

БЫЧКОВА Ольга Владимировна

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

Специальность 06.01.05 – селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Барнаул – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Алтайский государственный университет» (ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»).

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Соколова Галина Геннадьевна

Официальные оппоненты: **Евдокимов Михаил Григорьевич**, доктор сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией селекции твердой пшеницы ФГБНУ «Омский аграрный научный центр»

Тоболова Галина Васильевна, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, доцент кафедры производства и переработки сельскохозяйственной продукции ФГБОУ ВО «Аграрный университет Северного Зауралья»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук

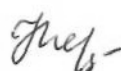
Защита диссертации состоится «28» июня 2018 г. в 11-30 часов на заседании диссертационного совета Д 999.176.03, созданного на базе ФГБОУ ВО «Алтайский государственный аграрный университет», ФГБНУ «Научно-исследовательский институт садоводства Сибири имени М.А. Лисавенко», ФГБНУ «Алтайский научно-исследовательский институт сельского хозяйства» по адресу: 656049 г. Барнаул, пр. Красноармейский, 98, тел./факс 8 (3852) 62-83-96, E-mail: agau@asau.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Алтайский государственный аграрный университет», с материалами по защите диссертации на сайте: <http://www.asau.ru>

Автореферат разослан « »

2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Н.Н. Чернышева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. 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*. 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 соматической, расширяет спектр изменчивости исходного материала, повышая эффективность отбора, в том числе по устойчивости к стрессам. Идентификация генотипов с выраженной соле- и осмоустойчивостью на основе соматической 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 соматических клонов 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 соматических клонов 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 соматических клонов 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 пылевого анализа выполнено ранжирование образцов по наличию внутренней и индуцированной осмотической регуляции, выделены перспективные для селекции генотипы, обладающие высокой осмотической адаптацией.

Защищаемые положения:

- особенности формирования стрессоустойчивых клеточных линий и регенерантов яровой твердой пшеницы на селективных средах *in vitro*;
- соматические 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 соматических вариантов яровой твердой пшеницы. Определен вклад различных факторов в реализацию каллусогенеза, морфогенеза и регенерационных процессов генотипов. Показана корре-

ляция 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. 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.

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).

Публикации. 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 таблицы, 38 рисунков, 25 приложений. Список литературы включает 390 источников, в том числе 186 на иностранном языке

Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность научному руководителю д.б.н., профессору Г.Г. Соколовой и к.б.н., доценту кафедры экологии, биохимии и биотехнологии Л.П. Хлебовой за помощь и поддержку, оказанные при подготовке и написании диссертационной работы, а также сотрудникам лаборатории селекции твердой пшеницы АНИИСХ ФАНЦА за предоставление семян исходных генотипов твердой пшеницы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Современные подходы к оценке засухоустойчивости сельскохозяйственных растений

Рассмотрены анатомо-морфологические и физиолого-биохимические механизмы устойчивости к осмотическому стрессу. Представлены классические и современные методы диагностики засухоустойчивости сельскохозяйственных растений.

Глава 2. Условия, объекты и методы проведения исследований

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. Штудгарт). Эксплантами для введения в культуру *in vitro* служили зрелые и незрелые зародыши. Для физиологической оценки стрессоустойчивости использовали семена и пыльцу 26 соматоклональных линий третьего поколения (R_3), производные сорта Оазис и линии 12S2-24, различающиеся по реакции к недостатку влаги.

Состав питательной среды. В качестве питательной среды использовали состав по прописи Мурасиге-Скуга (МС). 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.

Условия культивирования. Клеточные культуры выращивали в темноте при $t 26 \pm 1^\circ \text{C}$. В качестве селективной системы *in vitro* моделировали 8 вариантов сред МС, дополненных осмотическими агентами – NaCl и полиэтиленгликолем 6000 (ПЭГ-6000) в концентрации 0,5-2,0 и 10-25%, с шагом 0,5 и 5%, соответственно. Контролем служила среда того же состава, не содержащая стресс-факторов. Для индукции регенерационных процессов культуры переносили на среды для регенерации и культивировали в условиях 16-ти часового фотопериода при $t 20-22^\circ \text{C}$. Каллусогенез оценивали через 30-35 суток культивирования и выражали как процент клеточных линий к общему числу эксплантов. Частоту морфогенеза оценивали долей (%) морфогенных каллусов от числа сформировавшихся. Успех регенерации рассчитывали как количество регенерантов от числа морфогенных каллусов (%).

Физиологическая оценка регенерантов. Оценка исходных генотипов и соматоклональных линий, полученных в результате отбора стрессоустойчивых регенерантов на селективных средах *in vitro*, проводили путем проращивания семян на 15%-ном р-ре ПЭГ-6000 и 1,3%-ном р-ре NaCl (Money, 1989; Шихмуратов, 2014). В качестве контроля использовали дистиллированную воду.

Индексы устойчивости (ИУ) к осмотическим стрессам выражали отношением показателя, полученного в условиях стресса, к контролю. Изучали ИУ длины корней и проростка, массы корней и проростка, количества корней и индекс всхожести. Интегративный индекс устойчивости (ИИУ) определяли как среднее всех частных индексов (Юдина 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 генотипов 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, образцы соответствовали категориям: Оазис и Безенчукская 210 – высокоустойчивые; Омская степная, Памяти Янченко,

Солнечная 573, Г-752, и 1480-Д4 – среднеустойчивые; Жемчужина Сибири, 12S1-14 и 12S2-24 – неустойчивые к засухе (Розова и др., 2016).

Пыльцевой анализ. Для анализа засухоустойчивости соматоклональных линий проводили оценку площади пыльцевых зерен, культивируемых на питательных средах, содержащих осмотический компонент: вариант 1 – 55% р-р ПЭГ-6000 – оценивает внутреннюю способность к осморегуляции (Б); вариант 2 – 55% р-р ПЭГ-6000 + 10 μ M KCl – оценивает индуцированную способность к осморегуляции (В). Контролем являлся вариант, где питательным раствором служил 30% ПЭГ-6000 (А) (Patil et al., 2011). Пыльцу культивировали при t 24,0 \pm 1,0 $^{\circ}$ C в течение 2-х суток, анализ проводили на цитологических препаратах с использованием микроскопа OlympysBX51. Площадь цитоплазмы рассчитывали при помощи программы SellsensStandard.

Параметры для определения механизмов осмотической адаптации (ОА) в пыльце различных генотипов твердой пшеницы рассчитывали как отношение проекции площадей пыльцевых зерен, подвергшихся различным уровням осмотического стресса: $B/A \cong 1$ – внутренняя ОА; $B/A < 1$ – отсутствие внутренней ОА. $C/B \cong 1$ – индуцированная ОА; $C/B < 1$ – отсутствие индуцированной ОА; $C/A \cong 1$ – общая ОА; $C/A < 1$ – отсутствие общей ОА.

Статистическую обработку данных проводили с использованием методов вариационной статистики (рассчитывали среднюю арифметическую \pm ошибку средней), дисперсионного, корреляционного, регрессионного и дискриминантного анализов (Лакин, 1990). 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

Все изучаемые образцы независимо от типа экспланта сформировали каллусную ткань на уровне 80,7-97,7%. Варьирование частоты морфогенеза в культуре незрелых зародышей происходило от 83,1 \pm 1,8 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). 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). Лучшие результаты, как в культуре зрелых, так и незрелых зародышей, показали 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. Высокий уровень ризогенеза при использовании зрелых зародышей обусловил существенно более низкий выход регенерантов. Кроме того, эффективность использования зародышей в качестве эксплантов может снижаться за счет их прямого прорастания. 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). В культуре незрелых

зародышей средняя частота прорастания была ниже и составила 34,7%, варьируя от 18,4±3,8 (Г-752) до 49,5±2,4% (12S1-14).

Таким образом, высокий процент прямого прорастания зрелых зародышей и отрицательная корреляция между частотами ризогенеза и регенерации растений свидетельствуют о низкой эффективности их применения для получения регенерантов.

3.1.2. Период культивирования

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.

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 морфогенеза зависело от времени пребывания культур на исходной среде: при увеличении инкубационного периода до 15 суток доля ризогенеза снижалась на 25%. 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

Селективная система, имитирующая условия засухи, включала два вида осмотиков: ионный – NaCl и неионный – ПЭГ-6000 в концентрации 0,5-2,0 и 10-25%. Модельными объектами служили образцы твердой пшеницы, различающиеся по уровню полевой засухоустойчивости: высокий – у сорта Оазис, средний – у формы 1480-Д4 и низкий – у линии 12S2-24. Селективная система *in vitro*, смоделированная на основе сублетальной концентрации NaCl (1,3%), позволяет отбирать в культуре незрелых зародышей 12,1% регенерантов с потенциальной устойчивостью к засолению. Аналогичная система отбора растений с потенциально высокой осмоустойчивостью, представляющих интерес в селекции на засухоустойчивость, конструируется путем добавления в среду 20% ПЭГ-6000, что обеспечивает 10,9% уровень регенерации.

Оценка регенерационного потенциала генотипов на селективных средах в культуре зрелых зародышей показала, что у линии 12S2-24 регенерация отсутствовала. У образца 1480-Д4 и сорта Оазис формирование единичных растений происходило при концентрации NaCl до 1,1 и 1,2%, соответственно. Таким образом, чрезвычайно низкий уровень регенерационных событий в системе отбора при культивировании зрелых зародышей не позволил выявить концентрации NaCl, эффективные для получения соматклонов с потенциальной солеустойчивостью. Использование зрелых зародышей обусловило довольно низкий уровень регенерации в селективной системе, смоделированной на основе ПЭГ-6000. У линии 12S2-24 на среде с минимальной концентрацией селективного агента – 10% – формирование регенерантов не происходило. У генотипов 1480-Д4 и Оазис уровень регенерации составил 3,6-17,8% (рис. 1).

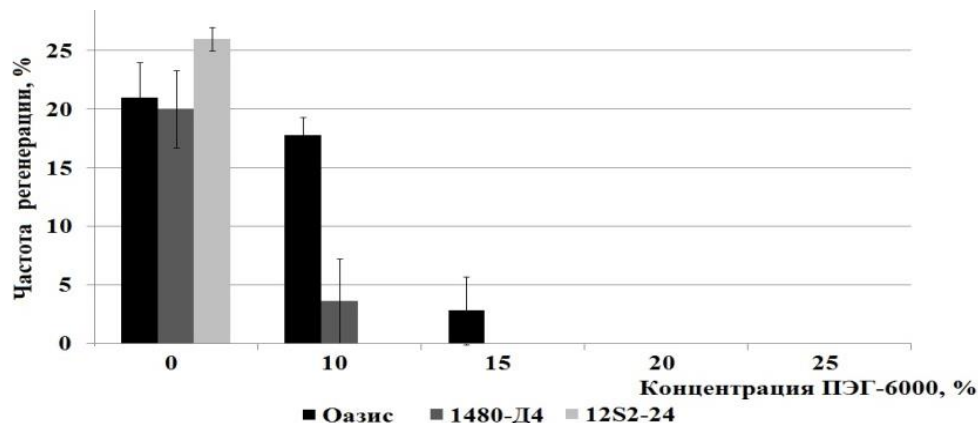


Рисунок 1 – Частота регенерации в культуре зрелых зародышей яровой твердой пшеницы в зависимости от концентрации ПЭГ-6000, %

Анализ данных, полученных при культивировании зрелых зародышей твердой пшеницы в экспериментах по оптимизации селективного агента, показал низкую эффективность использования подобных систем в клеточной селекции. Не зависимо от уровня засухоустойчивости генотипов отбор клеточных линий *in vitro*, устойчивых к осмотическому стрессу, сохраняющих регенерационную способность, следует проводить в культуре незрелых зародышей при концентрации в питательной среде NaCl до 1,3%, ПЭГ-6000 – до 20%.

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

3.2.1. Каллусогенез

Испытание 6-ти образцов твердой пшеницы на сублетальных дозах осмотиков показало, что сорта Оазис и Памяти Янченко, относящиеся к группам с высокой и средней полевой устойчивостью к недостатку влаги, в среднем за три года исследования обладали максимально высоким уровнем формирования клеточных линий. В условиях солевого стресса *in vitro* эти же генотипы зарекомендовали себя как лучшие, минимально снижая частоту образования 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

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

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%. (табл. 1).

Таблица 1 – 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

На средах, содержащих селективный фактор, несмотря на активный морфогенетический процесс в каллусных тканях, у большинства линий получено незначительное количество растений. 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%.

Результаты оценки взаимосвязи различных культуральных процессов, происходящих *in vitro* как в контроле, так и в селективной системе, представлены на рис. 2. 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. 2А). 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. 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. 2В).

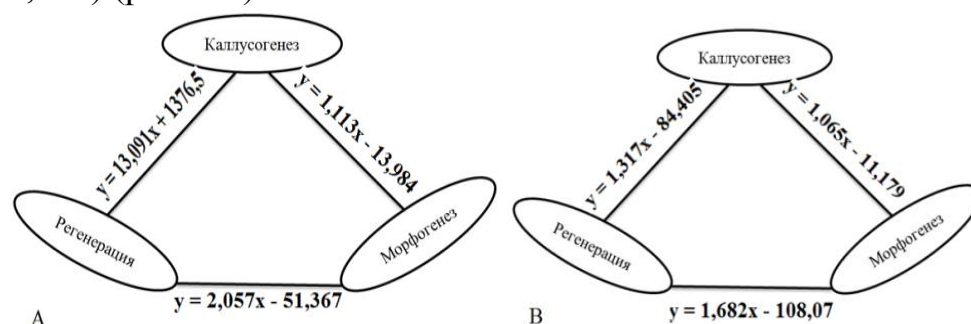


Рисунок 2 – Взаимосвязь каллусогенеза, морфогенеза и регенерации растений *in vitro* в культуре незрелых зародышей яровой твердой пшеницы: А – контроль; В – NaCl

Нами не установлено достоверной корреляции между морфогенезом и регенерацией в культуре ткани в контрольных условиях ($r=0,327$). 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. 2В). Обнаружена достоверная корреляция между частотами каллусогенеза и регенерации в отсутствии стресс-фактора в питательной среде ($r=0,624$, $R^2=39\%$). При использовании селективного агента подобной взаимосвязи не установлено.

Таким образом, генотипы 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.

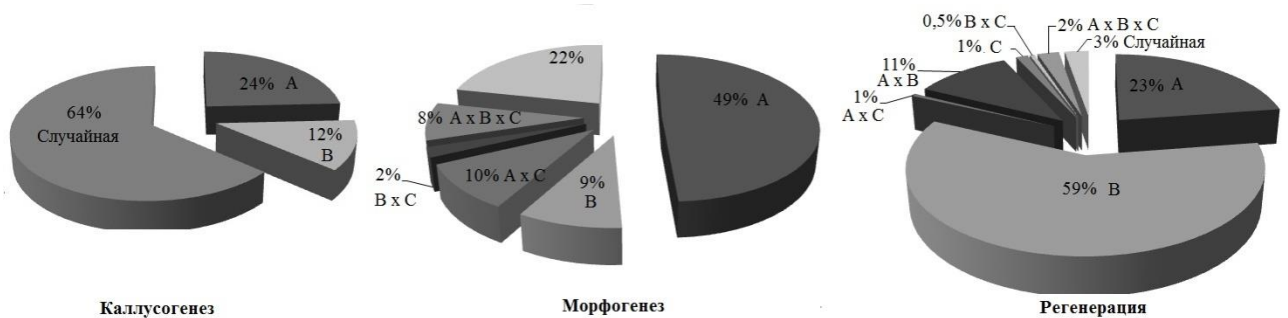
3.3. Влияние различных факторов на каллусогенные и морфогенетические процессы

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. 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%) (рис. 3А).

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 годы вегетации.

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 (рис. 3Б).

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 ($246,0 \pm 20,1\%$) и 12S2-24 ($237,7 \pm 8,3\%$). В среднем по всем генотипам регенерационная способность морфогенных каллусов в 2014 г. составила 149,3%, в 2015 г. – 134,2%, в 2016 – 126,6%. Результаты дисперсионного анализа подтвердили статистически значимое влияние на признак «регенерация растений» всех без исключения рассматриваемых факторов (рис. 3В).



Каллусогенез	Морфогенез	Регенерация
Генотип (A)	Условия года (C)	Генотип × условия года» (A×C)
Стресс (B)	Генотип × стресс (A×B)	Стресс × условия года» (B×C)
	Генотип × стресс × условия года» (A×B×C)	Случайная

Рисунок 3 – 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 соматоклональных линий яровой твердой пшеницы

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

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.

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 (табл. 2). Схожие результаты были получены при оценке этих же регенерантов в лабораторных условиях на провокационном фоне, стресс-фактором которого являлся ПЭГ-6000 (табл. 3).

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-C-68-6, R₃-C-612-5, R₃-П-64-3, R₃-П-66-6, R₃-П-67-6, R₃-C-16-1, R₃-C-16-3, R₃-П-12-4 R₃-П-15-4, R₃-П-11-2.

Таблица 2 – ИУ солеустойчивости соматклональных линий яровой твердой пшеницы, %

Генотип	ИУ	Генотип	ИУ
12S2-24		Оазис	
R3-C-61-2	47,3	R3-C-11-3	56,5
R3-C-62-1	42,9	R3-C-12-4	50,5
R3-C-63-5	51,1	R3-C-13-6	60,1
R3-C-65-4	39,5	R3-C-13-8	59,5
R3-C-65-7	70,8	R3-C-14-2	60,9
R3-C-67-2	65,9	R3-C-15-4	69,6
R3-C-68-6	82,5	R3-C-16-1	72,9
R3-C-612-5	78,1	R3-C-16-3	70,1
R3-П-62-1	66,2	R3-П-11-2	95,4
R3-П-62-4	42,6	R3-П-12-4	61,3
R3-П-64-3	50,3	R3-П-13-3	59,3
R3-П-66-6	86,7	R3-П-15-2	60,1
R3-П-67-6	88,1	R3-П-15-4	68,2

Таблица 3 – ИУ устойчивости соматклональных линий твердой пшеницы к осмотическому стрессу, вызванному ПЭГ-6000, %

Генотип	ИУ	Генотип	ИУ
12S2-24		Оазис	
R3-C-61-2	44,4	R3-C-11-3	52,7
R3-C-62-1	43,0	R3-C-12-4	53,4
R3-C-63-5	52,5	R3-C-13-6	62,7
R3-C-65-4	44,6	R3-C-13-8	61,6
R3-C-65-7	52,2	R3-C-14-2	58,3
R3-C-67-2	51,9	R3-C-15-4	65,8
R3-C-68-6	82,2	R3-C-16-1	78,0
R3-C-612-5	84,6	R3-C-16-3	68,7
R3-П-62-1	50,3	R3-П-11-2	94,9
R3-П-62-4	45,5	R3-П-12-4	67,8
R3-П-64-3	57,2	R3-П-13-3	60,0
R3-П-66-6	91,7	R3-П-15-2	61,5
R3-П-67-6	87,0	R3-П-15-4	73,9

Вместе с тем, нами установлено, что формирование интегративного индекса устойчивости на основе усреднения частных, рассчитанных для отдельных показателей проростков, практически у каждого соматклона 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.

Более надежная классификация генотипов, в том числе отобранных нами соматклональных 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.

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).

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

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 ИДП_{ПЭГ-6000} – индекс длины проростка (ПЭГ-6000); ИМК_{NaCl} – индекс массы корней (NaCl); ИДП_{NaCl} – индекс длины проростка (NaCl); ИВ_{NaCl} – индекс всхожести (NaCl); ИМК_{сах} – индекс массы корней (сахароза); ИДП_{сах} – индекс длины проростка (сахароза); ИМП_{сах} – индекс массы проростка (сахароза); ИДК_{ПЭГ-6000} – индекс длины корней (ПЭГ-6000).

С помощью данных уравнений можно вычислить классификационные значения для созданных нами соматональных 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 соматональных вариантов для каждой из групп устойчивости, представлены в таблице 4.

Подавляющая часть потомств регенерантов, исходной формой которых является линия 12S2-24, относится к группе неустойчивых к засухе образцов. Исключения 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 ИИ солеустойчивости более чем на 20% превышал родительское значение, а ИИ устойчивости к осмотическому стрессу, вызванному ПЭГ-6000, был несколько ниже в сравнении с исходным генотипом, на основании чего данная линия была исключена из группы засухоустойчивых. Однако, согласно проведенному дискриминантному анализу, соматональную линию R₃-С-67-2 следует рассматривать как среднеустойчивую.

Таблица 4 – Классификационные значения для соматональных 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-C-68-6, R₃-C-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-C-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-C-16-3.

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

Физиологическую оценку реакции пыльцы на осмотический стресс при ее культивировании в концентрированных растворах осмотика проводили для 10 соматоклональных линий, ИИУ которых превысил индекс родительских форм при испытании на обоих стрессовых фонах (табл. 5).

Таблица 5 – Площадь пыльцы исходных генотипов и соматоклональных линий яровой твердой пшеницы в условиях осмотического стресса *in vitro*, pxl²

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 -C-612-5	46891,15±439,3	41956,21±1349,9	43127,89±1548,4
R ₃ -C-68-6	46465,95±1715,8	39825,76±526,9	46135,21±693,9
R ₃ -C-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 -C-16-1	54402,26±1848,3	52258,67±1030	52430,26±1139,9
R ₃ -C-16-3	54385,60±1624,3	50258,67±1031	51430,33±666,5
R ₃ -C-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 пшени-

цы, что подтверждает двухфакторный дисперсионный анализ ($F_{\text{факт}} = 14,6 > F_{\text{табл}} = 2,2$). 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» ОА.

Пределы варьирования внутренней ОА составили от 0,86 (R₃-П-68-6) до 1,1 (Оазис) в зависимости от генотипа (табл. 6). Следует отметить, что сорт Оазис, характеризующийся как устойчивый к засухе в полевых условиях, продемонстрировал высокую (1,1) внутреннюю ОА, тогда как линия не устойчивая к действию осмотического стресса – 12S2-24 – показала наиболее низкое значение данного показателя (0,90).

Таблица 6 – Соотношение различных параметров площади цитоплазмы пыльцы исходных генотипов и соматоклональных линий яровой твердой пшеницы в условиях осмотического стресса *in vitro*

Генотип	Внутренняя ОА	Индуцированная ОА	Общая ОА
	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, характеризовалась несколько меньшей вариабельностью с размахом изменчивости в пределах от 0,96 до 1,16. Реакция генотипа на добавление КСl к 55%-ному раствору ПЭГ, не зависела от их внутренней осмотической регуляции, что подтверждает низкий коэффициент корреляции ($r = 0,43$). Лишь два генотипа (Оазис и R₃-П-11-2) обладали обоими типами адаптации, в то время как другие образцы демонстрировали лишь один тип ОА. Несмотря на достаточно высокий уровень индуцированной ОА у соматоклональных линий (до 1,16), регрессионный анализ показал отсутствие корреляции между данным показателем и общей регуляцией ($r=0,33$). Сравнение внутренней и общей адаптации выявило высокий уровень корреляции, что подтверждается коэффициентом детерминации, равным 48%. Этот факт подтверждает преобладание внутренней осмотической регуляции при формировании признака засухоустойчивости у изученных соматоклональных линий твердой пшеницы. Таким образом, у потомств регенерантов, полученных на селек-

тивных 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 соматоклонов яровой твердой пшеницы в культуре *in vitro*. Низкий морфогенетический потенциал зрелых зародышей определяет низкую эффективность их использования для получения соматоклональных вариантов, устойчивых к стрессовым факторам. Независимо 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 отсутствие 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-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.

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-C-14-2, R₃-C-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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, включенных в перечень ВАК РФ

1. Никитина Е.Д., Хлебова Л.П., Ерещенко О.В. Разработка отдельных элементов технологии клеточной селекции яровой пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессам // Известия АлтГУ, 2014. – №3/2(83). – С.50-54.
2. 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.

Публикации в изданиях, индексируемых в базе данных Web of Science

1. Бычкова О.В., Хлебова Л.П., Ерещенко Д.В. Морфогенез яровой твердой пшеницы в культуре зрелых зародышей // Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitkiy Melitopol State Pedagogical University, 2016. – №6(3). – P.209-218.

Публикации в других изданиях

1. 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: сборник статей. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. – С.341-345.
2. Ерещенко О.В., Хлебова Л.П. Клеточная селекция яровой твердой пшеницы на устойчивость к дефициту влаги // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VIII-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием 20-22 мая 2015 года, г. Бийск. Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2015. – С.232-236.
3. Бычкова О.В., Хлебова Л.П. Физиологическая оценка засухоустойчивости яровой твердой пшеницы // Acta Biologica Sibirica, 2015. – Т.1. – №1-2. – С.107-117.
4. 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.
5. Бычкова О.В. Сравнение методов оценки засухоустойчивости яровой твердой пшеницы // Агроэкологические аспекты устойчивого развития АПК: Материалы XIII Международной научной конференции. Ч.2. Брянск. Изд-во: Брянского ГАУ, 2016. – С.286-289.
6. Ерещенко Д.В., Бычкова О.В. Осмотическая адаптация яровой твердой пшеницы в условиях индуцированного стресса // Науки о жизни: от исследований к практике: материалы I Международного форума студентов и молодых ученых (11-15 сентября 2017 г.). – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2017. – С.54-55.
7. Бычкова О.В., Хлебова Л.П., Совриков А.Б., Титова А.М. Реакция генотипов яровой твердой пшеницы в условиях моделированного осмотического и солевого стресса // Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2018. – №2 (160). – С.5-11.

Подписано в печать 09.04.2018 г. Формат 60x84/16.
Бумага для множительных аппаратов. Печать ризографная.
Гарнитура «Times New Roman». Усл.-печ. л. 1. Тираж 100 экз. Заказ № .

РИО Алтайского ГАУ
656049, г. Барнаул, пр. Красноармейский, 98
тел. 62-84-26