

ХАРАКТЕРИСТИКА СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ РЕГЕНЕРАНТОВ МЯГКОЙ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ

В.Ю. СТУПКО;

Н.В. ЗОБОВА, кандидат биологических наук

Красноярский научно-исследовательский институт Сибирского регионального отделения
Россельхозакадемии, Красноярск, Россия

Введение

В связи с повышенным спросом на продовольственное зерно яровую пшеницу в Красноярском крае возделывают во всех почвенно-климатических зонах, где зачастую солонцовые пятна занимают до 10% пашни [8], что сильно лимитирует ее урожайность. В борьбе с засолением сорт является самым дешевым и доступным средством роста урожайности [1, 3]. При традиционных методах селекции сорт приходит на поля лишь через 12-20 лет. Современные технологии, генная инженерия и культура тканей *in vitro* могут уменьшить этот срок. Однако методы генетической трансформации имеют ряд недостатков, главный из которых – ограничение введения полученных таким образом растений в рацион человека из-за возможных, по мнению ряда ученых, опасных для здоровья побочных эффектов [5], а количественная оценка реакции на стресс генетически модифицированных растений проводится крайне редко [12]. Культура изолированных растительных тканей является экологически чистой технологией, ускоряющей создание адаптивных форм зерновых культур, использующей природные резервы соматоклональной изменчивости растений. Многие ее приемы уже успешно применяются селекционерами [10], в том числе в селекции пшеницы [9, 11, 14]. Однако повторение описанных в литературе биотехнологических протоколов не эффективно из-за зависимости регенерационных процессов в каллусе от вводимого в культуру генотипа.

Целью работы являлось создание в культуре *in vitro* на материале сибирской селекции солеустойчивых форм мягкой яровой пшеницы и их характеристика. Для этого было необходимо решить следующие задачи: оптимизировать гормональный состав питательных сред; подобрать уровни давления селективирующего агента и параметры эксплантов; провести лабораторными методами сравнительную физиологическую оценку солеустойчивости регенерантов и их родительских форм.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили 15 линий-регенерантов мягкой яровой пшеницы, полученные на засоленной селективной (0,42% NaCl) и нейтральной средах в каллусной культуре по разработанному протоколу [4, 5] от сортов Таежная, Новосибирская 15, Минуса и селекционной линии КС-1607 сибирской селекции. Оценка солеустойчивости проводили рулонным методом с использованием 1,68% раствора NaCl в качестве стрессовой среды и дистиллированной воды – контрольной среды. По окончании 7-суточной экспозиции фиксировали длину и сырую массу побегов и корней у проростков. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента [2].

Результаты и обсуждение

Оптимизированная технология получения стрессоустойчивых регенерантов включала в себя двукратный отбор на селективных средах на этапах пролиферации каллуса и регенерации растений (рис. 1) [4, 5].

Оценка ответной реакции полученных регенерантов и исходных форм на солевой стресс на основании физиологических лабораторных тестов показала, что регенеранты, сформировавшиеся на селективной среде в присутствии NaCl (PC), в большинстве своем продемонстрировали устойчивость к засолению среды (NaCl - 1.68%) (табл. 1, 2). Однако эта реакция зависела от донорного генотипа.

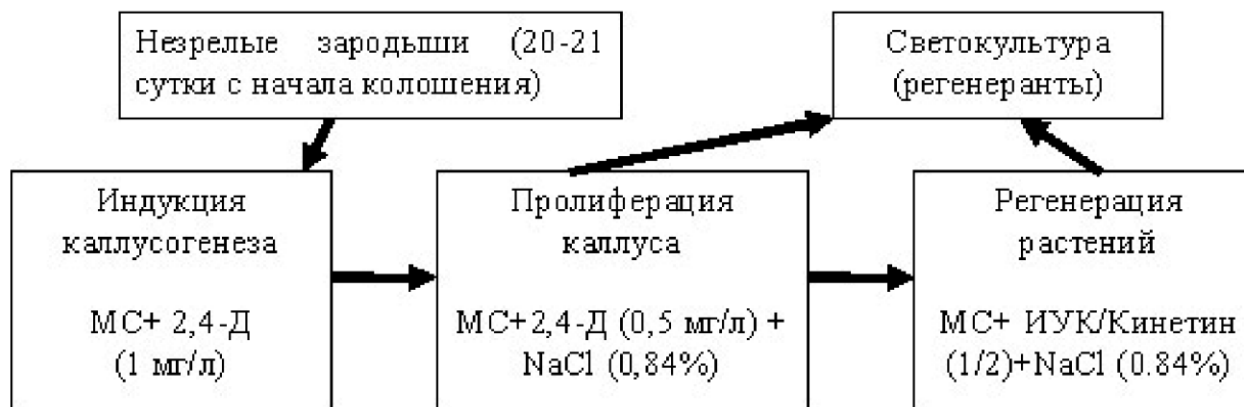


Рис. 1. Схема получения солеустойчивых форм мягкой яровой пшеницы на основе генотипов сибирской селекции

Линии, полученные от сорта Минуса, имевшие в контрольных условиях показатели близкие или ниже родительской формы, в стрессовых условиях превзошли ее в 1,5 раза по длине корней (табл. 1) и массе побегов и в 2 раза по длине побегов (табл. 2). Отмечено увеличение у них числа корней по сравнению с донорным сортом в присутствии стрессового фактора, сочетавшееся с увеличением их суммарной длины.

Однако регенерант РС-3-13 в этих условиях по массе корней не отличался от родительской формы. При этом число корней у данного регенеранта по сравнению с контрольными условиями не уменьшалось, что говорит о его высокой толерантности к повышенным концентрациям NaCl (табл. 1).

Различия между регенерантом и родительской формой достоверны при уровне значимости * – $P \leq 0,1$, ** – $P \leq 0,05$; *** – $P \leq 0,01$.

Регенерант РС-1-21 от селекционной линии КС-1607 в стрессовых условиях имел длину побега в 5 раз, а массу в 2 раза больше, чем у родительского генотипа (табл. 2). По всем остальным показателям (длина, число, масса корней) регенерант превзошел линию в 2 раза. Проростки регенеранта имели максимальное число корней в стрессовых условиях, достоверно не изменившееся по сравнению с контрольными (табл. 1). Регенерант РС-2-9 в свою очередь превзошел родительскую форму по массе побегов в стрессовых условиях (табл. 1, 2).

Оставшийся третий регенерант также проявил тенденцию к увеличению показателей по отношению к родительской форме во всех исследованных условиях.

У всех регенерантов сорта Новосибирская 15, полученных на селективной с NaCl и нейтральной (РН) средах, показатели проростков в присутствии соли были на уровне родительского сорта (табл. 1, 2). Отличия отмечены только по массе корней в стрессовых условиях при уровне значимости $P < 0,1$, где она была ниже, чем у родительской формы (табл. 1). В то время, как образовавшиеся на нейтральной среде регенеранты от линии КС-1607, которая уже была отмечена как подходящая для получения стрессоустойчивых форм, имели большой разброс значений длины и массы проростков в контрольных условиях в основном ниже, чем у родительской формы. При этом снижение их ростовых характеристик под действием NaCl было менее значительным, чем у родительской формы (КС-1607), что говорит о их большей толерантности к данному стрессовому фактору (табл. 1, 2).

Таблица 1

Параметры корневой системы исходных форм и их регенерантов

Генотип	Число корней, шт.		Длина корней, мм		Масса корней, мг		
	контроль	NaCl	контроль	NaCl	контроль	NaCl	
Минуса (исходная форма)	4,94	4,04	423,04	61,91	78,59	28,71	
Регенеранты	PC -3-13	4,84	4,74**	316,68***	89,29**	57,89***	30,23
	PC -9-9	5,00	4,52	468,55	77,59	89,50	24,39
КС-1607(исходная форма)	4,08	2,82	295,56	35,53	83,00	15,91	
Регенеранты	PC- 1-21	4,48	4,00***	291,57	62,69**	84,03	24,53**
	PC-2-9	4,42	3,09	386,80**	46,09	95,00	18,16
	PC-3-11	4,40	2,93	345,03	38,57	91,38	18,79
КС-1607	4,27	3,12	410,19	52,06	104,23	22,31	
Регенеранты	PH-2-1	3,47***	3,25	214,87***	40,42	62,65***	21,10
	PH-8-1	3,56**	3,40	298,09**	56,92	76,36***	23,94
	PH-9-1	3,56***	2,87	295,79***	40,80	77,31***	19,53
	PH-3-12	3,64**	3,38	311,88**	52,15	86,00*	21,95
Новосибирская 15	4,54	4,65	500,13	117,87	85,72	25,87	
Регенеранты	PC- 8-13	4,40	4,61	477,09	110,92	79,60	23,51*
	PC-11-8	4,67	4,52	466,65	105,50	78,19	21,17***
	PH-12-6	4,56	4,81	393,98***	106,67	80,16	24,39
	PH-8-12	4,66	4,59	464,74	122,36	86,62	24,91
Таежная	4,63	4,91	406,59	234,26	85,52	54,47	
Регенеранты	PH-1-71	4,75	4,84	406,14	246,52	83,55	51,61
	PH-1-9	4,83	4,87	376,52	174,22***	78,49	39,89***

Различия между регенерантом и родительской формой достоверны при уровне значимости * – $P \leq 0,1$, ** – $P \leq 0,05$; *** – $P \leq 0,01$.

У регенерантов сорта Таежная, полученных на нейтральной среде, толерантности не наблюдали. Они не только не превосходили исходный генотип, но и уступали ему по этому параметру. В стрессовых условиях проростки обоих образцов уступили донорному генотипу по массе побегов – регенерант PH-1-9 имел длину и массу органов в 1,5-2 раза меньшую, чем донорный сорт при показателях в контрольных условиях, близких к родительской форме. Таким образом, снижение его ростовых характеристик было значительным (табл. 1).

Вариации в количественных показателях реакции регенерантов на засоление можно объяснить образованием соматклонов в каллусной культуре. В пользу этой гипотезы свидетельствует сохранение признака устойчивости до третьего поколения (исследованы семена регенерантов R₂).

Важно отметить, что из 7 отобранных на селективной среде регенерантов 4 (57%) проявили высокую по сравнению с исходной формой устойчивость к действию соли. В то время как в подобных опытах других авторов этот показатель достигал только 43% [13].

Выводы

1. Показана эффективность получения солеустойчивых форм мягкой яровой пшеницы в каллусной культуре с использованием донорных генотипов сибирской селекции по разработанному в Красноярском НИИСХ протоколу.

Таблица 2

Параметры стеблей исходных форм и их регенерантов

генотип		Длина побегов, мм		Масса побегов, мг	
		контроль	NaCl	контроль	NaCl
Минуса (исходная форма)		151,00	21,78	85,58	31,27
Регенеранты	PC -3-13	120,74**	35,41***	72,82**	34,93
	PC -9-9	157,90	40,74***	89,75	41,55**
КС-1607(исходная форма)		128,84	7,59	104,80	15,22
Регенеранты	PC- 1-21	154,30	31 77***	98,87	33,94***
	PC-2-9	136,72	14,64	95,56	24,76*
	PC-3-11	127,59	10,07	99,66	14,01
КС-1607		136,85	17,24	99,04	26,54
Регенеранты	PH-2-1	82,12***	9,42	75,00*	19,29
	PH-8-1	125,03	12,60	85,61	21,90
	PH-9-1	88,75***	7,73	77,50**	15,19*
	PH-3-12	99,72**	7,92	82,80	24,98
Новосибирская 15		170,33	58,93	107,32	51,61
Регенеранты	PC- 8-13	167,84	58,65	112,75	52,77
	PC-11-8	185,23	60,95	112,75	48,70
	PH-12-6	162,68	55,14	106,67	50,64
	PH-8-12	186,90	56,56	116,99*	48,26
Таежная		130,49	95,23	88,73	73,33
Регенеранты	PH-1-71	119,00	100,17	90,72	62,54***
	PH-1-9	117,76	41,11***	101,43**	34,78***

2. Отмечено, что регенеранты отличаются от исходной формы по основным ростовым показателям, которые можно характеризовать как соматоклональную изменчивость, связанную с культивированием *in vitro*.

Список литературы

1. Безе С. Мало влаги, а пшеницы много! // Новое сельское хозяйство. – 2005. – № 6. – С. 46-48.
2. Лакин Г. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1980. – 290 с.
3. Семина С.А., Мачнева В.В. Урожай и качество зерна яровой мягкой пшеницы в зависимости от сорта // Зерновое хозяйство. – 2005. – № 3. – С. 23-24.
4. Ступко В.Ю. Подбор уровней давления селектирующих факторов для отбора стрессоустойчивых форм мягкой яровой пшеницы *in vitro* // Молодые ученые – науке Сибири: Сб. ст. молодых ученых. – Красноярск: Краснояр. гос. аграр. ун-т, 2008. – Вып. 3, Ч. I. – С. 80-83.
5. Ступко В.Ю., Зобова Н.В., Сурин Н.А. Подбор условий для создания стрессоустойчивых форм мягкой яровой пшеницы *in vitro* // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2008. – Т. 168, № 6. – С. 20-26.
6. Удовенко Г.В. Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. – Л.: Колос, 1976. – 318 с.
7. Фридт В. Генная инженерия: возможности и ограничения // Новое сельское хозяйство. – 2005. – № 1. – С. 62-65.
8. Шаманин В.С., Чернов В.М., Трущенко А.Ю., Коваль В.С., Потоцкая И.В. Селекция яровой мягкой пшеницы и адаптивность в условиях Западной Сибири: Итоги и перспективы // Актуальные задачи селекции и семеноводства сельскохозяйственных растений на современном этапе: Докл. и сообщ. IX генетико-селекц. шк., 5-9 апреля 2004 г. – Новосибирск: Сиб. отд-ние РАСХН Сиб- НИИРС НГАУ, 2005. – С. 204-221.
9. Almansouri M., Kinet J.-M., Lutts S. Effect of salt osmotic stress on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) // Plant and Soil. – 2001. – V. 231, N 2. – P. 243-254.

10. Evaluation of drought-resistance-related traits in durum wheat somaclonal lines selected *in vitro* / Bajji M., Bertin P., Lutts S., Kinet J-M. // Australian Journal of Experimental Agriculture. – 2004. – V. 44. – P. 27-35.
11. Farooq S., Azam F. Co-existence of salt and drought tolerance in Triticeae // Hereditas. – 2001. – V. 135, N 2-3. – P. 205-210.
12. Flowers T.J. Improving crop salt tolerance // J. Exp. Bot. – 2004. – V. 55. – P. 307-319.
13. Hsissou D. In vitro selection and characterization of drought-tolerant plants of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) // Agronomie. – 1994. – V. 2. – P. 65-70.
14. Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of *in vitro* selection pressure / Zairi I., Chlyah A., Sabounji K., Tittahsen M., Chlyah H. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2003. – V. 73, N 3. – P. 237-244.

Рекомендовано к печати к.б.н. Губановой Т.Б.