, Бурдун, Санина, 2012; Иванченко, 2012; Чеботарь, Благодарова, Куракина и др., 2012; Сидоров, Плеханова, 2014; Леонова, 2015).

Наиболее перспективными в настоящее время являются молекулярные, или ДНК-маркеры. Преимущества использования данной системы маркеров заключаются в возможности тестирования генетического полиморфизма на уровне самих генов, а не их продуктов, как в случае применения биохимического маркирования. ДНК-маркерная система позволяет маркировать всевозможные участки ДНК, в том числе некодирующие. Помимо этого, материалом для подобного рода маркирования могут служить различные ткани и органы, не зависимо от стадии онтогенеза, что дает несомненное преимущество по сравнению с другими типами маркеров (Сулимова, 2004; Шамшин, 2014).

В литературе встречаются различные классификации ДНК-маркеров, в том числе по количеству локусов, методам детекции продуктов и т.д. Однако большинство исследователей придерживаются деления молекулярных маркеров на классы, представленных на рисунке 2.

RFLP маркеры (restriction fragment length polymorphism) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов. Данный молекулярный маркер, разработанный Д. Ботштейном с коллегами (1980), основан на полиморфизме длины рестрикционных фрагментов. Принцип анализа заключается в применении рестрикционных ферментов, которые разделяют молекулы геномной ДНК на специфические нуклеотидные последовательности, тем самым получая фрагменты различного размера

(Southern, 1975). Благодаря использованию RFLP-оценки за короткие сроки удалось изучить генетическое разнообразие и построить молекулярно-генетические карты различных видов растений, а также определить группы сцепления с хозяйственно-ценными признаками (Tanksley, Young, Paterson, 1989; Ragot, Hoisington, 1993; Semagn, Bjørnstad, Ndjiondjop, 2006).

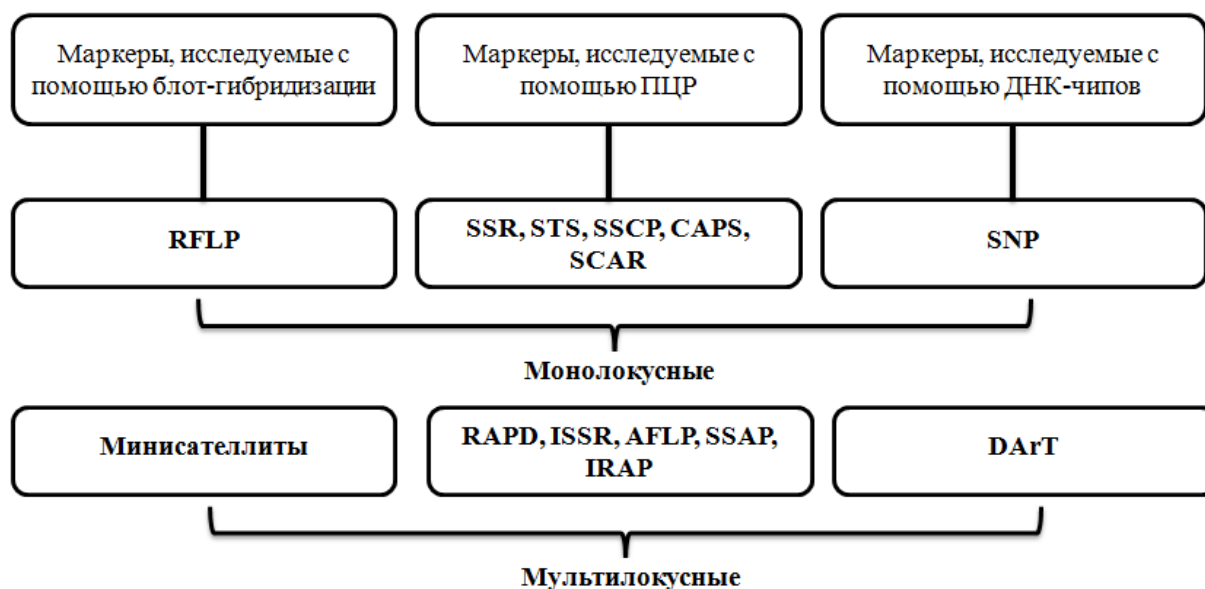


Рисунок 2 – Классификация молекулярных маркеров (Хлесткина, 2013)

CAPS маркеры (*cleaved amplified polymorphic sequences*) – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности. Данная система маркеров успешно применяется в молекулярной биологии для оценки генетических ресурсов различных групп растений (Konieczny, Ausubel, 1993; Hu, Tsai, Lin, 2014). Принцип работы CAPS-маркеров основан на амплификации небольшого фрагмента ДНК вместо использования всего генома (Heubl, 2010; Lu, Lee, Liu et al., 2010; Hu, Tsai, Lin, 2014). Этот маркер является кодоминирующим маркером. Так, разработанный CAPS маркер – *P22F/Pra/PvuII*, позволяет отличать гены-кандидаты DREB (*dehydration-responsive element-binding protein*) пырейного происхождения от генов DREB мягкой пшеницы. Встраивание подобных генов в чужой геном позволяет повышать устойчивость растений к абиотическим стрессам, в том числе

дефициту влаги и избыточному засолению (Почтовый, Карлов, Дивашук, 2013).

SSRs маркер (simple sequence repeats) – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты). Простые повторяющиеся последовательности, или микросателлиты, встречаются повсеместно у эукариот. Полиморфизм SSR отражает изменение количества повторяющихся единиц в определенной области генома. По некоторым оценкам, частота повторов у растений колеблется от 10 до 80 (Nicks, 1998). Нуклеотидная последовательность, фланкирующая повтор, используется для конструирования праймеров для амплификации различного количества повторяющихся единиц в разных вариантах. Эти праймеры очень полезны для быстрого и точного обнаружения полиморфных локусов.

Важной особенностью микросателлитов является то, что они эволюционируют быстрее, чем остальная ДНК, подвергаясь «динамичным мутациям», которые приводят к появлению аллелей с различным количеством повторяющихся единиц. Как следствие, микросателлиты очень полиморфны. Высокий полиморфизм в сочетании с повсеместным распространением и мультиаллелизмом делает их очень перспективными в качестве молекулярных маркеров (Paniego, Echaide, Munoz et al., 2002). Так, например, Е.Б. Кудашкина с соавторами (2016), с использованием SSR маркеров провели отбор гомозиготных линий риса, содержащих локус количественного признака (QTL) *SalTol* (устойчивость к засолению), который представлен значительным участком первой хромосомы, включающим более 4500 тысяч п.н. Одними из полиморфных микросателлитных локусов, связанных с *SalTol*, являются *RM 493* и *RM 7075* (Linh L.H., Linh T.H., Xuan, 2012).

SNP маркер (single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм. Молекулярные маркеры являются полиморфными, когда существует разница в последовательности ДНК между исследуемыми индивидуумами. Таким образом, молекулярные маркеры являются

индикатором полиморфизма последовательностей. Последовательный полиморфизм между индивидуумами может принимать много форм, например, это может быть связано с вставкой или удалением нескольких оснований, или однонуклеотидный полиморфизм – SNPs, (Brookes, 1999). Существует целый ряд методов идентификации SNP в генетическом локусе, а именно: прямое секвенирование, одноцепочечный конформационный полиморфизм (SSCP), химическое расщепление несоответствий (CCM) и расщепление несоответствия ферментов (EMC) (Varshney, Mohapatra, Sharma, 2004).

Так, разработаны молекулярные маркеры SNP, которые могут быть использованы для последующего анализа ассоциации нуклеотидного полиморфизма гена *Srlk* (*salt-induced receptor-like kinase*), повышенная экспрессия которого, активизирует работу других генов – факторов транскрипции *MtZpt2-1* и *MtZpt-2*, формирующих защитную реакцию на засоление у различных видов люцерны (Вишневецкая, Павлов, Дзюбенко и др., 2014).

RAPD маркеры (*random amplified polymorphic DNA*) – случайно амплифицированная полиморфная ДНК. Случайно амплифицированная полиморфная ДНК является доминантным маркером на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Williams, Kubelik, Livak et al., 1990). RAPD-оценка используется для изучения генетического разнообразия мало изученных таксономических групп, редко применяют при поиске ассоциации с хозяйственно-ценными признаками (Jones, Edwards, Castaglione, 1997; Garcia, Banchimol, Barbosa, 2004), за исключением картирования генов количественных признаков (Galande, Tiwari, JAmmiraju, 2001; Irzikowska, Wolko, Świącicki, 2002; Чегамирза, 2004). Специфичный фрагмент *OPZ09-590* является RAPD-маркером, сцепленным с геном солевыносливости (Weng Yue-Jin, Chen Dao-Ming, 2002).

AFLP маркер (*amplified fragment length polymorphism*) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов. Маркеры полиморфизма длины

амплифицированного фрагмента генерируются селективной амплификацией фрагментов ДНК, полученных расщеплением рестрикционными ферментами (Vos, Hogers, Bleeker, 1995). Высокомолекулярную ДНК расщепляют двумя рестрикционными ферментами: одним гексакатером (например, EcoRI) и одним тетракатером (например, Mse I). Молекулы-адаптеры лигируют с концами фрагментов ДНК. Два праймера, обладающие последовательностью, комплементарной адаптеру, а также несколько случайных нуклеотидов на 3'-концах, используются для селективной амплификации фрагментов с помощью ПЦР. Амплифицированные продукты разделяют, используя агарозные или полиакриламидные гели (Varshney, Mohapatra, Sharma, 2004).

При использовании маркеров, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР-маркеры) – iPBS (*inter primer binding site*), RAPD и ISSR выделены полиморфные продукты амплификации пшенично-пырейные гибридов, которые можно использовать для поиска генетических факторов дикого (пырейного) происхождения, что обеспечит устойчивость проростков культурных видов к солевому и осмотическому стрессу (Крупин, Дивашук, Баженов и др., 2013).

Таким образом, основываясь на изучении различных механизмов осмотолерантности и методов оценки засухоустойчивости сельскохозяйственных культур, засухо- и солеустойчивость можно рассматривать в качестве многокомпонентных признаков. Например, не обнаружено отдельного гена или признака, который бы обеспечивал толерантность ко всем сценариям дефицита влаги (Sinclair, 2011; Passioura, 2012). Тем не менее, с применением молекулярно-генетических маркеров, на примере *Triticum aestivum* L., ученым удалось идентифицировать многочисленные QTL и определить их локализацию на хромосомах. При этом наличие каждого из локусов ассоциируется с наличием устойчивости к разным типам засухи (Bennett, Reynolds, Mullan et al., 2012).

Солеустойчивость, также как и засухоустойчивость, является сложным признаком и контролируется многими QTL. Установлено, что у

мягкой пшеницы локусы устойчивости к избыточному засолению расположены в А, В и D геноме на хромосомах 2D, 6D, 2A, 5A, 6A, 7A, 1B, 4B, 3B, 6B, 7B (Díaz De León, Escoppinichi, Geraldo et al., 2011).

Таким образом, в связи со сложным характером признаков засухо- и солеустойчивости растений, создание новых устойчивых сортов на основе существующих методов классической селекции весьма затруднительно. Принципиально новым подходом на сегодняшний день является сочетание рекомбинационной селекции с методами биотехнологии, в том числе с клеточной селекцией.

ГЛАВА 2. УСЛОВИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объект исследования

Объектом исследования служили 6 образцов яровой твердой пшеницы различного эколого-географического происхождения: Памяти Янченко, Оазис, Гордеиформе 752, селекции Алтайского НИИСХ (г. Барнаул); линия 1480-Д4, селекции Самарского НИИСХ (г. Самара); линии 12S1-14 и 12S2-24 из Германии (университет Хоэнхайм, г. Штудгардт).

Исходный материал выращивали на полевом стационаре Алтайского НИИСХ (ФГБНУ ФАНЦА) в лаборатории селекции твердой пшеницы в течение летнего периода 2014-2016 гг. (прил. 3). Все использованные для скрининга образцы входят в коллекцию лаборатории и проходят параллельное испытание по основным хозяйственно ценным признакам.

Памяти Янченко. Родословная: (Алтайская нива × Леукурум 42) × Зарница Алтай. Включен в Госреестр по Западно-Сибирскому региону. Рекомендован для возделывания в Алтайском крае. Разновидность гордеиформе. Куст полупрямостоячий. Растение длинное. Соломина выполнена средне. Опушение верхнего узла отсутствует или очень слабое. Восковой налет на листовой пластинке флагового листа слабый, на шейке соломины и колосе сильный, на влагалище флагового листа очень сильный. Колос цилиндрический, средней длины, сильноокрашенный, средней плотности. Ости коричневые, длиннее колоса. Нижняя колосковая чешуя ланцетная, опушение наружной поверхности отсутствует. Плечо приподнятое, узкое. Зубец слегка изогнут, короткий. Зерновка удлиненная, светлая, хохолок средней длины. Масса 1000 зерен 41-50 г. Средняя урожайность в регионе – 25,8 ц/га, на уровне среднего стандарта. Среднеспелый, вегетационный период 83-98 дней, созревает на 2-3 дня позднее сорта Алтайская нива. Среднеустойчив к полеганию.

Засухоустойчивость на уровне и выше стандарта. Макароны качества хорошие. Умеренно устойчив к пыльной и твердой головне, бурой ржавчине; умеренно восприимчив к мучнистой росе; восприимчив к септориозу; сильно восприимчив к корневым гнилям.

Оазис. Родословная: Ангел × Саратовская золотистая. Включён в Госреестр по Западно-Сибирскому и Восточно-Сибирскому регионам. Рекомендован для возделывания в Кулундинской степи Алтайского края и в Канско-Красноярской лесостепи и Степи предгорий на обыкновенных и южных черноземах Красноярского края и Республике Хакасия. Разновидность гордеиформе. Куст полупрямостоячий. Растение длинное. Соломина выполнена слабо. Опушение верхнего узла отсутствует или очень слабое. Восковой налёт на колосе, влагалище флагового листа и шейке соломины очень сильный, на листовой пластинке флагового листа сильный. Колос пирамидальный, средней длины – длинный, слегка окрашенный, рыхлый – средней плотности. Ости светло-коричневые, по длине равны колосу. Нижняя колосковая чешуя ланцетная, опушение наружной поверхности отсутствует. Плечо приподнятое, узкое. Зубец короткий – средний длины, слегка изогнутый. Зерновка удлинённая, очень светлая, хохолок короткий. Масса 1000 зёрен – 35-51 г. Средняя урожайность в Западно-Сибирском регионе – 26,1 ц/га, в Восточно-Сибирском – 25,0 ц/га. Среднепоздний, вегетационный период – 81-95 дней, созревает на 4-6 дней позднее сорта Памяти Янченко. По устойчивости к полеганию и засухе на уровне стандарта. Макароны качества хорошие. Умеренно устойчив к бурой ржавчине. Сильновосприимчив к корневым гнилям. В полевых условиях сильно поражался пыльной головнёй (<http://gossort.com/>).

Линия **Гордеиформе 752** (Г-752) создана в Алтайском НИИСХ отбором из комбинации Гордеиформе 516 × Гордеиформе 547. Сорт среднеранний. Урожайность за годы изучения в КСИ составила 2,84 т/га, что на 0,14 т/га больше стандарта Памяти Янченко. Засухоустойчивость на уровне стандарта. Обладает хорошим качеством зерна и макарон: высокой

натурой зерна, повышенным содержанием белка и клейковины, лучшей цветовой характеристикой макарон. Стабильно формирует макароны хорошего качества. Слабо поражается пыльной головней.

Линия **1480-Д4** создана в Самарском НИИСХ на основе скрещивания двух местных линий. Относится к среднеранней группе спелости. Урожайность в среднем за 2015-2016 гг. составила 3,25 т/га, что близко урожайности стандарта Памяти Янченко – 3,19 т/га. Линия среднерослая с хорошей устойчивостью к полеганию. Засухоустойчивость ниже стандарта. Зерно крупное, округло-овальное. Стекловидность средняя, зерно склонно к обесцвечиванию. Содержание белка в зерне 12,6%, клейковины в муке – 31,4%. Цвет лепешки оценивается в 4 балла. Пыльной головней поражается слабо.

Короткостебельные среднеспелые линии **12S1-14** и **12S2-24** созданы в селекционной фирме Südwestdeutsche Saatzücht GmbH&Co.KG. Несмотря на слабую адаптацию к местным условиям, они лучше многих других европейских генотипов переносят воздействие стрессовых факторов Сибири. В среднем за 2015-2016 годы изучения урожайность 12S1-14 составила 1,58 т/га, 12S2-24 – 2,34 т/га, что на 1,50 и на 0,74 т/га ниже стандарта Памяти Янченко. Засухоустойчивость ниже стандарта. Формируют крупное зерно. При этом показатели содержания белка и клейковины высокие. У 12S1-14 они равны 15,3 и 40,0%, у 12S2-24 – 14,6 и 39,8%, соответственно. Измерение деформации клейковины находилось в пределах 90 – 95 единиц. Показатели цвета лепешки 4 балла.

Объектами для клеточной селекции служили зрелые и незрелые зародыши яровой твердой пшеницы. При использовании в качестве эксплантов незрелых зародышей, их изолировали из семян на 15-17 сутки после опыления. Цвет зародышей молочно-белый, при этом их длина составляла от 1,5 до 2,0 мм (рис. 3).



Рисунок 3 – Внешний вид колосьев (А), зерновок (В) и эксплантов – незрелых зародышей (С) исходных сортов яровой твердой пшеницы

При использовании в качестве эксплантов зрелых зародышей их изолировали из зрелых семян (время после опыления – более 25 суток). При этом длина таких зародышей несколько больше – 2,3-2,6 мм, консистенция более плотная по сравнению с незрелыми, цвет молочный с желтоватым оттенком (рис. 4).



Рисунок 4 – Внешний вид колосьев (А), зерновок (В) и эксплантов – зрелых зародышей (С) исходных сортов яровой твердой пшеницы

Для физиологической оценки стрессоустойчивости использовали семена и пыльцу соматоклональных линий яровой твердой пшеницы третьего поколения (R_3), родительскими генотипами которых являлись сорт Оазис и линия 12S2-24. Данные образцы являются контрастными по отношению к недостатку влаги. Так, сорт Оазис толерантен к дефициту воды, а линия 12S2-24 обладает низкой устойчивостью к засухе.

Растеньица (R_0), полученные на селективных питательных средах, доращивали до полного созревания, получая семена R_1 . Далее материал пересевали, раскладывая на линии (рис. 5).

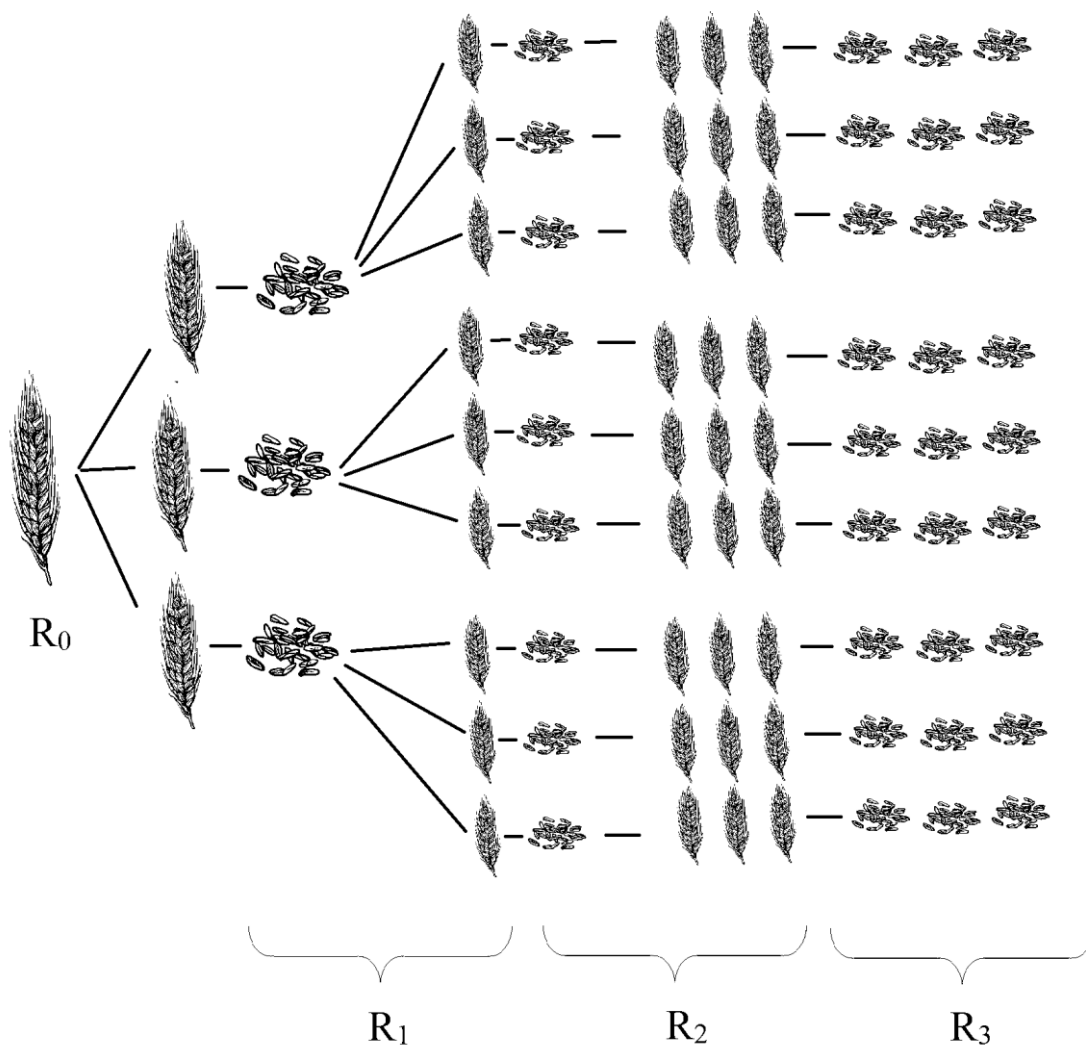


Рисунок 5 – Схема получения соматклональных линий R_3

В результате было получено 26 соматклональных линий, фенотипически выровненных, сходных по морфологическим признакам с родительскими генотипами. По 8 линий, производных каждого сорта, были отобраны на средах, содержащих в качестве селективного агента хлорид натрия, и по 5 линий – на средах, в составе которых в качестве осмотического фактора присутствовал полиэтиленгликоль 6000 (ПЭГ-6000).

2.2. Метеорологические условия

Метеорологические условия в годы проведения исследований характеризовались некоторыми отклонениями от средних многолетних показателей (прил. 4).

Условия произрастания яровых культур в 2014 году имели свои особенности. Среднемесячная температура воздуха в мае составила $11,0^{\circ}\text{C}$, что оказалось ниже нормы на $1,1^{\circ}\text{C}$. Суммарное количество осадков в среднем за месяц достигло 49,3 мм, при многолетней норме 42 мм. Однако наблюдалось их неравномерное распределение в течение месяца. Так в первой декаде мая количество осадков составило 2,8 мм, что ниже нормы на 12,2 мм. Их основная доля пришлась на вторую половину мая – начало июня. При этом погода характеризовалась как теплая с достаточным количеством влаги во второй декаде месяца и избыточным увлажнением в конце мая – начале июня. Именно эта влага помогла растениям пережить последующий длительный период отсутствия осадков при высокой температуре. Среднемесячная температура июня соответствовала многолетней норме; осадки – 22,4 мм – составили 47,7% относительно нормы. Температура воздуха в июле 2014 г. соответствовала многолетним наблюдениям, количество осадков превышало норму практически в 2 раза, однако данные метеоусловия обеспечили хороший налив зерна (рис. 6).

Вегетационный период 2015 года можно рассматривать как умеренно благоприятный с проявлением кратковременной засухи. Май характеризовался умеренно теплой погодой, соответствующей многолетним наблюдениям, с неравномерным распределением осадков. Так, в первой декаде мая их количество составило 1,1 мм, что соответствовало 7% относительно нормы. Вторая и третья декады характеризовались уровнем осадков, превышающим в 1,1-2,6 раз многолетние наблюдения. Средняя температура в первой декаде июня превышала многолетнюю норму на $3,8^{\circ}\text{C}$, достигая при этом $18,8^{\circ}\text{C}$. Количество выпавших осадков составило 88,6%

относительно нормы. Средняя температура воздуха во второй и третьей декадах июня превышала многолетнюю на 1,3 и 1,4°C, соответственно. Количество осадков во второй декаде месяца превышало норму на 13 мм, составляя 15,6 мм. В третьей декаде июня дождей не наблюдалось. В связи с этим, погоду июня 2015 года можно охарактеризовать как теплую с недостаточным количеством осадков. Погода в июле практически не отличалась от многолетних наблюдений: средняя температура воздуха равнялась 20,3°C, при норме 19,9°C; количество осадков, выпавших за месяц, составило 99,4% относительно нормы (рис. 6).

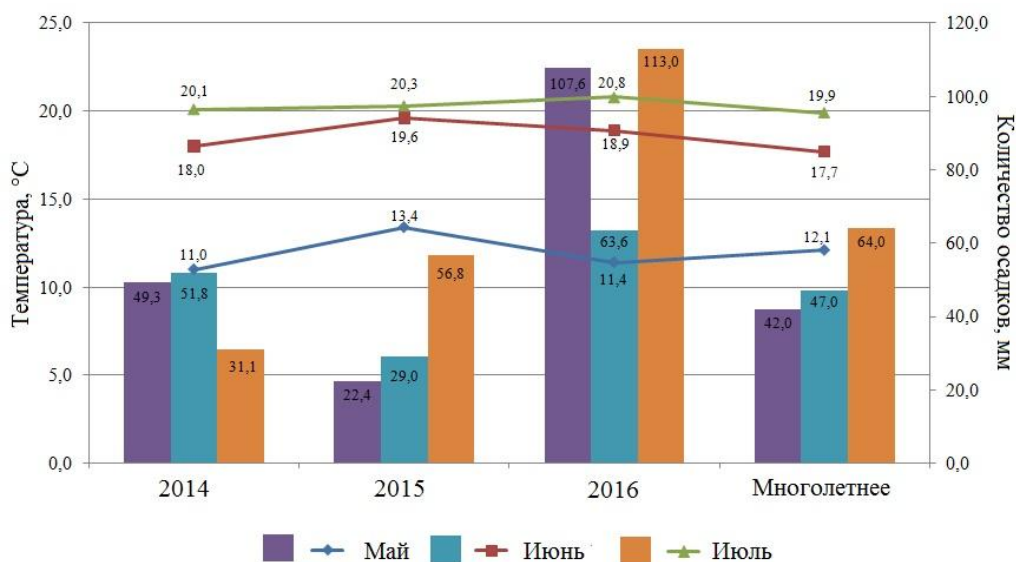


Рисунок 6 – Гидротермический режим вегетационного периода (2014-2016 гг.)

Вегетационный период 2016 года сочетал благоприятное распределение тепла и влаги. Низкая, относительно нормы, средняя температура воздуха в первой и второй декадах мая, в сочетании с количеством осадков, соответствующих многолетним наблюдениям, и превышающая норму на несколько градусов температура в третьей декаде месяца и низком увлажнении характеризуют погоду мая 2016 г. как прохладную с достаточным количеством влаги.

Первая декада июня отличалась высокой температурой воздуха, превышающей многолетнюю норму на $1,8^{\circ}\text{C}$, на фоне отсутствия осадков. Во второй декаде месяца наблюдались обильные дожди, что определило суммарное количество осадков на уровне 287% относительно нормы при средней температуре $20,3^{\circ}\text{C}$, превысившей среднемноголетнюю на $2,3^{\circ}\text{C}$. Третья декада июня по гидротермическому режиму соответствовала многолетним наблюдениям. В июле 2016 г. преобладала достаточно теплая погода с обильными, превышающими норму в 1,1-2,5 раза, осадками (рис. 6).

2.3. Методы исследования

Стерилизация растительного материала. Поверхностную стерилизацию семян, предназначенных для вычленения эксплантов и их последующего культивирования на агаризованной питательной среде, тщательно промывали в воде с детергентом, а затем – в проточной водопроводной воде. Дальнейшая стерилизация материала проходила в асептических условиях 70% спиртом в течение 5-ти (зрелые зародыши) или 2-х минут (незрелые зародыши). В качестве основного дезинфицирующего агента использовали 2% раствор лизоформина-3000, в который перемещали материал, обработанный спиртом. При использовании зрелых зародышей время стерилизации составляло 15 минут, незрелых – 10 минут. После чего стерилизующий раствор сливали, а растительный материал промывали в нескольких порциях стерильной дистиллированной воды (не менее трех). В последней порции воды зерновки, для облегчения вычленения зрелых зародышей, оставляли в стерильных условиях на сутки. Вычленение незрелых зародышей производили непосредственно после стерилизации. Количество эксплантов на каждый вариант составляло не менее 60 штук. Все эксперименты проводили в 4-х повторениях.

Работу в асептических условиях осуществляли с использованием ламинар-бокса Lamsystems, соблюдая все необходимые процедуры, обеспечивающие стерильность.

Состав питательной среды. В качестве основной питательной среды был использован состав по прописи Мурасиге-Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962). Источником углерода служила сахароза в концентрации 30 г/л. Для получения полутвердой питательной среды применяли агар-агар марки «Васто» в концентрации 0,7% (табл. 2). В качестве регуляторов роста использовали 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) и кинетин. Иницирующая среда содержала 2 мг/л 2,4-Д, среда для регенерации – 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л 2,4-Д (Никитина, Мухин, Хлебова и др., 2016).

Таблица 2 – Компонентный состав питательной среды по прописи Мурасиге-Скуга

Компоненты	Количество, мг/л	Компоненты	Количество, мг/л
<i>Макросоли:</i>		<i>Хелат-железа:</i>	
NH ₄ NO ₃	1650	FeSO ₄ ·7H ₂ O	37,3
KNO ₃	1900	Na ₂ ЭДТА·2H ₂ O	27,8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	<i>Хлорид кальция:</i>	
KH ₂ PO ₄	170	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
<i>Микросоли:</i>		<i>Витамины:</i>	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	Тиамин-НСl	0,1
H ₃ BO ₃	6,2	Пиридоксин-НСl	0,5
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	Никотиновая кислота	0,5
KJ	0,83		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	Сахароза	30
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	Агар-агар	7
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	pH	5,8

Условия культивирования. Клеточные культуры выращивали в темноте при температуре 26±1°С. Период культивирования варьировался в зависимости от цели эксперимента. Для индукции процессов регенерации в каллусных культурах, их переносили на среды для регенерации и культивировали в условиях 16-ти часового фотопериода при температуре 20-22°С.

С целью отбора генотипов с заданными свойствами в культуру *in vitro* вводили 15-17-суточные незрелые зародыши яровой твердой пшеницы для формирования каллусов и морфогенных структур. В качестве селективной системы *in vitro* моделировали 8 вариантов сред МС, дополненных осмотическими агентами – NaCl и полиэтиленгликолем с молекулярной массой 6000 (ПЭГ-6000) в концентрации 0,5-2,0 и 10-25%, с шагом 0,5 и 5%, соответственно. Контролем служила питательная среда того же состава, не содержащая стрессовых факторов. Изолированные зародыши помещали на иницирующую среду щитком вверх. Выявленные зоны морфогенеза переносили на среду для регенерации. Проростки, достигшие 5-7 см и имеющие сформированную корневую систему, пересаживали в сосуды с почвой и доращивали до созревания в климатической камере Memmert при температуре 12°C ночью, 17°C днем с 16-часовым фотопериодом.

Уровень каллусогенеза оценивали через 30-35 суток культивирования и выражали как процент сформированных клеточных линий к общему числу высаженных эксплантов. Частоту морфогенеза оценивали как долю (%) морфогенных каллусов от числа сформировавшихся. Долю регенерации рассчитывали как количество регенерантов от числа морфогенных каллусов, выраженное в процентах.

Физиологическая оценка регенерантов. Физиологическую оценку исходных генотипов и регенерантов проводили лабораторным методом, основанным на свойствах проростков развивать сосущую силу на растворах с повышенным осмотическим давлением. Устойчивость образцов твердой пшеницы к осмотическому стрессу определяли по способности семян прорасти на 15%-ном растворе ПЭГ-6000 (Money, 1989; Baloch, Dunwell, Khakwani et al., 2012), а также растворе хлорида натрия с концентрацией соли 1,3% (Шихмурадов, 2014). В качестве контроля использовали дистиллированную воду. Заранее отобранные и отсортированные семена подвергались обеззараживанию 0,1% раствором перманганата калия.

Для проращивания семян использовали метод рулонов. Зерновки проращивали в термостате при температуре $22,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ в течение 5 суток. На пятые сутки определяли следующие показатели: всхожесть, количество и длину зародышевых корешков, длину проростка (рис. 7). Измерения проводили с помощью линейки с точностью до 1 мм. Кроме того, определяли массу корней и проростков. Эксперимент проводили в 3 повторениях, по 30 семян на одно повторение.



Рисунок 7 – Измерение длины главных зародышевых корней и проростка

Индексы устойчивости (ИУ) к осмотическим стрессам рассчитывали как отношение показателя, полученного в условиях стресса, к контролю.

$$\text{ИУ длины корней} = \frac{\text{Длина корней в условиях стресса}}{\text{Длина корней в условиях контроля}}$$

$$\text{ИУ длины проростка} = \frac{\text{Длина проростков в условиях стресса}}{\text{Длина проростков в условиях контроля}}$$

$$\text{ИУ массы проростка} = \frac{\text{Масса проростков в условиях стресса}}{\text{Масса проростков в условиях контроля}}$$

$$\text{ИУ массы корней} = \frac{\text{Масса корней в условиях стресса}}{\text{Масса корней в условиях контроля}}$$

$$\text{ИУ количества корней} = \frac{\text{Количество корней в условиях стресса}}{\text{Количество корней в условиях контроля}}$$

$$\text{Индекс всхожести} = \frac{\text{Всхожесть семян в условиях стресса}}{\text{Всхожесть семян в условиях контроля}}$$

Интегративный индекс устойчивости (ИИ) определяли как среднее всех частных индексов (Юдина, Леонова, Салина и др., 2014).

Определение уровня устойчивости к стрессам у соматоклональных линий, полученных в результате отбора регенерантов на селективных средах *in vitro*, проводили методом дискриминантного анализа, позволяющего отнести образец с неизвестной характеристикой к одной из заранее определённых групп (Тюрин, Щеглов, 2015), в нашем случае устойчивости к стресс-факторам. Формирование модельных групп проводили на основе физиологических показателей генотипов с известной полевой засухоустойчивостью. Для этой цели выполнено лабораторное тестирование 10 образцов яровой твердой пшеницы в растворах, содержащих различные осмотические компоненты: 1,3% NaCl, 15% ПЭГ-6000 и 5% сахарозу. Согласно полевым испытаниям 2009-2012 гг. в условиях Приобской лесостепи Алтайского края, данные образцы соответствовали следующим категориям: Оазис и Безенчукская 210 – высокоустойчивые; Омская степная, Памяти Янченко, Солнечная 573, Гордеиформе 752 и 1480-Д4 – среднеустойчивые; Жемчужина Сибири, 12S1-14 и 12S2-24 – неустойчивые к засухе (Розова, Зиборов, 2016).

Пыльцевой анализ. Для оценки засухоустойчивости соматоклональных линий яровой твердой пшеницы проводили пыльцевой анализ с использованием пыльцы регенерантов 3-го поколения. Отбирали не менее 5 колосьев каждого образца. Подрезали колосковые чешуи, пыльцу стряхивали на лист бумаги и переносили препаровальной иглой на предметное стекло. Питательной средой для культивирования пыльцевых зерен служили 2 опытных варианта, позволяющие оценить внутреннюю и индуцированную способность генотипов к осморегуляции в условиях осмотического стресса:

вариант 1 – 55% раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000) – оценивает внутреннюю способность к осморегуляции;

вариант 2 – 55% раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000) + 10 μ M KCl – оценивает индуцированную способность к осморегуляции.

Контролем являлся вариант, где питательным раствором служила 30% ПЭГ-6000 (Patil, Ravikumar, 2011). Препараты переносили в чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу, помещали в термостат при температуре $24,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ и культивировали в течение 2-х суток. Анализировали пыльцу на цитологических препаратах с использованием светового микроскопа Olympus BX51 при увеличении $40\times$. Оценивали площадь цитоплазмы пыльцевых зерен после воздействия осмотического стресса в сравнении с контрольным вариантом. Площадь цитоплазмы рассчитывали при помощи программы SellSensStandard, позволяющей в автоматическом режиме после вывода изображения на экран, провести сканирование поверхности пыльцевого зерна.

Были определены следующие параметры пыльцевых зерен:

A – площадь цитоплазмы в условиях отсутствия стресса (30% ПЭГ);

B – площадь цитоплазмы в условиях осмотического стресса (55% ПЭГ);

C – площадь цитоплазмы в условиях осмотического стресса (55% ПЭГ) с добавлением осмолита $10 \mu\text{M}$ KCl.

Параметры для определения механизмов осмотической адаптации в пыльце различных генотипов твердой пшеницы рассчитывали как отношение проекции площадей пыльцевых зерен, подвергшихся различным уровням осмотического стресса:

$B/A \cong 1$ – внутренняя осмотическая адаптация;

$B/A < 1$ – отсутствие внутренней осмотической адаптации.

$C/B \cong 1$ – индуцированная осмотическая адаптация;

$C/B < 1$ – отсутствие индуцированной осмотической адаптации.

$C/A \cong 1$ – общая осмотическая адаптация;

$C/A < 1$ – отсутствие общей осмотической адаптации (Patil, Ravikumar, 2011).

Количество оцененных пыльцевых зерен на каждое повторение составляло не менее 50 шт. Эксперимент выполнен в 4 повторениях.

Статистическую обработку данных проводили с использованием методов вариационной статистики (рассчитывали среднюю арифметическую \pm ошибку средней), дисперсионного, корреляционного, регрессионного и дискриминантного анализов (Доспехов, 1973; Лакин, 1990; Тюрин, Щеглов, 2015). Все статистические расчеты производили с помощью прикладных программ *Microsoft Excel 2007*.

ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ ФОРМООБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ ЯРОВОЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ *IN VITRO*

3.1. Оптимизация технологии получения растений-регенерантов яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro*

3.1.1. Тип экспланта

Согласно литературным данным, процесс органо- и эмбриоидогенеза растений в культуре *in vitro* зачастую зависит от выбранного типа экспланта (Benkirane, Sabounji, Chlyah, 2000; Авксентьева, Петренко, 2009; Танасиенко, Емец, Блюм, 2009; Чернов, Пендинен, 2011; Yin, Wang, She, 2011; Gill, Gosal, Sah, 2014; Пыкало, 2015). Так, для получения эмбриогенных каллусных линий используют соматические ткани молодых соцветий (Nakamura, Keller, Fedak, 1984; Чернов, Пендинен, 1992; Sharma, Rao, Varshney et al., 1995), апикальные меристемы конусов нарастания побегов (Исаева, Першина, Шумный, 1983; Wigel, Hughes, 1985; Zhang S., Zhang H., Sticklen, 1996; Konov, Bronner, Skryabin et al., 1998; Авксентьева, Жмурко, 2012), узлы кущения, пыльники (для андрогенеза) (Голованова, Григорьева, Никитина, 1991; Бавол, Дубровная, Лялько, 2008), листовые экспланты (Vitanova, Vitanov, Trifonova et al., 1995; Wang, Wei, 2004; Сидор, Орлов, 2005). Для двудольных характерно использование семядолей (Seriani, Norr, Nahne et al., 1992; Егорова, Ставцева, Митрофанова, 2011; Манабаева, Рахимжанова, Каиржанова и др., 2013). Для злаков наиболее распространенным эксплантом с высоким морфогенетическим потенциалом являются незрелые зародыши (Хамула, Солодовниченко, Базько, 1987; Григорьева, Шлецер, 2006; Shrawat, Becker, Lorz, 2006; Круглова, Катасонова, 2009; Никитина, 2014). Однако их применение связано с необходимостью иметь в наличии большое количество цветущих растений, находящихся в определенной стадии онтогенеза, что

зачастую довольно трудновыполнимо. При исследовании каллусо-, морфогенеза и регенерации обычно используют тот тип экспланта, который наиболее удобен для проведения экспериментов и обеспечивает эффективное получение достоверных результатов. Привлечение зрелых зародышей злаков в качестве эксплантов позволяет избежать неудобств, связанных с сезонностью работы, и получать первичный каллус круглогодично (Lupotto, 1984; Zapata, Sabater, Martin, 2004; Россеев, Белан, Россеева, 2011). В связи с этим, одним из этапов оптимизации технологии получения растений-регенерантов являлось проведение сравнительной оценки использования зрелых и незрелых зародышей в культуре *in vitro* как наиболее часто применяемых типов эксплантов в селекции зерновых культур.

В процессе исследования было установлено, что все изучаемые генотипы яровой твердой пшеницы не зависимо от типа экспланта формировали каллусную ткань, однако скорость и частота индукции каллусогенеза была различной. Так, интенсивная дедифференциация незрелых зародышей начиналась на 3-и сутки, тогда как формирование первичного каллуса в культуре зрелых зародышей инициировалось лишь на 4-5-е сутки. Массовое образование каллусных культур наблюдалось на 5-7-й день после помещения зародышей на питательную среду для дедифференциации эксплантов.

На рисунке 8 представлены данные частоты каллусогенеза образцов яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro*. Согласно полученным результатам, исследуемые формы характеризовались разной способностью к индукции каллуса как в зависимости от генотипа, так и типа экспланта. При этом уровень образования каллусных линий при использовании в качестве эксплантов незрелых зародышей оказался выше на 3-11%, достигая в среднем 94,1%. Средняя частота каллусообразования в культуре зрелых зародышей была несколько ниже и составила 86,7% (прил. 5).

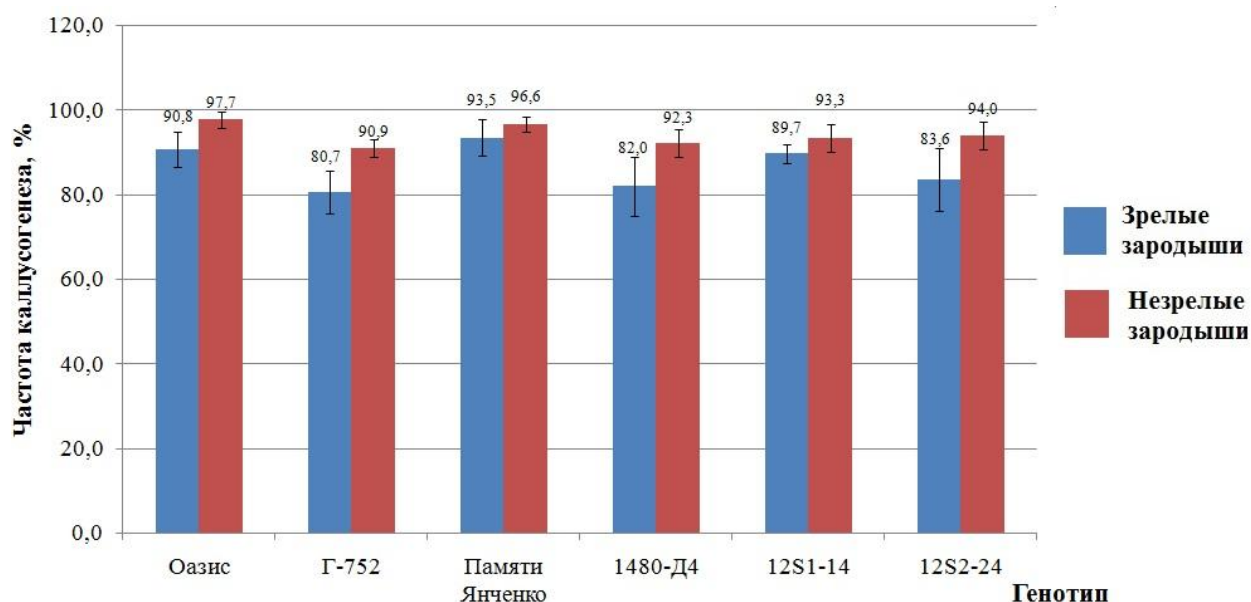


Рисунок 8 – Частота каллусогенеза образцов яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro* зрелых и незрелых зародышей, %

Лучшими показателями характеризовались сорта Оазис и Памяти Янченко. Так, у сорта Оазис частота каллусогенеза в культуре незрелых зародышей находилась на уровне $97,7 \pm 1,8\%$, при этом наблюдалось снижение данного признака при использовании в качестве эксплантов зрелых зародышей ($90,8 \pm 4,1\%$). Максимальным уровнем каллусогенеза – $93,5 \pm 4,3\%$ – в культуре зрелых зародышей обладал сорт Памяти Янченко. На средах с другим типом эксплантов показатель был выше на $3,1\%$, равняясь $96,6 \pm 1,8\%$. Однако различия между значениями в данном случае статистически незначимы.

Худшими показателями частоты образования каллусных линий характеризовались генотипы 1480-Д4 и Г-752. На средах, где в качестве эксплантов использовали незрелые зародыши, уровень каллусогенеза составил $92,3 \pm 3,3$ и $90,9 \pm 2,1\%$, соответственно. В культуре зрелых зародышей произошло снижение рассматриваемого показателя, составляя при этом $82,0 \pm 7,0$ (1480-Д4) и $80,7 \pm 5,0\%$ (Г-752).

Для большинства практических целей важен не столько уровень каллусогенеза, сколько количество образовавшихся морфогенных линий,

сопряженного с дальнейшей регенерацией растений. Большинство авторов придерживается мнения об отсутствии связи между частотой индукции каллуса и уровнем морфогенеза (Maddock, Risiott, Parmar, 1985; Hong-jun, Shuij, Osamu, 1989). В связи с этим представляла интерес сравнительная оценка морфогенетического потенциала изучаемых генотипов в культуре зрелых и незрелых зародышей.

Согласно полученным данным, уровень морфогенеза существенно различался в зависимости от генотипа и типа эксплантов (рис. 9). Так, варьирование частоты морфогенеза в культуре незрелых зародышей происходило от $83,1 \pm 2,4$ до $97,6 \pm 2,4$ %, составляя в среднем 91,5%. Лучшими генотипами по данному признаку оказались сорта Памяти Янченко ($97,6 \pm 2,4$), Оазис ($95,2 \pm 2,4$), линии Г-752 ($93,3 \pm 3,8$) и 12S1-14 ($91,4 \pm 5,4$) (прил. 6).

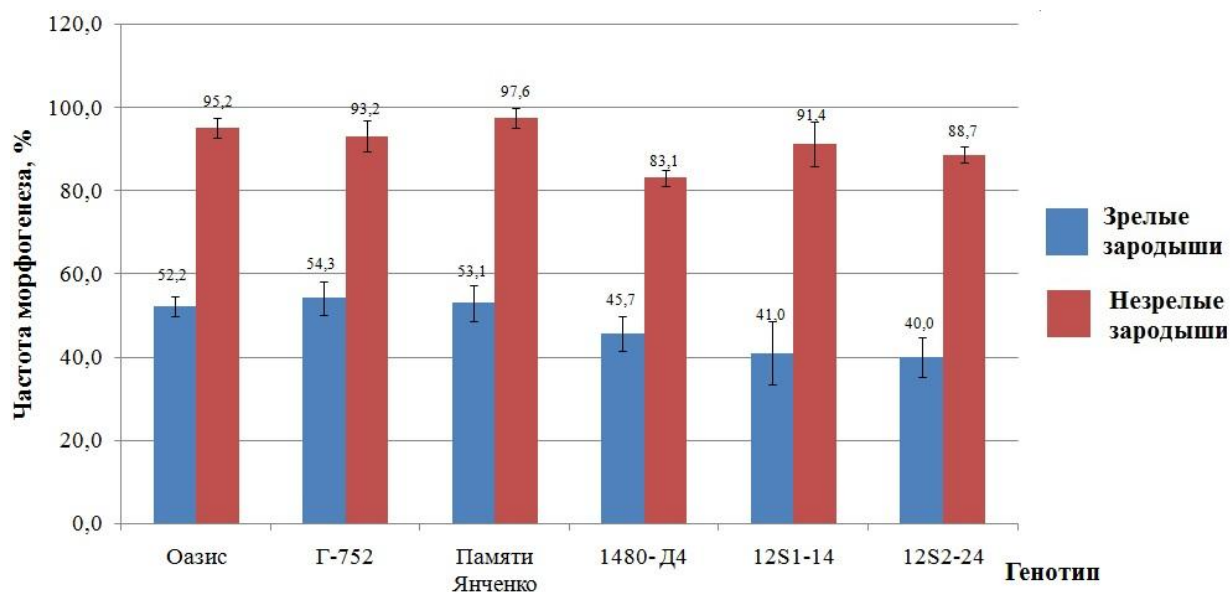


Рисунок 9 – Частота морфогенеза образцов яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro* зрелых и незрелых зародышей, %

Группа образцов, показавших максимальные результаты формирования морфогенетических линий, являлась однородной и, согласно $НСР_{0,05} = 10,3$, не различалась между собой. Линия 1480-Д4, уровень

морфогенеза которой характеризовался как минимальный ($83,1 \pm 1,8\%$), достоверно отличалась от всех представленных генотипов, обладающих лучшими показателями.

В культуре зрелых зародышей наблюдали достоверное снижение частоты индукции морфогенного каллуса на 37-50% в зависимости от генотипа. В среднем морфогенез был на уровне 47,7%, варьируя от $40,0 \pm 4,2$ (12S2-24) до $54,3 \pm 4,0\%$ (Г-752). Генотипами, показавшими лучшие результаты, как в культуре зрелых, так и незрелых зародышей, являются сорта Оазис ($52,2 \pm 2,4\%$), Памяти Янченко ($53,1 \pm 4,3\%$) и линия Г-752 ($54,3 \pm 4,0\%$). Максимальное снижение частоты морфогенеза – в 2,3 раза – выявлено у генотипа 12S1-14, составляя при этом $41,0 \pm 7,6\%$.

При качественной оценке морфогенетических линий, полученных в культуре зрелых и незрелых зародышей, были отмечены отличительные особенности процесса морфогенеза. Так, в культуре незрелых зародышей морфогенез заканчивался формированием целых растений (Ерещенко, Хлебова, Розова, 2015), что обусловлено высоким уровнем гемморизо-, и эмбриоидогенеза. При использовании другого типа эксплантов наблюдали формирование большого количества корней, характерного для ризогенных процессов (рис. 10), что привело к снижению числа регенерантов.

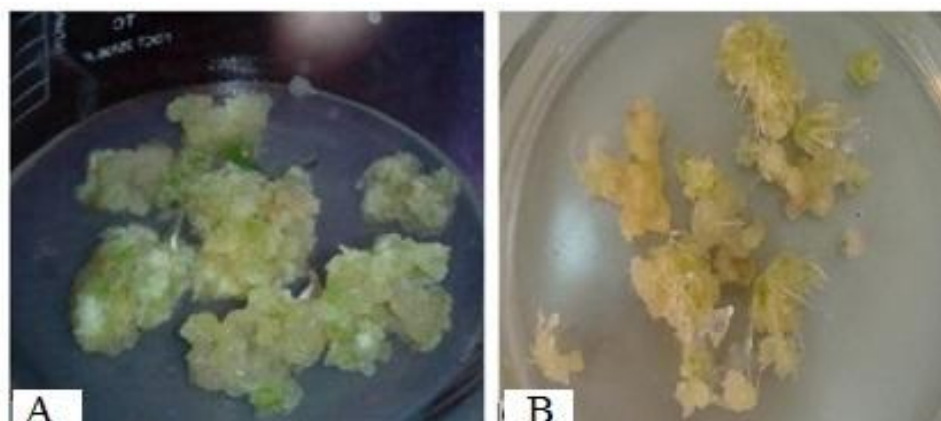


Рисунок 10 – Морфогенез яровой твердой пшеницы (сорт Памяти Янченко) в культуре *in vitro*

А – культура незрелых зародышей, В – культура зрелых зародышей

Возможной причиной этого мог стать высокий уровень эндогенных гормонов как в исходных эксплантах, так и в пролиферирующем каллусе. Основными веществами, регулирующими процессы морфогенеза *in vitro*, являются цитокинины и ауксины. Из литературных данных известно, что формообразовательные процессы в культуре ткани зачастую зависят от содержания эндогенных гормонов в исходных эксплантах, что продемонстрировано на растениях табака, трансгенных по гену изопентил-трансферазы (*ipt*) и глюкоизомеразы (*xyl*), обладающих повышенной способностью синтеза цитокининов. Изменение эндогенного баланса регуляторов роста (цитокинины/ауксины) оказало влияние на процесс морфогенеза у таких растений, введенных в культуру, обуславливая более интенсивное формирование побегов и снижение процесса ризогенеза (Фоменко, Бердичевец, Малюш и др., 2001). В результате ответная реакция экспланта зависит не только от концентрации экзогенно применяемого регулятора роста, но и от его эндогенного уровня в тканях растений и соотношения с другими гормонами. В данном случае, развивающийся зародыш сам продуцирует стимуляторы роста, поэтому не нуждается в экзогенных гормонах, либо для его дедифференциации необходимы сниженные дозы веществ, регулирующих процесс морфогенеза.

Таким образом, наличие эндогенных фитогормонов в зрелых зародышах твердой пшеницы, свидетельствует об особой роли чувствительности тканей экспланта к регуляторам роста, которые определяют его компетентность и готовность воспринимать экзогенный гормональный сигнал и реагировать на него определенным образом. Вполне вероятно, что особенностями гормонального статуса изучаемых сортов объясняется их специфическая реакция в зависимости от доз ауксина и цитокинина, присутствующих в питательной среде (Hess, Carman, 1998).

Помимо этого, эффективность использования зародышей в качестве эксплантов может снижаться за счет их прямого прорастания (рис. 11).

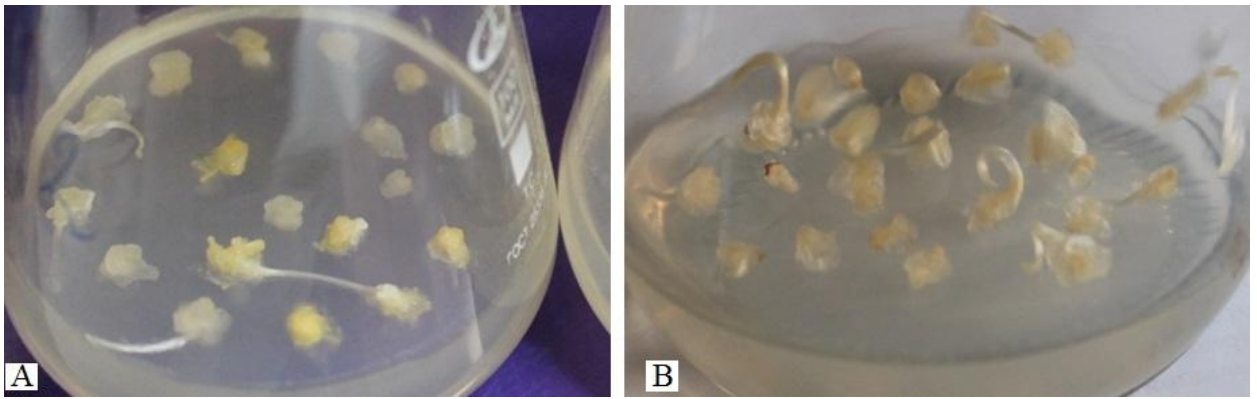


Рисунок 11 – Прямое прорастание эксплантов яровой твердой пшеницы (сорт Памяти Янченко) в культуре *in vitro*

А – культура незрелых зародышей, В – культура зрелых зародышей

Так, в зависимости от генотипа частота прямого прорастания в культуре зрелых зародышей варьировала от $65,4 \pm 4,7$ (1480-Д4) до $82,7 \pm 2,4\%$ (12S1-14) (рис. 12, прил. 7). В культуре незрелых зародышей средняя частота прорастания была существенно ниже и составила $34,7\%$, варьируя от $18,4 \pm 3,8$ (Г-752) до $49,5 \pm 2,4\%$ (12S1-14).

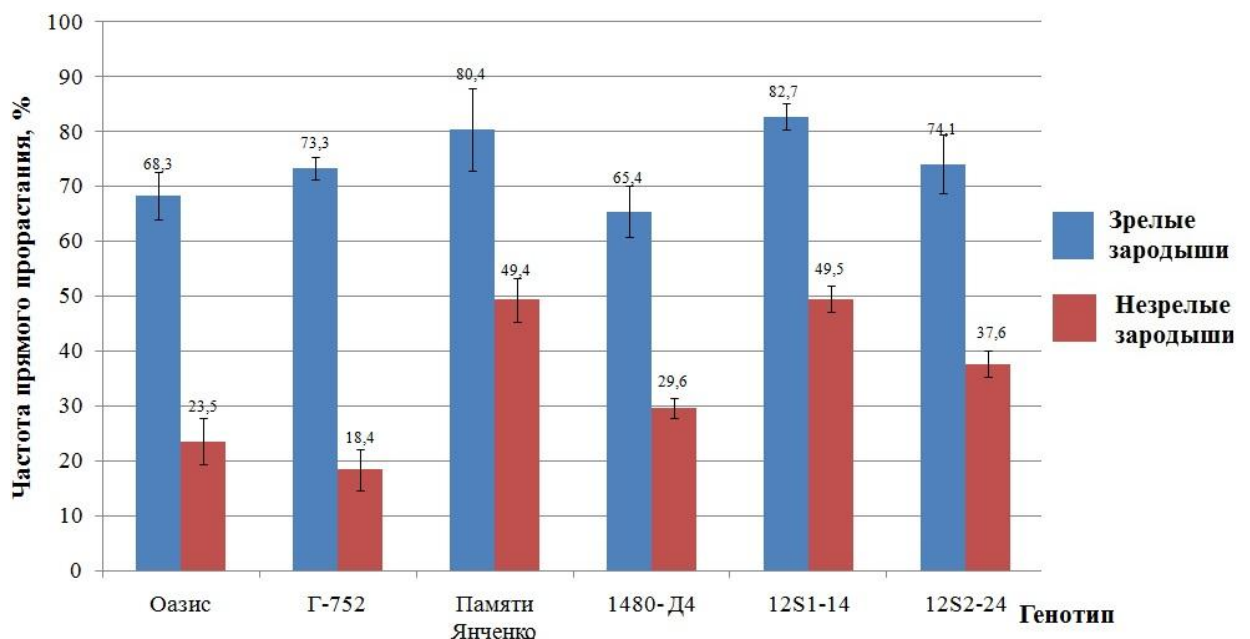


Рисунок 12 – Частота прямого прорастания образцов яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro* зрелых и незрелых зародышей, %

Полученные нами результаты согласуются с имеющимися литературными данными о высокой частоте предварительного прорастания в культурах зрелых и незрелых зародышей мягкой пшеницы (Ozias-Akins, Vasil, 1982; Vapat, Joshi, Mascarenhas, 1988; Chevrier, Quoreshi, Hull et al., 1990; Mzouri, Amssa, Bouiamrine, 2001) и ячменя (Abumhadi, Kamenarova, Todorovska et al., 2005). В работе Mzouri и Amssa (2002), было показано влияние стадии развития зародыша на прямое прорастание. Как упоминалось выше, существует корреляция между возрастом зародыша и эндогенным содержанием регуляторов роста, в частности гормона «покоя» – абсцизовой кислоты (АБК). Для эмбрионов на ранних стадиях развития характерен интенсивный синтез АБК, что объясняет их более низкое прорастание (Qureshi, Kartha, Abrams et al., 1989; Gaspar, Kevers, Penel et al., 1996).

Прямое прорастание зародышей в культуре *in vitro* рассматривают как нежелательное явление, поскольку оно снижает частоту каллусо- и морфогенеза. Для преодоления этой проблемы Н. Chlyah с коллегами (1990), предлагает разделять зародыш на фрагменты. Существует мнение, что на прямое прорастание эксплантов оказывают влияние условия культивирования зародышей. Так С.И. Пурис с соавторами (2014) показано, что за счет температурного режима предварительное прорастание эксплантов можно снизить в 7,1 раз, а за счет светового режима – в 3,1 раза.

Таким образом, высокая отрицательная корреляция между частотами ризогенеза и регенерации растений, установленная в ряде работ (Maddock, Risiott, Parmar, 1985; Hong-jun, Shuij, Osamu, 1989), а также высокий процент прямого прорастания зрелых зародышей (Bouiamrine, Diouri, Halimi, 2012), говорит о низкой эффективности применения их для получения растений-регенерантов. Однако использование данного типа экспланта позволяет моделировать и изучать в культуре *in vitro* влияние неблагоприятных факторов на растения с дальнейшим отбором ценных генотипов (Дубровна, Моргун, 2009; Россеев, Белан, Россеева, 2010; Зеленянская, Подуст, Гогоулинская, 2013; Сашко, 2016), проводить оценку селекционного

материала в культуре *in vitro* на устойчивость к экстремальным факторам среды (Россеев, 2007; Россеев, Белан, Россеева, 2011, 2016; Тагиманова, Ергалиева, Райзер и др., 2013; Сашко, 2014), а также применять в качестве объекта исследования для решения фундаментальных задач в области эмбриологии растений (Батыгина, 1974; Банникова, Хведынич, Кравец и др., 1991; Батыгина, 1997), физиологии и биохимии растений (Митрофанова, 2009; Шакирова, 2001) и т.д. В связи с этим поиск путей повышения уровня регенерации при использовании зрелых зародышей остается актуальным.

3.1.2. Период культивирования

Индукция и поддержание высокой скорости неорганизованного роста клеточных культур *in vitro* требует присутствия в питательных средах достаточно высокого уровня экзогенных ауксинов, а процессы дифференциации проходят при наличии гормонов цитокининового ряда. В связи с этим, особую роль может играть период нахождения культуры на индукционной и дифференцирующей средах, различающихся, как правило, составом и концентрацией регуляторов роста. В силу пониженной компетентности зрелых зародышей определение временных интервалов их культивирования на разных средах может оказаться одним из факторов, имеющих решающее значение для протекания морфогенетических процессов и последующей регенерации растений.

Изучение особенностей прохождения различных образовательных процессов в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от периода их культивирования на средах различного назначения позволит управлять процессами морфогенеза, что является важным звеном практического применения клеточной биотехнологии в селекции.

Для индукции морфогенеза часть каллусов в течение 30 суток каждые 5 дней пассировали на среду для дифференциации. Проведено изучение 6-ти

вариантов временных интервалов выращивания каллусов на иницирующей среде (5, 10, 15, 20, 25, 30 суток) и вариант, когда развитие клеточных культур полностью проходило на исходной среде без переноса на дифференцирующую. Оценивали следующие показатели, %: частоты каллусогенеза, морфогенеза и регенерации (относительно морфогенных каллусов).

Через 4-5 суток после пассирования зрелых зародышей твердой пшеницы на индукционную питательную среду, содержащую экзогенный ауксин, началось формирование первичных каллусных культур (прил. 8). На рисунке 13 представлен уровень каллусогенеза в зависимости от времени культивирования с момента посадки эксплантов.

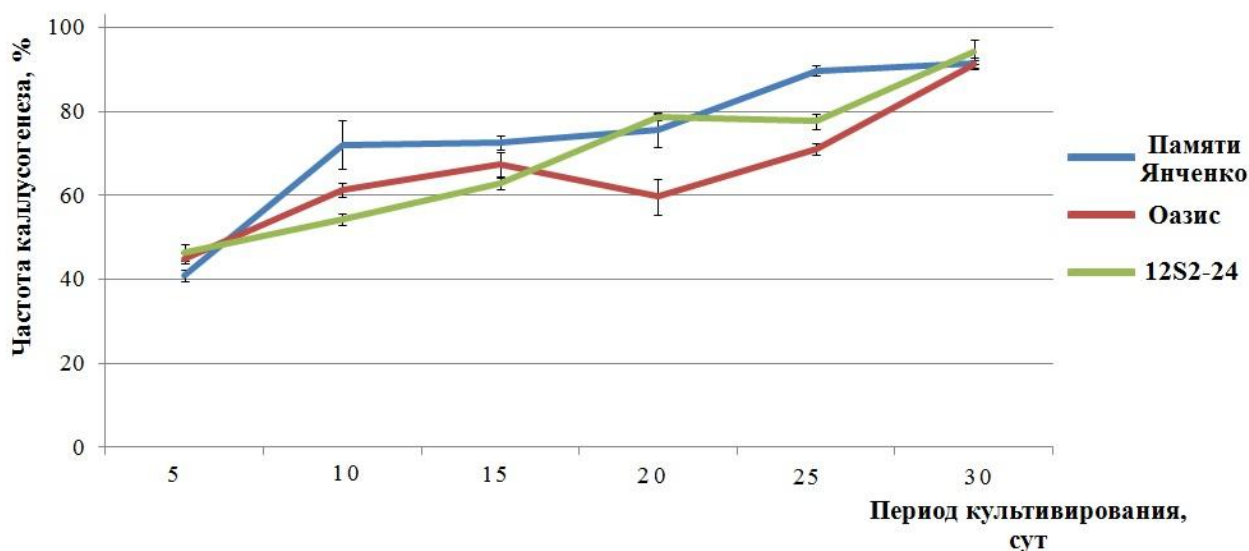


Рисунок 13 – Частота каллусогенеза в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от времени нахождения на иницирующей среде, %

Согласно рисунку, наблюдается тенденция увеличения частоты образования каллуса от 1-го к 6-му варианту. Максимальное значение признака для всех генотипов установлено в 6-ом варианте, когда каллусы в течение 30-ти суток находились на индукционной среде: в среднем по образцам он составил 92,3%. В течение пяти суток индукция каллусов

происходила у 44,3% эксплантов, при переносе которых на дифференцирующую среду протекало их дальнейшее развитие. При этом новых клеточных линий не формировалось.

Следовательно, процессы дедифференциации специализированных клеток экспланта *in vitro* тормозятся на средах с пониженным содержанием ауксина (0,5 мг/л 2,4-Д) и добавлением цитокинина (0,5 мг/л кинетина). Следует отметить, что частота каллусогенеза в результате пребывания культур на исходной среде в течение 9-ти недель без пересадки сохранилась на уровне последнего варианта, составляя при этом 87,9%.

Ранее нами установлено, что при использовании зрелых зародышей активная индукция каллусогенных процессов наблюдается на 5-7-й день после помещения их на питательную среду (Бычкова, Ерещенко, Розова, 2016), что подтверждается результатами данного эксперимента.

Дисперсионный анализ показал достоверное влияние всех рассматриваемых факторов на процессы каллусогенеза при введении в культуру *in vitro* зрелых зародышей твердой пшеницы ($F_{\text{факт.}} = 12,02; 123,26$ и $5,85$ для факторов «генотип», «период культивирования» и их «взаимодействие», соответственно, $P < 0,01$) (прил. 9). Сравнение отдельных генотипов между собой в пределах одного варианта выявило, что специфичность конкретного сортообразца проявляется, начиная с 10-суточного пребывания на иницирующей среде, и сохраняется до 25 суток. Дальнейшее культивирование нивелирует сортовые различия, приводя к выравниванию результатов.

Данные по оценке морфогенных способностей полученных каллусных культур представлены на рисунке 14. При краткосрочном пребывании на исходной среде (до 10-ти суток) в среднем около половины каллусов при дальнейшем культивировании на среде дифференциации оказались неморфогенными. При этом культуры выглядели рыхлыми, водянистыми, без видимых меристематических очагов. Пролиферация первичного каллуса на индуцирующей среде в течение 25-30 дней способствовала сохранению

компетентности соматических тканей зрелых зародышей и обеспечила формирование морфогенных зон. Как результат, уровень признака у сорта Памяти Янченко, например, составил более 90%. Таким же высоким уровнем морфогенетического потенциала обладали каллусы, развитие которых проходило исключительно на исходной среде. Значение данного показателя оказалось на уровне 5 и 6-го вариантов, достигая в среднем 86,1% (прил. 10).

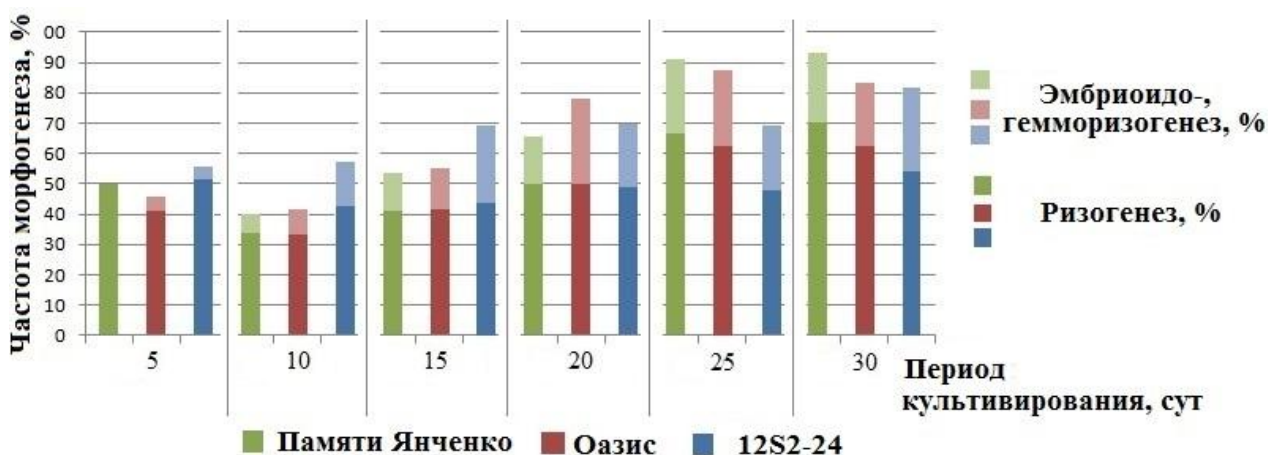


Рисунок 14 – Морфогенетическая способность каллусных культур яровой твердой пшеницы в зависимости от времени нахождения на иницирующей среде, %

Статистический анализ полученных данных подтвердил достоверность их различия в зависимости от периода культивирования каллусов на индукционной среде ($F_{\text{факт.}} = 79,01$, $P < 0,01$). Роль генотипа, также как и при оценке каллусогенеза, проявилась, начиная со 2-го варианта, и выражалась в специфичности реакции отдельного образца на условия культивирования; F-критерий фактора «взаимодействие генотип \times период культивирования» составил 7,06 при $P < 0,01$ (прил. 11).

Стабильная регенерация растений, как одна из важнейших задач в прикладной биотехнологии, свидетельствует об успешности протекания морфогенных процессов в каллусных тканях. Получение регенерантов из морфогенного каллуса может быть достигнуто несколькими путями – через

соматический эмбриогенез или органогенез. Первый – реализуется за счет формирования биполярных структур, сходных с зиготическими эмбрионами, и получившими название эмбриоидов. Второй путь предполагает индукцию монополярных структур, приводящих к появлению стеблей (геммогенез), корней (ризогенез) или побегов (гемморизогенез). В связи с этим, представляло интерес оценить долю морфогенетических структур, развивающихся по пути эмбриоидо- и гемморизогенеза, поскольку в этом случае формируются полноценные растения. Установлено, что 5-10-суточное содержание каллусов на среде с повышенным уровнем экзогенного ауксина, приводит в дальнейшем к преимущественному развитию ризогенных процессов. При смене режима культивирования – перемещения культур в условия фотопериода – не происходило синтеза хлорофилла, которое, как правило, предшествует появлению побегов. При увеличении инкубационного периода каллусов на исходной среде до 15 суток доля ризогенеза снижалась примерно на 25%, в каллусе формировались узелковые структуры, внутри которых появлялись зеленые пигментированные области, из которых развивались растеньица. Подобная тенденция сохранялась и на последующих вариантах. Уровень эмбриоидо-/гемморизогенеза при культивировании каллусов исключительно на иницирующей среде на 4% уступал наиболее оптимальным вариантам (прил. 12).

Установлено достоверное влияние генотипа и режима культивирования на интенсивность ризогенных процессов ($F_{\text{факт.}} = 8,26$ и $14,26$, соответственно, $P < 0,01$) (прил. 13).

На рисунке 15 представлена частота регенерации растений в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы. Максимальные показатели наблюдали при выращивании клеточных культур в течение 15 – 20-ти суток на исходной среде с последующим переносом на среду с цитокинином: у линии 12S2-24 частота регенерации составила 36,3%, а у сорта Оазис – 36,1% (прил. 14).

Для клеточных культур сорта Памяти Янченко наиболее эффективным оказался 5-ый вариант (25-суточная экспозиция на исходной среде). Реализация регенерационного потенциала морфогенных каллусов с 5-дневным периодом инкубации на иницирующей среде была чрезвычайно низка для всех генотипов, составляя 6-10%. Дисперсионный анализ подтвердил достоверность влияния генотипа и условий культивирования на данный признак ($F_{\text{факт.}} = 8,38$ и $12,27$, соответственно, $P < 0,01$) (прил. 15).

Сравнение особенностей прохождения различных образовательных процессов на разных этапах культивирования свидетельствует, что высокий уровень каллусогенеза не гарантирует получения максимального числа регенерантов.

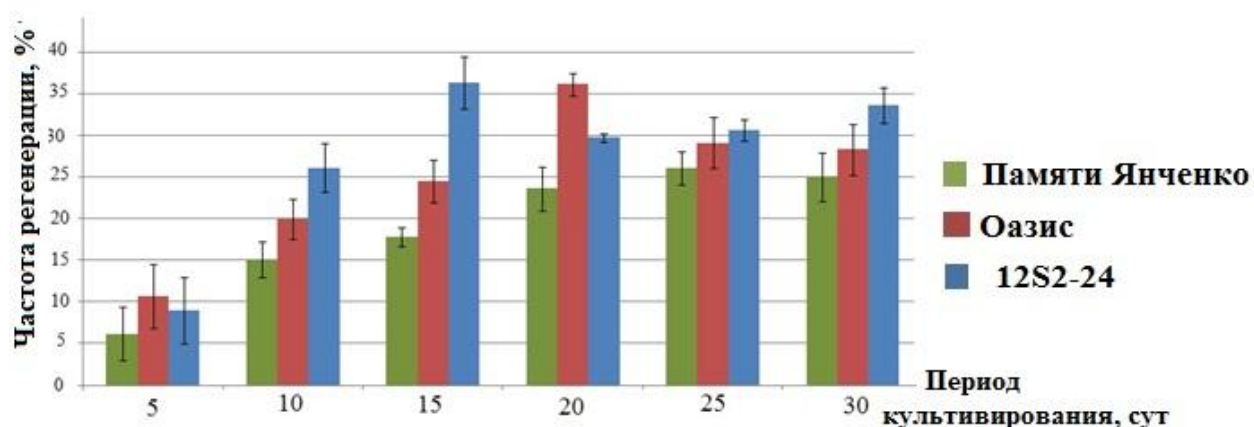


Рисунок 15 – Частота регенерации растений в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы, в зависимости от времени нахождения на иницирующей среде, %

Регенерационная способность каллусов определялась преимущественно частотой эмбриоидогенных и гемморизогенных клеточных линий. Сходные результаты были получены нами при культивировании незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы. Анализ множественных взаимосвязей между каллусо-, морфогенезом и регенерацией растений выявил доминирующий фактор – процесс образования эмбриоидов и

побегов, определяющий выход регенерантов. Доля его в вариабельности уровня регенерации растений составила 51% (Хлебова, Никитина, Мацюра, 2016). На отсутствие корреляции между частотой индукции каллуса и регенерации у пшеницы указывали и другие авторы (Zale, Borchardt-Wier, Kidwell et al., 2004; Be, Kou, Chen et al., 2007). Существует мнение, что ключевым моментом в культуре зрелых зародышей является уровень дифференциации индуцированного каллуса. Идентификация локусов (QTL), ответственных за реакцию пшеницы в культуре ткани, выявила, что большое количество независимых и тесно сцепленных генов контролируют различные стадии образовательных процессов *in vitro* (Jia, Yi, Yu et al., 2007; Ma, Deng, Si-Yu et al., 2016). Выполненное нами настоящее исследование также подтвердило генотипическую обусловленность прохождения всех этапов формирования клеточных культур и регенерации растений.

Таким образом, установлено, что максимальный уровень каллусогенеза (92,3%) наблюдали при инкубации культур на исходной среде в течение 30 суток. При краткосрочном культивировании эксплантов на иницирующей среде (в течение 5 суток) и последующем переносе на дифференцирующую среду происходит пролиферация уже оформившихся клеточных кластеров, однако новых каллусов не иницируется, что обусловило низкую частоту каллусогенеза (44,3%).

Развитие первичного каллуса на индуцирующей среде в течение 20-30 дней способствовало сохранению компетентности соматических тканей зрелых зародышей и обеспечило формирование максимального числа морфогенных структур различного качества. Направление развития морфогенеза зависело от времени пребывания культур на исходной среде: при увеличении инкубационного периода до 15 суток доля ризогенеза снижалась на 25%, в каллусе формировались узелковые структуры, из которых в дальнейшем развивались растеньица. Наиболее эффективный вариант реализации регенерационного потенциала морфогенных каллусов для сорта Оазис и линии 12S2-24 – 15-20-суточная экспозиция на исходной

среде с последующим переносом на дифференцирующую среду; для сорта Памяти Янченко – выращивание каллусов на исходной среде в течение 25 суток.

3.1.3. Селективный фактор

Подбор селективных факторов и определение их оптимальных доз для последующего отбора устойчивых форм при условии сохранения регенерационного потенциала в культуре *in vitro* является одной из ведущих задач при создании стрессоустойчивого селекционного материала.

Для имитации осмотического стресса в условиях *in vitro* применяют осмотически активные вещества, которые снижают внешний водный потенциал. К таким веществам относят сахарозу, маннит, сорбит, полиэтиленгликоль и др. (Сидоров, 1990; Тучин, Архипова, Носова и др., 1991; Shen, Jensen, Bohnert, 1997; Tabori, Dobranszki, Iszaly-Toth et al., 2009; Аль-Холани, Тоайма, Долгих, 2010; Игнатова, 2011). Другим перспективным направлением клеточной селекции является отбор устойчивых форм на селективных средах, моделирующих засуху за счет присутствия компонентов природного засоления почв, например, хлорида натрия. В таком случае можно получить соле- и засухоустойчивые формы растений (Ошмарина, 1983; Сидоров, 1990; Щуплецова, 2008; Гладков, 2009; Егорова, Ставцева, 2013; Никитина, Хлебова, Соколова и др., 2013; Никитина, Хлебова, Ерещенко, 2014).

В ряде работ показана возможность отбора на средах с вышеперечисленными селективными агентами стрессоустойчивых клеточных линий и регенерантов, сохраняющих искомый признак в ряду поколений (Долгих, Ларина, Шамина и др., 1994; Аль-Холани, Тоайма, Долгих, 2010; Моргун, Дубровна, Моргун, 2016). Данные об используемых концентрациях осмотиков в клеточной селекции существенно различаются в зависимости от объекта исследования. Сведений о применении *in vitro* в

качестве экстремальных факторов ПЭГ и хлорида натрия для отбора устойчивых форм яровой твердой пшеницы недостаточно, что и определило необходимость выполнения подобного эксперимента применительно к генотипам и типам эксплантов, изучаемым в настоящей работе.

Разрабатываемая нами селективная система, имитирующая условия засухи, включала два вида осмотических веществ: ионный – хлорид натрия и неионный – полиэтиленгликоль 6000. Модельными объектами служили 3 образца яровой твердой пшеницы, различающиеся по уровню засухоустойчивости: высокий – у сорта Оазис, средний – у формы 1480-Д4 и низкий – у линии 12S2-24.

Результаты исследования образцов в культуре незрелых зародышей на средах, содержащих хлорид натрия в концентрации от 0,5 до 2,0%, демонстрируют существенное варьирование частоты каллусогенеза как в зависимости от генотипа, так и дозы селективного агента ($61,3 \pm 2,0$ – 100%) (табл. 3). В контроле значение признака в среднем по генотипам составило 96,3%. При этом статистически значимых различий между отдельными образцами не выявлено.

Таблица 3 – Частота каллусогенеза в культуре незрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации хлорида натрия в питательной среде

Сорт/ линия	Содержание в питательной среде NaCl, %				
	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Оазис	98,7±1,3	96,5±3,3	97,3±1,5	94,7±2,9	84,8±2,0
1480-Д4	97,7±2,3	100,0±0,0	96,4±3,3	89,0±3,0	66,7±2,4
12S2-24	92,4±4,3	91,7±3,3	90,3 ±2,0	86,7±3,3	61,3±2,0
HCP _{0,05}	9,7				

Достоверное снижение частоты образования каллусных линий в сравнении с контрольным значением не зависимо от генетических особенностей представленных образцов наблюдали на селективной среде, содержащей 2%-ную дозу NaCl. Однако индивидуальная реакция отдельных

генотипов существенно различалась. Менее всего ингибирующий эффект селективного агента был выражен у засухоустойчивого сорта Оазис (85,9% к контролю), а максимальное снижение (66,3% к контролю) зафиксировано у линии 12S2-24, неустойчивой к засухе. Несмотря на то, что для изучаемых генотипов данная концентрация селективного агента не является сублетальной с точки зрения реализации каллусогенных компетенций, тем не менее, скорость и интенсивность пролиферации клеток существенно снижалась. Решающим аргументом в выборе эффективной дозы селективного фактора в данной системе отбора явилась чрезвычайно низкая частота формирования морфогенных каллусов и отсутствие регенерантов у всех введенных в культуру образцов в присутствии 1,5 и 2%-ной концентрации хлорида натрия (табл. 4).

Поскольку необходимым условием успешно реализованной клеточной селекции является наличие растений-регенерантов, мы можем рассматривать уровни стрессового фактора в пределах 1,5 – 2,0% в качестве летальных.

Таблица 4 – Частота регенерации растений в культуре незрелых зародышей сортов мягкой яровой пшеницы в зависимости от концентрации хлорида натрия в питательной среде

Сорт/ линия	Содержание в питательной среде NaCl, %				
	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Оазис	83,7±4,3	82,4±3,6	55,3±1,5	00,0±0,0	00,0±0,0
1480-Д4	79,3±2,9	74,1±4,2	30,8±0,9	00,0±0,0	00,0±0,0
12S2-24	184,3±7,2	176,7±6,3	32,1±4,2	00,0±0,0	00,0±0,0
НСР _{0,05}					12,1

Следует отметить, что достоверное снижение частоты регенерации относительно контрольного значения наблюдали у всех генотипов при добавлении в питательную среду 1% хлорида натрия. Отмеченная выше закономерность интенсивности снижения калусогенных возможностей в зависимости от уровня засухоустойчивости образцов твердой пшеницы, сохранилась и при реализации их регенерационного потенциала.

Максимальное снижение данного параметра – 17,4% относительно контроля – установлено у линии 12S2-24. Уровень регенерации морфогенных каллусов засухоустойчивого сорта Оазис составил 66,1% к контрольному значению. Образец 1480-Д4 занял промежуточное положение, реализовав регенерационный потенциал на селективной среде на 38,8% от контроля.

Учитывая результаты рассмотренного эксперимента, мы считаем логичным определить более точную дозу селективного агента в системе отбора, выполнив дополнительный эксперимент в интервале концентраций хлорида натрия от 1,0 до 1,5% с шагом 0,1% (табл. 5).

Уровень каллусогенеза варьировал от 85,7±2,3 до 98,3±1,3% в зависимости от генотипа и концентрации селективного фактора. Существенное снижение частоты формирования клеточных линий относительно контроля у изученных образцов наблюдалось в интервале 1,3 – 1,5%.

Таблица 5 – Частота каллусогенеза в культуре незрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации хлорида натрия в питательной среде

Сорт/ линия	Содержание в питательной среде NaCl, %						
	0	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
Оазис	98,7±1,3	98,3±1,7	97,3±1,5	95,3±2,6	93,0±1,7	88,3±1,7	92,7±1,5
1480-Д4	97,7±2,3	97,0±3,0	95,3±2,9	97,7±2,3	95,7±2,3	87,7±1,5	86,3±1,7
12S2-24	92,4±4,3	93,3±1,7	91,7±1,7	90,7±1,8	91,3±2,0	86,7±1,7	85,7±2,3
НСР _{0,05}							4,6

На рисунке 16 представлена частота регенерации растений в культуре незрелых зародышей образцов яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации селективного агента. В контроле, при отсутствии селективного фактора, признак варьировал от 79,3±2,9 до 184,3±7,2%, составляя в среднем 119,8%. При увеличении содержания хлорида натрия в питательной среде отмечено снижение регенерационного потенциала исследуемых образцов. При концентрации селективного агента на уровне 1,5% регенерация

оказалась заблокированной, несмотря на наличие небольшого числа морфогенных каллусов.

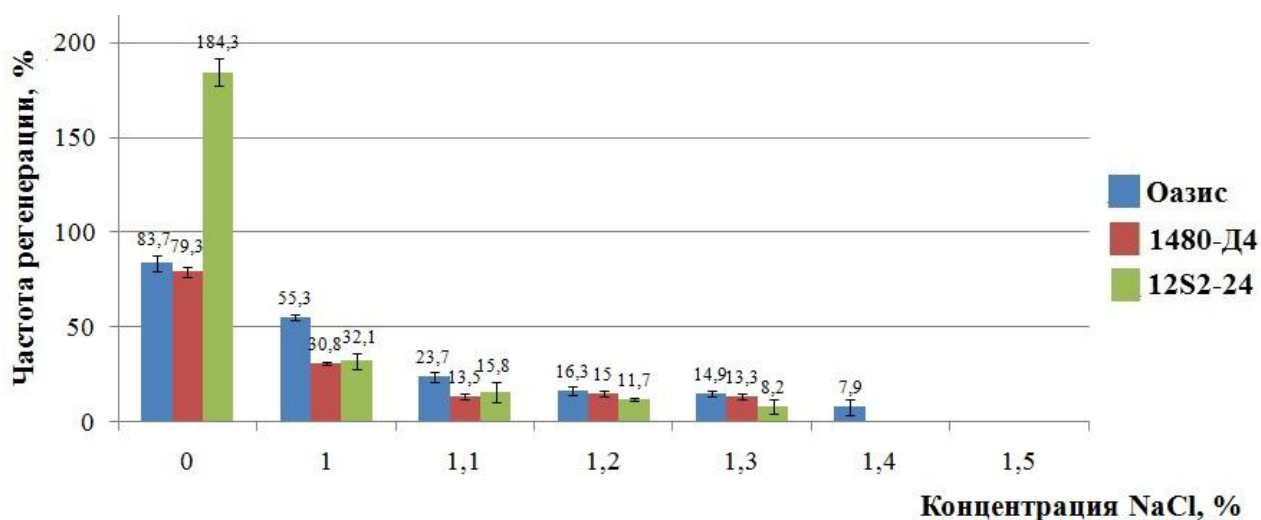


Рисунок 16 – Частота регенерации в культуре незрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации хлорида натрия, %

Морфогенные возможности таких культур реализовывались по пути ризогенеза. На каллусах сорта Оазис регенерировало единичное растение на среде с добавлением 1,4% NaCl; каллусы остальных генотипов индуцировали полноценные растеньица при дозах селективного фактора до 1,3% (прил. 16). Учитывая частоты формообразовательных процессов *in vitro* на различных дозах селективного агента, полагаем, что отбор стрессоустойчивых клеточных линий твердой пшеницы, сохраняющих регенерационный потенциал, следует проводить при концентрации хлорида натрия на уровне 1,3%.

Для создания условий осмотического стресса с использованием полиэтиленгликоля 6000 в питательной среде был заложен эксперимент в интервале 10 – 25% с шагом 5%. Частота образования клеточных линий в культуре незрелых зародышей варьировала как в зависимости от генотипа, так и от содержания стресс-фактора в среде (табл. 6).

Таблица 6 – Частота каллусогенеза в культуре незрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации ПЭГ-6000 в питательной среде

Сорт/ линия	Содержание в питательной среде ПЭГ-6000, %				
	0	10	15	20	25
Оазис	98,7±1,3	92,7±2,4	70,3±3,7	58,3±1,9	43,3±1,7
1480-Д4	97,7±2,3	82,0±3,5	65,7±1,5	49,0±2,1	36,7±3,3
12S2-24	92,4±4,3	90,3±3,4	64,0±2,1	50,0±2,1	36,0±3,8
НСР _{0,05}					44,7

Согласно $НСР_{0,05} = 44,7$, достоверное снижения уровня каллусогенеза относительно контроля наблюдали на средах, содержащих ПЭГ-6000 в концентрациях 20 – 25%. У сорта Оазис данный показатель составил 59,0% к контролю, а у образцов 1480-Д4 и 12S2-24 – 50,1 и 54,1%, соответственно. При этом отмечено формирование морфогенных каллусов различной структуры (рис. 17).

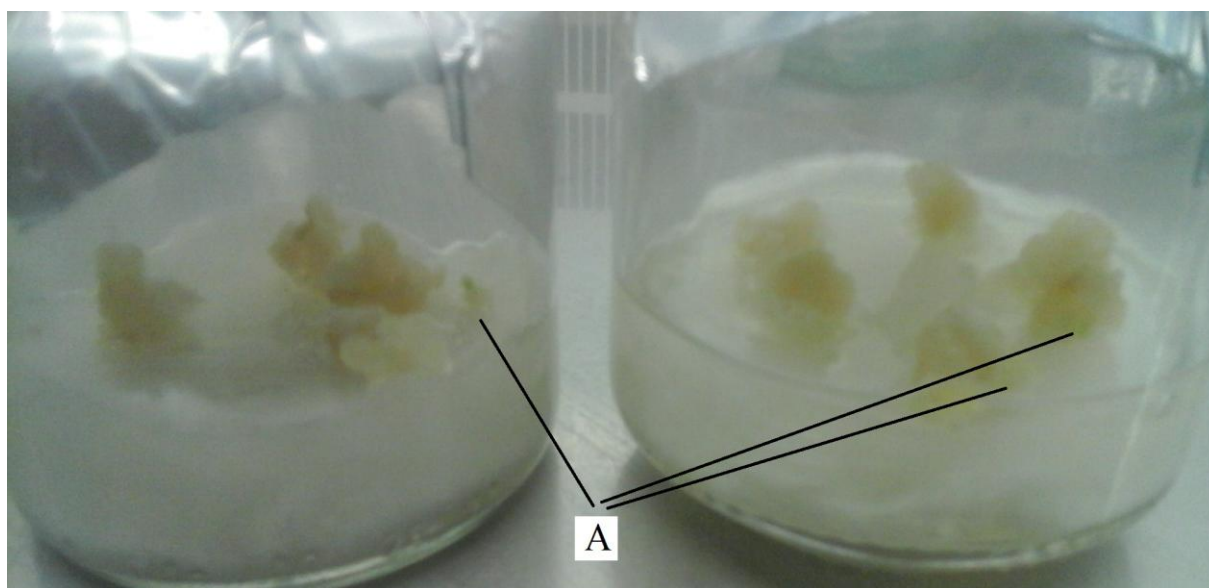


Рисунок 17 – Каллусогенез линии 12S2-24 на питательной среде, содержащей 20% ПЭГ-6000: А – морфогенные каллусы

Оценка регенерационной способности клеточных культур показала достоверное снижение признака в зависимости от содержания ПЭГ-6000 в питательной среде, начиная с концентрации 10% (рис. 18). Варьирование по

генотипам составило от 32,3 до 43,3%, что в 1,9-5,2 раза уступало контрольному значению.

Единичное формирование растений-регенерантов у всех изучаемых образцов наблюдали на средах с добавлением экстремального фактора в концентрации 15 – 20%. При максимальной дозе ПЭГ-6000 – 25% – не удалось получить ни одного регенеранта (прил. 17). В результате, сублетальная концентрация селективного агента ПЭГ-6000 для отбора устойчивых к дефициту влаги форм яровой твердой пшеницы определена на уровне 20%.

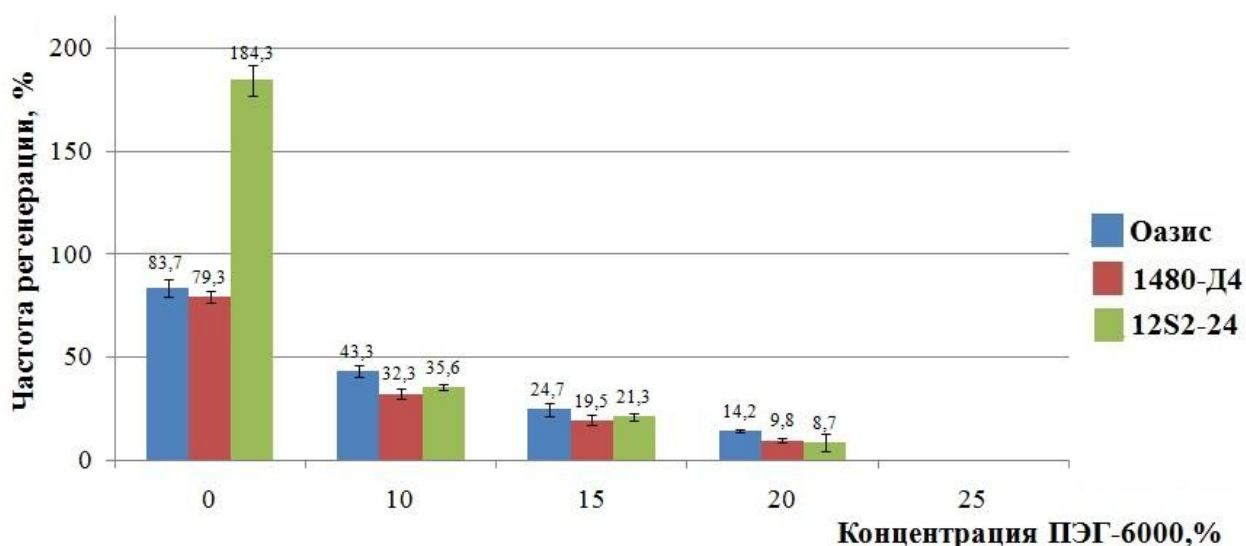


Рисунок 18 – Частота регенерации в культуре незрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации ПЭГ-6000, %

Таким образом, селективная система *in vitro*, смоделированная на основе сублетальной концентрации хлорида натрия на уровне 1,3%, позволяет отбирать в культуре незрелых зародышей 12,1% регенерантов яровой твердой пшеницы с потенциальной устойчивостью к засолению. Аналогичная система отбора растений с потенциально высокой осмоустойчивостью, представляющих интерес в селекции на засухоустойчивость, конструируется путем добавления в питательную среду 20% ПЭГ-6000, что обеспечивает 10,9% уровень регенерации. Кроме того,

описанные системы пригодны для скрининга коллекционного и селекционного материала твердой пшеницы с целью дифференциации генотипов по устойчивости к засухе и избыточному засолению.

Представленная выше оптимизация культивирования *in vitro* зрелых зародышей яровой твердой пшеницы позволяет успешно получать определенное количество регенерантов (см. гл. 3.1.2.). Учитывая круглогодичную доступность для исследователя данного типа эксплантов, весьма привлекательно разработать аналогичную селективную систему для оценки и отбора стрессоустойчивых генотипов.

В таблице 7 представлены результаты культивирования зрелых зародышей трех генотипов яровой твердой пшеницы на питательных средах, содержащих различные концентрации хлорида натрия. Уровень каллусогенеза в системе отбора при использовании данного типа эксплантов был несколько ниже в сравнении с культивированием незрелых зародышей.

Таблица 7 – Частота каллусогенеза в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации хлорида натрия в питательной среде

Сорт/ линия	Содержание в питательной среде NaCl, %				
	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Оазис	90,7±4,1	86,9±2,2	85,9±2,7	69,5±1,9	53,3±2,6
1480-Д4	86,9±2,2	78,9±2,6	72,1±1,9	45,8±2,7	43,1±4,0
12S2-24	83,3±7,4	87,8±1,3	77,4 ±2,9	43,7±2,3	41,6±2,1
НСР _{0,05}	31,0				

Достоверное снижение частоты образования клеточных линий определялось генотипом и наблюдалось на селективных средах, начиная с 1,5%-ной концентрации хлорида натрия для образцов, относящихся к группе неустойчивых либо среднеустойчивых к дефициту влаги. Засухоустойчивый сорт Оазис характеризовался высокой частотой каллусогенеза при культивировании эксплантов на всех дозах селективного агента до 2%-ного порога. Ингибирующий эффект стрессового фактора более выражено

проявлялся у линий 1480-Д4 и 12S2-24, составив 49,6 и 49,9% относительно контроля.

Частота регенерации, как в контроле, так и на селективных средах у всех генотипов не зависимо от концентрации соли была довольно низкой, не превышая 26,0% (табл. 8). Каллусные культуры линии 12S2-24 формировали единичные растения лишь при уровне хлорида натрия до 0,5%. Низкий уровень регенерации всех генотипов не позволил достаточно четко выделить сублетальную дозу агента при рассмотренном диапазоне концентраций.

Дальнейшее детальное изучение каллусогенных и регенерационных процессов при культивировании зрелых зародышей твердой пшеницы на селективных средах с содержанием NaCl в диапазоне 1,0 – 1,5% выявило существенное варьирование параметров в зависимости от генотипа и концентрации селективного фактора.

Таблица 8 – Частота регенерации в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации хлорида натрия в питательной среде

Сорт/ линия	Содержание в питательной среде NaCl, %				
	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Оазис	21,0±2,1	20,9±2,2	23,0±1,4	00,0±0,0	00,0±0,0
1480-Д4	20,0±2,2	22,5±2,6	22,0±2,1	00,0±0,0	00,0±0,0
12S2-24	26,0±2,1	24,8±1,3	00,0±0,0	00,0±0,0	00,0±0,0
НСР _{0,05}					3,0

Частота индукции клеточных линий в системе отбора варьировала от 43,7±2,3 до 85,9±2,7%, существенно превышая изменчивость, наблюдаемую при культивировании незрелых зародышей (табл. 9). Достоверное снижение интенсивности каллусогенных процессов относительно контроля отмечено у исследуемых генотипов, начиная с дозы 1,0%, достигая почти двукратных различий при концентрации 1,5%. Оценка регенерационного потенциала генотипов на селективных средах продемонстрировала единичное

формирование растений при концентрации хлорида натрия в пределах от 1,0 до 1,2% (рис. 19).

Таблица 9 – Частота каллусогенеза в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации хлорида натрия в питательной среде

Сорт/ Линия	Содержание в питательной среде NaCl, %						
	0	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
Оазис	90,7±4,1	85,9±2,7	76,3±3,0	75,9±2,1	72,1±1,4	68,7±2,1	69,5±1,9
1480-Д4	86,9±2,2	72,1±1,9	71,5±2,2	64,6±2,3	55,9±2,4	48,4±2,6	45,8±2,7
12S2-24	83,3±7,4	77,4 ±2,9	77,6±1,8	70,1±3,1	61,6±1,8	55,3±2,5	43,7±2,3
HCP _{0,05}	6,8						

Признак варьировал от 0 до 23,0±1,4%. При этом у линии 12S2-24, неустойчивой к засухе, на среде, содержащей селективный фактор, регенерация отсутствовала. У остальных генотипов образование единичных регенерантов происходило на средах с концентрацией селективного агента до 1,2% (прил. 18).

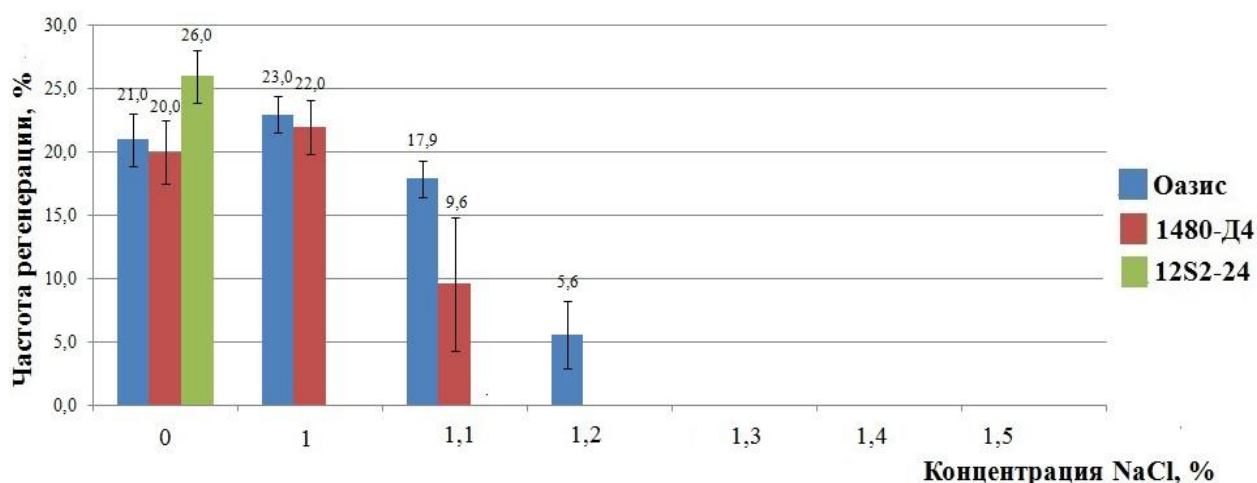


Рисунок 19 – Частота регенерации в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации хлорида натрия, %

Таким образом, чрезвычайно низкий уровень регенерационных событий в системе отбора при культивировании зрелых зародышей не

позволил выявить концентрации хлорида натрия, эффективные для получения соматклонов с потенциальной солеустойчивостью.

При использовании в качестве селективного агента ПЭГ-6000 в пределах концентраций 10 – 25% частота каллусогенеза варьировала от $42,7 \pm 1,6$ до $81,2 \pm 1,1\%$ (табл. 10). Достоверное снижение признака относительно контроля наблюдали уже при 10%-ной дозе стресс-фактора. Повышение концентрации агента приводило к дальнейшему снижению показателя.

Таблица 10 – Частота каллусогенеза в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации ПЭГ-6000 в питательной среде

Сорт/ линия	Содержание в питательной среде ПЭГ-6000, %				
	0	10	15	20	25
Оазис	$90,7 \pm 4,1$	$81,2 \pm 1,1$	$79,6 \pm 0,8$	$62,8 \pm 1,6$	$47,5 \pm 3,9$
1480-Д4	$88,0 \pm 1,5$	$73,4 \pm 1,9$	$71,8 \pm 1,8$	$53,4 \pm 3,5$	$44,6 \pm 2,3$
12S2-24	$83,3 \pm 7,4$	$71,8 \pm 1,9$	$61,6 \pm 4,2$	$62,6 \pm 1,5$	$42,7 \pm 1,6$
НСР _{0,05}					9,1

Использование зрелых зародышей обусловило также довольно низкий уровень регенерации аналогично отбору в селективной системе, смоделированной на основе хлорида натрия (прил. 19). У линии 12S2-24 на среде с минимальной концентрацией селективного агента – 10% – формирование регенерантов не происходило. У генотипов 1480-Д-4 и Оазис уровень регенерации составил 3,6 – 17,8% (рис. 20).

Таким образом, анализируя результаты, полученные при культивировании зрелых зародышей твердой пшеницы в экспериментах по оптимизации селективного агента, следует признать довольно низкую эффективность подобных систем для их использования в клеточной селекции. Основной причиной неудач является низкий морфогенетический потенциал эксплантов вследствие высокой организации тканей зрелых

зародышей, что затрудняет их использование для получения соматоклональных вариантов, устойчивых к стрессовым факторам.

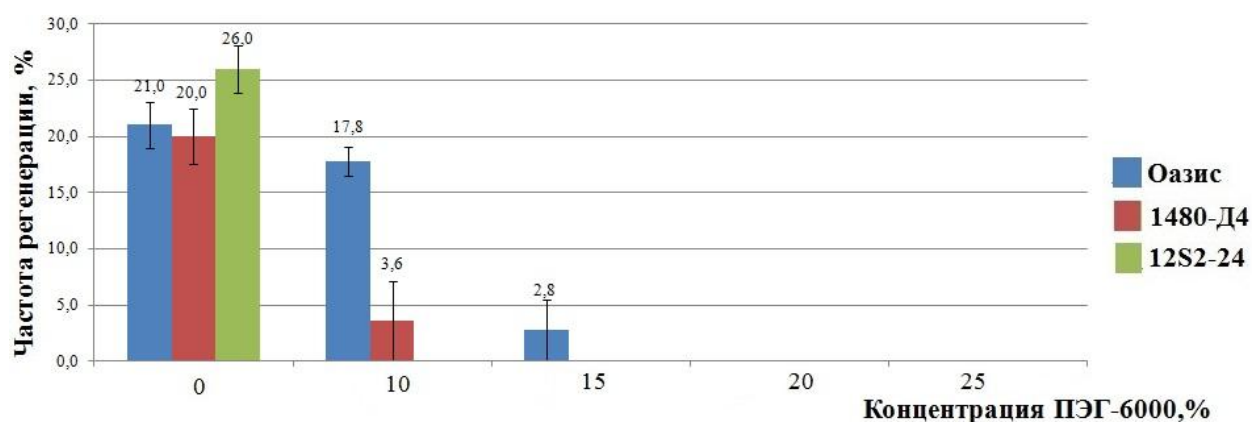


Рисунок 20 – Частота регенерации в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации ПЭГ-6000, %

Не зависимо от уровня засухоустойчивости генотипов твердой пшеницы отбор клеточных линий *in vitro*, устойчивых к осмотическому стрессу, сохраняющих регенерационную способность, следует проводить в культуре незрелых зародышей при концентрации в питательной среде хлорида натрия до 1,3%, полиэтиленгликоля 6000 – до 20%.

3.2. Особенности формообразовательных процессов в культуре ткани яровой твердой пшеницы в условиях осмотического и солевого стресса

3.2.1. Каллусогенез

Высокий уровень формирования каллусов после введения в культуру *in vitro* незрелых зародышей характерен для всех изучаемых генотипов яровой твердой пшеницы (Бычкова, 2016). Массовое образование клеточных линий происходило на 5-7-е сутки после помещения эксплантов на питательные среды. Однако единичная дедифференциация клеток тканей зародыша на 2-3-и сутки культивирования наблюдалась у сортов Памяти

Янченко – $4,7 \pm 2,3$ (2014 г.) и $6,3 \pm 3,1$ (2016 г.), Оазис – $4,2 \pm 2,8$, а также у линий 1480-Д4 – $20,7 \pm 8,25$ (2014 г.) и Г-752 – $3,9 \pm 1,2\%$ (2016 г.).

В таблице 11 представлена частота каллусообразования образцов яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro* после 35-40 суток культивирования. Средняя частота формирования каллусов в контроле в 2014 г. составила 96,3%. Максимальный уровень каллусогенеза – 100% – характерен для образцов сорта Памяти Янченко и линии 1480-Д4. Незначительно ниже оказался показатель у образцов Оазис и линии 12S1-14, составляя $97,7 \pm 3,4$ и $98,0 \pm 5,8\%$, соответственно. Минимальным процентом образовавшихся клеточных линий характеризовались генотипы Г-752 и 12S2-24.

Таблица 11 – Частота каллусогенеза образцов яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro*, % (2014-2016 гг.)

Сорт/ линия	2014		2015		2016	
	Контроль	NaCl	Контроль	NaCl	Контроль	NaCl
Оазис	$97,9 \pm 3,4$	$97,0 \pm 2,3$	$97,7 \pm 1,8$	$92,7 \pm 2,8$	$96,9 \pm 1,4$	$93,8 \pm 1,7$
Г-752	$92,0 \pm 5,2$	$89,3 \pm 5,8$	$90,0 \pm 2,1$	$88,7 \pm 4,8$	$93,7 \pm 3,4$	$87,0 \pm 1,3^*$
Памяти Янченко	$100,0 \pm 0,0$	$97,0 \pm 2,5^*$	$96,6 \pm 1,8$	$92,3 \pm 2,4$	$97,0 \pm 2,4$	$94,9 \pm 2,2$
1480-Д4	$100,0 \pm 0,0$	$84,0 \pm 4,9^*$	$92,3 \pm 3,3$	$89,0 \pm 1,7$	$91,2 \pm 4,5$	$86,2 \pm 1,8$
12S1-12	$98,0 \pm 5,8$	$96,7 \pm 1,7$	$93,3 \pm 3,3$	$95,0 \pm 3,2$	$92,9 \pm 2,7$	$85,3 \pm 0,8^*$
12S2-24	$90,3 \pm 7,0$	$75,0 \pm 3,8^*$	$94,0 \pm 3,2$	$86,7 \pm 3,4$	$90,9 \pm 3,0$	$82,8 \pm 2,6^*$
Среднее	96,4	89,8	93,9	90,7	93,8	88,3
НСР _{0,05}	12,5	12,4	8,8	10,7	9,1	5,7

Примечание: * – различия с контролем достоверны при $P < 0,05$.

Частота каллусообразования в 2015 г. снизилась на 2,4%, составляя при этом 93,9%. Варьирование данного показателя происходило в пределах от $90,0 \pm 2,1$ (Г-752) до $97,7 \pm 1,8\%$ (Оазис). У образцов сорта Памяти Янченко, линий 1480-Д4 и 12S1-14, зарекомендовавших себя в 2014 г. как генотипы с высоким уровнем каллусогенеза, снизилось образование клеточных линий до $96,6 \pm 1,8$; $92,3 \pm 3,3$ и $93,3 \pm 3,3\%$, соответственно.

Средний показатель индукции каллусных культур в 2016 г. соответствовал частоте каллусогенеза 2015 г. и составлял 93,8%. Высокие

результаты показали сорта Памяти Янченко ($97,0 \pm 2,4\%$) и Оазис ($96,9 \pm 1,4\%$). Максимальный результат за три года исследования – $93,7 \pm 3,4\%$ наблюдали у генотипа Г-752.

Таким образом, не зависимо от условий выращивания донорных растений, лучшими образцами, показавшими максимальный уровень образования каллусов, оказались сорта Оазис и Памяти Янченко. Несколько худшими результатами обладают образцы линий 1480-Д4 и 12S1-14. Максимально низким оказался уровень каллусообразования у генотипов Г-752 и 12S2-24.

На средах с добавлением осмотического агента – хлорида натрия ($1,3\%$) – практически у всех изучаемых вариантов яровой твердой пшеницы наблюдали снижение частоты каллусообразования. Варьирование уровня образования каллусов в условиях стресса, в среднем, составляло от $88,3$ до $90,7\%$, в зависимости от года. Генотипами с высокой частотой индукции клеточных линий на протяжении нескольких лет исследования оказались сорта Оазис и Памяти Янченко. Так сорт Оазис показал максимальный результат образования каллусов в 2014 г., уровень которого достигал $97,0 \pm 2,3\%$. В 2015-2016 гг. уровень каллусогенеза снизился на несколько процентов и составил $92,7 \pm 2,8$ и $93,8 \pm 1,7\%$, соответственно. Показатели сорта Памяти Янченко оказались на уровне предыдущего генотипа – $97,0 \pm 2,5$ в 2014 г., $92,3 \pm 2,4$ в 2015 г. В 2016 г. частота формирования клеточных линий оказалась выше показателей предшествующего года, что характеризует сорт Памяти Янченко как генотип с максимальным уровнем каллусогенеза.

Достаточно стабильными оказались линии Г-752 и 1480-Д4, предел варьирования между показателями каллусогенеза в зависимости от года составил $2,3$ и 5% , соответственно. Однако их результаты оказались ниже, чем у предыдущих генотипов. Менее стабильной выглядела линия 12S1-14. В 2014-2015 гг. данный генотип показал достаточно высокие результаты – $96,7 \pm 1,7$ и $95,0 \pm 3,2\%$, соответственно. Вегетационный период 2016 г. оказался менее благоприятным, уровень образования каллусов значительно

снижился, равняясь при этом $85,3 \pm 0,8\%$. Минимальными показателями частоты клеточных линий обладал генотип 12S2-24, варьирование признака составляло от $75,0 \pm 3,8$ (2014 г.) до $86,7 \pm 3,4\%$ (2015 г.).

На рисунке 21 представлены относительные частоты (%) каллусогенных процессов изученных образцов в условиях солевого стресса относительно контрольных значений, свидетельствующие о различной реакции генотипов на селективный фактор.

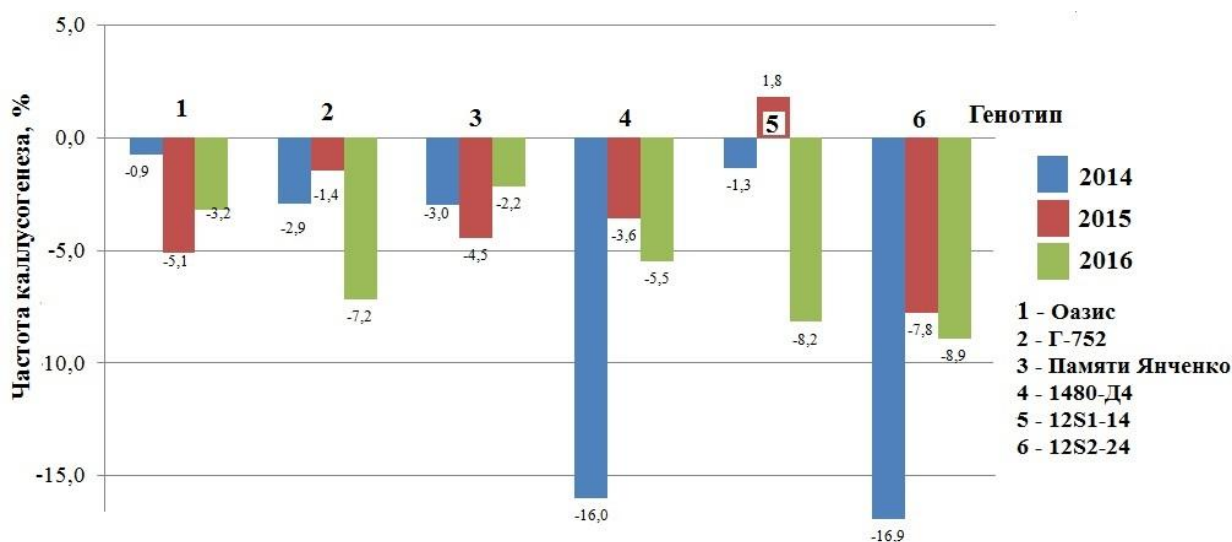


Рисунок 21 – Изменение относительно контроля частоты каллусогенеза образцов яровой твердой пшеницы на питательных средах со стресс-фактором, %

Так у сортов Оазис и Памяти Янченко интенсивность образования клеточных линий на средах с добавлением 1,3% хлорида натрия снизилась в среднем по годам на 3,1 и 3,2%, соответственно. У образцов Г752 и 12S1-14, не смотря на значительное снижение каллусообразования в 2016 г. – на 7,2 и 8,2%, соответственно, – в среднем снижение частоты формирования клеточных линий составило 3,8 и 2,6% относительно контроля. Интенсивность формирования каллусов у образца 1480-Д4 на средах, имитирующих недостаток влаги, снижалась относительно контроля на 3,6-16%, составляя в среднем 8,4%. Максимально выраженное влияние стресс-

фактора на каллусогенные возможности наблюдали у линии 12S2-24. Количество сформировавшихся каллусов в условиях солевого стресса оказалась ниже контроля на 7,8-16,9% в зависимости от года. В среднем у данного образца уровень каллусогенеза уменьшился на 11,2%.

Таким образом, за весь период исследования (2014-2016 гг.) генотипами, обладающими максимально высоким уровнем образования клеточных линий, являются сорта Оазис и Памяти Янченко, относящиеся к группам с высокой и средней полевой устойчивостью к недостатку влаги. В условиях солевого стресса *in vitro* эти же генотипы зарекомендовали себя как лучшие, стабильно минимально снижая частоту формирования каллусов – в среднем на 3,0%. Поведение линии 12S1-14, относящейся к группе с низкой полевой устойчивостью к засухе, неоднозначно. Несмотря на небольшой средний уровень снижения признака в условиях стресса (на 2,6% относительно контроля), размах варьирования по годам был достаточно широким. Второй генотип из группы образцов, неустойчивых к засухе, – 12S2-24 – показал максимальное снижение частоты каллусогенеза при воздействии стрессового фактора *in vitro*.

3.2.2. Морфогенез

Несмотря на высокую частоту образования клеточных линий при культивировании незрелых зародышей яровой твердой пшеницы их морфогенный потенциал может существенно различаться. Одним из подходов к классификации каллусов может быть их фенотипическая оценка. Так, компактные, хорошо структурированные каллусы светлого цвета относят к типу морфогенных. К неморфоренным – относят мелкие, водянистые каллусы темного цвета. Другим подходом к делению клеточных линий является наличие визуально различимых меристематических очагов (Сельдиминова, Катасонова, Круглова, 2011). В нашем случае интерес

представляет морфогенный тип каллусов, поскольку именно они способны к регенерации.

Оценка частоты морфогенетических линий показала достаточно высокий уровень морфогенеза у изучаемых генотипов. В таблице 12 представлена морфогенетическая способность образцов яровой твердой пшеницы за 2014-2016 гг. Максимальными результатами на средах без осмотического стресса за весь период исследования обладали сорта Памяти Янченко и Оазис. Так, у образца Оазис уровень морфогенеза варьировал от $95,2 \pm 2,4$ до $98,0 \pm 2,0\%$. У сорта Памяти Янченко максимальную частоту морфогенеза – 100% – наблюдали в 2014 г., далее, в 2015-2016 гг., морфогенетическая способность снижалась до $98,0 \pm 2,0$ и $97,6 \pm 2,4\%$, соответственно.

Таблица 12 – Частота морфогенеза образцов яровой твердой пшеницы в культуре незрелых зародышей *in vitro*, % (2014-2016 гг.)

Сорт/ линия	2014		2015		2016	
	Контроль	NaCl	Контроль	NaCl	Контроль	NaCl
Оазис	$97,5 \pm 0,6$	$89,8 \pm 2,0^*$	$95,2 \pm 2,4$	$95,5 \pm 2,2$	$98,0 \pm 2,0$	$93,6 \pm 1,7$
Г-752	$93,0 \pm 1,0$	$100,0 \pm 0,0^*$	$93,2 \pm 3,8$	$88,9 \pm 4,4$	$94,3 \pm 3,8$	$88,8 \pm 2,4$
Памяти Янченко	$100,0 \pm 0,0$	$86,2 \pm 1,3^*$	$97,6 \pm 2,4$	$92,3 \pm 3,9$	$98,0 \pm 2,0$	$91,3 \pm 3,2^*$
1480-Д4	$55,1 \pm 15,4$	$69,1 \pm 3,2$	$83,1 \pm 1,8$	$57,8 \pm 2,2^*$	$85,3 \pm 2,9$	$73,3 \pm 4,3^*$
12S1-12	$100,0 \pm 0,0$	$89,9 \pm 2,3^*$	$91,4 \pm 5,4$	$75,5 \pm 2,2^*$	$92,7 \pm 1,5$	$83,6 \pm 3,1^*$
12S2-24	$92,4 \pm 0,3$	$87,5 \pm 1,6^*$	$88,7 \pm 2,0$	$74,5 \pm 1,2^*$	$90,3 \pm 2,6$	$79,6 \pm 2,0^*$
Среднее	89,7	87,1	91,5	80,7	93,1	85,0
НСР _{0,05}	20,5	7,0	10,7	9,6	8,3	9,7

Примечание: * – различия с контролем достоверны при $P < 0,05$.

Стабильной частотой образования морфогенных каллусов характеризовалась линия Г-752 ($93,0 \pm 1,0$ – $94,3 \pm 3,8\%$). Не смотря на максимально возможный уровень морфогенеза – 100%, характерный для генотипа 12S1-14 в 2014 г., в последующие годы данный показатель не превышал $92,7 \pm 1,5\%$. Образцом, обладающим минимальной частотой формирования морфогенных каллусов, оказалась линия 1480-Д4, средний уровень признака за три года составил 74,5%.

На средах с добавлением 1,3% хлорида натрия уровень морфогенеза в среднем по генотипам в разные годы исследования варьировал от 85,0 до 87,1%. Достоверное снижение данного показателя относительно контроля наблюдали у более половины образцов. Максимальное количество морфогенных линий – 100% – наблюдали в 2014 г. у генотипа Г-752, минимальное – $57,8 \pm 2,2\%$ – характерно для линии 1480-Д4 (2015 г.).

Интересно отметить генотипы, для которых в разные годы исследования характерно увеличение частоты образования морфогенных каллусов на средах со стресс-фактором (рис. 22). Так у образцов Г-752 и 1480-Д4 в 2014 г. уровень сформировавшихся морфогенных каллусов в условиях стресса *in vitro* оказался выше на 7,5 и 25,4%, соответственно, а у сорта Оазис – в 2015 г. на 0,3% превысил контроль.

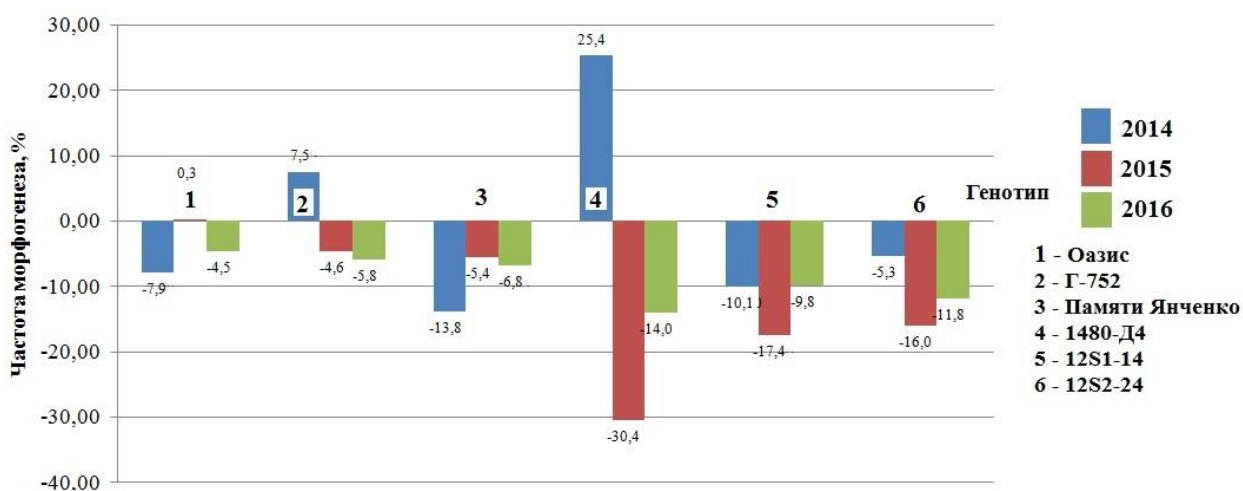


Рисунок 22 – Изменение относительно контроля частоты морфогенеза образцов яровой твердой пшеницы на питательных средах со стресс-фактором, %

Наиболее стабильным образованием морфогенетических линий в условиях солевого стресса *in vitro* характеризовались генотипы Г-752, Оазис, 1480-Д4 и Памяти Янченко. Данные образцы, относящиеся к группе с высокой и средней полевой устойчивостью к засухе, в селективных условиях в культуре ткани минимально снижали свой морфогенетический потенциал –

на 1,0; 4,1; 6,4 и 8,7%, соответственно. Линии 12S1-14 и 12S2-24, неустойчивые к недостатку влаги в полевых условиях, отрицательно реагировали на присутствие стресс-фактора в среде культивирования *in vitro*, снижая средний уровень морфогенеза на 12,4 и 11,5%, соответственно.

3.2.3. Регенерация

Наблюдение за развитием незрелых зародышей яровой твердой пшеницы на питательных средах *in vitro* в течение двух месяцев показало, что экспланты всех образцов проходят процесс дедифференциации, формируют каллусы, в которых в дальнейшем происходят процессы морфогенеза, заканчивающиеся формированием растений. Однако частота образования регенерантов различна у представленных генотипов (табл. 13). При этом стабильная регенерационная способность является необходимым условием практического применения культуры тканей в клеточной селекции, направленной на получение новых форм растений, пригодных для растениеводства.

Таблица 13 – Частота регенерации яровой твердой пшеницы в культуре незрелых зародышей *in vitro*, % (2014-2016 гг.)

Сорт/ линия	2014		2015		2016	
	Контроль	NaCl	Контроль	NaCl	Контроль	NaCl
Оазис	79,0±12,5	53,7±12,2	120,7±5,9	26,7±0,7*	99,7±4,5	47,8±3,7*
Г-752	246,0±20,1	70,7±16,2*	193,7±5,4	73,3±4,3*	203,9±8,3	83,8±4,2*
Памяти Янченко	162,0±10,0	24,0±2,6*	141,0±6,1	31,3±3,7*	121,2±3,2	28,7±3,7*
1480-Д4	75,7±14,5	17,7±5,8*	74,0±5,5	9,6±0,7*	86,8±3,9	11,9±2,3*
12S1-12	95,7±12,7	28,3±3,7*	103,3±5,6	32,2±2,0*	89,9±1,7	26,1±2,7*
12S2-24	237,7±8,3	13,7±1,5*	172,3±6,9	10,9±2,1*	158,0±10,8	15,8±6,8*
Среднее	149,4	34,7	134,2	30,7	126,6	35,7
НСР _{0,05}	22,4	29,0	17,2	15,2	19,9	12,6

Примечание: * – различия с контролем достоверны при $P < 0,05$

У половины изученных образцов в контроле почти каждый каллус регенерировал от одного до нескольких растений, а у форм Г-752, 12S2-24 и сорта Памяти Янченко регенерационный потенциал превышал 100%, т.е. из каждого морфогенного каллуса формировалось более одного растения-регенеранта. Максимальным регенерационным потенциалом обладал генотип Г-752, варьируя в пределах от $193,7 \pm 5,4$ до $246,0 \pm 20,1\%$ в разные годы исследования. Частота регенерации сорта Оазис изменялась от $79,0 \pm 12,5$ до $120,7 \pm 5,9\%$. Сходные результаты показала линия 12S1-14 ($89,9 \pm 1,7$ – $103,3 \pm 5,6\%$). Минимальную частоту образования растений-регенерантов наблюдали у образца 1480-Д4.

На средах, содержащих селективный фактор, несмотря на активный морфогенетический процесс в каллусных тканях, у большинства линий получено незначительное количество растений. Максимальное число регенерантов наблюдали у линии Г-752, не менее 70% морфогенных линий формировали полноценные растения. Эффективность регенерации у сорта Оазис оказалась несколько ниже, ее варьирование происходило от $26,7 \pm 0,7$ до $53,7 \pm 12,2\%$. Средней регенерационной способностью обладал сорт Памяти Янченко ($31,3 \pm 3,7$ – $24,0 \pm 2,6\%$) и линия 12S-14 ($32,2 \pm 2,0$ – $26,1 \pm 2,7\%$). Генотипы, показавшие в контроле максимально высокий и самый низкий регенерационный потенциал, на средах с добавлением осмотика обладали минимальной частотой регенерации.

При оценке материала в культуре *in vitro* на устойчивость к моделированному стрессу необходимо учитывать не столько уровень регенерации на селективных средах, сколько его снижение относительно контроля (рис. 23). Присутствие селективного агента *in vitro* в системе отбора в среднем по годам более чем в 2 раза уменьшило эффективность регенерации образцов Оазис и Г-752. Однако это снижение оказалось минимальным по сравнению с остальными образцами. Максимальное снижение регенерационной способности относительно контрольного

значения наблюдали у линии 12S2-24 (до 94,2%), что составило в среднем 92,6%.

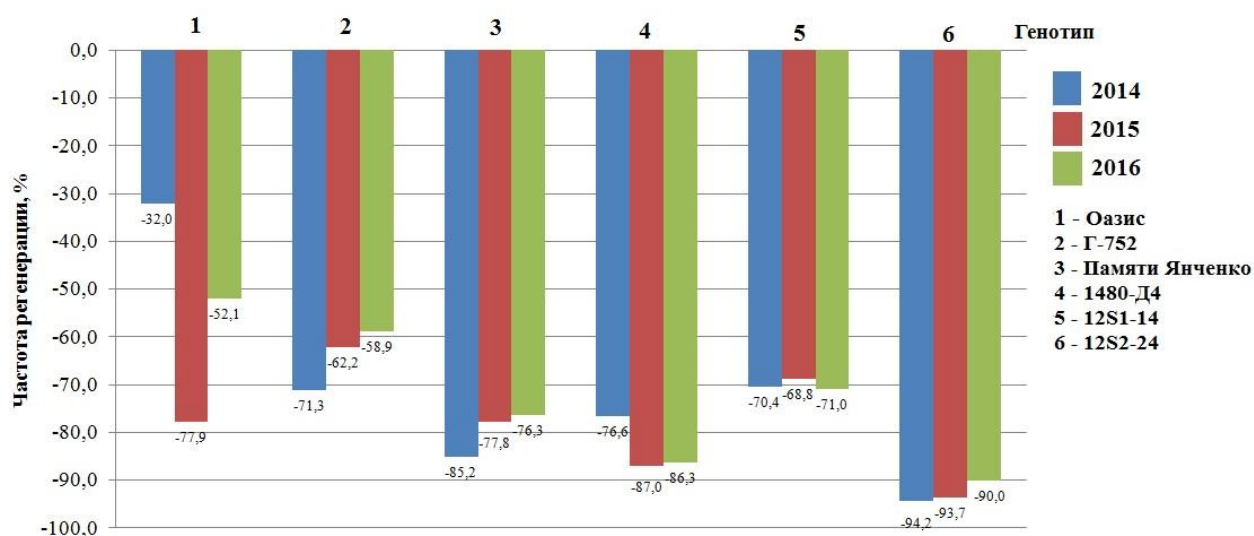


Рисунок 23 – Изменение относительно контроля частоты регенерации образцов яровой твердой пшеницы на питательных средах со стресс-фактором, %

Таким образом, генотипами, формирующими максимальное число регенерантов *in vitro* на селективной среде, оказались Оазис и Г-752, относящиеся к группе с высокой полевой устойчивостью к засухе. Образцы со средней и низкой устойчивостью к дефициту влаги снижали в культуре ткани в условиях осмотического стресса свой регенерационный потенциал относительно контроля на 70-92%.

Процесс формирования регенерантов *in vitro* состоит из нескольких этапов: индукция и пролиферация каллуса, морфогенез и собственно сама регенерация растений (Хлебова, Никитина, Мацюра и др., 2016). Каждый предыдущий этап позволяет реализоваться следующему. Однако нельзя однозначно утверждать, что при увеличении уровня одного из них возрастет эффективность другого. В связи с этим возникает необходимость провести оценку взаимосвязи различных культуральных процессов, происходящих *in*

in vitro как в отсутствие селективного фактора, так и в селективной системе. Результаты представлены на рисунке 24.

Из уравнения прямолинейной регрессии ($y = 1,113x - 13,984$) следует, что в контроле изменение факториального признака (x – каллусогенез) на 1% приводит к незначительному возрастанию уровня результативного показателя (y – морфогенез) (рис. 24А).

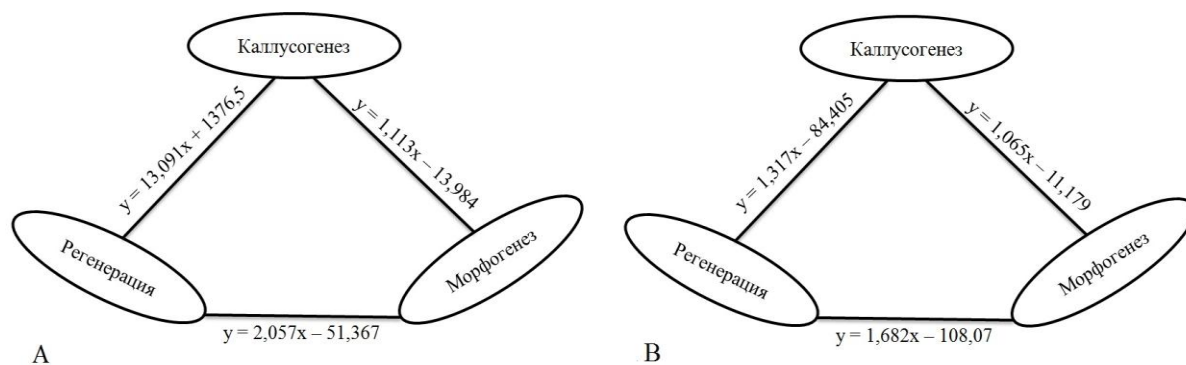


Рисунок 24 – Взаимосвязь каллусогенеза, морфогенеза и регенерации растений *in vitro* в культуре незрелых зародышей яровой твердой пшеницы:

А – контроль; В – NaCl

Корреляционный анализ показал отсутствие достоверной связи между рассматриваемыми параметрами ($r = 0,334$). Однако в условиях стресса *in vitro* взаимосвязь каллусогенных и морфогенных процессов положительна и существенна, о чем свидетельствует коэффициент корреляции, равный 0,716. Согласно коэффициенту детерминации (R^2), вариабельность морфогенетических процессов на 51% определяется каллусогенными событиями. При этом эффективность морфогенеза увеличивается на 1,065% при изменении частоты каллусогенеза на 1% ($y = 1,065x - 11,179$) (рис. 24В).

Анализ литературных данных показал, что рядом авторов также установлено отсутствие сопряженности между частотой индукции каллуса и общим уровнем морфогенеза в стандартных условиях культивирования эксплантов (Maddock, Risiott, Parmar, 1985; Komatsuda, Enomoto, Nekajima, 1989; Zale, Borchardt-Wier, Kidwell, 2004; Хлебова, Никитина, Мацюра и др., 2016), что позволяет в подобных случаях рассматривать морфогенез

генетически независимым от каллусогенеза. Добавление в питательную среду селективного фактора (в нашем эксперименте избыток NaCl) моделирует провокационный фон для выживания и последующего размножения мутантных клеток, устойчивых к фактору отбора. Морфогенетические процессы в каллусах, сформированных под селективным давлением, также принимают направленный характер под воздействием того же селективного агента, что, вероятно и обусловило сопряженность рассматриваемых процессов.

Взаимосвязь морфогенеза и регенерации в культуре ткани, на первый взгляд, кажется вполне очевидной, поскольку выход растений определяется эмбриоидогенными и гемморизогенными процессами, являющимися одними из направлений морфогенетических событий в каллусных культурах. Однако нами не установлено достоверной корреляции между данными параметрами в контрольных условиях ($r = 0,327$). Вероятнее всего, это объясняется высоким уровнем ризогенеза, существенно снижающим выход регенерантов, но повышающим общую частоту морфогенных каллусов. При изучении *in vitro* различных культуральных процессов у яровой мягкой пшеницы была установлена практически прямая отрицательная зависимость между эмбриоидо- и ризогенезом и высокая отрицательная корреляция между эффективностью регенерации и ризогенными процессами (Хлебова, Никитина, Мацюра и др., 2016).

Сопряженность морфогенеза и регенерации в условиях моделированного стресса более очевидна ($r = 0,554$, $R^2 = 31\%$). Выход растений увеличивается на 1,682% при повышении уровня морфогенеза на 1% (рис. 24В). Данный факт, вероятно, можно также объяснить действием общей селективной системы, способствующей отбору определенных генотипов. Несколько неожиданным, на наш взгляд, явилось обнаружение достоверной корреляции между частотами каллусогенеза и регенерации в отсутствии стресс-фактора в питательной среде ($r = 0,624$, $R^2 = 39\%$). Согласно уравнению прямолинейной регрессии, при оптимизации процесса

каллусогенеза выход регенерантов увеличивается на 13,091% (рис. 23А). При использовании селективного агента подобной взаимосвязи не установлено. Мы полагаем, что выявленная сопряженность каллусогенных и регенерационных процессов имеет, скорее всего, совместный характер, определяемый общим третьим параметром. Так, например, при изучении закономерностей каллусогенеза красной столовой свеклы установлено, что индукция каллуса происходит из клеток зон экспланта, имеющих повышенное содержание сахаров (Kuzevanov, Nefed'ev, Sumtsova et al., 1990). В то же время известно, что в каллусных культурах, имеющих морфогенные зоны, также увеличивается концентрация сахаров (Kuzevanov, Sumtsova, Sizych et al., 1991). Наличие общих механизмов поддержания клеточного гомеостаза не является взаимоопределяющим, но может обусловить положительную взаимосвязь рассматриваемых культуральных процессов, обнаруженных в нашем эксперименте.

Таким образом, генотипы яровой твердой пшеницы, характеризующиеся высокой и средней полевой устойчивостью к засухе, в селективных условиях в культуре ткани обладают наиболее стабильным каллусогенезом и минимально снижают свой морфогенетический и регенерационный потенциал. Линии, неустойчивые к недостатку влаги в полевых условиях, отрицательно реагируют на присутствие стресс-фактора в среде культивирования *in vitro*, существенно, снижая уровень морфогенеза и регенерации. Установлена положительная взаимосвязь между каллусогенными и морфогенными процессами, а также морфогенными и регенерационными событиями *in vitro* в условиях солевого стресса.

3.3. Влияние различных факторов на каллусогенные и морфогенетические процессы

Морфогенез *in vitro* – сложный и труднорегулируемый процесс. Многие авторы в своих работах говорят о том, что морфогенетический потенциал

зачастую обусловлен генотипом, типом экспланта, условиями культивирования, а также условиями произрастания донорных растений (Pellegrineschi, Brito, McLean et al., 2004; Mitić, Dodig, Nikolić, 2006; Chauhan, Desa, Khurana, 2007; Khlebova, Nikitina, 2016). Создание селективной системы *in vitro* накладывает дополнительные сложности в регуляции всех культуральных процессов. Выполненный нами многофакторный дисперсионный анализ позволил выявить основные факторы, влияющие на частоту каллусо- и морфогенеза, а также регенерационную способность яровой твердой пшеницы.

Результаты исследования различных генотипов *T. durum* свидетельствуют о достаточно высокой частоте каллусогенеза как в контроле, так и на средах, содержащих селективный агент. Средний уровень формирования каллусных линий на питательных средах без добавления селективного агента варьировал от 93,7 (2016 г.) до 96,3% (2014 г.). В условиях стресса средний результат оказался несколько ниже и составил 89,8; 90,7; и 88,3% в 2014-2016 гг., соответственно. Максимальное варьирование данного параметра между генотипами наблюдали в контроле в 2014 г. ($97,0 \pm 2,3$ (Оазис) – $75,0 \pm 3,8\%$ (12S2-24)). В остальных случаях интервал различий не превышал 12%.

Трехфакторный дисперсионный анализ показал, что изменчивость каллусообразования в культуре незрелых зародышей яровой твердой пшеницы статистически значимо зависит от генотипа образцов (24,2%) и условий формирования каллуса (контроль-стресс) (12,1%) (табл. 14). Влияние условия вегетационного периода произрастания растений-доноров эксплантов статистически не доказано. Несущественны для вариабельности данного признака и различные варианты взаимодействия изученных факторов.

Морфогенез в среднем по всем генотипам эффективнее всего реализовывался в каллусных культурах твердой пшеницы в контроле при отсутствии солевого стресса, варьируя от 89,7 до 93,1% в зависимости от

года исследования. Средняя частота формирования морфогенного каллуса на средах со стресс-фактором уменьшалась на 2,6 – 10,7% в разные вегетации. Достоверное снижение данного показателя наблюдали у более половины генотипов. Максимальный уровень морфогенеза в условиях стресса (87,1%) наблюдали в 2014 г., минимальный – 80,8% – в 2015 г.

Таблица 14 – Влияние различных факторов на процесс каллусогенеза яровой твердой пшеницы в культуре незрелых зародышей

Дисперсия	Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F _{факт.}	F _{0,5}
Общая	5185,5	107	-	-	-
Генотип (А)	1256,55	5	251,31	8,46	2,30
Стресс (В)	625,93	1	625,93	21,06	3,94
Условия года (С)	99,12	2	49,56	1,67	3,09
Взаимодействие «генотип × стресс» (А×В)	273,10	5	54,62	1,84	2,30
Взаимодействие «генотип × условия года» (А×С)	465,40	10	46,54	1,57	1,92
Взаимодействие «стресс × условия года» (В×С)	20,48	2	10,24	0,34	3,09
Взаимодействие «генотип × стресс × условия года» (А×В×С)	305,80	10	30,58	1,03	1,92
Случайная	2139,12	72	29,71	-	-

Данные многофакторного дисперсионного анализа подтверждают достоверность наблюдаемых различий по признаку «морфогенез» как по генотипам, так и по условиям культивирования (табл. 15). Кроме того, достоверный вклад в общую изменчивость частоты морфогенеза внесли следующие факторы: специфическая реакция генотипа на наличие стресс-фактора в питательной среде, взаимодействие генотипа с условиями года выращивания растений-доноров, взаимодействие условий вегетации произрастания донорных генотипов с условиями моделирования селективной системы, а также сложное взаимодействие всех рассматриваемых в данном комплексе факторов. Влияние случайного фактора составило 22% от общей вариабельности признака.

Таблица 15 – Влияние различных факторов на процесс морфогенеза яровой твердой пшеницы в культуре незрелых зародышей

Дисперсия	Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F _{факт}	F _{0,5}
Общая	15474,05	107	-	-	-
Генотип (А)	7606,25	5	1521,25	38,64	2,30
Стресс (В)	1387,47	1	1387,47	35,24	3,94
Условия года (С)	153,84	2	76,92	1,95	3,09
Взаимодействие «генотип × стресс» (А×В)	355,15	5	71,03	1,80	2,30
Взаимодействие «генотип × условия года» (А×С)	1524,5	10	152,45	3,87	1,92
Взаимодействие «стресс × условия года» (В×С)	335,46	2	167,73	4,26	3,09
Взаимодействие «генотип × стресс × условия года» (А×В×С)	1275,3	10	127,53	3,24	1,92
Случайная	2836,08	72	39,39	-	-

Регенерационные процессы *in vitro* активно проходили у образцов яровой твердой пшеницы на средах без добавления селективного агента, достигая максимальных значений в 2014 г. у линий Г-752 (246,0±20,1%) и 12S2-24 (237,7±8,3%). В среднем по всем генотипам регенерационная способность морфогенных каллусов в 2014 г. составила 149,3%, в 2015 г. – 134,2%, в 2016 – 126,6%. Однако реакция изученных образцов была неоднозначной и определялась физиологическим состоянием донорных растений. В условиях 2014 г. благоприятно сказались на развитии регенерантов у генотипов Г-752, 12S2-24, Памяти Янченко. Минимальный выход растений-регенерантов наблюдали у линии 1480-Д4 – 75,7±14,5%. Метеорологические условия 2015 г. способствовали снижению регенерации у всех изученных образцов за исключением линии 12S1-14. Несмотря на максимальный уровень формирования морфогенных каллусов в 2016 г., эффективность регенерации была минимальной. Лишь для линии 1480-Д4 условия 2016 г. оказались оптимальными, уровень регенерации достиг 86,8%, что явилось максимальным среди всех изученных лет.

Результаты дисперсионного анализа подтвердили статистически значимое влияние на признак «регенерация растений» всех без исключения рассматриваемых факторов (табл. 16).

Таблица 16 – Влияние различных факторов на процесс регенерации яровой твердой пшеницы в культуре незрелых зародышей

Дисперсия	Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F _ф	F _{0,5}
Общая	482690,8	107	-	-	-
Генотип (А)	109219,45	5	21843,89	122,17	2,30
Стресс (В)	286010,50	1	286010,5	1599,6	3,94
Условия года (С)	2587,26	2	1293,63	7,24	3,09
Взаимодействие «генотип × стресс» (А×В)	51565,60	5	10313,12	57,68	2,30
Взаимодействие «генотип × условия года» (А×С)	6340,20	10	634,02	3,55	1,92
Взаимодействие «стресс × условия года» (В×С)	2539,36	2	1269,68	7,10	3,09
Взаимодействие «генотип × стресс × условия года» (А×В×С)	11556,90	10	1155,69	6,46	1,92
Случайная	12871,57	72	178,77	-	-

На рисунке 25 представлены доли вклада значимых факторов и их взаимодействия в различные образовательные процессы при культивировании незрелых зародышей яровой твердой пшеницы в контроле и условиях селективной системы в присутствии 1,3% хлорида натрия в питательной среде.

Установлено, что фактор «генотип» существенно влияет на все этапы формирования клеточных культур и растений-регенерантов. Доля его влияния была максимальной на этапе развития морфогенного каллуса, достигая 49%. Каллусогенные и регенерационные процессы определялись генотипическим разнообразием исходного материала примерно в равных долях на уровне 23 и 24%, соответственно.

Наличие селективного агента в питательной среде, определяющего фактор «стресс», оказывало максимальное влияние на этапе регенерации

растений, достигая 59%. Его участие в вариабельности результатов каллусо- и морфогенеза было постоянным, но относительно небольшим, не превышая 12%. Фактор «условия года» оказал небольшое прямое влияние лишь на процесс регенерации (1%). Однако его вклад в изменчивость различных показателей косвенно проявлялся через взаимодействие с генотипом, стресс-фактором и общее взаимодействие всех трех факторов в объеме 0,5-10%.

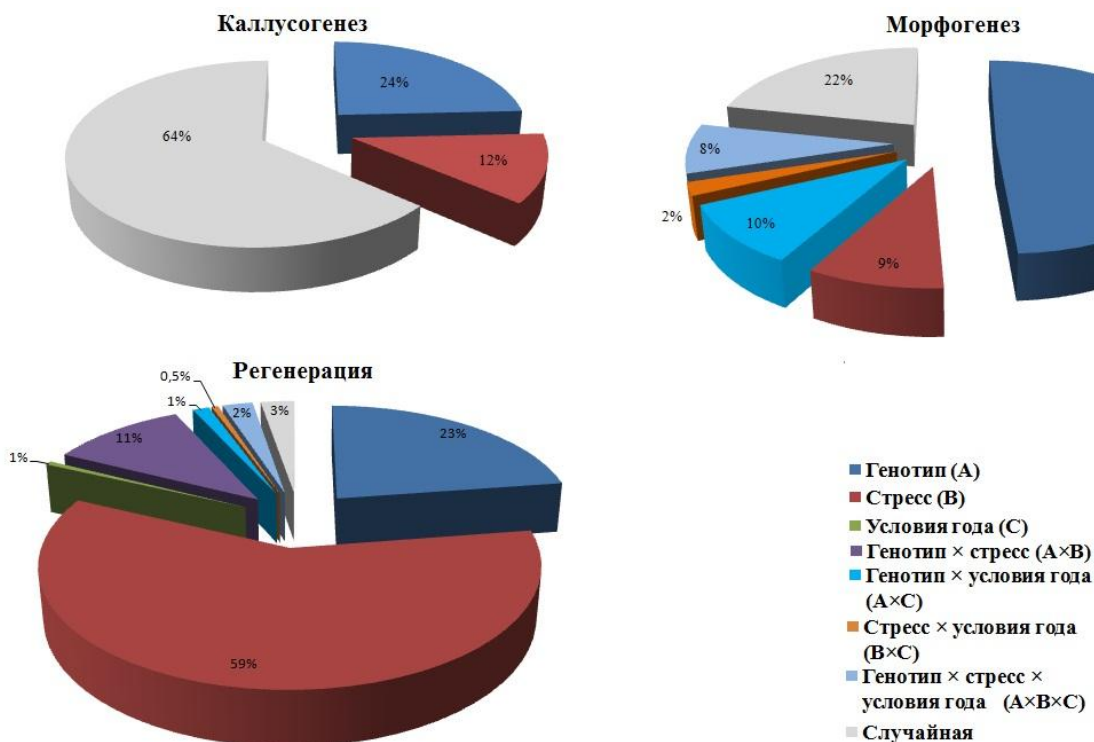


Рисунок 25 – Доля влияния факторов на общую изменчивость образовательных процессов в культуре незрелых зародышей яровой твердой пшеницы

Таким образом, различные образовательные процессы в культуре незрелых зародышей яровой твердой пшеницы в большей мере зависят от наследственности сортов и наличия стрессовых условий в питательной среде, которые позволяют отбирать устойчивые генотипы, обладающие ценными хозяйственными признаками.

ГЛАВА 4. ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ СОМАКЛОНАЛЬНЫХ ЛИНИЙ ЯРОВОЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ

4.1. Влияние солевого и осмотического стрессов на показатели семян и проростков

Одним из способов оценки засухо- и солеустойчивости сельскохозяйственных культур, в том числе пшеницы, является лабораторное тестирование семян и проростков в растворах осмотических веществ, имитирующих недостаток влаги и избыток засоления (Удовенко, 1988; Шихмурадов, 2014). Метод основан на использовании наследственного качества семян прорасти при малом количестве влаги, а также свойствах проростков развивать сосущую силу на растворах с повышенным осмотическим давлением.

В настоящем исследовании оценку исходных генотипов и соматоклональных линий твердой пшеницы, полученных в результате отбора стрессоустойчивых регенерантов на селективных средах *in vitro*, проводили путем проращивания семян на 15%-ном растворе ПЭГ-6000 (Money, 1989; Baloch, Dunwell, Khakwani et al., 2012) и 1,3%-ном растворе хлорида натрия (Шихмурадов, 2014). О реакции образцов на осмотический стресс судили по величине индексов устойчивости (ИУ), рассчитанных по соотношению показателей семян и проростков, полученных в контроле и условиях стресса.

Родительские генотипы, при культивировании которых отобраны соматоклоны, при испытании в лабораторных условиях характеризовались различной степенью устойчивости к осмотическому стрессу как при проращивании в растворе ПЭГ-6000, так и растворе NaCl (прил. 20-23). Большинство физиологических показателей семян и проростков линии 12S2-24 снижались на растворе хлорида натрия более чем на 50% по сравнению с контролем (рис. 26А). Интегративный индекс устойчивости (ИИУ),

определенный как среднее всех частных индексов, составил 43,1%, что указывает на низкую устойчивость образца к избыточному засолению. Сорт Оазис оказался более устойчив в условиях моделируемого осмотического стресса – ИУУ составил 62,1%.

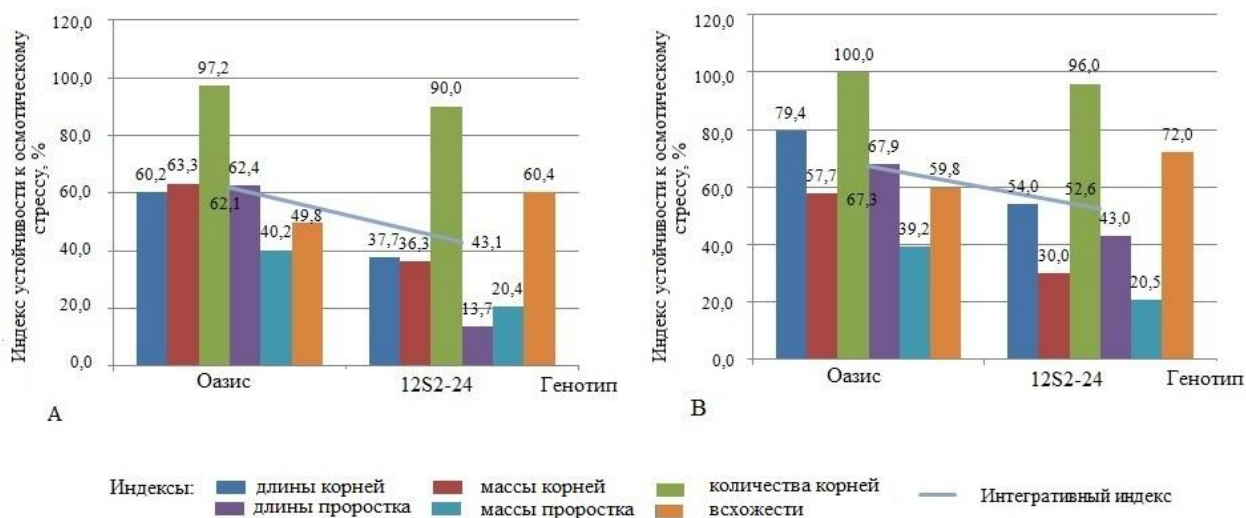


Рисунок 26 – Индексы устойчивости показателей проростков к стрессовым факторам у исходных генотипов яровой твердой пшеницы:

А – NaCl, В – ПЭГ-6000

Сравнение отдельных параметров семян и проростков показало, что наиболее стабильным признаком у обоих генотипов является количество зародышевых корешков, снижение которого в условиях стресса минимально, однако более выражено у линии 12S2-24. Два других признака этого образца, связанные с развитием корневой системы, такие как длина корней и их масса, в условиях стресса достоверно снижали свои значения до 37,7 и 36,3%, соответственно. Признаком, наиболее подверженным солевому стрессу у обоих генотипов, оказалась масса проростка. Статистически значимое снижение данного параметра относительно контроля достигало 60-80% в зависимости от генотипа (рис. 26А).

Общий тренд ответной реакции исходных генотипов на использование в качестве стресс-фактора высокомолекулярного неионного

осмотика ПЭГ-6000 сохранился (рис. 26В). Интегративный индекс устойчивости образцов к дефициту влаги установлен на уровне 67,3 (Оазис) и 52,6% (12S2-24). Развитие корневой системы в условиях стресса оказалось более стабильным признаком в сравнении с развитием проростка. Всхожесть семян в неионном осмотике снижалась в меньшей степени, чем в растворе хлорида натрия, что, вероятно, связано с дополнительным токсическим стрессом ионной природы.

Таким образом, реакция генотипов яровой твердой пшеницы на осмотический стресс в условиях лабораторного эксперимента соответствовала их поведению во время засухи в полевую вегетацию. Засухоустойчивый сорт Оазис формировал изученные признаки либо на уровне контроля, либо снижал их менее выражено в сравнении с линией 12S2-24.

Оценка ответной реакции соматоклональных линий на осмотический стресс, вызванный различными типами осмотиков в процессе физиологических лабораторных тестов, показала, что потомства растений, сформировавшихся *in vitro* на селективных средах в присутствии хлорида натрия и ПЭГ-6000, в большинстве случаев оказались более устойчивыми, чем исходные формы. Однако эта реакция зависела от родительского генотипа.

На рисунке 27 представлен интегративный индекс солеустойчивости соматоклонов по сравнению с исходными формами. У 77% (10 из 13) потомств регенерантов, родительской формой которых является линия 12S2-24, обладающая низкой устойчивостью к осмотическому стрессу как в полевых, так и лабораторных условиях, данный параметр оказался выше исходного образца. Тогда как среди соматоклональных линий, полученных от устойчивого к засухе сорта Оазис, всего 5 (38%) превосходили родительский генотип.

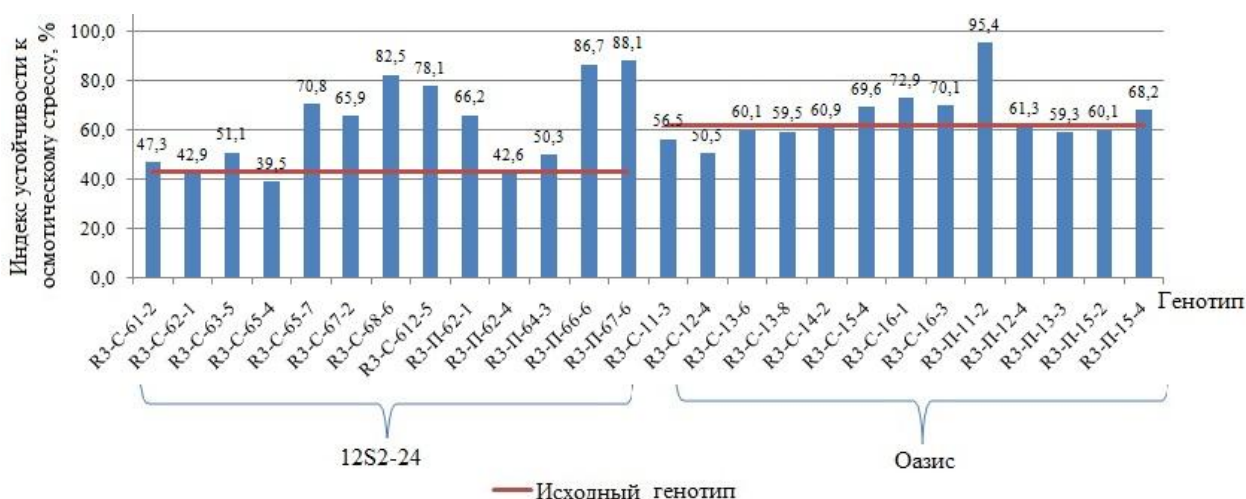


Рисунок 27 – Интегративный индекс солеустойчивости соматклональных линий яровой твердой пшеницы

Схожие результаты были получены при оценке этих же регенерантов в лабораторных условиях на провокационном фоне, стресс-фактором которого являлся ПЭГ-6000 (рис. 28). Около 62% новых генотипов, полученных в результате отбора регенерантов, исходной формой которых служила линия 12S2-24, и 31% линий, родительским генотипом которых являлся сорт Оазис, оказались более устойчивыми к действию осмотика, чем исходные формы.

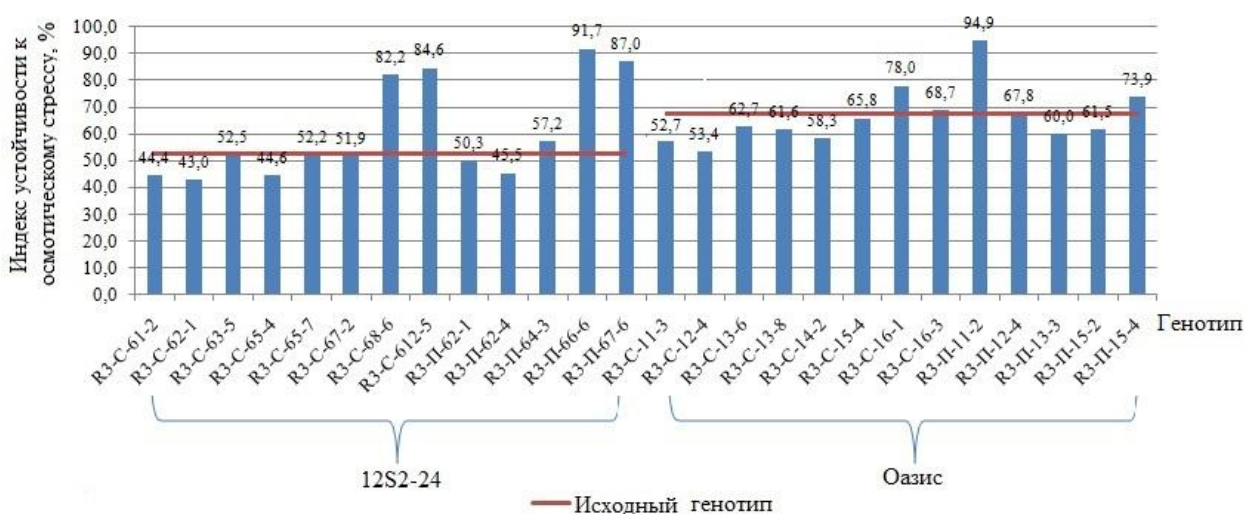


Рисунок 28 – Интегративный индекс устойчивости соматклональных линий твердой пшеницы к осмотическому стрессу, вызванному ПЭГ-6000

Таким образом, более выраженный положительный эффект наблюдали в том случае, когда в клеточной селекции *in vitro* участвовал генотип с изначально низким уровнем полевой засухоустойчивости (линия 12S2-24). Введение в культуру генотипов, обладающих высокой устойчивостью к действию стрессов, реже приводило к ее повышению у соматклонов, индуцированных селективной системой. Вероятно, у исследованных нами устойчивых генотипов генетический потенциал роста побега и развития корневой системы в стрессовых условиях практически реализован, поэтому проявление соматклональной изменчивости по данным признакам не всегда носит положительный характер. Аналогичные результаты были получены при отборе соматклональных вариантов ячменя, устойчивых к токсичности ионов алюминия. Превосходство регенерантов над родительскими формами наблюдали лишь в случаях введения в культуру неустойчивых форм (Шуплецова, Щенникова, 2016).

Таким образом, соматклональными линиями, полученными при культивировании 12S2-24, проявившими устойчивость к действию хлорида натрия, являются R₃-С-61-2, R₃-С-63-5, R₃-С-65-7, R₃-С-67-2, R₃-С-68-6, R₃-С-612-5, R₃-П-62-1, R₃-П-64-3, R₃-П-66-6 и R₃-П-67-6. Устойчивые линии R₃-С-15-4, R₃-С-16-1, R₃-С-16-3, R₃-П-11-2 и R₃-П-15-4 являются производными сорта Оазис.

Несмотря на высокий интегративный индекс солеустойчивости перечисленных выше регенерантов, параметры его слагающие, различались в зависимости от генотипа. Изменения частных индексов устойчивости к действию солевого стресса в положительную или отрицательную сторону по сравнению с индексами исходных форм пшеницы представлены на рисунках 28 и 29. Так, регенеранты R₃-С-65-7 и R₃-С-68-6, не снижающие показатели развития побега и корневой системы относительно исходной формы, показали большое превосходство массы проростка в условиях засоления (прил. 20). Кроме того, отношение всхожести в условиях действия стресс-фактора к контролю оказалось выше такового родительской линии на 30-

40%, что способствовало увеличению общей устойчивости к стрессу. Три других генотипа – R₃-C-67-2, R₃-C-612-5 и R₃-П-62-1 – несмотря на снижение отдельных индексов, таких как масса проростка (R₃-C-67-2) и количество корней (R₃-C-612-5), показали развитие мощной корневой системы за счет увеличения длины корней и их массы, что также позволило увеличить интегративный индекс устойчивости до 66-78%, тогда как у исходной формы он составлял 43,1%. У регенерантов R₃-П-66-6 и R₃-П-67-6 минимальное снижение развития побега и корневой системы в условиях стресса относительно контроля позволило достичь высокой устойчивости к действию солевого стресса (рис. 29).

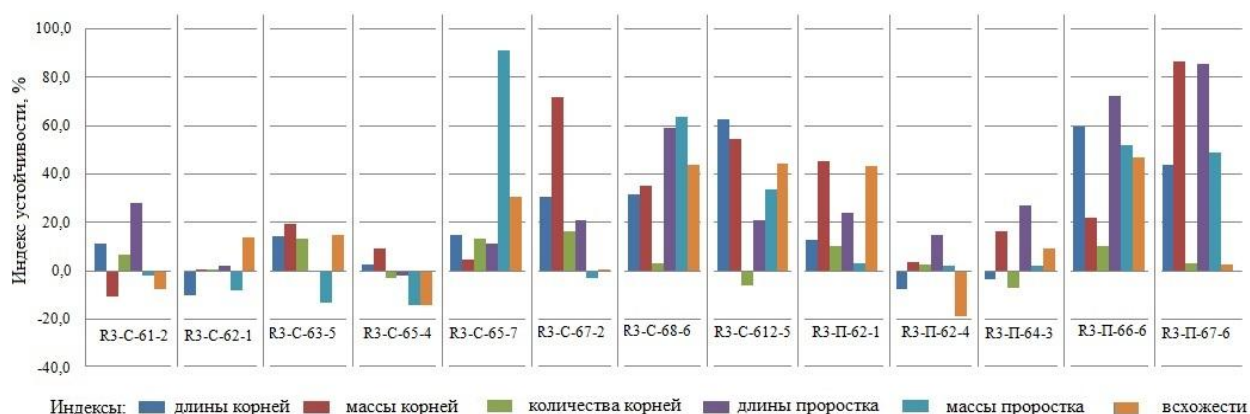


Рисунок 29 – Отношение индексов солеустойчивости соматклональных линий яровой твердой пшеницы, производных 12S2-24, к индексам исходной формы

Для регенерантов, полученных на основе сорта Оазис, имеющих интегративный индекс устойчивости выше, чем у исходной формы, характерно большее варьирование индексов развития побега и корневой системы в положительную и отрицательную сторону, чем у выше описанных генотипов (рис. 30). Лишь два регенеранта – R₃-C-16-1 и R₃-П-11-2 – характеризуются увеличением всех индексов развития относительно исходного сорта, при этом на фоне стабильного развития побега и хорошего

развития корневой системы у генотипа R₃-C-16-1 наблюдается минимальное снижение всхожести в условиях стресса относительно контроля (прил. 21).

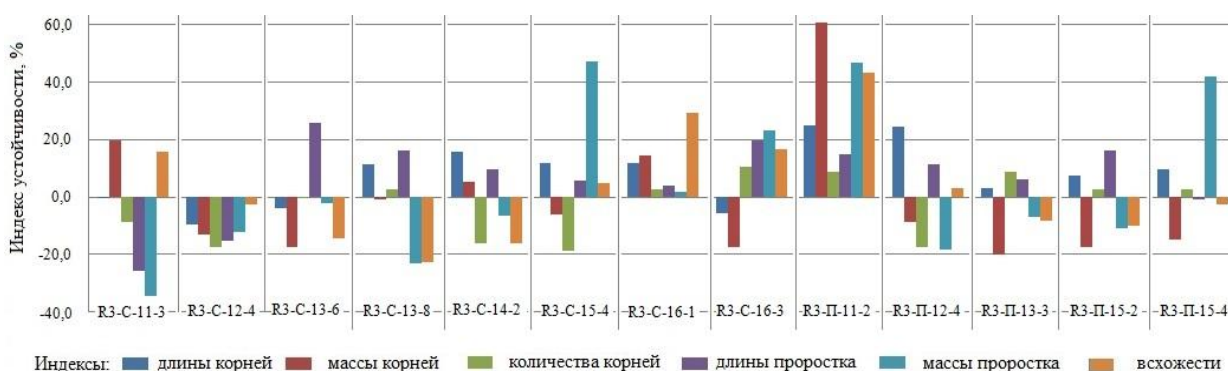


Рисунок 30 – Отношение индексов солеустойчивости соматклональных линий яровой твердой пшеницы, производных сорта Оазис, к индексам исходной формы

Регенерант R₃-П-11-2 обладает высоким ИИУ за счет хорошего развития побега и корневой системы, достаточно высокой всхожести в условиях стресса на фоне стабильного развития растений в условиях контроля. У регенерантов R₃-C-15-4, R₃-C-16-3 и R₃-П-15-4 наблюдали снижение различных индексов развития корневой системы относительно исходной формы. Несмотря на это, за счет развития отдельных параметров проростка (R₃-C-15-4, R₃-C-16-3 и R₃-П-15-4) и увеличения всхожести (R₃-C-16-3) общий индекс солеустойчивости оказался у этих соматклонов выше, чем у родительской формы.

Среди изученных соматклональных линий устойчивыми к действию ПЭГ-6000 оказались следующие генотипы: R₃-C-68-6, R₃-C-612-5, R₃-П-64-3, R₃-П-66-6, R₃-П-67-6, исходной формой которых являлась линия 12S2-24, и генотипы R₃-C-16-1, R₃-C-16-3, R₃-П-11-2, R₃-П-12-4, R₃-П-15-4, полученные на основе сорта Оазис (рис. 28).

За счет хорошего развития как корневой системы, так и побега в сравнении с исходной формой у образцов R₃-C-68-6, R₃-C-612-5, R₃-П-66-6 и

R₃-П-67-6 интегративный индекс устойчивости к водному стрессу достигал высоких значений – до 88,1%. (рис. 31, прил. 22).

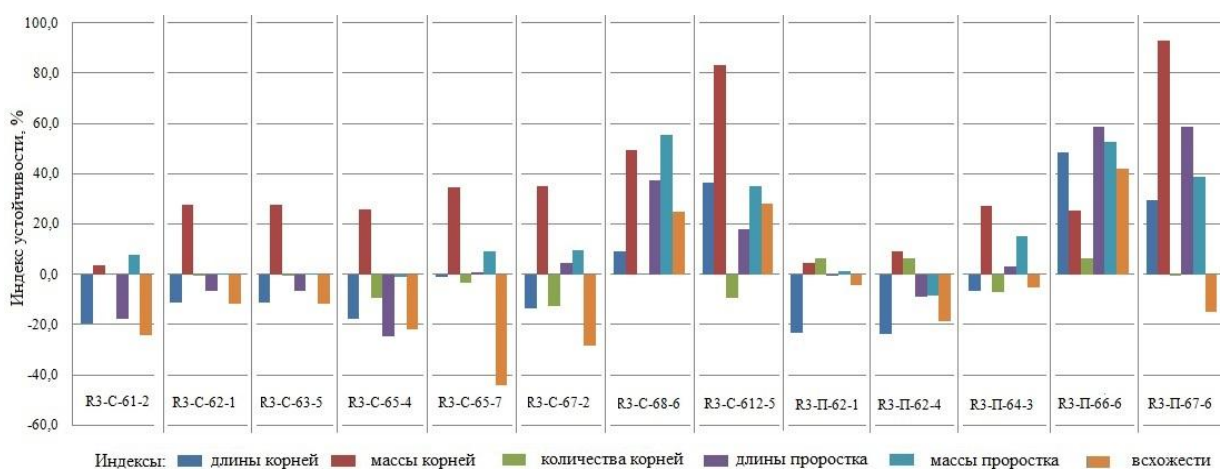


Рисунок 31 – Отношение индексов устойчивости к осмотическому стрессу, вызванному ПЭГ-6000, у соматклональных вариантов линии 12S2-24 к индексам исходной формы

Во второй группе регенерантов, исходной формой которых служил сорт Оазис, при испытании в растворе осмотика превосходство частных индексов устойчивости над индексами родителя было существенно меньшим (рис. 32).

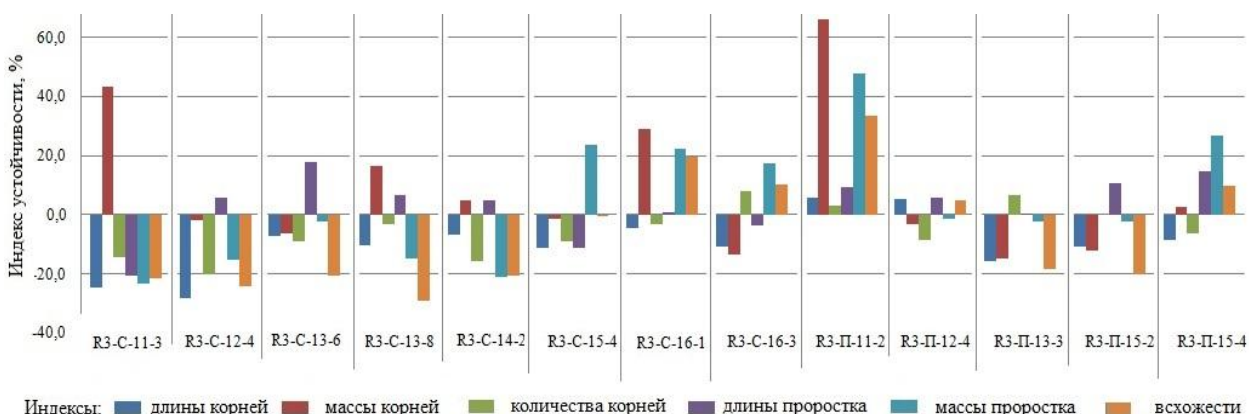


Рисунок 32 – Отношение индексов устойчивости к осмотическому стрессу, вызванному ПЭГ-6000, у соматклональных вариантов сорта Оазис к индексам исходной формы

Максимальным интегративным индексом устойчивости (94,9%) обладал генотип R₃-П-11-2, что обусловлено суммарным превышением всех изучаемых параметров над исходным образцом. За счет небольшого увеличения отдельных показателей развития корневой системы (количества корней – R₃-С-16-3 и длины корней – R₃-П-12-4), проростка (длины проростка – R₃-П-12-4, массы проростка – R₃-С-16-3), всхожести (на 4,9-10,2%), а также незначительного снижения остальных признаков позволило этим генотипам противостоять осмотическому стрессу, вызванному ПЭГ-6000, на уровне исходного образца (прил. 23).

Таким образом, по итогам физиологической оценки развития растений в условиях индуцированного стресса при использовании различных типов осмотиков выделены соматоклональные варианты яровой твердой пшеницы с ИИУ, превышающим индекс исходных образцов на обоих стрессовых фонах. К ним относятся R₃-С-68-6, R₃-С-612-5, R₃-П-64-3, R₃-П-66-6, R₃-П-67-6, R₃-С-16-1, R₃-С-16-3, R₃-П-12-4 R₃-П-15-4, R₃-П-11-2.

Вместе с тем, нами установлено, что формирование интегративного индекса устойчивости на основе усреднения частных, рассчитанных для отдельных показателей проростков, практически у каждого соматоклона имеет свои особенности. Преимущество одного признака может быть нивелировано спадом другого и, напротив, низкие значения компенсируются положительными эффектами остальных параметров. Кроме того, индексы устойчивости, обозначая превосходство либо снижение признаков в стрессовых условиях относительно контроля, позволяют дифференцировать генотипы относительно исходного сорта, но не дают полного основания для отнесения их к определенной группе устойчивости, в том числе к засухе. Использование различных стресс-факторов при создании «провокационного фона» для оценки генотипов (ПЭГ-6000 и избыток хлорида натрия), несмотря на наличие общей осмотической компоненты, зачастую дает разные результаты. Например, ИУ линии R₃-С-65-7, производной 12S2-24, при испытании на растворе NaCl превзошел родительскую форму по всем

показателям, а при оценке на ПЭГ-6000 существенно утратил свое преимущество практически по всем признакам, а по всхожести уступал более чем на 40% (рис. 29, 31). Линия R₃-С-15-4, полученная от сорта Оазис, доминировала по всем показателям за исключением всхожести и массы корней при хлоридном засолении, формируя ИИУ, превосходящий родительский генотип и сохранила свой элитный ранг только по массе проростка, когда оценивалась на ПЭГ-6000, утратив интегративное преимущество над родителем (рис. 27, 28, 30, 32).

Более надежная классификация генотипов, в том числе отобранных нами соматоклональных линий, по устойчивости к осмотическому стрессу была бы возможна при построении некой «модели», позволяющей предсказать, к какой группе устойчивости следует отнести новый неизвестный образец. Очевидно, что построение такой модели должно базироваться на признаках, вносящих максимальный вклад в разделение на заданные группы. Возможности дискриминантного анализа, на наш взгляд, вполне удовлетворяют обозначенным выше условиям.

Получение достоверных результатов для решения поставленной задачи предполагает использование достаточного большого массива исходных данных. В нашем случае такой массив может включать набор физиологических показателей, полученных на нескольких стрессовых фонах, для генотипов с известной полевой устойчивостью к засухе. Для этой цели было проведено лабораторное тестирование 10 образцов яровой твердой пшеницы в растворах, содержащих различные осмотические компоненты: 1,3% NaCl, 15% ПЭГ-6000 и 5% сахарозу. Согласно полевым испытаниям 2009-2012 гг. в условиях Приобской лесостепи Алтайского края, данные образцы соответствовали следующим категориям: Оазис и Безенчукская 210 – высокоустойчивые; Омская степная, Памяти Янченко, Солнечная 573, Гордеиформе 752 и 1480-Д4 – среднеустойчивые; Жемчужина Сибири, 12S1-14 и 12S2-24 – неустойчивые к засухе (Розова, Зиборов, 2016).

Распределение генотипов с известной засухоустойчивостью (прил. 24), на группы по показателям семян и проростков, полученным при испытании на различных стрессовых фонах, а также комплексная оценка (с одновременным учетом трех осмотических факторов) показано на рисунке 33.

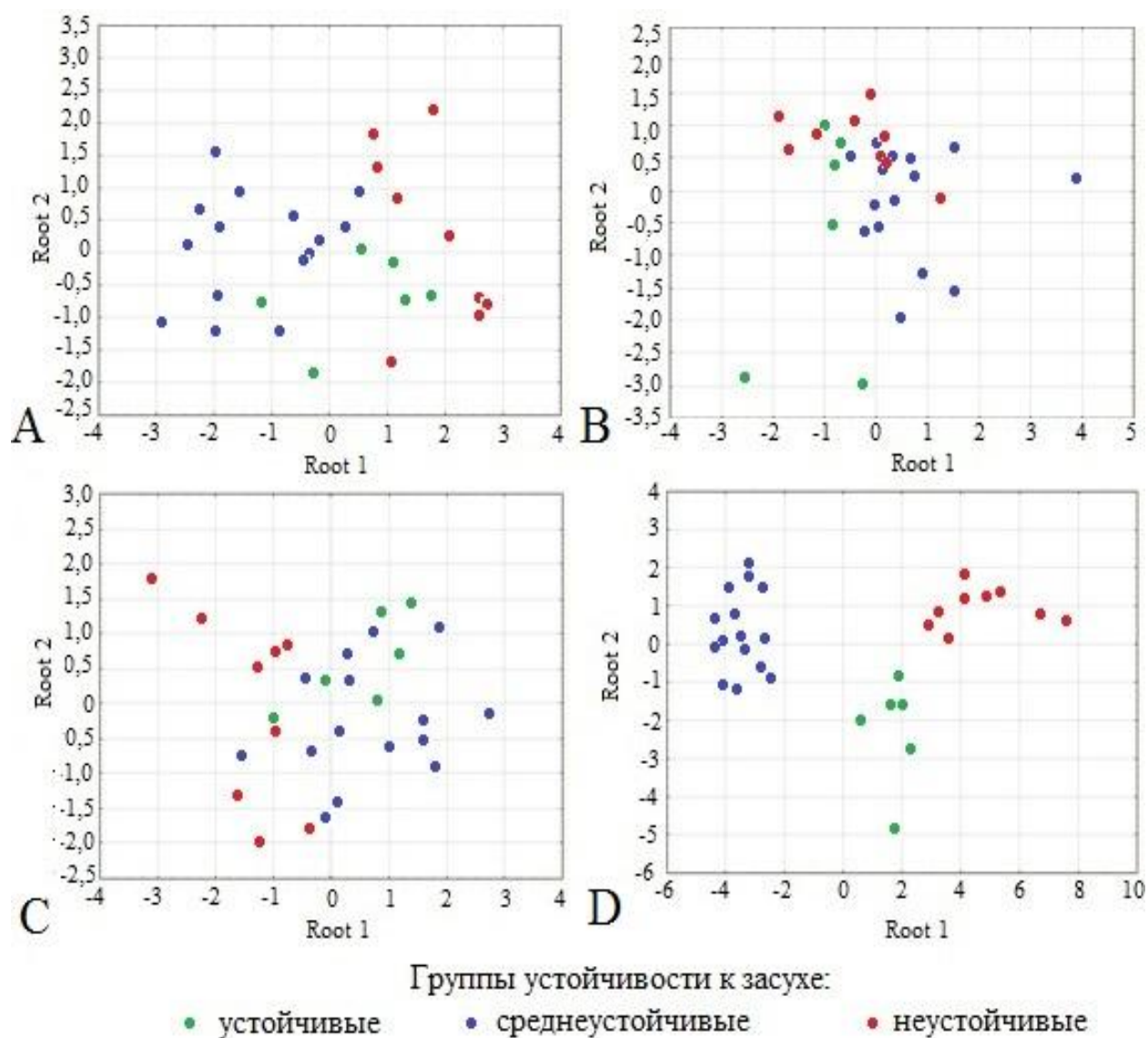


Рисунок 33 – Распределение образцов яровой твердой пшеницы в пространстве двух дискриминантных функций:
 А – ПЭГ-6000, В – сахара, С – хлорид натрия, D – комплексная оценка

Согласно представленной картине распределения генотипов в пространстве двух дискриминантных функций, можно заключить, что использование каждого в отдельности вещества, имитирующего дефицит влаги, не приводит к четкому разделению материала на группы устойчивости. Если в случае использования в качестве осмолита ПЭГ-6000 (рис. 33А) и хлорида натрия (рис. 33С) возможно выделение образцов, неустойчивых к засухе, то разделить генотипы со средней и высокой устойчивостью к недостатку влаги весьма затруднительно. Испытание семян и проростков на 5% растворе сахарозы дает еще более сложную картину, не позволяющую четко выделить ни одну из групп. Точное разделение наблюдается в случае применения комплексной оценки образцов, что визуально позиционируется на графике (рис. 33D), свидетельствующем, что «облака точек» каждой из сравниваемых семей располагаются отдельно друг от друга.

Графические данные подтверждает классификационная матрица (табл. 17), в которой представлен процент верных отнесений объектов совокупности в ту или иную группу устойчивости, отражающих качество дискриминации групп.

Таблица 17 – Классификационная матрица групп устойчивости к осмотическому стрессу по полному комплексу морфометрических индексов

Группа устойчивости	Процент верных отнесений				Число объектов, отнесенных в разделяемые группы											
					среднеустойчивая p = 0,5				неустойчивая p = 0,3				устойчивая p = 0,2			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Среднеустойчивая	93,3	93,3	93,3	100,0	14	14	14	15	1	1	1	0	0	0	0	0
Неустойчивая	88,9	55,5	88,9	100,0	0	4	1	0	8	5	8	9	1	0	0	0
Устойчивая	33,3	50,0	16,7	100,0	1	0	4	0	3	3	1	0	2	3	1	6
Общее	80,0	73,3	76,7	100,0	15	18	19	15	12	9	10	9	3	3	1	6

Примечания: p – значение априорных вероятностей; 1 – ПЭГ-6000, 2 – сахароза, 3 – хлорид натрия, 4 – комплексная оценка.

Достаточно высока точность выделения среднеустойчивой группы: 14 из 15 объектов (5 образцов × 3 повторения) попадали в «свою» группу. У генотипов, характеризующихся низкой устойчивостью к засухе, один образец не попадал в «свою» группу при использовании в качестве осмострессора ПЭГ-6000 и NaCl. При оценке материала в растворе сахарозы лишь 5 из 9 объектов (3 сорта × 3 повторения) оказались в «своей» группе, а 4 попадали в группу среднеустойчивых образцов. Процент верных отнесений составил от 55,5 до 88,9%, что уступало предыдущей группе, при этом значение априорной вероятности снизилось до 0,3. Минимальную долю корректных отнесений при оценке каждого осмотика в отдельности наблюдали в группе устойчивых к засухе генотипов – от 16,7 до 50,0% с еще более низкой априорной вероятностью, равной 0,2. Абсолютное распределение по группам устойчивости к дефициту влаги (100%) установлено при комплексном учете исследуемых параметров на различных «провокационных» фонах.

Для исключения малозначимых в разделении групп признаков и выделения параметров, содержащих максимум информации о различии между группами, использован алгоритмический подход, включающий один из методов пошагового анализа, – пошаговый вперед («Forward stepwise»). При использовании данного метода расчет начинается с переменной, вносящей максимальный вклад в межгрупповые различия, к которой пошагово присоединяются другие переменные (Тюрин, Щеглов, 2015).

Итогом проведения пошагового анализа «Forward stepwise» явилось выделение признаков, играющих ведущую роль в разделении генотипов яровой твердой пшеницы на группы устойчивости к засухе при сохранении точности распределения на уровне 97%. Так, для создания модели, способствующей качественному распределению неизвестных образцов, достаточно использовать признаки, вносящие максимальный вклад в межгрупповую изменчивость (табл. 18).

Таблица 18 – Результаты общего анализа дискриминантных функций
Метод Forward stepwise (пошаговый вперед)

Признаки	Лямбда Уилкса	Частная лямбда Уилкса	F (2,20)	p	R ²	1 — R ²
Индекс длины проростка (ПЭГ-6000)	0,20117	0,5579	7,9241	0,0029	0,3346	0,6653
Индекс массы корней (NaCl)	0,21108	0,5317	8,8078	0,0018	0,2408	0,7592
Индекс длины проростка (NaCl)	0,13393	0,8379	1,9337	0,1707	0,5768	0,4233
Индекс всхожести (NaCl)	0,14631	0,7671	3,0361	0,0706	0,3228	0,6772
Индекс массы корней (сахароза)	0,13552	0,8282	2,0747	0,1518	0,6445	0,3555
Индекс длины проростка (сахароза)	0,16855	0,6659	5,0178	0,0171	0,3662	0,6338
Индекс массы проростка (сахароза)	0,12982	0,8645	1,5674	0,2331	0,4309	0,5691
Индекс длины корней (ПЭГ-6000)	0,12809	0,8762	1,4132	0,2666	0,5808	0,4192

Примечания: F – F-критерий, связанный с соответствующей частной лямбдой Уилкса; p – уровень значимости F-критерия; R² – коэффициент множественной корреляции данной переменной со всеми другими переменными модели; 1 — R² – толерантность – мера избыточности переменной в модели.

В заключительной части анализа были рассчитаны коэффициенты классификационных функций (функций классификации) (табл. 19) и построены сами функции, представляющие собой уравнения, составленные для каждой группы устойчивости.

Таблица 19 – Коэффициенты функций классификации Метод Forward stepwise (пошаговый вперед)

Признаки	Среднеустойчивая группа, p = 0,5	Неустойчивая группа, p = 0,3	Устойчивая группа, p = 0,2
Индекс длины проростка (ПЭГ-6000)	16,3718	3,7567	10,0831
Индекс массы корней (NaCl)	5,9467	-7,7983	7,3843
Индекс длины проростка (NaCl)	9,1365	2,0177	9,0257
Индекс всхожести (NaCl)	14,6751	26,4693	8,3247
Индекс массы корней (сахароза)	8,7604	8,4879	2,4241
Индекс длины проростка (сахароза)	-13,1790	-7,9140	-3,0711
Индекс массы проростка (сахароза)	13,6720	9,4886	5,2852
Индекс длины корней (ПЭГ-6000)	5,6262	7,2032	1,9788
Constant	-23,1621	-11,3438	-13,8502

Каждая функция классификации имеет следующий вид:

$$f_i = \sum_j a_{ij} x_j + a_0$$

где f_i – i -ая функция классификации,

x_j – j -ый признак,

a_{ij} – коэффициент i -ой функции классификации при j -ом признаке,

a_0 – свободный член (константа).

Устойчивая группа = $10,0831 \times \text{ИДП}_{\text{ПЭГ-6000}} + 7,3843 \times \text{ИМК}_{\text{NaCl}} + 9,0257 \times \text{ИДП}_{\text{NaCl}} + 8,3247 \times \text{ИВ}_{\text{NaCl}} + 2,4241 \times \text{ИМК}_{\text{сах}} - 3,0711 \times \text{ИДП}_{\text{сах}} + 5,2852 \times \text{ИМП}_{\text{сах}} + 1,9788 \times \text{ИДК}_{\text{ПЭГ-6000}} - 13,8502$;

Неустойчивая группа = $3,7567 \times \text{ИДП}_{\text{ПЭГ-6000}} - 7,7983 \times \text{ИМК}_{\text{NaCl}} + 2,0177 \times \text{ИДП}_{\text{NaCl}} + 26,4693 \times \text{ИВ}_{\text{NaCl}} + 8,4879 \times \text{ИМК}_{\text{сах}} - 7,9140 \times \text{ИДП}_{\text{сах}} + 9,4886 \times \text{ИМП}_{\text{сах}} + 7,2032 \times \text{ИДК}_{\text{ПЭГ-6000}} - 11,3438$;

Среднеустойчивая группа = $16,3718 \times \text{ИДП}_{\text{ПЭГ-6000}} + 5,9467 \times \text{ИМК}_{\text{NaCl}} + 9,1365 \times \text{ИДП}_{\text{NaCl}} + 14,6751 \times \text{ИВ}_{\text{NaCl}} + 8,7604 \times \text{ИМК}_{\text{сах}} - 13,1790 \times \text{ИДП}_{\text{сах}} + 13,6720 \times \text{ИМП}_{\text{сах}} + 5,6262 \times \text{ИДК}_{\text{ПЭГ-6000}} - 23,1621$,

где $\text{ИДП}_{\text{ПЭГ-6000}}$ – Индекс длины проростка (ПЭГ-6000);

ИМК_{NaCl} – Индекс массы корней (NaCl);

ИДП_{NaCl} – Индекс длины проростка (NaCl);

ИВ_{NaCl} – Индекс всхожести (NaCl);

$\text{ИМК}_{\text{сах}}$ – Индекс массы корней (сахароза);

$\text{ИДП}_{\text{сах}}$ – Индекс длины проростка (сахароза);

$\text{ИМП}_{\text{сах}}$ – Индекс массы проростка (сахароза);

$\text{ИДК}_{\text{ПЭГ-6000}}$ – Индекс длины корней (ПЭГ-6000).

С помощью данных уравнений можно вычислить классификационные значения для созданных нами соматоклональных линий с целью отнесения их к определенной группе устойчивости. Новый образец будет относиться к той группе, для которой классификационное значение максимально. Такие

значения, рассчитанные для соматклональных вариантов для каждой из групп устойчивости, представлены в таблице 20.

Согласно данной таблице, подавляющая часть потомств регенерантов, исходной формой которых является линия 12S2-24, относится к группе неустойчивых к засухе образцов. Исключение составляют генотипы R₃-С-67-2 и R₃-П-67-6, относящиеся к группе со средней устойчивостью к недостатку влаги. Стоит отметить образец R₃-С-67-2, у которого интегративный индекс солеустойчивости более чем на 20% превышал родительское значение, а ИИ устойчивости к осмотическому стрессу, вызванному полиэтиленгликолем, был несколько ниже в сравнении с исходным генотипом, на основании чего данная линия была исключена из группы засухоустойчивых. Однако, согласно проведенному дискриминантному анализу, соматклональную линию R₃-С-67-2 следует рассматривать как среднеустойчивую.

Таблица 20 – Классификационные значения для соматклональных линий яровой твердой пшеницы

Генотип	Классификационные значения для групп устойчивости к засухе			Генотип	Классификационные значения для групп устойчивости к засухе		
	устойчивые	среднеустойчивые	неустойчивые		устойчивые	среднеустойчивые	неустойчивые
R ₃ -С-61-2	2,0200	1,7100	10,3500	R ₃ -С-11-3	10,9400	16,6780	15,1290
R ₃ -С-62-1	0,0460	-2,4870	10,6060	R ₃ -С-12-4	9,5190	12,2860	10,5740
R ₃ -С-63-5	3,3500	2,8450	12,3170	R ₃ -С-13-6	13,3180	17,1310	10,2470
R ₃ -С-65-4	-0,6772	-3,3590	5,3500	R ₃ -С-13-8	12,2480	15,1410	7,3510
R ₃ -С-65-7	8,1030	13,4150	23,5520	R ₃ -С-14-2	10,9090	10,5560	5,0060
R ₃ -С-67-2	11,0418	11,6650	8,7261	R ₃ -С-15-4	11,2370	15,4300	14,9150
R ₃ -С-68-6	17,7130	24,9780	28,4920	R ₃ -С-16-1	18,5940	25,5050	20,4960
R ₃ -С-612-5	16,8840	25,2000	28,4320	R ₃ -С-16-3	12,6230	16,0300	17,1470
R ₃ -П-62-1	11,8610	13,5010	19,6640	R ₃ -П-11-2	22,8740	30,6850	21,9400
R ₃ -П-62-4	1,4930	-0,7440	5,7400	R ₃ -П-12-4	12,9250	17,6960	14,7730
R ₃ -П-64-3	9,8840	14,7300	19,3160	R ₃ -П-13-3	8,9456	10,0950	8,3910
R ₃ -П-66-6	22,0790	29,9170	30,7820	R ₃ -П-15-2	11,6402	15,3770	11,0190
R ₃ -П-67-6	27,5750	39,0822	20,9485	R ₃ -П-15-4	13,3270	20,9760	16,6600

Примечание: жирным шрифтом указаны максимальные значения

Интересующие нас образцы – R₃-С-68-6, R₃-С-612-5, R₃-П-64-3, R₃-П-66-6, R₃-П-67-6, имеющие интегративные индексы устойчивости на разных

провокационных фонах выше контроля, относятся к группе неустойчивых к засухе генотипов, кроме линии R₃-П-67-6.

Регенеранты, родительским генотипом которых является сорт Оазис, в большинстве случаев относились к группе среднеустойчивых к недостатку влаги образцов. Линия R₃-С-14-2, согласно дискриминантному анализу, была отнесена к устойчивым к засухе образцам, не смотря на то, что интегративный индекс не превышал такового у родительского генотипа. В группу неустойчивых к осмотическому стрессу попал один образец – R₃-С-16-3.

Представленные результаты можно объяснить тем, что не все показатели, участвующие в определении интегративного индекса, являются информативными и при классификации на группы устойчивости не используются. Так, например, генотип R₃-С-68-6 за счет стабильного развития количества корней на стрессовых фонах, минимального снижения всхожести на среде с избыточным засолением, достаточно стабильного развития проростка обладает высоким интегративным индексом устойчивости (более 80%) (рис. 27, 28). Однако данные признаки при использовании дискриминантного анализа оказались неинформативными и были исключены при классификации генотипов по группам устойчивости.

Таким образом, физиологическая оценка развития семян и проростков в условиях индуцированного стресса при использовании различных типов осмотиков (ПЭГ-6000 и хлорид натрия) позволила выделить соматоклональные линии яровой твердой пшеницы с индексом интегративной устойчивости, превышающим индекс исходных образцов: R₃-С-68-6, R₃-С-612-5, R₃-П-64-3, R₃-П-66-6, R₃-П-67-6, R₃-С-16-1, R₃-С-16-3, R₃-П-12-4 R₃-П-15-4, R₃-П-11-2.

Методом дискриминантного анализа установлено, что 100% соответствие распределения образцов яровой твердой пшеницы с известной полевой засухоустойчивостью по соответствующим группам устойчивости наблюдается при комплексном учете признаков на различных «провокационных» фонах в лабораторных условиях (15% ПЭГ-6000, 1,3%

хлорид натрия и 5% сахара). На основе построенной модели определены признаки, информативные для распределения соматических линий по уровню устойчивости к заданным стрессам. В соответствии с классификационными значениями, рассчитанными с помощью функции классификаций, среди 26 отобранных *in vitro* линий выделены 14 генотипов:

- с высокой осмоустойчивостью: R₃-C-14-2;
- со средней осмоустойчивостью: R₃-C-67-2, R₃-П-67-6, R₃-C-11-3, R₃-C-12-4, R₃-C-13-6, R₃-C-13-8; R₃-C-15-4, R₃-C-16-1, R₃-П-11-2, R₃-П-12-4, R₃-П-13-3, R₃-П-15-2, R₃-П-15-4.

4.2. Оценка осмотической адаптации методом пыльцевого анализа

Осмотическая адаптация (ОА) является одним из основных механизмов засухо- и солеустойчивости сельскохозяйственных растений, в том числе мягкой и твердой пшеницы (Morgan, 1977; Morgan, Hare, Fletcher., 1986; David, 2012), сорго (Blum, Sullivan, 1986; Santamaria, Ludlow, Fukai, 1990; Basnayake, Ludlow, Cooper et al., 1993; Tangpremsri, Fukai, Fischer, 1995), нута (Morgan, Rodrigues-Maribona, Knights, 1991), гороха полевого (Rodrigues-Maribona, Tenorio, Ayerve., 1992), подсолнечника (Qian, Fry, 1997), риса (Cutler Shahan, Steponkus, 1980; Hsiao, O'Toole, Yambao et al., 1984; Turner, O'Toole, Cruz et al., 1986) и др. Способность к осмотической регуляции позволяет поддерживать тургор клеток путем накопления органических или неорганических осмолитов в условиях водного дефицита, являясь единственным механизмом, который активируется только при наличии дефицита влаги, поэтому не влияет на потенциальную урожайность в условиях отсутствия стресса (Morgan, 1983, 1999).

Наиболее распространенные методические подходы к оценке осморегуляции осуществляются с использованием семян и листьев (Moud, Maghsoudi, 2008; Patil, Ravikumar, 2011; Reynolds, Pask, Mullan, 2012; Шуйская, Ли, Рахманкулова и др., 2014). Однако осмотическая адаптация

проявляется во всех клетках растений, в том числе и пыльцевых зернах (Morgan, 1999; Moud, Yamagishi, 2005). Доступность пыльцы для визуальной оценки ее реакции на воздействие факторов окружающей среды, гаплоидный геном и возможность изучать выборки из множества гамет позволяют проводить раннюю оценку селекционных образцов, значительно сокращать время проработки большого числа генотипов и выделять среди них редкие и устойчивые.

Физиологическую оценку реакции пыльцы на осмотический стресс при ее культивировании в концентрированных растворах осмотика проводили для 10 соматональных линий, интегративный индекс устойчивости которых превысил индекс родительских форм при испытании на обоих стрессовых фонах (табл. 21).

Таблица 21 – Площадь пыльцы исходных генотипов и соматональных линий яровой твердой пшеницы в условиях осмотического стресса *in vitro*, pxl^2

Генотип	30% ПЭГ	55% ПЭГ	55% ПЭГ + 10 mM KCl
12S2-24	46330,33±383,1	41805,67±487,2	42012,67±692,1
R ₃ -П-66-6	45977,80±156,9	42677,17±259,4	44461,43±2066,9
R ₃ -П-64-3	44714,71±2809,4	39710,34±1349,5	40263,53±844,7
R ₃ -П-67-6	45258,67±2218,1	41763,60±1000,1	41998,93±353,1
R ₃ -С-612-5	46891,15±439,3	41956,21±1349,9	43127,89±1548,4
R ₃ -С-68-6	46465,95±1715,8	39825,76±526,9	46135,21±693,9
R ₃ -С-67-2	45328,33±822,1	40419,67±604,9	46585,33±367,1
Оазис	49911,69±445,9	5466,71±1005,5	57484,5±588,7
R ₃ -П-11-2	51557,81±964,5	52461,23±482,9	51956,21±1349,8
R ₃ -С-16-1	54402,26±1848,3	52258,67±1030	52430,26±1139,9
R ₃ -С-16-3	54385,60±1624,3	50258,67±1031	51430,33±666,5
R ₃ -С-14-2	52057,80±363,7	53261,33±665,4	51289,67±744,3
HCP _{0,05}	4262,1	2205,4	3122,2

Действие осмотического стресса приводило к достоверному изменению площади цитоплазмы пыльцевых зерен у изученных генотипов яровой твердой пшеницы, что подтверждает двухфакторный дисперсионный анализ ($F_{\text{факт}} = 14,6 > F_{\text{табл}} = 2,2$) (прил. 25). В среднем по всем образцам

площадь проекции цитоплазмы пыльцы, культивируемой в растворе 55% ПЭГ-6000, была меньше исходной, измеряемой в контроле (культивирование в растворе 30% ПЭГ-6000) на 5,5%. Исключения составили три генотипа: сорт Оазис и регенеранты R₃-П-11-2 и R₃-С-14-2, исходной формой которых служил вышеназванный сорт. У этих форм площадь цитоплазмы в условиях стресса увеличивалась относительно контроля на 9,5, 1,7 и 3,7%, соответственно. Добавление в 55%-ый ПЭГ в качестве экзогенного осмолита хлорида калия способствовало увеличению площади пыльцы в среднем по всем образцам на 3,2%.

Несмотря на относительно большие стандартные отклонения, рассчитанные для изучаемых форм, которые свидетельствуют о высокой изменчивости площади пыльцевых зерен, очевидно, что образцы по-разному реагировали на применение осмотического стресса, что наглядно демонстрирует рисунок 34. Три генотипа в результате воздействия на них 55% ПЭГ увеличивали проектную площадь цитоплазмы (Оазис, R₃-П-11-2, R₃-С-14-2), в то время как остальные снизили ее более чем на 14%.

При добавлении в 55%-ный ПЭГ осмолита – KCl – у генотипов R₃-П-11-2, R₃-С-68-6 и R₃-С-14-2 происходило восстановление цитоплазмы клеток до исходных размеров. У ряда образцов (например, 12S2-24, R₃-С-67-6, R₃-С-16-1) площадь цитоплазмы сохранилась на прежнем уровне, а у остальных форм увеличилась. Особенно выделился сорт Оазис, у которого рассматриваемый признак вырос весьма существенно. Представленные данные позволяют предположить, что разные генотипы могут использовать разные типы осмотической адаптации, с различным уровнем вовлеченности неорганических катионов.

С целью идентификации механизмов осмотической настройки у рассматриваемых образцов были использованы различные соотношения параметров площади пыльцы, инкубированной в различающихся условиях стресса. Реакцию изменения тургора клеток, индуцированного 55%-ной концентрацией ПЭГ, можно рассматривать как «внутреннее» осмотическое

регулирование, обеспеченное внутренней мобилизацией осмотически активных веществ. В то время как ответ на экзогенное добавление осмолитов свидетельствует об «индуцированной» осмотической адаптации (Patil, Ravikumar, 2011).

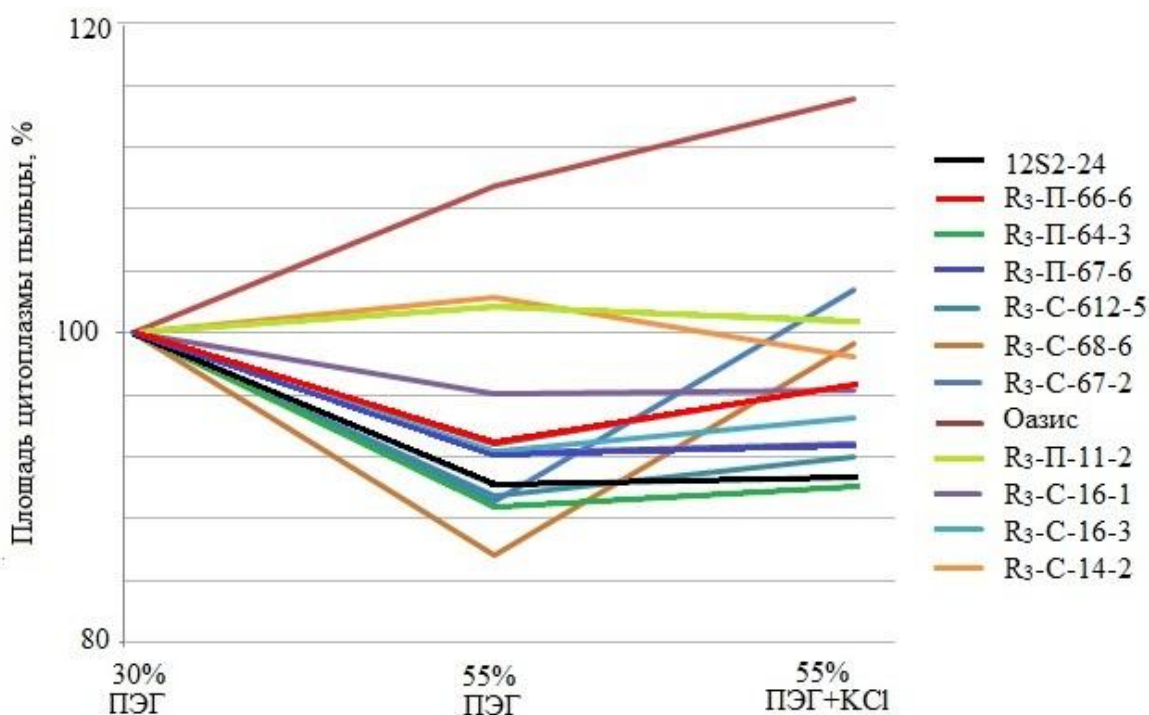


Рисунок 34 – Относительная реакция цитоплазмы пыльцы исходных генотипов и соматоклональных линий яровой твердой пшеницы на осмотический стресс с добавлением или без добавления осмолита

В таблице 22 представлены указанные параметры, рассчитанные для каждого образца. Пределы варьирования внутренней осмотической адаптации составили от 0,86 (R₃-П-68-6) до 1,1 (Оазис) в зависимости от генотипа. Несмотря на то, что устойчивость к осмотическому стрессу зависит от многих физиологических и биохимических особенностей растения, следует отметить, что сорт Оазис, характеризующийся как устойчивый к засухе в полевых условиях, продемонстрировал высокую (1,1) внутреннюю осмотическую адаптацию, тогда как линия не устойчивая к действию осмотического стресса – 12S2-24 – показала наиболее низкое значение данного показателя (0,90). Возможно, у этих генотипов именно данная

характеристика играет важную роль в адаптации к водному стрессу, обуславливая соответствующий уровень устойчивости.

Таблица 22 – Соотношение различных параметров площади цитоплазмы пыльцы исходных генотипов и соматоклональных линий яровой твердой пшеницы в условиях осмотического стресса *in vitro*

Генотип	Внутренняя осмотическая адаптация	Индукцированная осмотическая адаптация	Общая осмотическая адаптация
	В/А	С/В	С/А
12S2-24	0,90	1,00	0,91
R ₃ -П-66-6	0,93	1,04	0,97
R ₃ -П-64-3	0,89	1,01	0,90
R ₃ -П-67-6	0,92	1,01	0,93
R ₃ -С-612-5	0,89	1,03	0,92
R ₃ -С-68-6	0,86	1,16	0,99
R ₃ -С-67-2	0,89	1,15	1,03
Оазис	1,10	1,05	1,15
R ₃ -П-11-2	1,02	0,99	1,01
R ₃ -С-16-1	0,96	1,00	0,96
R ₃ -С-16-3	0,92	1,02	0,95
R ₃ -С-14-2	1,02	0,96	0,99

Способность к индуцированной адаптации изученных образцов, рассчитанной как соотношение площади пыльцы при добавлении осмолита к значению, полученному при культивировании в 55% растворе ПЭГ-6000, характеризовалась несколько меньшей вариабельностью с размахом изменчивости в пределах от 0,96 до 1,16. Реакция генотипа на добавление КС1 к 55%-ному раствору ПЭГ, вызывающему осмотический стресс, не зависела от их внутренней осмотической регуляции, что подтверждает низкий коэффициент корреляции (рис. 35). Лишь два генотипа (Оазис и R₃-П-11-2) обладали обоими типами адаптации, в то время как другие образцы демонстрировали лишь один тип ОА. Это позволяет предположить наличие независимых механизмов внутренней и индуцированной осмотической настройки, которые можно объединить с помощью селекции с целью повышения устойчивости материала к осмотическому стрессу.

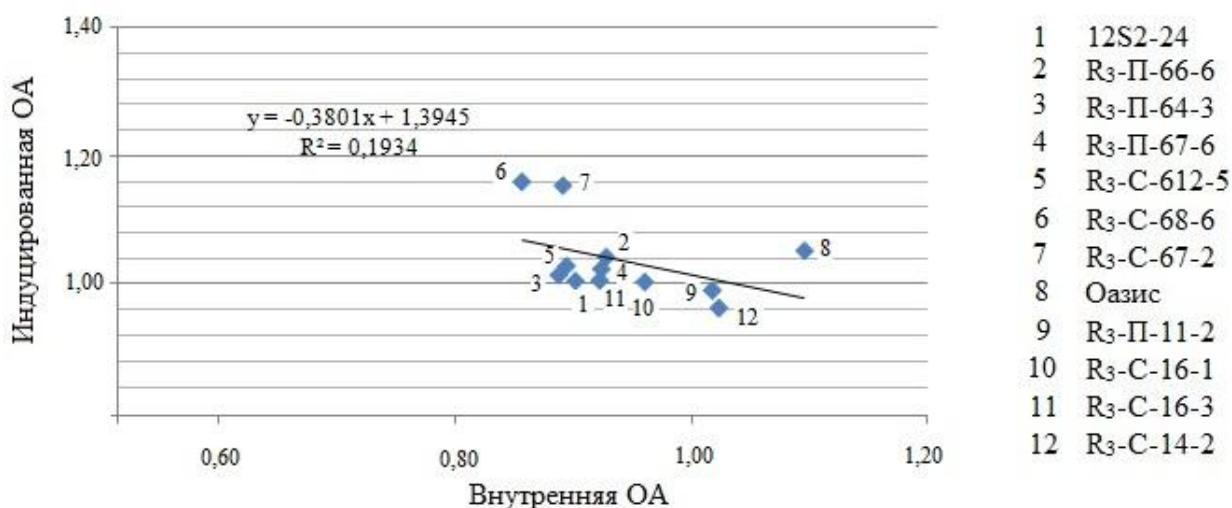


Рисунок 35 – Взаимосвязь между индуцированной и внутренней осмотической адаптацией у генотипов яровой твердой пшеницы

Несмотря на достаточно высокий уровень индуцированной осмотической адаптации у соматоклональных линий (до 1,16), регрессионный анализ показал отсутствие корреляции между данным показателем и общей регуляцией (рис. 36).

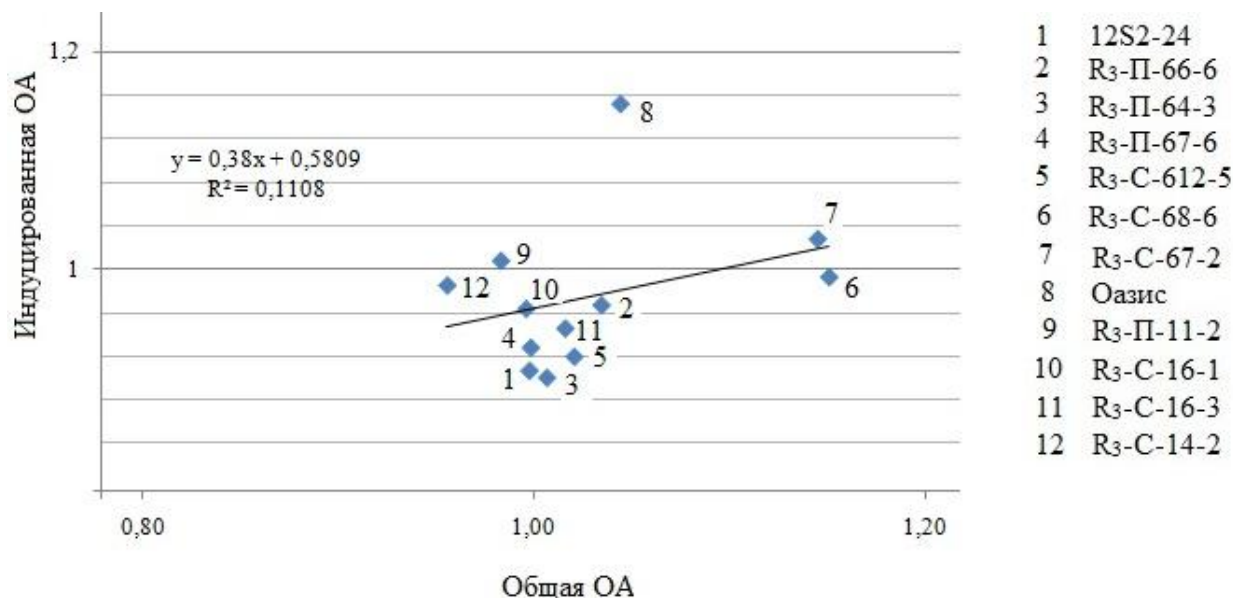


Рисунок 36 – Взаимосвязь между общей и индуцированной осмотической адаптацией у исходных форм и соматоклональных линий яровой твердой пшеницы

Сравнение внутренней и общей адаптации выявило высокий уровень корреляции, что подтверждается коэффициентом детерминации, равным 48% (рис. 37). Этот факт подтверждает преобладание внутренней осмотической регуляции при формировании признака засухоустойчивости у изученных соматклональных линий твердой пшеницы.

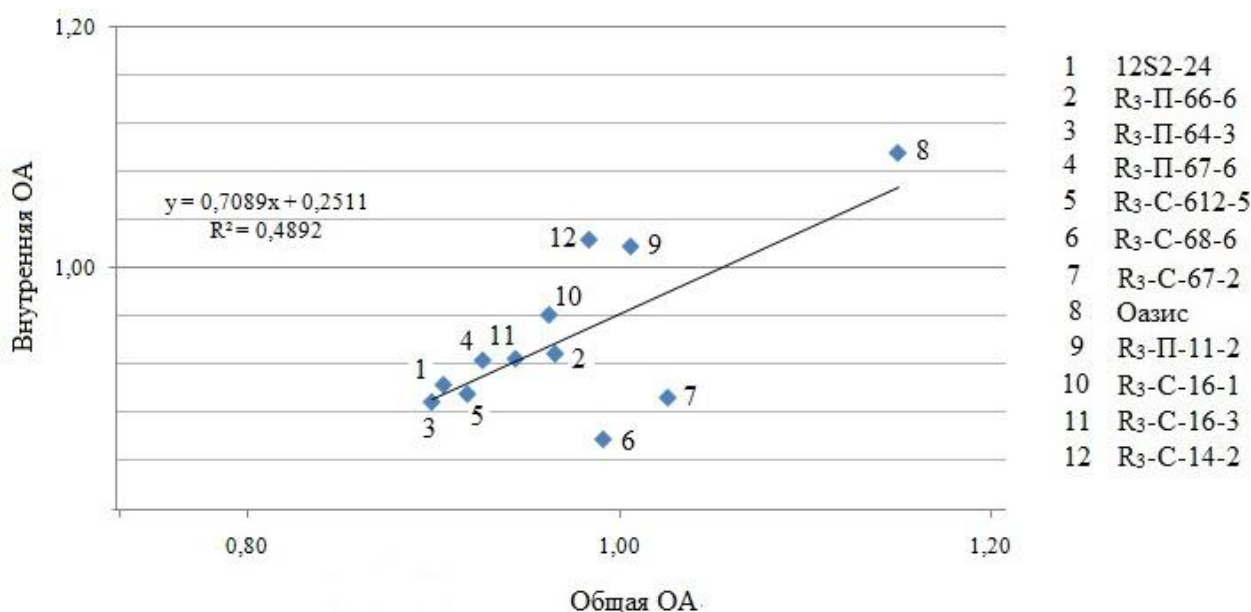


Рисунок 37 – Взаимосвязь между общей и внутренней осмотической адаптацией у исходных форм и соматклональных линий яровой твердой пшеницы

Известно, что осмотическую регуляцию у растений обеспечивают различные механизмы – синтез органических растворов и / или накопление катионов, таких как Ca^{2+} и K^+ в цитоплазме, высвобождение связанных с мембраной катионов либо их транслокации через плазматическую мембрану. Анализ 12 образцов яровой твердой пшеницы показал, что генотипы R₃-П-11-2, R₃-С-14-2 и Оазис, не снижающие размеры площади цитоплазмы пыльцевых клеток под действием осмотического стресса, обладают механизмами внутренней ОА. Можно предположить, что данные образцы способны к синтезу и/или биохимическим изменениям, приводящим к накоплению внутреннего резерва осмолитов.

Снижение площади цитоплазмы пыльцевых зерен у генотипов в отсутствии внешнего источника осмолита указывает на низкую внутреннюю осмотическую регуляцию. Однако в присутствии экзогенного осмолита (K^+) они восстанавливают площадь, что свидетельствует о поглощении катионов через плазматическую мембрану и наличии индуцированной осмотической адаптации. Следовательно, осмотическая устойчивость большинства изученных образцов зависит от внешних факторов, что может отражаться на урожайности в период засухи.

На рисунке 38 представлены различные стратегии изменения площади цитоплазмы пыльцевых зерен у изученных форм при действии различных концентраций полиэтиленгликоля, а также в присутствии экзогенного осмолита. Генотип R₃-С-68-6, родителем которого является линия 12S2-24, обладает достаточно высокой общей ОА, несмотря на низкую внутреннюю за счет максимально высокой индуцированной осмотической адаптации (рис. 38В). Вероятно, поэтому при испытании семян и проростков в отсутствии экзогенного осмолита данный образец распределился в группу неустойчивых форм.

Образцы R₃-С-14-2 (рис. 38Е) и R₃-П-11-2 (рис. 38D), согласно классификационным значениям (табл. 20), относящиеся к устойчивой и среднеустойчивой к засухе группам, обладают высокой внутренней осмотической адаптацией, увеличивая площадь пыльцы в условиях стресса. На фоне несколько сниженной индуцированной ОА, общая осмотическая адаптация близка к единице, что говорит о перспективности использования данных генотипов в селекционных целях.

Засухоустойчивый сорт Оазис продемонстрировал наличие обоих типов регуляции (рис. 38С), в то время как родительская линия 12S2-24 существенно снижала площадь пыльцы в условиях осмотического стресса (рис. 38А).

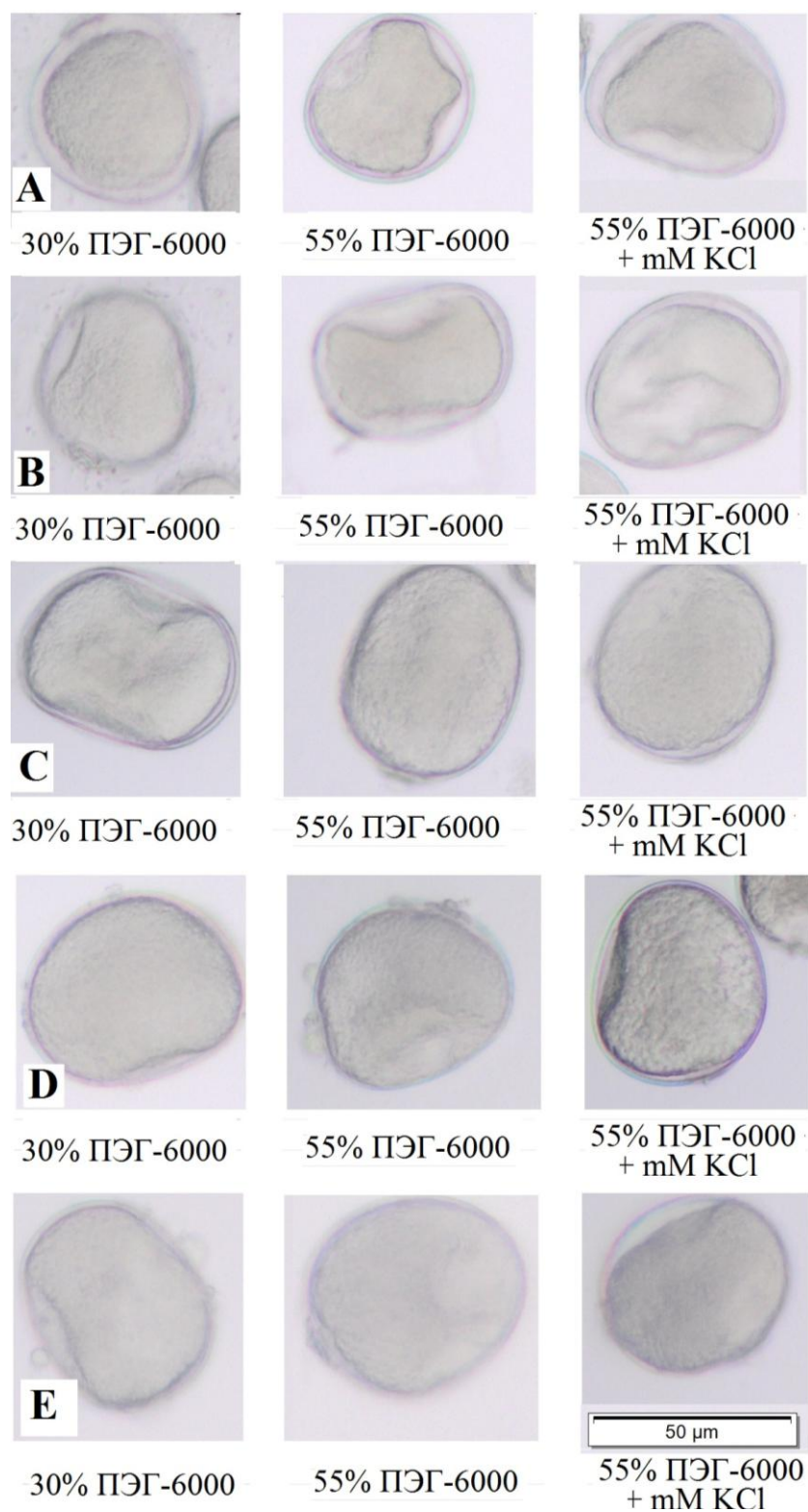


Рисунок 38 – Изменение площади цитоплазмы пыльцевых зерен у генотипов твердой пшеницы при разных моделях осмотического стресса *in vitro*, вызванных ПЭГ-6000

A – 12S2-24, B – R₃-C-68-6, C – Оазис, D – R₃-П-11-2, E – R₃-C-14-2

Таким образом, у потомств регенерантов, полученных на селективных средах в культуре *in vitro*, индуцированная осмотическая адаптация превалирует над внутренней. Исключение составили соматоклональные линии R₃-П-11-2 и R₃-С-14-2, внутренняя осмотическая настройка которых была выше индуцированной и составила 1,02. Стоит отметить, что у всех линий, производных 12S2-24, индуцированная осмотическая регуляция превышает таковой показатель родительского генотипа, тем самым повышая общую осмотическую адаптацию. Исключение составляет соматоклональный вариант R₃-П-64-3.

Распределение соматоклональных линий по группам устойчивости к осмотическому стрессу на основании классификационных функций, полученных с использованием дискриминантного анализа, а также основываясь на результатах пыльцевого анализа можно выделить генотипы, обладающие лучшими показателями среди изученного материала. Линии R₃-С-14-2, R₃-С-67-2, R₃-П-11-2 и R₃-П-67-6 являются наиболее перспективным исходным материалом, который можно использовать в селекции яровой твердой пшеницы на соле- и засухоустойчивость.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведена оптимизация получения соматклонов яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro*. Низкий морфогенетический потенциал зрелых зародышей определяет низкую эффективность их использования для получения соматклональных вариантов, устойчивых к стрессовым факторам. Не зависимо от уровня засухоустойчивости исходных генотипов твердой пшеницы отбор клеточных линий *in vitro*, устойчивых к осмотическому стрессу, сохраняющих регенерационную способность, следует проводить в культуре незрелых зародышей при концентрации в питательной среде хлорида натрия до 1,3%, полиэтиленгликоля 6000 – до 20%.

2. Генотипы яровой твердой пшеницы, характеризующиеся высокой и средней полевой устойчивостью к засухе (Оазис, Г-752), в селективных условиях в культуре незрелых зародышей *in vitro* обладают наиболее стабильным каллусогенезом и минимально снижают свой морфогенетический (на 1,0-4,1%) и регенерационный (на 54,0-67,1%) потенциал. Образцы, неустойчивые к недостатку влаги в полевых условиях (12S1-14, 12S2-24), отрицательно реагируют на присутствие стресс-фактора в среде культивирования *in vitro*, существенно, снижая уровень морфогенеза (на 11,5-12,4%) и регенерации (на 92,6%).

3. Установлена положительная корреляция между каллусогенными и морфогенными процессами ($r = +0,716$, $R^2 = 51\%$), а также морфогенными и регенерационными событиями ($r = +0,554$, $R^2 = 31\%$) *in vitro* в селективной системе в условиях солевого стресса (1,3% NaCl) при культивировании незрелых зародышей яровой твердой пшеницы. В отсутствии селективного фактора не выявлена достоверная связь между рассматриваемыми параметрами ($r = +0,334$ и $r = +0,327$, соответственно). Отсутствие корреляции морфогенеза и регенерации объясняется высоким уровнем ризогенеза, существенно снижающим выход регенерантов, но повышающим общую частоту морфогенных каллусов.

4. Фактор «генотип» существенно влияет *in vitro* на все этапы формирования клеточных культур и растений-регенерантов с максимальным вкладом на этапе развития морфогенного каллуса (49%). Каллусогенные и регенерационные процессы определялись генотипическим разнообразием исходного материала на уровне 23 и 24%, соответственно. Наличие селективного агента в питательной среде оказывало максимальное влияние на этапе регенерации растений (59%), что позволяет отбирать устойчивые к стрессу генотипы. Условия выращивания доноров эксплантов оказали небольшое прямое влияние лишь на процесс регенерации (1%). Наибольший вклад данного фактора в изменчивость морфогенеза косвенно проявлялся через взаимодействие с генотипом (10%).

5. Проведена физиологическая оценка семян и проростков 26 соматоклональных линий яровой твердой пшеницы, отобранных *in vitro* на селективных средах, содержащих 1,3% хлорид натрия и 20% ПЭГ-6000. Более выраженный положительный эффект наблюдали в том случае, когда в клеточной селекции *in vitro* участвовал генотип с изначально низким уровнем полевой засухоустойчивости (линия 12S2-24). Введение в культуру генотипов, обладающих высокой устойчивостью к действию стрессов (Оазис), реже приводило к ее повышению у соматоклонов, индуцированных селективной системой.

6. В результате лабораторного тестирования семян и проростков в растворах осмотических веществ, имитирующих недостаток влаги (15% ПЭГ-6000) и избыток засоления (1,3% хлорида натрия) выделены соматоклональные линии с интегративным индексом осмо- и солеустойчивости, превышающим родительские генотипы:

– производные 12S2-24 – R₃-C-61-2, R₃-C-63-5, R₃-C-65-7, R₃-C-67-2, R₃-C-68-6, R₃-C-612-5, R₃-П-62-1, R₃-П-64-3, R₃-П-66-6 и R₃-П-67-6. Линии R₃-C-15-4, R₃-C-16-1, R₃-C-16-3, R₃-П-11-2 и R₃-П-15-4 – производными сорта Оазис.

– более устойчивыми к действию ПЭГ-6000 оказались генотипы: R₃-С-68-6, R₃-С-612-5, R₃-П-64-3, R₃-П-66-6, R₃-П-67-6, исходной формой которых являлась линия 12S2-24, и генотипы R₃-С-16-1, R₃-С-16-3, R₃-П-11-2, R₃-П-12-4, R₃-П-15-4, полученные на основе сорта Оазис.

7. Основным механизмом адаптации соматоклональных линий яровой твердой пшеницы к условиям осмотического стресса *in vitro* на клеточном уровне является индуцированная осмотическая регуляция, которая вносит решающий вклад в формирование общих механизмов адаптации.

8. Определены признаки семян и проростков, информативные для определения уровня засухоустойчивости соматоклональных линий. Распределение генотипов по группам устойчивости к осмотическому стрессу на основании классификационных значений, полученных с использованием дискриминантного анализа, а также результатах пыльцевого анализа выделены генотипы, перспективные в селекции яровой твердой пшеницы на соле- и засухоустойчивость: R₃-С-14-2, R₃-С-67-2, R₃-П-11-2 и R₃-П-67-6.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В качестве исходного материала для селекции на соле- и засухоустойчивость предлагается использовать, созданные методами биотехнологии, перспективные линии яровой твердой пшеницы R₃-C-14-2, R₃-П-11-2, R₃-П-67-6 и R₃-C-67-2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллаев А., Касымова Г.Ф., Сабоиев И.А. Влияние почвенной засухи на компонентный состав запасных белков пшеницы // Доклады академии наук республики Таджикистан, 2011. – Т. 54. – № 11. – С. 936-941.
2. Авксентьева О.А., Жмурко В.В. Генетический контроль путей морфогенеза *in vitro* изогенных по генам PPD линий озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. // Вестник КазНУ, 2012. – Т. 56. – № 4. – С. 133-136.
3. Авксентьева О.А., Петренко В.А. Роль генотипа, состава среды и типа экспланта в формировании первичного каллюса изогенных линий пшеницы // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія, 2009. – Вип. 9. – № 856. – Р. 56-62.
4. Агротехника озимой пшеницы. – М.: Колос, 1967. – С. 3-25.
5. Аджаосу Д.Ф. Засуха и продуктивность растений // Наука и общество, 1983. – № 4. – С. 151.
6. Александров В.Я., Кислюк И.М. Реакция растений на тепловой шок: физиологический аспект // Цитология, 1994. – № 36. – С. 5-59.
7. Альтергот В.Ф., Мордкович С.С., Фадеева Л.Г. Тепловые нарушения развития мужского гаметофита у яровой пшеницы // Физиология и биохимия культурных растений, 1998. –Т. 10. – № 5. – С. 451-456.
8. Аль-Холани Х.А.М. Получение стресс – толерантных растений кукурузы методом клеточной селекции: автореф. ... к.б.н. – М., 2010. – 24 с.
9. Аль-Холани Х.А.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. – С. 60-67.
10. Антоненко В.С., Гойса Н.И. О влиянии водного дефицита озимой пшеницы на её фотосинтетическую продуктивность // Тр. Регион. НИИ Госкомгидромета, 1985. – № 20. – С. 18-23.

11. Бавол А.В., Дубровная О.В., Лялько И.И. Регенерация растений из различных типов эксплантов мягкой пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений, 2008. – Т. 40. – № 2. – С. 150-156.
12. Банникова В.П., Хведынич О.А., Кравец Е.А. и др. Основы эмбриогенеза злаков. – Киев: Наукова думка, 1991. – 176 с.
13. Батыгина Т.Б. Эмбриология пшеницы. – Л.: Колос, 1974. – 206 с.
14. Батыгина Т.Б. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. Семя. – СПб.: Мир и семья-95, 1997. – С. 528-538.
15. Беккужина С.С. Гаплоидные технологии в ускоренном создании исходных форм и линий яровой мягкой пшеницы, устойчивых к засухе и к *Septoria nodorum* Berk: автореф. ... д. б. н. – М., 2011. – 43с.
16. Березина О.В. Структурно-функциональная организация фотосинтетического аппарата сортов твердой и мягкой пшеницы в связи с их продуктивностью: автореф. дис. ... к. б. н. – Казань, 1989. – 23 с.
17. Берсимбаев Р.И., Шулембаева К.К. Цитогенетические исследования мягкой пшеницы в Казахстане // Вестник ВОГиС, 2005. – Т. 9. – № 3. – С. 317-323.
18. Бишимбаева Н.К., Амирова А.К., Парменова А.К., Булатова К.М. Исследование соматоклональных линий пшеницы при помощи биохимических маркеров, характеризующих генотип // KazNU Bulletin, 2012. – №3 (55). – С. 37-40.
19. Боме Н.А., Колоколова Н.Н., Белозерова А.А., Воронова Н.С., Боме А.Я., Иеронова В.В. Устойчивость сортов зерновых культур к стрессовым факторам // Успехи современного естествознания, 2006. – № 4. – С. 28-32.
20. Бучинский И. Е. Засухи и суховеи. – Л.: Гидрометеиздат, 1976. – 214 с.
21. Бычкова О.В. Оценка эффективности морфогенеза и регенерации яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro* // Acta Biologica Sibirica, 2016. – Т. 2. – № 1. – С. 139-149. doi: 10.14258/abs.v2i1-4.923

22. Бычкова О.В., Ерещенко Д.В., Розова М.А. Сравнительная оценка использования зрелых и незрелых зародышей яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro* // *Acta Biologica Sibirica*, 2016. – Т. 2. – № 2. – С. 76-80.
23. Варавкин В. А., Таран Н. Ю. Диагностика засухоустойчивости сортов пшеницы разной селекции по осморегуляторным свойствам семян // *Scientific Journal «Science Rise»*, 2014. – №3/1(3). – С. 18-22.
24. Васильчук Н.С. Результаты селекции яровой твёрдой пшеницы на адаптивность // *Селекция и семеноводство*, 2005. – № 4. – С. 2-6.
25. Веденічева Н.П. Роль цитокінінів у регуляції ростових процесів різних органів рослин // *Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку*, 2009. – Т. 1. – С. 612-624.
26. Вишневская М.С., Павлов А.В., Дзюбенко Е.А. и др. Нуклеотидный полиморфизм гена *srlk*, определяющего устойчивость к засолению люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) // *Генетика*, 2014. – Т. 50. – № 4. – С. 433-442.
27. Генкель П.А. Крахмальная проба как один из методов диагностики засухоустойчивости растений // *Докл. АН СССР*, 1952. – Т. 86. – № 5. – С. 1049-1052.
28. Генкель П.А. Методические указания по диагностике засухоустойчивости культурных растений. – М.: Колос, 1968. – 24 с.
29. Генкель П.А. Физиология растений. – М.: Просвещение, 1975. – 335 с.
30. Генкель П.А. Физиология устойчивости растительных организмов // *Физиол. с.-х. растений*, 1967. – Т. 3. – С. 269-287.
31. Генкель П.А., Баданова К.А., Левина В.В. О новом лабораторном способе диагностики жаро- и засухоустойчивости для селекции // *Физиология растений*, 1970. – Т. 17. – Вып. 2. – С. 431-437.
32. Генкель П.А., Баданова К.А., Левина В.В. Применение прямого лабораторного метода диагностики жаро- и засухоустойчивости растений для

селекции путём гидролиза статолитного крахмала. – М.: Колос, 1972. – С. 260.

33. Гикало Г., Бурдун А., Санина О.Г. Подбор перспективных линий томата с маркерными признаками с целью использования их в селекции гетерозисных гибридов для открытого грунта // Научный журнал КубГАУ, 2012. – №81(07). – С. 1-11.

34. Гладков Е.А. Получение растений полевицы побегоносной с комплексной устойчивостью к тяжелым металлам и засолению методами клеточной селекции // Сельскохозяйственная биотехнология, 2009. – № 6. – С. 85-88.

35. Голованова И.В., Григорьева Л.П., Никитина Е.Д. Получение андрогенетических линий при культивировании пыльников мягкой яровой пшеницы // Современные проблемы генетики и селекции сельскохозяйственных растений, Одесса, 22-26 апреля 1991 г.: материалы Всесоюзной научно-технической конференции молодых ученых. – Одесса: Одесская городская типография, 1991. – 124-125.

36. Головоченко А. П. Засухи и селекция засухоустойчивых сортов яровой пшеницы в Среднем Поволжье // Сб. науч. трудов «Проблемы повышения продуктивности полевых культур», 1999. – С. 109-115.

37. Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. – Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2012. – 523 с.

38. Горис И.Я. Дыхание и фосфорный обмен семян, прорастающих в условиях разнокачественного засоления: автореф. дис. ... к.б.н. – Владивосток, 1967. – 21 с.

39. Горчакова А.Ю. Научные аспекты изучения особенностей побегообразования бореальных злаков // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 2011. – Т. 13. – № 5. – С. 54-59.

40. Григорьева Л.П., Шлецер И.А. Скрининг сортов пшеницы по способности к морфогенезу в культуре незрелых зародышей *in vitro* // Известия Алтайского государственного университета, 2006. – № 3. – С. 64-66.

41. Губарева Н.К., Алпатьева Н.В. К вопросу об использовании белковых маркеров в оценке морозостойкости озимой мягкой пшеницы // Аграрная Россия, 2002. – № 3. – С. 31-34.
42. Гусейнова И.М., Алиева Д.Р., Маммадов А.Ч., Алиев Д.А. Антиоксидантные ферменты, участвующие в детоксикации H_2O_2 в листьях и корнях пшеницы в условиях продолжительной почвенной засухи // АМЕА-*nın Xəbərləri (biologiya və tibb elmləri)*, 2014. – Cild 69. – №3. – Səh. 5-15.
43. Демченко О.А. Влияние осмотического стресса на рост корней и надземных органов яровой пшеницы: автореф. дис. ... к.б.н. – М., 1989. – 26 с.
44. Джиффорд Р.М., Дженкинс К.Л.Г. Использование достижений науки о фотосинтезе для повышения продуктивности культурных растений // Фотосинтез, 1987. – Т. 2. – С. 365-410.
45. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений. – Минск: БГУ, 2007. – 102 с.
46. Дмитриенко В.П. Методические указания по комплексной оценке влияния засушливых явлений на урожайность зерновых культур и сахарной свеклы. – М.: Гидрометеоиздат, 1992. – 84 с.
47. Долгих Ю.И. Соматоклональная изменчивость растений и возможности ее практического использования (на примере кукурузы): автореф. ... д.б.н. – М., 2005. – 45 с.
48. Долгих Ю.И., Ларина С.М., Шамина З.Б., Пустовойтова Т.Н. Засухоустойчивость растений кукурузы, полученных из устойчивых к осмотическому действию полиэтиленгликоля клеточных линий // Физиология растений, 1994. – Т. 42. – № 6. – С. 853-858.
49. Дорошенко Т.Н., Захарчук Н.В., Рязанова Л.Г., Митракова С.И. Агробиологический аспект повышения устойчивости яблони к абиотическим стресс-факторам летнего периода // Научный журнал КубГАУ, 2010. – №62. – С. 379-388.
50. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1973. – 336 с.

51. Дубровна О.В., Моргун Б.В. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля // Физиология и биохимия культурных растений, 2009. – Т. 41. – № 6. – С. 463-465.

52. Дьяков А.Б., Васильева Т.А. Физиологическое обоснование идеатипа сортов сои, адаптированных к климату юга России // Современные проблемы селекции и технологии возделывания сои: сб. статей 2-й Междунар. конф. по сое, Краснодар, 9-10 сентября, 2008 г. – Краснодар, 2008. – С. 62-82.

53. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Биотехнологические приемы получения форм шалфея, устойчивых к осмотическому стрессу *in vitro* // Экосистемы, их оптимизация и охрана, 2013. – Вып. 8. – С. 93-100.

54. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Митрофанова И.В. Морфогенез и клональное микроразмножение *Salvia sclarea* L. *in vitro* // Труды Никитского ботанического сада, 2011. – Т. 133. – № 41. – С. 41-52.

55. Ерещенко О.В., Хлебова Л.П., Розова М.А. Оценка регенерационного потенциала яровой твердой пшеницы для создания засухоустойчивого селекционного материала // Биотехнология и общество в XXI веке, Барнаул, 15-18 сентября 2015 г.: сборник статей Международной научно-практической конференции. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. – С. 341-345.

56. Живетьев М.А., Граскова И.А., Поморцев А.В., Войников В.К. Содержание воды и сахаров в листьях лекарственных растений в течение вегетации // Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 2011. – Т. 7. – № 4. – С. 69-79.

57. Журбицкий З.И. Теория и практика вегетационного метода. – М.: Наука, 1968. – 226 с.

58. Жученко А. А. Стратегия адаптивной интенсификации Сельского хозяйства (концепция). – Пушкино: ОНТИ Пушкин. науч. центра РАН, 1994. – 148 с.

59. Жученко А.А. Ресурсный потенциал производства зерна в России. – М.: ООО «Изд-во Агро-рус», 2004. – 1109 с.
60. Зелёные пластиды при водном дефиците и адаптации к засухе. – Кишинёв: Штиинца, 1981. – 160 с.
61. Зеленянская Н.Н., Подуст Н.В., Гогоулинская Е.И. Влияние засухи *in vitro* на формирование и рост каллусной ткани винограда //Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук, 2013. – № 1. – С. 62-65.
62. Ибрагимова С.С., Горелова В.В., Кочетов А.В., Шумный В.К. Роль различных метаболитов в формировании стрессоустойчивости растений // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина, 2010. – Т. 8. – № 3. – С. 98-103.
63. Иванченко Л.Е. Использование электрофоретических спектров ферментов дикорастущей сои как маркеров процесса биохимической адаптации к условиям выращивания // Масличные культуры, 2012. – Вып. 1 (150). – С. 10-15.
64. Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. – Одеса: Астропринт, 2011. – 224 с.
65. Ионова Е.В. Засуха и засухоустойчивость зерновых колосовых (обзор) // Зерновое хозяйство России, 2011. – № 2 (14). – С. 37-41.
66. Ионова Е.В., Скворцова Ю.Г. Изменение посевных качеств озимой пшеницы при различных условиях выращивания (засушник) // Зерновое хозяйство России, 2013. – № 4 (28). – С. 27-29.
67. Исаева Н.А., Першина Л.А., Шумный В.К. Особенности органогенеза в каллусных тканях разных видов и межвидовых гибридов ячменя // Изв. Сибирского отделения АН СССР: Сер. Биологические науки, 1983. – № 5. – С. 76-81.
68. Карманова О.И., Карманов И.В. Возможности динамического фитомониторинга в селекции генотипов по засухоустойчивости // Растение и стресс, Москва, 9-12 ноября, 2010 г.: сборник статей всероссийского

симпозиума. – М.: Типография Московской Федерации профсоюзов, 2010. – С. 177-178.

69. Касумов Н.А. О механизме действия экстремального засоления среды на растения // Сб. науч. трудов «К изучению резистентности растений при экстремальных воздействиях среды». – Баку, 1982. – С. 46-49.

70. Климачев Д.А., Кузнецова С.А., Старикова В.Т. Изменение интенсивности дыхания растений в условиях солевого стресса // Вестник МГОУ, 2011. – № 1. – С. 30-34.

71. Кожушко Н.Н. Выход электролитов как критерий оценки засухоустойчивости и особенности его использования для зерновых культур // Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. – Л., 1976. – С. 32-42.

72. Колкунов В. В. К вопросу и транспирации и засухоустойчивости культурных растений // Научно-агроном. журн., 1926. – № 9. – С. 531-551.

73. Колкунов В.В. К вопросу о выработке выносливых к засухам раскультурных растений. Анатомо-физиологическое исследование степени ксерофильности некоторых злаков // Журнал Киев. политехн. ин-та им. Имп. Александра II, 1905. – Т.1. – С. 83.

74. Колодяжная Я.С., Куцоконь Н.К., Левенко Б.А., Сютикова О.С., Рахметов Д.Б., Кочетов А.В. Трансгенные растения, толерантные к абиотическим стрессам // Цитология и генетика, 2009. – № 2. – С. 72-93.

75. Конарев А.В. Использование молекулярных маркеров в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции // Аграрная Россия, 2006. – № 6. – С. 4-22.

76. Косаковская И.В. Стрессовые белки растений. – Киев: Фитосоциоцентр, 2008. – 151 с.

77. Кошкин Е. И., Гатаулина Г. Г., Дьяков А. Б. и др. Частная физиология полевых культур. – М.: КолосС, 2005. – 344 с.

78. Красовская И.В. Предельная влажность почвы для развития узловых корней // Тр. по прикл. бот., 1935. – Сер. III. – № 8. – С. 15-18.

79. Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетический компетентный эксплант // Физиология и биохимия культ. растений, 2009. – Т.41. – № 2. – С. 124-131.
80. Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Баженов М.С. и др. Полиморфизм реакции проростков пшенично-пырейных гибридов на засоление // Сельскохозяйственная биология, 2013. – № 5. – С. 44-53.
81. Крупнов В.А. Генетическая сложность и контекст-специфичность признаков урожая пшеницы в засушливых условиях // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013. – Т. 17. – № 3. – С. 524-534.
82. Кудашкина Е.Б., Костылев П.И., Азарин К.В. и др. Маркерная селекция риса на солеустойчивость // Таврический вестник аграрной науки, 2016. – № 2(6). – С. 79-87.
83. Кузнецов В.В., Кимпел Дж., Гокджиян Дж., Ки Дж. Элементы неспецифичности реакции генома растений при холодовом и тепловом стрессе // Физиология растений, 1987. – № 34. – С. 859-868.
84. Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений, 1999. – Т. 46. – С. 321-336.
85. Кумаков В.А. Физиологическое обоснование моделей сортов пшеницы. – М.: Колос, 1985. – 270 с.
86. Кушниренко М. Д. Физиология водообмена и засухоустойчивости плодовых культур. – Кишинёв: Штиинца, 1975. – 215 с.
87. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
88. Леонова И.Н. Генетический контроль устойчивости к грибным болезням у мягкой пшеницы с интрогрессиями от *Triticum timopheevii* Zhuk.: автореф. ... д.б.н. – Новосибирск, 2015. – 34 с.
89. Литвинов Л.С. Методы оценки засухоустойчивости // Семеноводство, 1933. – № 6. – С. 7-12.
90. Лихенко И.Е. Селекционная оценка окраски колоса яровой мягкой пшеницы // Селекция и семеноводство, 2002. – № 2. – С. 13-16.

91. Логинов В. Ф., Неушкин А. И., Рочева Э. В. Засухи, их возможные причины и предпосылки предсказания. – Обнинск: ВНИИГМИ-МЦД, 1976. – 71 с.
92. Лукина Л.Ф., Слушная Н.П. Физиологические особенности растений озимой пшеницы, различающихся по мощности корневой системы // Докл. ВАСХНИЛ, 1971. – № 9. – С. 3-10.
93. Лыкова Н.А. Адаптивность злаков (*Poaceae*) в связи с условиями превегетации и вегетации // Сельскохозяйственная биология, 2008. – № 1. – С. 48-54.
94. Лыфенко С.Ф. Сортовые различия озимой пшеницы по площади листового аппарата и связь их с продуктивностью // Теоретические и прикладные аспекты селекции и семеноводства пшеницы, риса, ячменя и тритикале. – Одесса: Изд-во ВСГИ, 1981. – С. 102-103.
95. Лыфенко С.Ф., Данильчук П.В., Ериняк Н.И. Сортовые различия озимой пшеницы по площади листового аппарата и их связь с элементами продуктивности // Репродуктивный процесс и урожайность полевых культур: Сб. научн. тр. ВСГИ. – Одесса: ВСГИ, 1981. – С. 7-18.
96. Ляшок А.К., Мусич В.Н. Способы отбора устойчивых озимых и яровых растений из ярово-озимых гибридов в фитотроне // Системы интенсивного культивирования растений: Сб. науч. тр. – Л., 1987. – С. 125-129.
97. Маймистов В.В. Определение водоудерживающей способности листьев растений // Методы опред. устойч. к абиотич. факторам среды при селекции зерновых культур: Сб. методических разработок селекции и акклиматизации растений. – Радзиков: ПНР, 1988. – С. 98-100.
98. Маймистов В.В. Физиологические основы селекции озимой пшеницы на засухоустойчивость: автореф. дис. ... д.б.н. – Краснодар, 2000. – 50 с.
99. Маймистов В.В., Мутовина Т.В. Связь ксероморфности флагового листа с физиологическими показателями засухоустойчивости у

озимой пшеницы // Физиолого-генетические проблемы интенсификации селекционного процесса. Ч. 1. – Саратов, 1984. – С. 161-169.

100. Максимов Е. А. Основы засухоустойчивости растений. – Л., 1925. – 380 с.

101. Малышев В.Ф. Интенсивность дыхания растений риса и содержание в них углеводов в зависимости от уровня азотного питания при засолении // Труды Кубанского сельскохозяйственного института, 1982. – Вып. 210 (238). – С. 144-147.

102. Мамонов Ю.Л.К. Физиологические особенности яровой пшеницы в Северном Казахстане: автореф. дис. ... д.б.н. – М., 1987. – 29 с.

103. Манабаева Ш.А., Рахимжанова А.О., Каиржанова А.Д., Раманкулов Е.М. Изучение каллусогенеза и морфогенеза хлопчатника сорта «туркистан» в культуре *in vitro* // Биотехнология. Теория и практика, 2013. – № 4. – С. 68-73.

104. Мелехов Е.И. Принцип регуляции скорости процесса повреждения клетки и реакция защитного торможения метаболизма (РЗТМ) // Журнал общей биологии, 1985. – № 46. – С. 174-189.

105. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений // Физиология и биохимия культ. растений, 2009. – Т. 41. – № 6. – С. 496-509.

106. Михайловская И.С. Строение растений в связи с условиями их жизни. – М.: Просвещение, 1977. – 103 с.

107. Мокроносов А.Т., Борзенкова Р.А. Методика количественной оценки структуры и функциональной активности фотосинтезирующих тканей и органов // Тр. по прикл. бот., ген. и сел., 1987. – Т. 61. – Вып. 3. – С. 43-46.

108. Моргун В.В., Дубровна О.В., Моргун Б.В. Современные биотехнологии получения устойчивых к стрессам растений пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений, 2016. – Т. 48. – № 3. – С. 196-214.

109. Мурсалимова Г.Р., Хардикова С.В. Засухоустойчивость вегетативно размножаемых подвоев яблони в условиях Южного Урала // Вестник ОГУ, 2012. – № 6(142). – С. 63-65.

110. Никитин В. А. Быстрый способ определения электропроводности растительной ткани // Физиология растений, 1964. – Т. 13. – Вып. 2. – С. 373-376.

111. Никитина Е.Д. Формообразовательные процессы в культуре незрелых зародышей *Triticum aestivum* L. и их взаимосвязь // Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2014. – № 4 (114). – С. 48-52.

112. Никитина Е.Д., Мухин В.Н., Хлебова Л.П., Мацюра А.В., Бычкова О.В. Оптимизация гормонального состава питательной среды для эффективной регенерации мягкой пшеницы *in vitro* // Biological Bulletin of Bogdan Chmelniyskiy Melitopol State Pedagogical University, 2016. – Т. 6 (2). – С. 294-302.

113. Никитина Е.Д., Хлебова Л.П., Ерещенко О.В. Разработка отдельных элементов технологии клеточной селекции яровой пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессам // Известия Алтайского государственного университета, 2014. – Т. 2. – № 3. – С. 50-54. DOI: 10.14258/izvasu(2014)3.2-09.

114. Никитина Е.Д., Хлебова Л.П., Соколова Г.Г., Ерещенко О.В. Создание стрессоустойчивого материала яровой мягкой пшеницы с использованием клеточной селекции *in vitro* // Известия Алтайского государственного университета, 2013. – № 3 – 2 (79). – С. 95-98. DOI: 10.14258/izvasu(2013)3.2-20

115. Ожерельева З.Е., Красова Н.Г., Галашева А.М. Изменение водного режима листьев яблони в течение вегетации // Современное садоводство, 2015. – №1. <http://journal.vniispk.ru/pdf/2015/1/12.pdf>

116. Олейникова Т.В., Осипов Ю.Ф. Определение засухоустойчивости сортов пшеницы и ячменя, линий и гибридов кукурузы по прорастанию

семян на растворах сахарозы с высоким осмотическим давлением // Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. – Л.: Колос, 1976. – С. 23-32.

117. Оценочный доклад об изменениях климата и их последствиях на территории Российской Федерации. Т. I. Изменения климата. – М.: Росгидромет, 2008. – 227 с.

118. Ошмарина В. И., Шамина З. Б., Бутенко Р. Г. Получение резистентных к NaCl и этионину клеточных линий *Nicotiana sylvestris* и их характеристика // Генетика, 1983. – Т. 19. – № 5. – С. 822-827.

119. Панкова Е.И., Конюшкова М.В., Горохова И.Н. О проблеме оценки засоленности почв и методике крупномасштабного цифрового картографирования засоленных почв // Экосистемы: экология и динамика, 2017. – Т. 1. – № 1. – С. 26-54.

120. Пахомова В.М. Основные положения современной теории стресса и неспецифический адаптационный синдром у растений // Цитология, 1995. – № 43. – С. 66-91.

121. Пахомова В.М., Чернов И.А. Некоторые особенности индуктивной фазы неспецифического адаптационного синдрома растений // Известия РАН. Сер. Биол., 1996. – № 6. – С. 705-715.

122. Петин Н.С. Физиология орошаемой пшеницы. – М.: Изд-во АН СССР, 1959. – С. 30-37.

123. Петункина Л.О. Диагностика устойчивости растений к засолению и засухе методом проростков // Флора и растительность антропогенных нарушенных территорий, 2008. – Вып. 4. – С. 3-7.

124. Петункина Л.О., Свиркова С.В., Маевская Н.А., Старцев А.А. Физиологическая оценка устойчивости овса // Вестник Кемеровского государственного университета, 2012. – Т. 4. – № 1. – С. 20-24.

125. Поляков В.А., Левчук А.Н., Лях В.А. Изучение белкового комплекса семян льна // Вісник Запорізького національного університету, 2011. – № 2. – С. 23-28.

126. Почвы Алтайского края. – М.: Изд-во АН СССР, 1999. – 382 с.
127. Почтовый А.А., Карлов Г.И., Дивашук М.Г. Создание молекулярных маркеров на гены DREB пырейного происхождения, обеспечивающих повышение засухоустойчивости в геномах злаков // Вестник Башкирского университета, 2013. – Т. 18. – № 3. – С. 745-747.
128. Проблема адаптации: Ключевые проблемы влияния климатических изменений на производство сельскохозяйственных культур и благосостояние сельскохозяйственных работников в Российской Федерации // Научно-исследовательские отчеты OXFAM, 2012 октябрь. – 43 с. http://ecfs.msu.ru/sites/default/files/node/publication/15/10/rus_rr-adaptation-challenge-russian-federation-agriculture-102012-rus_final.pdf
129. Производство высококачественного зерна яровой твердой пшеницы в Среднем Поволжье: науч.-практ. руковод. / С.Н. Шевченко, В.А. Корчагин, О.И. Горянин, П.Н. Мальчиков, А.А. Вьюшков, А.П. Чичкин; науч. ред., сост. В.А. Корчагин; Самарский НИИСХ. – Самара: СамНЦ РАН, 2010. – 75 с.
130. Прусакова Л.Д. Рост листьев в связи с содержанием аминокислот и ДНК при различном водном режиме // Водный режим растений в связи с обменом веществ и продуктивностью. – М. Изд-во АН СССР, 1963. – С. 64-67.
131. Прянишников Д.Н. Вегетационный метод и его роль в агрохимическом исследовании. – М.: Изд-во АН СССР, 1963. – С. 5-16.
132. Пурис С.И., Никитина Е.Д., Хлебова Л.П. Влияние абиотических факторов на прямое прорастание эксплантов в культуре незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы *in vitro* // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности, Бийск, 21-23 мая 2014 г.: материалы VII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. – Барнаул: ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова» (АлтГТУ), 2014. – С. 227-231.

133. Пустовойтова Т.Н. Стрессовые воздействия и изменение уровня регуляторов роста растений. Рост растений и дифференцировка. – М.: Наука, 1981. – С. 225-244.

134. Пустовойтова Т.Н., Дроздова И.С., Жданова Н.Е., Жолкевич В.Н. Рост листьев, интенсивность фотосинтеза и содержание фитогормонов у *Cucumis sativus* при прогрессирующей почвенной засухе // Физиология растений, 2003. – Т. 50. – № 4. – С. 496-498.

135. Пыкало С.В. Биотехнология получения растений-регенерантов тритикале в культуре различных типов эксплантов // Austrian Journal of Technical and Natural Sciences, 2015. – № 5-6. – С. 34-39.

136. Рахманкулова З.Ф. Уровни регуляции энергетического обмена в растения // Вестник Башкирского университета, 2009. – Т. 14. – №3(I). – С. 1141-1154.

137. Розова М.А., Зиборов А.И. Продуктивность коллекционных образцов яровой твердой пшеницы в разнообразных погодных ситуациях в приобской лесостепи алтайского края // Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2016. – № 5 (139). – С. 9-15.

138. Россеев В.М. Реакции клеточных систем зерновых культур *in vitro* и биотестирование селекционного материала на устойчивость к неблагоприятным абиотическим факторам среды: автореф. ... к.б.н. – Омск, 2001. – 16 с.

139. Россеев В.М. Тестирование *in vitro* разных форм яровой мягкой пшеницы на устойчивость к неблагоприятным абиотическим факторам среды // Российская сельскохозяйственная наука, 2007. – № 5. – С. 3-4.

140. Россеев В.М., Белан И.А., Россеева Л.П. Использование метода *in vitro* в селекции пшеницы мягкой яровой // Вестник АГАУ, 2016. – № 2. – С. 5- 9.

141. Россеев В.М., Белан И.А., Россеева Л.П. Тестирование *in vitro* яровой мягкой пшеницы и ячменя на устойчивость к неблагоприятным

абиотическим факторам среды // Российская сельскохозяйственная наука, 2010. – № 3. – С. 14-16.

142. Россеев В.М., Белан И.А., Россеева Л.П. Тестирование *in vitro* яровой мягкой пшеницы на засухоустойчивость // Вестник АГАУ, 2011. – № 2. – С. 32-34.

143. Самофалова Н.Е., Иличкин А.Н., Лещенко М.А. и др. Состояние и задачи селекции твердой озимой пшеницы в изменяющихся условиях климата // Аграрный вестник Урала, 2015. – № 12 (142). – С. 18-23.

144. Сартакова С.В., Заушинцева А.В., Петункина Л.О. Оценка солеустойчивости ячменя // Доклады РАСХН, 1997. – С. 5-6.

145. Сашко Е.Ф. Наследование устойчивости реципрокных гибридов *Triticum aestivum* L. к культуральному фильтрату патогена *Helminthosporium avenae eidam* // Вестник защиты растений, 2016. – Т. 89. – № 3. – С. 149-150.

146. Сашко Е.Ф. Оценка устойчивости гибридов *Triticum aestivum* L. к метаболитам патогена *Helminthosporium avenae eidam* // Селекция и семеноводство овощных культур, 2014. – № 45. – С. 473-484.

147. Сельдимирова О.А., Катасонова А.А., Круглова Н.Н. Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллюсах различного происхождения у пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений, 2011. – Т. 43. – № 4. – С. 297-306.

148. Сельдимирова О.А., Янбаев Ю.А., Зайцев Д.Ю. Изоферментные маркеры в исследовании изменчивости сортов яровой мягкой пшеницы, районированных в Башкортостане // Вестник ОГУ, 2009. – № 6. – С. 337-339.

149. Селянинов Г.Т. Происхождение и динамика засух. В кн.: Засухи в СССР, их происхождение, повторяемость и влияние на урожай. – Л.: Гидрометеоиздат, 1958. – 207 с.

150. Семенов С.М. Методы оценки последствий изменения климата для физических и биологических систем: монография. – М.: Росгидромет, 2012. – 506 с.

151. Сергеева Л.Е., Бронникова Л.И., Тищенко Е.Н. Содержание свободного пролина как показатель жизнедеятельности клеточной культуры *Nicotiana tabacum L.* при стрессе // Биотехнологія, 2011. – Т. 4. – №4. – С. 87-94.

152. Сидор Л.С., Орлов П.А. Регенерационный потенциал различных видов пшеницы, ржи и ячменя в культуре листовых эксплантов // Цитология и генетика, 2005. – Т. 40. – №5. – С. 28-34.

153. Сидоров А.В., Плеханова Л.В. Влияние окраски колоса на урожай и качество зерна яровой пшеницы // Вестник Красноярского государственного аграрного университета, 2014. – № 1. – Р. 69-72.

154. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. – К.: Наукова думка. – 1990. – 280 с.

155. Синельникова В.Н., Удовенко Г.В. Способ диагностики солеустойчивости злаков по ростовой реакции клеоптильных биотестов // Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. – Л., 1976. – С. 243-248.

156. Слейчер Р. Водный режим растений. – М.: Мир, 1970. – 365 с.

157. Способ оценки растений *in vitro* к абиотическим факторам внешней среды: Пат. 2146865. Россия, А01Н4/00, А01Н1/04 / Россеев В.М.; Сиб. НПО «Колос». – No 92002021/13; Заявл. 26.10.92; Оpubл. 27.03.00; Бюл. No 9.

158. Судачкова Н.Е., Милютина И.Л., Романова Л.И. Влияние стрессовых воздействий в ризосфере на состав свободных аминокислот в тканях сосны обыкновенной // Journal of Stress Physiology and Biochemistry, 2007. – Vol. 3. – № 2. – Р. 4-14.

159. Судачкова Н.Е., Романова Л.И., Милютина И.Л. Действие засухи на формирование древесины и антиоксидантную защиту камбиальной зоны сосны обыкновенной // Сибирский лесной журнал, 2015. – № 5. – С. 54-63.

160. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // Усп. соврем. биологии, 2004. – Т. 124. – С. 260-271.

161. Тагиманова Д.С., Ергалиева А.Ж., Райзер О.Б., Хапилина О.Н. Оценка генотипов яровой мягкой пшеницы на засухоустойчивость в условиях *in vitro* // Биотехнология. Теория и практика, 2013. – № 2. – С. 42-46.

162. Танасиенко И.В., Емец А.И., Блюм Я.Б. Оценка эффективности каллусообразования и регенерации яровых сортов ячменя, районированных на территории Украины // Цитология и генетика, 2009. – № 4. – С. 12-19.

163. Тарчевский И.А. Фотосинтез и засуха. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1980. – 22 с.

164. Терек Н. Яворська О. Величко В. Ткаченко Л. Рости параметри та вміст індолілоцтової та абсцизової кислот у проростків сої за умов гіпо- і гіпертермії в разі дії регуляторів росту івіну та емістиму // Вісник львів. ун-ту. Серія біологічна, 2005. – Вип. 40. – С. 148-153.

165. Ткачев В.И., Гуляев Б.И. Реакция растений разных сортов озимой пшеницы на кратковременную почвенную засуху // Физиология и биохимия культурных растений, 2010. – Т. 42. – № 6. – С. 522-529.

166. Ткачук О.А. Влияние основной обработки почвы и регуляторов роста на засухоустойчивость и урожайность яровой пшеницы в лесостепи Поволжья: автореф. дисс. ... к. с-х. н. – Пенза, 2006. – 21 с.

167. Трапезников В.К., Иванов И.И., Тальвинская Н.Г. Локальное питание растений. – Уфа: Гилем, 1999. – 260 с.

168. Третьяков Н.Н. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений. – М.: Колос, 2005. – 639 с.

169. Трифонова Т.В., Максютова Н.Н., Викторова Л.В., Галеева Е.И., Яфарова Г.Г., Минибаева Ф.В. Регуляция активности нитратредуктазы и ее вовлечение в образование оксида азота в листьях пшеницы // Доклады академии наук, 2010. – Т. 435. – № 6. – С. 846-849.

170. Туманов И.И. Физиологические основы зимостойкости культурных растений. – М., Л., 1940. – С. 34-37.
171. Турманидзе Т.И. Климат и урожай винограда. – Л.: Гидрометеоиздат, 1981. – 224 с.
172. Тучин С.В., Архипова Л.Н., Носова Н.Н., Сахаджи Т.Н. Оценка различных селективных схем для отбора на засухоустойчивость в культуре изолированных тканей пшеницы // Биологические основы селекции, 1991. – С. 41-48.
173. Тюнин В.А. Селекция мягкой яровой пшеницы в условиях Южного Урала: дис. ... д. с.-х. н. – Челябинск, 2004. – 302 с.
174. Тюрин В.В., Щеглов С.Н. Дискриминантный анализ в биологии: монография. – Краснодар: Кубанский гос. ун-т, 2015. – 126 с.
175. Удовенко Г.В. Механизмы адаптации растений к стрессам // Физиология и биохимия культурных растений, 1979. – Т. 11. – № 122. – С. 99-107.
176. Федулов Ю.П., Маймистов В.В., Голуб О.О. Способ отбора морозоустойчивых сортов озимой пшеницы: Авторское свидетельство СССР N 1597124 // Бюл. Госкомитета СССР по делам изобретений и открытий. 1990.
177. Фоменко Т.И., Бердичевец Л.Г., Малюш М.К., Чумакова И.М. Влияние эндогенного и экзогенного действия гормонов на процесс каллусообразования и морфогенез у табака // Клеточные ядра растений – Экспрессия и реконструкция: Материалы I Региональной научной конференции, г. Минск, 28-29 мая 2001 г. – Минск, 2001. – С. 152-158.
178. Хамула П.В., Солодовниченко В.Д., Базько Л.В. Влияние генотипа и размера зародыша мягкой пшеницы на частоту каллусообразования // Селекционно-генетические аспекты повышения продуктивности зерновых культур. – Мироновка, 1987. – С. 45-48.

179. Харанян Е. Е. Водоудерживающая способность листьев различных по засухоустойчивости растений при завядании // Физиология растений, 1965. – Т. 12. – Вып. 1. – С. 170-171.

180. Хисамутдинов А. Ф. Водные стрессовые явления на виноградниках // Материалы дистанционной конференции «Новые технологии повышения стрессоустойчивости плодовых и виноградных растений», 10 июля - 21 августа 2009г, СКЗНИИСиВ, г. Краснодар, Россия <http://vinograd.info/stati/stati/vodnye-stressovye-yavleniya-na-vinogradnikah.html>

181. Хлебова Л.П., Никитина Е.Д., Мацюра А.В., Бычкова О.В. Взаимосвязь морфогенетических процессов в культуре ткани пшеницы // Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University, 2016. – Т. 6. – № 2. – С. 311-320.

182. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013. – Т. 17. – № 4/2. – С. 1044-1054.

183. Холодова В.П., Мещеряков А.Б., Александрова С.Н., Кузнецов В.В. Исследование неспецифической стрессорной реакции растений на шоковое действие абиотических факторов // Вестник ННГУ, 2001. – № 1. – С. 151-164.

184. Чеботарь С.В., Благодарова Е.М., Куракина Е.А., Семенюк И.В., Полищук А.М., Козуб Н.А., Созинов И.А., Хохлов А.Н., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М. Генетический полиморфизм локусов, определяющих хлебопекарное качество украинских сортов пшеницы // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2012. – Т. 16. – № 1. – Р. 87-99.

185. Чегамирза К. Молекулярно-генетическое картирование локусов качественных и количественных признаков у гороха: автореф. ... к.б.н. – М., 2004 – 25 с.

186. Чернов В.Е., Пендинен Г.И. Особенности микроразмножения *in vitro* межвидовых гибридов ячменя // Сб. науч. тр. по прикл. бот., ген и сел., 1992. – № 148. – С. 53-57.

187. Чернов В.Е., Пендинен Г.И. Сравнительная оценка каллусогенеза и регенерации у различных видов ячменя // Сельскохозяйственная биология, 2011. – № 1. – С. 44-53.
188. Чиркова Т.В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям // Соросовский образовательный журнал, 1997. – № 9. – С. 12.
189. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
190. Шаманин В.П., Трущенко А.Ю. Общая селекция и сортоведение полевых культур. – Омск: Изд-во ФГОУ ВПО ОмГАУ, 2006. – 400 с.
191. Шамшин И. Н. Оценка генетического разнообразия сортов и форм яблони с использованием ДНК-маркеров: автореф. ... к. б.н. – Мичуринск, 2014. – 26 с.
192. Шевякова Е. И. Метаболизм и физиологическая роль пролина в растениях при водном и солевом стрессе // Физиология растений, 1983. – Т. 30. – Вып. 4. – С. 768-781.
193. Шелепов В.В. Чебаков Н.П., Вергунов В.А., Кочмарский В.С. Пшеница: история, морфология, биология, селекция: монография. – Мироновка: ЗАТ Мироновская типография, 2009. – 575 с.
194. Шелепов В.В., Маласай В.М., Пензев А.Ф., Кочмарский В.С., Шелепов А.В. Морфология, биология, хозяйственная ценность пшеницы. – Киев: Изд-во Мироновского института пшеницы, 2004. – 524 с.
195. Шихмурадов А.З. Биоресурсный потенциал и эколого-генетические аспекты устойчивости представителей рода *Triticum* L. к солевому стрессу. дисс. ... д.б н. – Дербент, 2014. – 275 с.
196. Шихов А. Н. Космический мониторинг засух на территории уральского прикамья по многолетним рядам данных дистанционного зондирования земли // Географический вестник, 2013. – № 4 (27). – С. 100-107.

197. Шматько И.Г., Григорюк И.А., Шведова О.Е. Устойчивость растений к водному и температурному стрессам. – Киев: Наук. думка, 1989. – 221 с.

198. Шуйская Е.В., Ли Е.В., Рахманкулова З. и др. Морфофизиологические особенности адаптации различных генотипов на *loxylon arhyllum* (chenopodiaceae) по градиенту засоления // Экология, 2014. – № 3. – С. 189-196.

199. Щербенко Е.В. Мониторинг засухи по данным космических съемок // Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса, 2007. – Вып. 4. – Т. 2. – С. 395-407.

200. Щуплецова О.Н., Щенникова И.Н. Результаты использования клеточных технологий в создании новых сортов ячменя, устойчивых к токсичности алюминия и засухе // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2016. – № 20(5). – С. 623-628.

201. Щуплецова О.Н. Клеточная селекция ячменя на устойчивость к эдафическим стрессам // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. Звенигород, 8-12 сентября 2008 г.: тезисы докладов IX международной конференции. – М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. – С. 443.

202. Эргашев А. Влияние высоких экстремальных температур на физиолого-биохимические процессы и продуктивность хлопчатника. Обзорная информация. – Душанбе: НПИЦентр, 1997. – 44 с.

203. Юдина Р.С., Леонова И.Н., Салина Е.А., Хлесткина Е.К. Влияние чужеродных интрогрессий в геноме пшеницы на ее устойчивость к осмотическому стрессу // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2014. – Т.18. – № 4/1. – С. 643-649.

204. Abumhadi N., Kamenarova K., Todorovska E., Stoyanova M., Dimov G., Todorovska E., Trifonova A., Gecheff K., Atanassov A. Biotechnological approaches for cereal crops improvement. Part I: Development of *in vitro* culture and genetic transformation technologies in cereals. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2005. – N 19. – P. 72-90.

205. American Meteorological Society. Meteorological drought – Policy statement // Bull. Amer. Meteorol. Soc., 1997. – Vol. 78. – P. 847-849, <http://www.ametsoc.org/policy/drought2.html>

206. Anjum F.M. Khan M.R., Din A. et al. Wheat gluten: high molecular weight glutenin subunits – structure, genetics, and relation to dough elasticity // J. Food Sci., 2007. – Vol. 72. – P. 56-63.

207. Ashraf M., Foolad M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance // Environ. Exp. Bot., 2007. – N 59. – P. 206-216.

208. Baier A.C., Somers D.J., Gustafson J.P. Aluminium tolerance in wheat: correlating hydroponic evaluations with field and soil performances // Plant Breeding, 1995. – Vol. 114. – P. 291-296.

209. Bajji M., Kinet J., Lutts S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat // Plant Growth Regul., 2002. – N 36. – P. 61-70.

210. Baloch M.J., Dunwell J., Khakwani A.A., Dennet M., Jatoi W.A., Channa S.A. Assessment of wheat cultivars for drought tolerance via osmotic stress imposed at early seedling growth stages // J. Agric. Res., 2012. – Vol. 50. – P. 299-310.

211. Bapat S.A., Joshi C.P., Mascarenhas A.F. Occurrence and frequency of precocious germination of somatic embryos is a genotype-dependent phenomenon in wheat // Plant cell Reports, 1988. – N 7. – P. 538-541.

212. Bartels D., Sunkar R. Drought and Salt Tolerance in Plants // Critical Reviews in Plant Sciences, 2005. – N 24. – P. 23-56.

213. Basnayake J., Ludlow M.M., Cooper M., Henzell R.G. Genotypic variation of osmotic adjustment and desiccation tolerance in contrasting sorghum inbred lines // Field Crop Res., 1993. – N 35. – P. 51-62.

214. Bates L.S., Waldra R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil., 1973. – Vol. 39. – P. 205-208.

215. Bates L.S., Waldrin R.P., Ter J.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // *Plant and soil*, 1973. – Vol. 39. – N 1. – P. 205-208.
216. Be R.M., Kou M., Chen L.G., Mao S.R., Wang H.G. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum* // *Plant Breed*, 2007. – Vol. 126(1). – P. 9-12.
217. Benkirane H., Sabounji S., Chlyah A., Chlyah H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2000. – Vol. 61. – P. 107-113.
218. Bennett D., Reynolds M., Mullan D. et al. Detection of two major grain yield QTL in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) under heat, drought and high yield potential environments // *Theor. Appl. Genet.*, 2012. – Vol. 125. – P. 1473-1485.
219. Blanchet R., Gelfi N. Relations entre developpement foliaire, transpiration et production chez le soja (cv. Amsoy 71 et Hodgson) // *Annales Agronomiques*, 1978. – Vol. 29. – N 3. – P. 223-242.
220. Blum A. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress // *Field Crops Res.*, 2009. – Vol. 112. – P. 119-123.
221. Blum A., Sullivan C.Y. The comparative drought resistance of landraces of sorghum and millet from dry and humid regions // *Ann Bot. (London)*, 1986. – N 57. – P. 835-846.
222. Botstein D., White R.L., Scolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // *Am. J. Hum. Genet.*, 1980. – Vol. 32. – P. 314-331.
223. Bouiamrine E.H., Diouri M., Halimi R.E. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity from mature and immature durum wheat embryos // *International Journal of Biosciences (IJB)*, 2012. – Vol. 2. – N 9. – P. 29-39.
224. Brookes A.J. The essence of SNPs // *Gene*, 1999. – N 234. – P. 177-186.

225. Capell T., Bassie L., Christou P. Modulation of the polyamine biosynthesis pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004. – Vol. 10. – P. 9909-9914.

226. Ceriani M.F., Hopp H.E., Hahne G., Escandon A.S. Cotyledons: An explant for routine regeneration of sunflower plants // Plant Cell Physiol., 1992. – N 33. – P. 157-164.

227. Chauhan H., Desai S.A., Khurana P. Comparative analysis of the differential regeneration response of various genotypes of *Triticum aestivum*, *Triticum durum* and *Triticum dicoccum* // Plant Cell Tiss Org Cult., 2007. – Vol. 91. – P. 191-199.

228. Chevrier N., Quoreshi J.A., Hull P., Kartha K.K. Heritability of *in vitro* regeneration in wheat (*T. aestivum* L.) // Canadian Journal of Plant Science, 1990. – N 70. – P. 547-550.

229. Chlyah H., Hsaine M., Karim R., Chlyah A. Improvement of somatic embryogenesis in wheat by segmentation of cultured embryos. In: Bajaj Y.P.S., ed. Biotechnology in agriculture and forestry. Wheat. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 1990. – Vol. 13. – P. 1388-1397.

230. Close T.J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins // Physiol. Plant, 1996. – N 97. – P. 795-803.

231. Collaku A. Selection for yield and its components in a winter wheat population under different environmental conditions in Albania // Plant Breed, 1994. – Vol. 112. – N 1. – P. 40-46.

232. Collins N.C., Tardieu F., Tuberosa R. Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? // Plant Physiology, 2008. – Vol. 147. – P. 469-486.

233. Cooper S.K., Pandhare J., Donald S. P., Phang J.M. A novel function of hydroxyproline oxidase in apoptosis through generation of reactive oxygen species // J. Biol. Chem., 2008. – Vol. 283. – P. 485-492.

234. Cox T.S., Lookhart G.L., Walker D., Harrell E.L.G., Albers L.D., Rodgers M.D. Genetic relationships among hard red winter wheat cultivars as

evaluated by pedigree analysis and gliadin polyacrylamide-gel electrophoretic patterns // *Crop Sci.*, 1985. – N 25. – P. 1058-1063.

235. Cox W.J., Jolliff G.D. Growth and yield of sunflower and soybean under soil water deficits // *Agronomy Journal*, 1986. – Vol. 78. – N 2. – P. 226-230.

236. Cutler J.M., Shahan K.W., Steponkus P.L. Dynamics of osmotic adjustment in rice // *Crop Sci.*, 1980. – N 20. – P. 310-314.

237. David M. Pollen grain expression of intrinsic and osmolyte induced osmotic adjustment in a set of wheat cultivars // *Romanian agricultural research*, 2012. – N 29. – P. 45-52.

238. Davies W.J., Kudoyarova G.R., Hartung W. Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought // *J. Plant Growth Regulation*, 2005. – Vol. 24. – P. 285-295.

239. Des Marais D.L., Juenger T.E. Pleiotropy, plasticity, and the evolution of plant abiotic stress tolerance // *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2010. – N 1206. – P. 56-79.

240. Deuschle K., Funck D., Hellmann H., Däschner K., Binder S., Frommer W.B. A nuclear gene encoding mitochondrial Deltapyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity // *Plant J.*, 2001. – Vol. 27. – N 4. – P. 45-56.

241. Diaz De Leon J.L., Escoppinichi R., Geraldo N. et al. Quantitative trait loci associated with salinity tolerance in field grown bread wheat // *Euphytica*, 2011. – Vol. 181. – P. 371-383.

242. Dixon R.A., Palva N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism // *Plan Cell*, 1995. – N 7. – P. 1085-1097.

243. Ekanayake I.J., De Datta S.K., Steponkus P.L. Sensitivity of pollination to water deficit at anthesis to upland rice // *Crop Sci.*, 1990. – N 30. – P. 310-315.

244. Ellis R.J., Van der Veis S.M. Molecular chaperones // *Ann. Rev. Biochem.*, 1991. – N 60. – P. 321-347.

245. Erdei L., Trivedi S., Takeda K., Matsumota H. Effect of osmotic and salt stresses on the accumulation of polyamines in leaf segments from wheat varieties differing in salt and drought tolerance // *J. Plant Physiol.*, 1990. – Vol. 137. – P. 165-168.

246. Estrada-Campuzano G., Miralles D.J., Slafer G.A. Genotypic variability and response to water stress of pre- and post-anthesis phases in triticale // *Eur. J. Agron.*, 2008. – N 28. – P. 171-177.

247. Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S.M.A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management // *Agronomy for Sustainable Development*, 2009. – Vol. 29. – Iss. 1. – P. 185-212.

248. Flexas J., Bota J., Loreto F., Cornic G., Sharkey T. D. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants // *Plant Biology*, 2004. – Vol. 6. – N 3. – P. 269-279.

249. Folkert A.H., Elena A.G., Buitink J. Mechanisms of plant desiccation tolerance Trends // *Plant Sci.*, 2001. – N 6. – P. 431-438.

250. Frederick J.R, Camp C.R., Bauer P.J. Drought-stress effects on branch and main stem seed yield and yield components of determinate soybean // *Crop Sci.*, 2001. – N 41. – P. 759-763.

251. Fufa H., Baenziger P.S., Beecher I., Dweikat V., Graybosch R.A., Eskridge K.M. Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars // *Euphytica*, 2005. – Vol. 145. – P. 133-146.

252. Galande A.A., Tiwari R., Ammiraju J.S.S., Santra D.K., Lagu M.D., Rao V.S., Gupta V.S., Misra B.K., Nagarajan S., Ranjekar P.K. Genetic analysis of kernel hardness in bread wheat using PCR-based markers // *Theor. Appl. Genet.*, 2001. – Vol. 103. – P. 601-606.

253. Garcia A.A.F., Banchimol L.L., Barbosa A.M.M. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP, and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines // *Genetics Mol. Biol.*, 2004. – Vol. 27. – P. 579-588.
254. Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D.M., Thorpe T.A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 1996. – N 32. – P. 272-289.
255. Gill A.K., Gosal S.S., Sah S.K. Differential cultural responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) with different explants // *Journal of Cell and Tissue Research*, 2014. – Vol. 14(2). – P. 4351- 4356.
256. Guillioni L., Wery J., Tardieu F. Heat stress-induced abortion of buds and flowers in pea: is sensitivity linked to organ age or to relations between reproductive organs? // *Ann. Bot.*, 1997. – N 80. – P. 159-168.
257. Haley S.D., Quick J.S., Morgan J.A. Excised-leaf water stress evolution and association in field-grown winter wheat // *Can. J. Plant Sci.*, 1993. – Vol. 73. – N 1. – P. 55-63.
258. Hall A.E. Breeding for heat tolerance // *Plant Breed*, 1992. – Rev. 10. – P. 129-168.
259. Hall J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // *Journal of Experimental Botany*, 2002. – Vol. 53. – N 366. – P. 1-11.
260. Hare P.D., Cress W.A., Staden J.V. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress // *Plant Cell Environ*, 1998. – N 21. – P. 535-553.
261. Hellmann H., Funk D., Rentsch D., Frommer W.B. Hypersensitivity of an *Arabidopsis* sugar signaling mutant toward exogenous proline application // *Plant Physiol.*, 2000. – Vol. 122. – P. 357-367.
262. Hess J.R., Carman J.G. Embryogenic competence of immature wheat embryos: genotype, donor plant environment, and endogenous hormone levels // *Crop Science*, 1998. – N 38. – P. 249-253.
263. Heubl G. New aspects of DNA-based authentication of Chinese medicinal plants by molecular biological techniques // *Planta Medica*, 2010. – N 76(17). – P. 1963-1974.

264. Hicks M., Adams D., O'Keefe S., Macdonald E., Hodgetts R. The development of RAPD and microsatellite markers in lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*) // *Genome*, 1998. – Vol. 41. – P. 797-805.
265. Hong-jun Liu, Shuij Misoo, Osamu Kamijima. Effect of genotype of the response in immature embryos culture of Japanese and Chinese wheat // *Sci. Rept. Fac. Age. Kobe. Univ.*, 1989. – Vol. 18. – P. 165-172.
266. Hsiao T.C., O'Toole J.C., Yambao E.B., Turner N.C. Influence of osmotic adjustment on leaf rolling and tissue death in rice (*Oryza sativa* L.) // *Plant Physiol.*, 1984. – N 75. – P. 338-341.
267. Hu C.Y., Tsai Y.Z., Lin S.F. Development of STS and CAPS markers for variety identification and genetic diversity analysis of tea germplasm in Taiwan // *Botanical Studies*, 2014. – N 55(1). – P. 12. DOI: 10.1186/1999-3110-55-12
268. Huang A.H.C., Cavalieri A. J. Proline oxidase and water stress-induced proline accumulation in spinach leaves // *Plant. Physiol.*, 1979. – Vol. 63. – P. 531-535.
269. Hussain M., Malik M.A., Farooq M., Ashraf M.Y., Cheema M.A. Improving Drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower // *J. Agron. Crop Sci.*, 2008. – N 194. – P. 193-199.
270. Irzikowska L., Wolko B., Świącicki W.K. Interval Mapping of QTLs Controlling Some Morphological Traits In Pea // *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2002. – Vol. 7. – N 2A. – P. 417-422.
271. Ismail A.M., Hall A.E. Reproductive-stage heat tolerance, leaf membrane thermostability and plant morphology in cowpea // *Crop Sci.*, 1999. – N 39. – P. 1762-1768.
272. Jeks V.A., Hasegawa P.M. *Plant abiotic stress*. – Springer: Blackwell Publ., 2005. – 350 p.
273. Jia H., Yi D., Yu J. et al. Mapping QTLs for tissue culture response of mature wheat embryos // *Mol. Cells*, 2007. – Vol. 23(3). – P. 323-330.

274. Jones C.J., Edwards K.J., Castaglione S. et al. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories // *Mol. Breed.*, 1997. – Vol. 3. – P. 381-390.

275. Kalamaki M.S., Merkouropoulos G., Kanellis A.K. Can ornithine accumulation modulate abiotic stress tolerance in Arabidopsis? // *Plant Signal Behav.*, 2009. – Vol. 4. – N 11. – P. 1099-1101.

276. Karim M.A., Fracheboud Y., Stamp P. Heat tolerance of maize with reference of some physiological characteristics // *Ann. Bangladesh Agri.*, 1997. – N 7. – P. 27-33.

277. Kaul S., Sharma S. S., Mehta I. K. Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assay // *Amino Acids*, 2008. – Vol. 34. – P. 315-320.

278. Kavi Kishor P.B., Sangam S., Amrutha R. N., Laxmi P. S., Naidu K. R., Rao K. R. S. S., Rao S., Reddy K.J., Theriappan P., Sreenivasulu N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance // *Curr. Sci.*, 2005. – Vol. 88. – P. 424-438.

279. Kaya M.D., Okçub G., Ataka M., Çıkılıc Y., Kolsarıcıa Ö. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Eur. J. Agron.*, 2006. – N 24. – P. 291-295.

280. Khlebova L. P., Nikitina E. D. Morphogenetic responses of wheat immature embryo culture depending on growing conditions of donor plants // *Acta Biologica Sibirica*, 2016. – N 2 (2). – P. 68- 75.

281. Komatsuda T., Enomoto S., Nekajima K. Genetics of callus proliferation and shoot differentiation in barley // *J. Hered.*, 1989. – Vol. 80. – P. 345-350.

282. Konieczny A., Ausubel F.M. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers // *Plant J.*, 1993. – N 4. – P. 403-410.

283. Konov A., Bronner R., Skryabin K., Hahne G. Formation of epiphyllous buds in sunflower (*Helianthus annuus* L.): induction in vitro and cellular origin // Plant Science, 1998. – N 135. – P. 77-86.

284. Kuzevanov V.Ya., Nefed'ev L.V., Sumtsova V.M., Lankevich S.V., Salyaev R.K. Growth rhythmicity and chemical differentiation of cells in wheat seedlings and calluses // Abstract of VIIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam, June 24–29, 1990. – Amsterdam, 1990. – P. 300.

285. Kuzevanov V.Ya., Sumtsova V.M., Sizych S.V., Lankevich S.V., Brook T.A., Salyaev R.K. Morphogenesis and growth rhythmicity in wheat callus // Golden Jubilee Symposium on Genetic Research and Education (Current Trends and the Next Fifty Years). New Delhi, February 12–15, 1991. – New Delhi, 1991. – Vol. 3. – P. 856-857.

286. Kuznetsov V.I., Shevyakova N.I. Polyamines and stress tolerance of plants // Plant Stress. Global Sci. Books, 2007. – Vol. 1. – N 1. – P. 50-71.

287. Landi P., Sanguineti M.C., Liu C. et al. Root-ABA1 QTL affects root lodging, grain yield, and other agronomic traits in maize grown under well-watered and water-stressed conditions // J. Exp. Bot., 2007. – Vol. 58. – P. 319-326.

288. Langer R.H.M., Prasad P. C., Laude H. M. Effects of kinetin on tiller bud elongation in wheat // Ann. Bot., 1973. – Vol. 37. – N 151. – P. 563-571.

289. Lawlor W., Cornic G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants // Plant Cell Environ, 2002. – N 25. – P. 275-294.

290. Lee E.A., Tollenaar M. Physiological basis of successful breeding strategies for maize grain yield // Crop Sci., 2007. – Vol. 47. – N 3. – P. 202-215.

291. Linh L.H., Linh T.H., Xuan T.D. et al. Molecular Breeding to Improve Salt Tolerance of Rice (*Oryza sativa* L.) in the Red River Delta of Vietnam // International Journal of Plant Genomics, 2012. – Vol. 2012. – Article ID 949038. – 9 p. DOI <http://dx.doi.org/10.1155/2012/949038>

292. Lu K.T., Lee H.C., Liu F.S., Lo C.F., Lin J.H. Identification of Ginseng Radix in Chinese medicine preparations by nested PCR-DNA sequencing

method and nested PCR-restriction fragment length polymorphism // J. Food Drug Analysis, 2010. – N 18(1). – P. 58-63.

293. Lupotto E. Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos // Annals of Botany, 1984. – N 54. – P. 523-529.

294. Lutts S., Guerrier G. Peroxidase activities of two rice cultivars differing in salinity tolerance as affected by proline and NaCl // Biologia Plantarum, 1995. – Vol. 37. – N 4. – P. 577-586.

295. Ma J., Deng M., Si-Yu Lv, Yang Q., *et al.* Identification of QTLs associated with tissue culture response of mature wheat embryos // Springer Plus, 2016. – Vol. 5. – P. 1552. DOI 10.1186/s40064-016-3241-y

296. Machado S., Paulsen G.M. Combined effects of drought and high temperature on water relations of wheat and sorghum // Plant Soil, 2001. – 233 p.

297. Maddock S.E., Risiott R., Parmar S. Somaclonal variation in the gliadin patterns of grains of regenerated wheat plants // J. Exp. Bot., 1985. – Vol. 36. – N 173. – P. 1976-1984.

298. Marcum K.B. Cell membrane thermostability and whole plant heat tolerance of Kentucky bluegrass // Crop Sci., 1998. – N 38. – P. 1214-1218.

299. Matysik J., Alia B., Bhalu B., Mohanty P. Molecular mechanism of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plant // Curr.Sci., 2002. – Vol. 82. – P. 525-532.

300. Mazorra L.M., Nunez M., Echerarria E., Coll F., S´anchez-Blanco M.J. Influence of brassinosteroids and antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures // Plant Biol., 2002. – N 45. – P. 593-596.

301. Milborrow B. The chemistry and physiology of abscisic acid // Annu. Rev. Plant Physiol., 1974. – N 25. – P. 259-307.

302. Mitić N., Dodig D., Nikolić R. Variability of *in vitro* culture response in wheat genotypes, genotype and environmental effects // Genetika, 2006. – N 38(3). – P. 183-192.

303. Mondini L., Noorani A., Pagnotta M.A. Assessing plant genetic diversity by molecular tools // Diversity, 2009. – N 1. – P. 19-35.

304. Money N.P. Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols // *Plant Physiol.*, 1989. – Vol. 91. – P. 766-769.
305. Morgan J.M. Differences in osmoregulation between wheat cultivars // *Nature*, 1977. – N 270. – P. 234-235.
306. Morgan J.M. Pollen grain expression of a gene controlling differences in osmoregulation in wheat leaves: a simple breeding method // *Aust. J. Agric. Res.*, 1999. – N 50. – P. 953-962.
307. Morgan J.M., Hare R.A., Fletcher R.A. Genetic variation in osmoregulation in bred and durum wheats and its relationship to grain yield in a range of field environments // *Aust. J. Agric. Res.*, 1986. – N 37. – P. 449-457.
308. Morgan J.M., Rodrigues-Maribona B., Knights E.J. Adaptation to water deficit in chickpea breeding lines by osmoregulation, relationship to grain yields in the fields // *Field Crops Res.*, 1991. – N 27. – P. 61-70.
309. Morimoto P.I., Kline M.P., Bimston D.N., Cotto J.J. The heat shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones // *Essay Biochem*, 1997. – N 32. – P. 17-29.
310. Moud A.A.M., Yamagishi T. Application of project pollen area response to drought stress to determine osmoregulation capability of different wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars // *International Journal of Agriculture and Biology*, 2005. – Vol. 7(4). – P. 604-605.
311. Moud A.M., Maghsoudi K. Salt stress effects on respiration and growth of germinated seeds of different wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars // *World J. Agric. Sci.*, 2008. – N 4 (3). – P. 351-358.
312. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plant.*, 1962. – Vol. 15. – N 95. – P. 473- 497.
313. Mzouri K., Amssa M. Amélioration de l'embryogenèse somatique à partir d'embryons immatures chez le Blé tendre (*Triticum aestivum* L.). I - Effet du stade de développement des embryons // *Acta Botanica Gallica*, 2002. – N 149(2). – P. 179-188.

314. Mzouri K., Amssa M., Bouiamrine E.H. Somatic embryogenesis from immature embryos of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.): genotype effect // *Acta Botanica Gallica*, 2001. – N 148(3). – P. 215-225.
315. Nakamura C., Keller W., Fedak G. In vitro propagation and chromosome doubling of *Triticum crassum* x *Hordeum vulgare* hybrid // *Theor. Appl. Genet.*, 1984. – N 60. – P. 80-96.
316. Nonami H. Plant water relations and control of cell elongation at low water potentials // *J. Plant Res.*, 1998. – N 111. – P. 373-382.
317. Nonami H., Boyer J. S. Primary events regulating stem growth at low water potentials // *Plant Physiol.*, 1990. – N 94. – P. 1601-1609.
318. O'Toole J.C., Moya T.B. Water deficit and yield in upland rice // *Field Crop Res.*, 1981. – N 4. – P. 247-259.
319. O'Toole J.C., Namuco O.S. Role of panicle exertion in water stress induced sterility // *Crop Sci.*, 1983. – N 23. – P. 1093-1097.
320. Osorio J., Osorio M. L., Chaves M. M., Pereira J. S. Water deficits are more important in delaying growth than in changing patterns of carbon allocation in *Eucalyptus globulus* // *Tree Physiol.*, 1998. – N 18. – P. 363-373.
321. Ozias-Akins P., Vasil I.K. Plant Regeneration from Cultured Immature Embryos and Inflorescences of *Triticum aestivum* (Wheat): Evidence for Somatic Embryogenesis // *Protoplasma*, 1982. – Vol. 110. – N 2. – P. 39.
322. Paniego N. Echaide M., Munoz M., Fernandez L., Torales S., Faccio P., Fuxan I., Carrera M., Zandomeni R., Suarez E.Y., Hopp H.E. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Genome*, 2002. – Vol. 45. – N 1. – P. 34-43.
323. Passioura J.B. Phenotyping for drought tolerance in grain crops: when is it useful to breeders? // *Functional Plant Biol.*, 2012. – Vol. 39. – P. 851-859.
324. Patil B.S., Ravikumar R.L. Osmotic adjustment in pollen grains: a measure of drought adaptation in sorghum // *Current Science*, 2011. – N 100 (3). – P. 377-382.

325. Peet M.M., Willits D.H. The effect of night temperature on greenhouse grown tomato yields in warm climate // Agric. Forest Meteorol., 1998. – N 92. – P. 191-202.

326. Pellegrineschi A., Brito R.M., McLean S., Hoisington D. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and NaCl on the establishment of callus and plant regeneration in durum and bread wheat // Plant Cell, Tissue, Organ Culture, 2004. – N 77(3). – P. 245-250.

327. Premachandra G.S., Saneoka H., Kanaya M., Ogata S. Cell membrane stability and leaf surface wax content as affected by increasing water deficits in maize // J. Exp. Bot., 1991. – N 42. – P. 167-171.

328. Price A.H., Cairas J.E., Horton P., Jones H., Griffiths H. Linking drought resistance mechanisms to avoidance in upland rice using QTL approach: progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll resistance responses // J. Exp. Bot., 2002. – N 53. – P. 989-1004.

329. Qian Y.L., Fry J.D. Water relations and drought tolerance of four turf grasses // J. Am. Soc. Hort. Sci., 1997. – N 122. – P. 129-133.

330. Quan R., Shang M., Zhang H., Zhao Y., Zhang J. Engineering of enhanced glycine betaine synthesis improves drought tolerance in maize // Plant Biotech. J., 2004. – N 2. – P. 477-486.

331. Quarrie S.A. Implications of genetic differences in ABA accumulation for crop production // Abscisic acid: physiology and biochemistry. – Oxford: Bios Scientific Publ., 1991. – P. 227-243.

332. Quarrie S.A., Stojanovic J., Pekic S. Improving drought resistance in small-grained cereals: a case study, progress and prospects // J. Plant Growth Regul., 1999. – Vol. 29. – P. 1-21.

333. Qureshi J.A., Kartha K.K., Abrams S.R., Steinhauer L. Modulation of somatic embryogenesis in early and late-stage embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) under the influence of (plus or minus) abscisic acid and its analogs // Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1989. – N 18. – P. 55-69.

334. Ragot M., Hoisington D.A. Molecular markers for plant breeding: comparisons of RFLP and RAPD genotyping costs // *Theor. Appl. Genet.*, 1993. – Vol. 86. – P. 985-994.
335. 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.
336. Reynolds M., Dreccer F., Trethowan R. Drought adaptive traits derived from wheat wild relatives and landraces // *J. Exp. Bot.*, 2007. – Vol. 58. – P. 177-186.
337. Reynolds M.P., Pask A.J.D., Mullan D.M. *Physiological Breeding I. Interdisciplinary Approaches to Improve Crop Adaptation.* – Mexico, D.F.: CIMMYT, 2012. – 188 p.
338. Richards R.A., Rebetzke G.J., Watt M. Breeding for improved water productivity in temperate cereals: phenotyping, quantitative trait loci, markers and the selection environment // *Funct. Plant Biol.*, 2010. – Vol. 37. – P. 85-97.
339. Rodriguez-Maribona B., Tenorio J.L., Ayerve L. Correlation between yield and osmotic adjustment of peas (*Pisum sativum* L.) under drought stress // *Field Crop Res.*, 1992. – N 29. – P. 15-22.
340. Sairam R.K., Tyagi A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants // *Curr. Sci.*, 2004. – N 86. – P. 407-421.
341. Sakamoto A., Murata N., The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants // *Plant Cell Environ.*, 2002. – N 25. – P. 163-171.
342. Salem K.F.M, El-Zanaty A.M. Esmail R.M. Assessing Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genetic Diversity Using Morphological Characters and Microsatellite Markers // *World Journal of Agricultural Sciences*, 2008. – N 4 (5). – P. 538-544.
343. Samarah N.H. Effects of drought stress on growth and yield of barley // *Agron. Sustain. Dev.*, 2005. – N 25. – P. 145-149.

344. Sandquist D.R., Ehleringer J.R. Population- and family-level variation of brittlebush (*Encelia farinosa*, Asteraceae) pubescence: its relation to drought and implications for selection in variable environments // *American Journal of Botany*, 2003. – Vol. 90. – P. 1481-1486.

345. Santamaria J.M., Ludlow M.M., Fukai S. Contribution of osmotic adjustment to grain yield in *Sorghum bicolor* (L.) under water-limited conditions // *Aust. J. Agric. Res.*, 1990. – N 41. – P. 51-65.

346. Schneider G.W., Childers N.F. Influence of soil moisture on photosynthesis, respiration and transpiration of apple leaves // *Plant Physiol.*, 1941. – Vol. 16. – N 6. – P. 565-583.

347. Semagn K., Bjørnstad Å., Ndjioudjop M.N. An overview of molecular marker methods for plants // *African Journal of Biotechnology*, 2006. – Vol. 5 (25). – P. 2540-2568.

348. Sharma V.K., Rao A., Varshney A., Kothari S.L. Comparison of developmental stages of inflorescence for high frequency plant regeneration in *Triticum aestivum* L. and *T. durum* Desf. // *Plant Cell Rep.*, 1995. – N 15. – P. 227-231.

349. Sharp R. E., Hsiao T. C., Silk W. K. Growth of the maize primary root at low water potentials. II. Role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment // *Plant Physiol.*, 1990. – N 93. – P. 1337-1346.

350. Sharp R.E., Hsiao T.C., Silk W.K. Growth of the maize primary root at low water potentials. I. Spatial distribution of expansive growth // *Plant Physiol.*, 1988. – N 87. – P. 50-57.

351. Shen B., Jensen R.C., Bohnert H.J. Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals // *Plant Physiology*, 1997. – Vol. 115. – P. 527-532.

352. Shen B., Jensen R.G., Bohnert H.J. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts // *Plant Physiol.*, 1997. – Vol. 113. – N 4. – P. 1177-1183.

353. Shrawat A.K., Becker D., Lorz H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Plant Sci.*, 2006. – N 172. – P. 281-290.
354. Simoes-Araujo J.L., Rumjanek N.G., Margis-Pinheiro M. Small heat shock proteins genes are differentially expressed in distinct varieties of common bean // *Braz. J. Plant Physiol.*, 2003. – N 15. – P. 33-41.
355. Sinclair T.R. Challenges in breeding for yield increase for drought // *Trends in Plant Sci.*, 2011. – Vol. 16. – P. 289-293.
356. Sing C.F., Brewer G.J. Isozymes of a polyploidy series of wheat // *Genetics*, 1969. – Vol. 61. – P. 391-398.
357. Slocum R.D., Kaur-Sawhney R., Galston A.W. The physiology and biochemistry of polyamines in plants // *Arch Biochem Biophys.*, 1984. – Vol. 235. – P. 283-303.
358. Southern E.M. Detection of specific sequences of DNA fragments separated by gel electrophoresis // *J. Mol. Bio.*, 1975. – N 98. – C. 503-517.
359. Stoop J. M. H., Williamson J. D., Pharr D.M. Mannitol metabolism in plants: method for coping with stress // *Trends Plant Sci.*, 1996. – Vol. 1. – № 5. – P. 134-144.
360. Szabados L., Savaure A. Proline: a multifunctional amino acid // *Trends Plant Sci.*, 2010. – Vol. 15. – N 2. – P. 89-97.
361. Tabori K.M., Dobranszki J., Iszaly-Toth J., Hudak I. Effect of osmotic stress on *in vitro* shoot culture of peas (*Pisum sativum*) // *Acta. Hort. (ISHS)*, 2009. – N 812. – P. 231-236.
362. Taiz L., Zeiger, E. *Plant Physiology*. – Sunderland, Massachusetts, 2006. – 243 p.
363. Tangpremsri T., Fukai S., Fischer K.S. Growth and yield of sorghum lines extracted from a population for differences in osmotic adjustment // *Aust. J. Agric. Res.*, 1995. – N 46. – P. 61-74.

364. Tanksley S.D., Young N.D., Paterson A.H., Bonierbale M.W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science // *Nature Biotechnol.*, 1989. – Vol. 7. – P. 257-264.

365. TeKrony D.M., Egly D.B. Relationship of seed vigor to crop yield: a review // *Crop Sci.*, 1991. – Vol. 31. – N 3. – P. 816-822.

366. Tezara W., Mitchel V.J., Driscoli S.D., Lawlor D.W. Water deficit inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP // *Nature*, 1999. – N 401. – P. 914-917.

367. Tsukaguchi T., Kawamitsu Y., Takeda H., Suzuki K., Egawa Y. Water status of flower buds and leaves as affected by high temperature in heat tolerant and heat-sensitive cultivars of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) // *Plant Prod. Sci.*, 2003. – N 6. – P. 4-27.

368. Turner N.C., Toole J.C.O., Cruz R.T. et al. Responses of seven diverse rice cultivars to water deficit. II. Osmotic adjustment, leaf elasticity, leaf extension, leaf death, stomatal conductance and photosynthesis // *Field Crop Res.*, 1986. – N 13. – P. 273-286.

369. Varshney A., Mohapatra T., Sharma R.P. Development and validation of CAPS and AFLP markers for white rust resistance gene in *Brassica juncea* // *Theor Appl Genet*, 2004. – N 109. – P. 153-159.

370. Vasil I.K. Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant Cell Rep.*, 2007. – N 26. – P. 1133-1154.

371. Verbruggen N., Hermans C. Proline accumulation in plants: a review // *Amino Acids*, 2008. – Vol. 35. – P. 753-759.

372. Vidal A., Pognones J.C. Effet de l'alimentation en eau sur quelques caracteres morphologiques et anatomiques des feuilles de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) // *Agronomie*, 1984. – Vol. 4. – N 10. – P. 967-975.

373. Vitanova Z., Vitanov V., Trifonova A., Savova D., Atanassov A. Effect of 2,4-D precultivation on regeneration capacity of cultivated barley // *Plant Cell Rep.*, 1995. – N 14. – P. 437-441.

374. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // *Nucleic Acids Res.*, 1995. – N 23. – P. 4407-4414.

375. Wada M. Über Citrullin, eine neue Aminosäure im Preßsaft der Wassermelone, *Citrus vulgaris* Schrad // *Biochem. Zeit*, 1930. – Bd. 224. – S. 420-429.

376. Wahid A., Close T.J., Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves // *Biol. Plant.*, 2007. – N 51. – P. 104-109.

377. Wang C., Wei Z. Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum* L.) leafbase // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004. – Vol. 77. – N 2. – P. 149-153.

378. Wardlaw I.F., Willenbrink J. Mobilization of fructan reserves and changes in enzyme activities in wheat stems correlate with water stress during kernel filling // *New Phytol.*, 2000. – N 148. – P. 413-422.

379. Weng Yue-Jin, Chen Dao-Ming. Молекулярные маркеры и их клон гена солевыносливости пшеницы // *Yichuan xuebao. Acta genet*, 2002. – Sin. 29. – N 4. – P. 343-349.

380. Westgate M. E., Boyer J. S. Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize // *Planta*, 1985. – N 164. – P. 540-549.

381. Wigel R., Hughes K. Longterm regeneration by somatic embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare*) // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 1985. – N 5. – P. 151-162.

382. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucleic Acids Res.*, 1990. – N 18. – P. 6531-6535.

383. Wollenweber B., Porter J.R., Schellberg J. Lack of interaction between extreme high temperature events at vegetative and reproductive growth stages in wheat // *J. Agron. Crop Sci.*, 2003. – N 189. – P. 142-150.

384. Xiong L., Wang R.G., Mao G., Koczan J. Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root responses to drought stress and abscisic acid // *Plant Physiol.*, 2006. – N 142. – P. 1065-1074.

385. Yin G.X., Wang Y.L., She M.Y., Du L.P., Xu H.J., Xg Y. Establishment of a highly efficient regeneration system for the mature embryo culture of wheat // *Agric Sci China*, 2011. – N 10(1). – P. 9-17.

386. Zale J.M., Borchardt-Wier H., Kidwell K.K., Steber C.M. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes // *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 2004. – Vol. 76. – P. 277-281.

387. Zapata J.M., Sabater B., Martin M. Callus induction and in vitro regeneration from barley mature embryos // *Biol. Plant*, 2004. – N 48(3). – P. 473-476.

388. Zhang J.H., Huang W.D., Liu Y.P., Pan Q. H. Effects of temperature acclimation pretreatment on the ultrastructure of mesophyll cells in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Jingxiu) under cross-temperature stresses // *J. Integr. Plant Biol.*, 2005. – N 47. – P. 959-970.

389. Zhang S., Zhang H., Sticklen H. B. Production of multiple shoots from shoot apical meristems of oat (*Avena sativa* L.) // *J. Plant Physiol.*, 1996. – 148. – N 6. – P. 667-671.

390. <http://gossort.com/> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственная комиссия Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений» (ФГБУ «Госсорткомиссия»)

ПРИЛОЖЕНИЯ

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научному и инновационному развитию
ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»

Е.С. Попов

2018 г.



АКТ

О внедрении результатов диссертационной работы Бычковой О.В.
**«СОЗДАНИЕ СТРЕССОУСТОЙЧИВОГО МАТЕРИАЛА ТВЕРДОЙ
ПШЕНИЦЫ МЕТОДОМ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ»**

Я, директор Алтайского центра прикладной биотехнологии кандидат биологических наук Хлебова Л.П., составила настоящий акт о том, что созданные в результате выполнения диссертационной работы соискателя Бычковой О.В. линии R₃-С-14-2, R₃-С-67-2, R₃-П-11-2 и R₃-П-67-6 переданы для формирования коллекции исходного и селекционного материала яровой твердой пшеницы.

Директор АЦПБ

Handwritten signature of L.P. Khlebova in blue ink.

к. б. н. Хлебова Л.П.

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор по учебной работе
ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»



Е.Е. Шваков

2018 г.

АКТ

О внедрении результатов диссертационной работы Бычковой О.В.

**«СОЗДАНИЕ СТРЕССОУСТОЙЧИВОГО МАТЕРИАЛА ТВЕРДОЙ
ПШЕНИЦЫ МЕТОДОМ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ»**

Мы, нижеподписавшиеся, заведующий кафедрой экологии, биохимии и биотехнологии, доктор биологических наук, профессор Соколова Г.Г. и декан биологического факультета, доктор биологических наук, профессор Силантьева М.М. составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы соискателя Бычковой О.В. используются при чтении лекционных курсов и проведении лабораторно-практических занятий по дисциплинам «Биотехнология», «Биотехнология растений», «Большой практикум» (профиль – биотехнология) по направлению подготовки 06.03.01 – Биология.

Зав. кафедрой экологии, биохимии
и биотехнологии

д. б. н., проф. Соколова Г.Г.

Декан БФ

д. б. н., проф. Силантьева М.М.



Питомник лаборатории селекции яровой твердой пшеницы АНИИСХ Федерального Алтайского научного центра агробιοтехнологий (г. Барнаул)

Гидротермический режим вегетационного периода 2014-2106 гг.

Месяц, декада	2014 г.		2015 г.		2016 г.		Многолетнее		
	Среднесуточная температура, °С	Осадки, мм	Среднесуточная температура, °С	Осадки, мм	Среднесуточная температура, °С	Осадки, мм	Среднесуточная температура, °С	Осадки, мм	
Май	I	13,4	2,8	12,4	1,1	8,4	14,0	10,1	15,0
	II	9,3	9,9	15,6	14,1	9,7	11,6	12,0	13,0
	III	10,3	36,6	12,3	36,6	16,2	5,5	13,9	14,0
	Среднее	11,0	49,3	13,4	51,8	11,4	31,1	12,1	42,0
Июнь	I	10,6	22,2	18,8	13,3	17,7	0,1	15,9	15,0
	II	20,1	0,0	19,3	15,7	20,3	37,3	18,0	13,0
	III	23,4	0,1	20,6	0,0	18,7	19,4	19,2	19,0
	Среднее	18,0	22,4	19,6	29,0	18,89	56,8	17,7	47,0
Июль	I	20,8	29,4	18,4	26,8	20,4	37,5	19,8	15,0
	II	20,9	17,0	21,6	0,9	21,5	42,6	20,3	18,0
	III	18,8	61,2	20,7	35,9	20,4	32,9	19,5	31,0
	Среднее	20,1	107,6	20,3	63,6	20,8	113,0	19,9	64,0

Частота каллусогенеза образцов яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro* зрелых и незрелых зародышей, %

Сорт/линия	Зрелые зародыши	Незрелые зародыши
Оазис	90,8±4,1	97,7±1,8
Г-752	80,7±5,0	90,9±2,1
Памяти Янченко	93,5±4,3	96,6±1,8
1480-Д4	82,0±7,0	92,3±3,3
12S1-14	89,7±2,2	93,3±3,3
12S2-24	83,6±7,4	94,0±3,2
Среднее	86,7	94,1
НСР _{0,05}	17,7	6,7

Примечание: *– достоверное различие признака при использовании разных типов эксплантов на 5%-ым уровне значимости

Частота морфогенеза образцов яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro* зрелых и незрелых зародышей, %

Генотип/линия	Зрелые зародыши	Незрелые зародыши
Оазис	52,2±2,4*	95,2±2,4
Г-752	54,3±4,0*	93,2±3,8
Памяти Янченко	53,1±4,3*	97,6±2,4
1480-Д4	45,7±4,2*	83,1±1,8
12S1-14	41,0±7,6*	91,4±5,4
12S2-24	40,0±4,7*	88,7±2,0
Среднее	47,7	91,5
НСР _{0,05}	12,8	10,3

Примечание: *– достоверное различие признака при использовании разных типов эксплантов на 5%-ым уровне значимости

Частота прямого прорастания образцов яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro* зрелых и незрелых зародышей, %

Генотип/линия	Зрелые зародыши	Незрелые зародыши
Оазис	68,3±4,3*	23,5±4,2
Г-752	73,3±2,0*	18,4±3,8
Памяти Янченко	80,4±7,6*	49,4±4,0
1480-Д4	65,4±4,7*	29,6±1,8
12S1-14	82,7±2,4*	49,5±2,4
12S2-24	74,1±5,4*	37,6±2,4
Среднее	74,0	34,7
НСР _{0,05}	16,3	8,8

Примечание: *– достоверное различие признака при использовании разных типов эксплантов на 5%-ым уровне значимости

Приложение 8

Частота каллусогенеза в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от нахождения на иницирующей среде, %

Сорт/линия	Период культивирования, сутки						
	5	10	15	20	25	30	Контроль
Памяти Янченко	41,0±1,3	72,0±5,8	72,5±1,7	76,0±4,1	89,7±1,2	91,4±1,3	87,6±2,9
Оазис	45,0±1,1	61,4±1,7	67,4±3,0	60,0±4,3	71,1±1,3	91,3±0,8	87,4±3,0
12S2-24	46,4±2,1	54,4±1,3	62,8±1,4	79,0±0,7	77,7±1,8	94,2±2,9	88,8±2,1
НСР _{0,05}	6,5	13,1	8	11	3,7	4,3	12,7

Приложение 9

Результаты дисперсионного анализа влияния факторов на частоту каллусогенеза в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от нахождения на иницирующей среде

Дисперсия	Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F _{факт.}	F _{0,5}
Общая	17108,61	62	-	-	-
Генотип (А)	469,74	2	234,87	12,02	3,22
Период культивирования (В)	14447,82	6	2407,97	123,26	2,32
Взаимодействие «генотип × период культивирования» (А×В)	1370,56	12	114,21	5,85	1,99
Случайная	820,49	42	19,54	-	-

Приложение 10

Частота морфогенеза в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости нахождения на иницирующей среде, %

Сорт/линия	Период культивирования, сутки						
	5	10	15	20	25	30	Контроль
Памяти Янченко	50,0±5,8	40,1±1,6	53,4±1,7	66,0±2,2	90,9±1,1	93,3±3,3	96,1±3,9
Оазис	44,9±2,3	40,9±1,5	54,1±2,5	77,0±1,6	88,1±2,2	84,5±2,6	81,1±1,1
12S2-24	55,6±5,6	57,1±3,7	69,4±4,3	69,0±4,7	68,9±4,9	81,7±0,9	81,1±4,7
НСР _{0,05}	21,4	8,9	14,5	14	15,1	11,8	16,9

Приложение 11

Результаты дисперсионного анализа влияния факторов на морфогенез в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости нахождения на иницирующей среде

Дисперсия	Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F _{факт.}	F _{0,5}
Общая	20281,97	62	-	-	-
Генотип (А)	81,56	2	40,78	1,21	3,22
Период культивирования (В)	15940,4	6	2656,73	79,01	2,32
Взаимодействие «генотип × период культивирования» (А×В)	2847,75	12	237,31	7,06	1,99
Случайная	1412,27	42	33,63	-	-

Приложение 12

Частота ризогенеза в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости нахождения на иницирующей среде (относительно морфогенных каллусов), %

Сорт/линия	Период культивирования, суток						Контроль
	5	10	15	20	25	30	
Памяти Янченко	100±0	84,9±4,2	76,7±5,1	76±2,6	73,9±2	75±2,8	74,7±1,8
Оазис	89,7±5,2	80,1±4,4	75,5±2,5	64±1,4	70,9±4,1	74,7±6,1	80,2±3,1
12S2-24	91,7±8,3	73,9±3,8	63,7±4,1	71±0,5	69,4±1,3	66,4±2,1	68,1±3,7
НСР _{0,05}	20,2	19	13,8	8,1	11,8	9,1	13,5

Приложение 13

Результаты дисперсионного анализа влияния факторов на частоту ризогенеза в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости нахождения на иницирующей среде

Дисперсия	Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F _{факт.}	F _{0,5}
Общая	6912,81	62	-	-	-
Генотип (А)	725,96	2	362,98	8,26	3,22
Период культивирования (В)	3760,47	6	626,74	14,26	2,32
Взаимодействие «генотип × период культивирования» (А×В)	580,65	12	48,39	1,10	1,99
Случайная	1845,73	42	43,95	-	-

Приложение 14

Частота регенерации в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости нахождения на иницирующей среде, %

Сорт/линия	Период культивирования, сутки						
	5	10	15	20	25	30	Контроль
Памяти Янченко	6,2±3,2	15,1±2,2	17,8±1,1	24,0±2,6	26,0±2	25,0±2,9	25,3±1,8
Оазис	10,7±3,9	19,9±2,4	24,5±2,5	36±1,4	29,1±3,1	28,3±3,1	19,8±3,1
12S2-24	9±4	26,1±2,9	36,3±3,1	30±0,5	30,6±1,3	33,6±2,1	31,9±3,6
НСР _{0,05}	15,8	19	12,8	8,1	11,8	9,3	13,5

Приложение 15

Результаты дисперсионного анализа влияния факторов на частоту регенерации в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости нахождения на иницирующей среде

Дисперсия	Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F _{факт.}	F _{0,5}
Общая	6336,57	62	-	-	-
Генотип (А)	723,42	2	361,71	8,39	3,22
Период культивирования (В)	3176,70	6	529,45	12,27	2,32
Взаимодействие «генотип × период культивирования» (А×В)	624,78	12	52,07	1,21	1,99
Случайная	1811,67	42	43,13	-	-

Приложение 16

Частота регенерации в культуре незрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации хлорида натрия, %

Сорт/линия	Концентрация в среде хлорида натрия, %						
	0	1	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
Оазис	83,7±4,3	55,3±1,5	23,7±2,9	16,3±2,2	14,9 ±1,4	7,9±4,0	0,0±0,0
1480-Д4	79,3±2,9	30,8±0,9	13,5±1,6	15,0±1,5	13,3±1,3	0,0±0,0	0,0±0,0
12S2-24	184,3±7,2	32,1±4,2	15,8±5,1	11,7±0,9	8,2±4,1	0,0±0,0	0,0±0,0
НСР _{0,05}							42,5

Приложение 17

Частота регенерации в культуре незрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации ПЭГ-6000, %

Сорт/линия	Концентрация в среде ПЭГ, %				
	0	10	15	20	25
Оазис	83,7±4,3	43,3±2,9	24,5±3,3	14,2±0,8	0,0±0,0
1480-Д4	79,3±2,8	32,3±2,3	19,5±2,5	9,8±0,8	0,0±0,0
12S2-24	184,3±7,3	35,6±1,7	21,3±1,9	8,7±4,4	0,0±0,0
НСР _{0,05}	52,4				

Приложение 18

Частота регенерации в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации хлорида натрия в питательной среде

Сорт/линия	Содержание в питательной среде NaCl, %						
	0	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
Оазис	21,0±2,1	23,0±1,4	17,9±1,4	5,6±2,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
1480-Д4	20,0±2,5	22,0±2,1	9,6±5,3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
12S2-24	26,0±2,1	00,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
НСР _{0,05}	4,6						

Приложение 19

Частота регенерации в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации ПЭГ-6000 в питательной среде

Сорт/линия	Содержание в питательной среде ПЭГ-6000, %				
	0	10	15	20	25
Оазис	21,0±2,1	17,8±1,3	2,8±2,7	0,0±0,0	0,0±0,0
1480-Д4	20,0±2,5	3,6±3,5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
12S2-24	26,0±2,1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
НСР _{0,05}	4,5				

Физиологические параметры проростков исходного генотипа и соматональных линий в контроле и условиях осмотического стресса,
вызванного хлоридом натрия

Генотип	Длина корней, см		Количество корней, шт		Масса корней, г		Длина проростка, см		Масса проростка, г		Всхожесть, %		
	Контроль	NaCl	Контроль	NaCl	Контроль	NaCl	Контроль	NaCl	Контроль	NaCl	Контроль	NaCl	
12S2 – 24 (исходный сорт)	6,76±0,40	2,55±0,06*	3,0±0,2	2,7±0,1	0,256±0,079	0,093±0,003*	4,23±0,60	0,58±0,05*	0,744±0,075	0,152±0,006*	71,6±2,3	43,3±7,3*	
Регенеранты	R3-C-61-2	7,00±0,25	3,42±0,17*	3,0±0,3	2,9±0,2	0,403±0,012	0,103±0,005*	5,30±0,21	2,20±0,16	0,824±0,031	0,154±0,005*	87,3±1,5	46,0±1,0*
	R3-C-62-1	7,80±0,23	2,17±0,09*	3,2±0,3	2,9±0,2	0,282±0,026	0,104±0,009*	5,30±0,40	0,83±0,09*	0,589±0,008	0,073±0,009*	71,7±1,7	53,3±1,7*
	R3-C-63-5	5,23±0,37	2,73±0,11	2,8±0,1	2,9±0,1	0,172±0,015	0,096±0,006*	4,20±0,15	0,55±0,04*	0,602±0,053	0,043±0,004*	77,7±1,5	58,3±1,7*
	R3-C-65-4	6,73±0,38	2,72±0,04*	3,1±0,1	2,7±0,1	0,193±0,013	0,088±0,006*	6,10±0,40	0,71±0,06*	0,763±0,024	0,048±0,009*	76,0±4,2	35,0±2,9*
	R3-C-65-7	4,50±0,25	2,38±0,05*	2,9±0,2	3,2±0,1	0,153±0,010	0,063±0,013*	2,80±0,15	0,72±0,05*	0,198±0,014	0,221±0,160	47,7±1,5	43,3±1,7
	R3-C-67-2	4,23±0,24	2,89±0,10	3,1±0,2	3,3±0,1	0,097±0,005	0,105±0,011	3,00±0,10	1,04±0,04*	0,489±0,008	0,086±0,005*	72,7±2,3	44,0±2,1*
	R3-C-68-6	5,62±0,44	3,91±0,24	3,0±0,1	2,8±0,1	0,126±0,004	0,090±0,007	2,85±0,09	2,07±0,12	0,193±0,004	0,162±0,005	48,0±1,2	50,0±2,9
	R3-C-612-5	4,30±0,26	4,33±0,33	3,1±0,1	2,6±0,1	0,074±0,012	0,067±0,013	4,13±0,75	1,43±0,05*	0,231±0,013	0,125±0,009*	48,3±1,7	50,7±2,3
	R3-П-62-1	4,33±0,27	2,19±0,04*	2,7±0,1	2,7±0,1	0,182±0,009	0,149±0,020	3,76±0,18	1,42±0,09*	0,578±0,039	0,135±0,004*	41,7±1,7	43,3±1,7
	R3-П-62-4	6,00±0,25	1,81±0,13*	2,8±0,2	2,6±0,1	0,310±0,018	0,124±0,012*	4,97±0,34	1,41±0,07*	0,624±0,031	0,140±0,007*	71,6±1,7	30,0±2,8*
	R3-П-64-3	3,60±0,17	1,23±0,09*	2,9±0,1	2,4±0,1	0,140±0,016	0,074±0,009*	3,97±0,27	1,61±0,17*	0,420±0,032	0,094±0,007*	55,0±2,9	38,3±4,4*
	R3-П-66-6	3,36±0,09	3,27±0,03	2,8±0,1	2,8±0,2	0,248±0,020	0,144±0,025*	4,36±0,18	3,74±0,04	0,355±0,026	0,256±0,015*	46,7±1,6	50,3±1,7
R3-П-67-6	3,56±0,24	2,90±0,18	2,9±0,1	2,7±0,1	0,10±0,006	0,123±0,018	2,96±0,09	2,94±0,04	0,155±0,026	0,107±0,002	58,3±4,4	36,7±3,3*	

Примечание: курсив – достоверное различие по сравнению с исходным генотипом на 5%-м уровне значимости;

* – различие достоверно по сравнению с контролем на 5%-м уровне значимости.

Физиологические параметры проростков исходного генотипа и соматональных линий в контроле и условиях осмотического стресса, вызванного хлоридом натрия

Генотип	Длина корней, см		Количество корней, шт		Масса корней, г		Длина проростка, см		Масса проростка, г		Всхожесть, %		
	Контроль	NaCl	Контроль	NaCl	Контроль	NaCl	Контроль	NaCl	Контроль	NaCl	Контроль	NaCl	
Оазис (исходный сорт)	5,00±0,87	3,01±0,30	3,6±0,1	3,5±0,2	0,161±0,025	0,102±0,036	3,49±0,49	2,18±0,38	0,829±0,124	0,334±0,046*	91,5±0,2	45,6±13,8*	
Регенеранты	R3-C-11-3	5,82±0,29	3,50±0,14	3,5±0,10	3,1±0,1	0,160±0,012	0,134±0,013	4,05±0,07	1,48±0,09*	0,942±0,024	0,053±0,005*	91,5±0,2	59,9±3,5*
	R3-C-12-4	3,70±0,16	1,87±0,07*	3,5±0,10	2,8±0,1*	0,183±0,006	0,092±0,008*	2,67±0,09	1,26±0,10*	0,565±0,018	0,158±0,007*	93,3±1,7	44,3±2,3*
	R3-C-13-6	5,74±0,09	3,23±0,13*	3,4±0,10	3,3±0,2	0,259±0,013	0,119±0,008*	3,34±0,06	2,94±0,20	0,495±0,040	0,189±0,002*	93,5±1,1	33,3±1,7*
	R3-C-13-8	3,62±0,19	2,60±0,08	3,2±0,20	3,2±0,2	0,120±0,009	0,075±0,011*	2,88±0,11	2,27±0,14	0,487±0,012	0,083±0,003*	92,1±1,5	25,0±2,9*
	R3-C-14-2	6,02±0,14	4,58±0,17*	3,2±0,10	2,6±0,2*	0,235±0,017	0,161±0,008*	4,67±0,07	3,37±0,09*	0,865±0,028	0,292±0,138*	93,8±1,2	31,7±1,7*
	R3-C-15-4	5,99±0,14	4,31±0,14*	3,3±0,20	2,6±0,1*	0,133±0,019	0,076±0,014*	3,18±0,26	2,17±0,11*	0,165±0,006	0,144±0,031	66,7±1,7	36,5±1,8*
	R3-C-16-1	3,33±0,11	2,40±0,09*	3,1±0,20	3,1±0,2	0,068±0,004	0,053±0,007	3,76±0,13	2,49±0,10*	0,140±0,009	0,059±0,011*	48,3±1,7	38,3±1,7*
	R3-C-16-3	4,94±0,10	2,70±0,35	2,5±0,20	2,7±0,9	0,223±0,012	0,102±0,011*	4,09±0,36	3,37±0,09*	0,278±0,009	0,176±0,034*	50,0±2,9	33,3±4,4*
	R3-П-11-2	4,15±0,44	3,53±0,106*	2,9±0,03	3,1±0,1	0,137±0,011	0,170±0,010*	3,19±0,13	2,47±0,08*	0,175±0,027	0,152±0,004	58,3±1,7	54,3±2,3
	R3-П-12-4	3,37±0,19	2,86±0,07	3,5±0,03	2,8±0,1*	0,187±0,003	0,102±0,002*	3,39±0,16	2,50±0,09*	0,632±0,028	0,138±0,013*	85,0±5,0	45,0±2,8*
	R3-П-13-3	5,52±0,17	3,51±0,23*	3,0±0,08	3,3±0,1	0,292±0,021	0,126±0,011*	3,52±0,13	2,41±0,09*	0,528±0,044	0,175±0,014*	88,4±1,7	36,6±1,7*
R3-П-15-2	4,28±0,14	2,9±0,29*	3,1±0,05	3,1±0,1	0,236±0,020	0,108±0,024*	3,83±0,11	3,01±0,21*	0,520±0,021	0,152±0,006*	88,3±4,4	35,0±5,0*	
R3-П-15-4	5,12±0,19	3,58±0,17*	3,3±0,14	3,3±0,2	0,126±0,025	0,061±0,008*	3,83±0,31	2,36±0,01	0,234±0,020	0,192±0,137	66,7±1,7	31,6±1,7*	

Примечание: курсив – достоверное различие по сравнению с исходным генотипом на 5%-м уровне значимости;

* – различие достоверно по сравнению с контролем на 5%-м уровне значимости.

Физиологические параметры проростков исходного генотипа и соматональных линий в контроле и условиях осмотического стресса,
вызванного ПЭГ-6000

Генотип	Длина корней, см		Количество корней, шт		Масса корней, г		Длина проростка, см		Масса проростка, г		Всхожесть, %		
	Контроль	ПЭГ-6000	Контроль	ПЭГ-6000	Контроль	ПЭГ-6000	Контроль	ПЭГ-6000	Контроль	ПЭГ-6000	Контроль	ПЭГ-6000	
12S2 – 24 (исходный сорт)	6,76±0,40	3,69±0,23	3,0±0,2	2,9±0,3	0,256±0,079	0,077±0,15*	4,23±0,60	1,84±0,28*	0,744±0,075	0,153±0,038*	71,6±2,3	51,6±3,3*	
Регенеранты	R3-C-61-2	7,00±0,25	2,44±0,10*	3,0±0,3	2,9±0,1	0,403±0,012	0,136±0,006*	5,30±0,21	1,37±0,1*	0,824±0,031	0,231±0,15*	87,3±1,5	41,7±1,7*
	R3-C-62-1	7,80±0,23	2,37±0,16*	3,2±0,3	2,9±0,1*	0,282±0,026	0,107±0,002*	5,30±0,40	1,11±0,01*	0,589±0,008	0,173±0,009*	71,7±1,7	35,0±2,9*
	R3-C-63-5	5,23±0,37	2,26±0,08*	2,8±0,1	2,7±0,1	0,172±0,015	0,099±0,006*	4,20±0,15	1,55±0,04*	0,602±0,053	0,127±0,011*	77,7±1,5	46,7±1,7*
	R3-C-65-4	6,73±0,38	2,47±0,19*	3,1±0,1	2,7±0,1*	0,193±0,013	0,108±0,012*	6,10±0,40	1,14±0,16*	0,763±0,024	0,148±0,008*	76,0±4,2	38,3±1,7*
	R3-C-65-7	4,50±0,25	2,41±0,16*	2,9±0,2	2,7±0,2	0,153±0,010	0,099±0,011*	2,80±0,15	1,24±0,12*	0,198±0,014	0,109±0,005	47,7±1,5	13,3±1,7*
	R3-C-67-2	4,23±0,24	1,74±0,12*	3,1±0,2	2,6±0,2*	0,097±0,005	0,063±0,006	3,00±0,10	1,44±0,11*	0,489±0,008	0,148±0,005*	72,7±2,3	31,7±1,7*
	R3-C-68-6	5,62±0,44	3,57±0,20	3,0±0,1	2,9±0,1	0,126±0,004	0,100±0,004	2,85±0,09	2,30±0,05	0,193±0,004	0,147±0,01	48,0±1,2	46,7±1,7
	R3-C-612-5	4,30±0,26	3,91±0,10	3,1±0,1	2,7±0,1	0,074±0,012	0,084±0,003	4,13±0,75	2,53±0,13*	0,231±0,013	0,128±0,011*	48,3±1,7	48,3±4,4
	R3-П-62-1	4,33±0,27	1,36±0,12*	2,7±0,1	2,8±0,1	0,182±0,009	0,063±0,280*	3,76±0,18	1,62±0,10*	0,578±0,039	0,126±0,012*	41,7±1,7	28,3±1,6*
	R3-П-62-4	6,00±0,25	1,84±0,29*	2,8±0,2	2,9±0,1	0,310±0,018	0,122±0,013*	4,97±0,34	1,72±0,04*	0,624±0,031	0,075±0,012*	71,6±1,7	38,3±1,6*
	R3-П-64-3	3,60±0,17	1,72±0,04*	2,9±0,1	2,7±0,1	0,140±0,016	0,080±0,012*	3,97±0,27	1,84±0,13*	0,420±0,032	0,150±0,008*	55,0±2,9	26,7±4,4*
R3-П-66-6	3,36±0,09	3,47±0,07	2,8±0,1	2,9±0,1	0,248±0,020	0,137±0,036*	4,36±0,18	4,49±0,26	0,355±0,026	0,260±0,018*	46,7±1,6	53,3±1,6	
R3-П-67-6	3,56±0,24	2,99±0,17	2,9±0,1	2,8±0,2	0,100±0,006	0,123±0,018	2,96±0,09	3,04±0,04	0,155±0,026	0,092±0,004*	58,3±4,4	33,3±3,3	

Примечание: курсив – достоверное различие по сравнению с исходным генотипом на 5%-м уровне значимости;

* – различие достоверно по сравнению с контролем на 5%-м уровне значимости.

Физиологические параметры проростков исходного генотипа и соматональных линий в контроле и условиях осмотического стресса,
вызванного ПЭГ-6000

Генотип		Длина корней, см		Количество корней, шт		Масса корней, г		Длина проростка, см		Масса проростка, г		Всхожесть, %	
		Контроль	ПЭГ-6000	Контроль	ПЭГ-6000	Контроль	ПЭГ-6000	Контроль	Контроль	ПЭГ-6000	Контроль	ПЭГ-6000	Контроль
Оазис (исходный сорт)		5,00±0,87	3,97±0,47	3,6±0,10	3,6±0,10	0,161±0,025	0,093±0,035*	3,49±0,49	2,37±0,19	0,829±0,124	0,325±0,040*	91,5±0,2	54,8±7,8*
Регенеранты	R3-C-11-3	5,82±0,29	3,20±0,09*	3,5±0,10	3,0±0,10*	0,160±0,012	0,163±0,010	4,05±0,07	1,91±0,13*	0,942±0,024	0,152±0,017*	91,5±0,2	35,0±2,8*
	R3-C-12-4	3,70±0,16	1,90±0,11*	3,5±0,10	2,8±0,15*	0,183±0,006	0,102±0,002	2,67±0,09	1,97±0,11	0,565±0,018	0,135±0,015*	93,3±1,7	33,3±3,3*
	R3-C-13-6	5,74±0,09	4,15±0,08*	3,4±0,10	3,1±0,10*	0,259±0,013	0,133±0,016*	3,34±0,06	2,86±0,15	0,495±0,040	0,182±0,008*	93,5±1,1	36,6±1,7*
	R3-C-13-8	3,62±0,19	2,50±0,10	3,2±0,20	3,1±0,10	0,120±0,009	0,089±0,010	2,88±0,11	2,15±0,05	0,487±0,012	0,118±0,006*	92,1±1,5	28,3±1,7*
	R3-C-14-2	6,02±0,14	4,38±0,11*	3,2±0,10	2,7±0,20*	0,235±0,017	0,147±0,008*	4,67±0,07	3,40±0,17	0,865±0,028	0,158±0,012*	93,8±1,2	36,7±4,4*
	R3-C-15-4	5,99±0,14	4,09±0,15*	3,3±0,20	3,0±0,10*	0,133±0,019	0,075±0,013*	3,18±0,26	1,80±0,14*	0,165±0,006	0,104±0,014	66,7±1,7	39,8±4,9
	R3-C-16-1	3,33±0,11	2,50±0,14	3,1±0,20	3,0±0,10	0,068±0,004	0,059±0,003	3,76±0,13	2,59±0,08	0,140±0,009	0,086±0,009*	48,3±1,7	38,3±1,7
	R3-C-16-3	4,94±0,10	3,40±0,09	2,5±0,20	2,7±0,10	0,223±0,012	0,099±0,003*	4,09±0,36	2,63±0,06*	0,278±0,009	0,158±0,010*	50,0±2,9	35,0±2,9*
	R3-П-11-2	4,15±0,44	3,53±0,11	2,9±0,03	3,0±0,10	0,137±0,011	0,170±0,012	3,19±0,13	2,47±0,09	0,175±0,027	0,152±0,004	58,3±1,7	54,3±2,3
	R3-П-12-4	3,37±0,19	2,86±0,07	3,5±0,03	3,2±0,12	0,187±0,003	0,102±0,002*	3,39±0,16	2,50±0,09	0,632±0,028	0,238±0,013*	85,0±5,0	45,0±2,9*
	R3-П-13-3	5,52±0,17	3,51±0,23*	3,0±0,08	3,2±0,14	0,292±0,021	0,126±0,011*	3,52±0,13	2,41±0,09	0,528±0,044	0,175±0,014*	88,4±1,7	36,6±1,6*
R3-П-15-2	4,28±0,14	2,93±0,29*	3,1±0,05	3,1±0,10	0,236±0,020	0,108±0,024*	3,83±0,11	3,01±0,21	0,520±0,021	0,192±0,006*	88,3±4,4	35,0±5,0*	
R3-П-15-4	5,12±0,19	3,64±0,37*	3,3±0,14	3,1±0,10	0,126±0,025	0,076±0,013	3,83±0,31	3,17±0,26	0,234±0,02	0,154±0,012*	66,7±1,7	46,4±1,7*	

Примечание: *курсив* – достоверное различие по сравнению с исходным генотипом на 5%-м уровне значимости;

* – различие достоверно по сравнению с контролем на 5%-м уровне значимости.

Индексы устойчивости яровой твердой пшеницы

Генотип	Стресс-фактор	Индексы устойчивости					
		Длина корней, см	Количество корней, шт.	Длина проростка, см	Масса корней, г	Масса проростка, г	Всхожесть, %
Оазис	ПЭГ-6000	0,79±0,09	0,99±0,01	0,68±0,05	0,58±0,22	0,27±0,05	0,60±0,08
	Сахароза	0,40±0,05	0,71±0,04	0,42±0,08	0,17±0,04	0,11±0,04	0,44±0,14
	NaCl	0,60±0,05	0,97±0,05	0,63±0,11	0,63±0,22	0,16±0,05	0,44±0,15
Безенчукская 210	ПЭГ-6000	1,13±0,08	1,08±0,04	1,39±0,22	0,47±0,23	0,37±0,13	0,34±0,15
	Сахароза	0,42±0,06	0,89±0,14	1,43±0,37	0,28±0,15	0,29±0,12	0,28±0,11
	NaCl	0,53±0,00	0,93±0,07	0,27±0,08	0,75±0,20	0,16±0,07	0,58±0,09
Омская степная	ПЭГ-6000	1,12±0,05	0,83±0,07	0,95±0,12	0,55±0,39	0,27±0,17	0,34±0,18
	Сахароза	0,39±0,06	0,69±0,03	0,48±0,06	0,44±0,06	0,24±0,04	0,73±0,09
	NaCl	0,58±0,02	0,84±0,07	0,28±0,08	1,06±0,16	0,12±0,01	0,59±0,12
Памяти Янченко	ПЭГ-6000	1,03±0,07	0,95±0,04	1,78±0,31	0,49±0,12	0,56±0,11	0,44±0,06
	Сахароза	0,53±0,03	0,83±0,05	0,74±0,13	0,61±0,01	0,22±0,05	0,40±0,03
	NaCl	0,52±0,05	0,89±0,12	0,49±0,01	0,13±0,04	0,14±0,04	0,26±0,09
Солнечная	ПЭГ-6000	1,83±0,06	1,04±0,06	1,72±0,17	1,04±0,59	0,53±0,16	0,51±0,16
	Сахароза	0,77±0,08	0,79±0,02	1,05±0,11	0,62±0,18	0,11±0,04	0,37±0,08
	NaCl	0,70±0,01	0,88±0,03	0,30±0,04	0,85±0,38	0,17±0,02	0,66±0,11
Г-752	ПЭГ-6000	1,40±0,04	1,14±0,11	1,41±0,07	1,94±0,31	0,69±0,03	0,45±0,01
	Сахароза	0,64±0,13	0,76±0,08	0,70±0,04	0,94±0,31	0,29±0,07	0,62±0,09
	NaCl	0,60±0,07	0,92±0,03	0,22±0,11	0,66±0,23	0,07±0,03	0,27±0,12
1480-Д4	ПЭГ-6000	1,29±0,19	0,94±0,03	1,54±0,27	0,36±0,08	0,49±0,15	0,46±0,04
	Сахароза	0,48±0,06	0,67±0,06	0,95±0,10	0,30±0,12	0,59±0,37	0,31±0,04
	NaCl	0,85±0,07	1,06±0,03	1,15±0,19	0,25±0,09	0,35±0,03	0,41±0,05
Жемчужина Сибири	ПЭГ-6000	1,43±0,06	0,82±0,04	0,62±0,02	0,76±0,09	0,38±0,04	0,57±0,05
	Сахароза	0,52±0,07	0,61±0,08	0,46±0,14	0,36±0,14	0,17±0,09	0,42±0,11
	NaCl	0,81±0,03	0,76±0,05	0,24±0,05	0,44±0,07	0,12±0,02	0,51±0,05
12S1-14	ПЭГ-6000	0,60±0,22	0,83±0,26	0,58±0,34	0,17±0,07	0,14±0,09	0,29±0,05
	Сахароза	0,44±0,07	0,99±0,07	0,57±0,11	0,43±0,16	0,39±0,14	0,57±0,03
	NaCl	0,37±0,05	0,89±0,05	0,21±0,06	0,26±0,11	0,09±0,03	0,39±0,11
12S2-24	ПЭГ-6000	0,55±0,03	0,97±0,09	0,44±0,06	0,28±0,05	0,21±0,05	0,72±0,04
	Сахароза	0,32±0,05	0,68±0,09	0,39±0,03	0,17±0,06	0,14±0,01	0,44±0,09
	NaCl	0,38±0,01	0,91±0,01	0,14±0,01	0,37±0,01	0,07±0,01	0,61±0,10

Результаты дисперсионного анализа площади пыльцы яровой твердой пшеницы

Дисперсия	Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F _{факт.}	F _{0,5}
Общая	905470222,7	35	-	-	-
Генотип (А)	758177726,3	11	68925248	14,60497	2,258518
Стресс (В)	43467909,43	2	21733955	4,605335	3,443357
Случайная	103824587	22	4719299	-	-