

УДК 62.33.29; 34.15; 34.31.33; 68.35.03; 68.35.29

ОЦЕНКА ГЕНОТИПОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ НА ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТЬ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Д.С. Тагиманова, А.Ж. Ергалиева, О.Б. Райзер, О.Н. Хапилина

РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, Казахстан, г. Астана
tagds@mail.ru

Засуха – одна из основных причин снижения урожайности растений. Чтобы гарантировать сельское хозяйство от потерь в засушливые годы, необходимо иметь устойчивые к дефициту влаги сорта пшеницы, ячменя и других культур. Под засухоустойчивостью растений подразумевается их способность наиболее продуктивно использовать воду при высокой температуре, низкой влажности почвы и воздуха и давать в этих условиях высокий урожай при хорошем качестве продукции.

С точки зрения агрономии, засухоустойчивость – это не выживание растений в условиях засухи, а способность сохранять относительно высокий уровень урожайности в условиях дефицита воды [1]. Проблема получения засухоустойчивых сортов яровой мягкой пшеницы актуальна во всем мире.

В результате исследований была проведена оценка селекционного материала на засухоустойчивость. Для оценки устойчивости селекционного материала к засухе использовали модифицированную методику тестирования пшеницы *in vitro*. В качестве эксплантов использовали зрелые зародыши семян пшеницы.

Показателем устойчивости образцов в данном эксперименте являлось проявление побегообразования в жестких селективных условиях. Изученные сорта характеризуются средней и повышенной устойчивостью к селективным условиям *in vitro*.

Показателем устойчивости генотипов к осмотическому стрессу являлась степень депрессии в накоплении сухой массы проростками при повышенном осмотическом давлении. Чем меньше подавлялся рост и накопление биомассы проростков пшеницы в растворе сахарозы по сравнению с контролем, тем устойчивее образец.

Ключевые слова: яровая мягкая пшеница, сорт, *in vitro*, засухоустойчивость, тестирование.

ВВЕДЕНИЕ

Успех селекции при создании засухоустойчивых сортов во многом зависит от правильной оценки степени устойчивости создаваемых сортов и гибридов. При отсутствии необходимой оценки селекционного материала засухоустойчивость новых сортов может оказаться недостаточной, поэтому оценка по данному показателю исходного материала и новых форм является необходимым условием эффективной селекции.

Прямая оценка засухоустойчивости в поле требует многолетних наблюдений. Засуха бывает не каждый год, изменяется и ее характер. Для ускорения селекционного процесса в последнее время все чаще прибегают к лабораторным методам. Особый интерес представляют методы ранней диагностики на семенах и проростках, поскольку они позволяют проводить оценку круглый год и анализировать большое количество селекционного материала [2].

Существуют различные методы тестирования в лабораторных условиях, однако все они базируются на сравнении биометрических характеристик либо биохимических показателей растений при помещении их в селективируемые условия [3, 4, 5]. Один из способов основан на определении скорости гидролиза статолитного крахмала в клетках корневого чехлика, устойчивость определяется по степени гидролиза статолитного крахмала, которая определяется визуально под микроскопом и оценивается в условных баллах [6].

Также в ряде исследований показана возможность использования метода *in vitro* для тестирования селекционного материала на устойчивость к неблагоприятным абиотическим факторам среды. Было выявлено наличие связи между реакциями клеточных систем на каллусогенной среде *in vitro* и засухоустойчивостью растений [7].

Лабораторные методы являются наиболее простыми методами массовой оценки засухоустойчивости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала исследований были использованы сортообразцы из питомника КАСИБ-12, предоставленные представительством СИММИТ в Казахстане, а также перспективные линии регенерантов и соматональные варианты яровой мягкой пшеницы, созданные методами биотехнологии в лаборатории биотехнологии и селекции растений РГП «Национальный центр биотехнологии».

Оценка засухоустойчивости яровой мягкой пшеницы *in vitro*

Для оценки устойчивости селекционного материала к засухе использовали модифицированную методику тестирования пшеницы *in vitro*. В качестве эксплантов использовали зародыши зрелых семян. Перед вычленением зародыша нижнюю его часть удаляли. Верхние части зародышей, содержащие апикальную меристему, помещали на среду для индукции каллусогенеза. Для оценки засухоустойчивости *in vitro* часть эксплантов помещали на среду, содержащую 20% ПЭГ-6000. Получение первичной каллусной ткани проводили по стандартным методикам [8].

Показателем устойчивости оцениваемых форм к неблагоприятным абиотическим факторам являлось проявление побегообразования у культивируемых эксплантов. Индекс устойчивости (Ir) рассчитывали [9] по следующей формуле:

$$Ir = [n_1 / (n_1 + n_2)] \cdot 100,$$

где n_1 – число эксплантов, у которых проявляется побегообразование;

n_2 – число эксплантов, у которых индуцируется каллусогенез, а побегообразование подавляется.

Определение жесткости среды (Р), необходимой для тестирования, определяли [10] по формуле:

$$P = K \cdot v^2,$$

где К – константа вида (для мягкой пшеницы равна 23);

v^2 – средняя скорость развития (сут.).

Данный показатель определяли по следующей формуле:

$$v = s/t,$$

где s – число этапов органогенеза в периоде всходы – цветение, т.е. s = 9 для мягкой пшеницы;

t – продолжительность периода всходы – цветение, сут.

Оценку засухоустойчивости образцов яровой мягкой пшеницы в полевых условиях проводили по методике, разработанной под руководством академика РАСХН В.А. Зыкина [11], по шкале: 1 - очень низкая (полная гибель); 3 - низкая (растения сильно угнетены); 5 - средняя (растения угнетены, только верхние два листа зеленые); 7 - высокая (слабое повреждение растения, нижний ярус листьев засох); 9 - очень высокая (листья зеленые).

Степень депрессии определяли по формуле: $Z = 100 - X/Y \cdot 100\%$, где Z – степень депрессии; X – средняя масса в контроле; Y – средняя масса в опыте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке устойчивости коллекционных образцов к неблагоприятным абиотическим факторам была использована модифицированная методика тестирования пшеницы *in vitro*. Показателем устойчивости образцов в данном эксперименте являлось проявление побегообразования в жестких селективных условиях. Различия в характере ответной реакции на стресс между генотипами обусловлены особенностями, в частности, эффектом скорости развития, а также изменениями в перестройке биологической системы при переходе из одного состояния в другое [12, 13].

При характеристике признака засухоустойчивости *in vitro* сорта разделяли на группы:

$Ir \leq 25$ – засухоустойчивость низкая;

$Ir \leq 25-50$ – средняя;

$Ir \leq 50-75$ – повышенная;

$Ir \leq 75-100$ – высокая.

Сравнительное изучение сортов яровой мягкой пшеницы показало, что индексы устойчивости коллекционных образцов, определенные путем тестирования довольно сильно различаются (таблица 1).

Таблица 1. Результаты тестирования сортов яровой мягкой пшеницы *in vitro*

Генотип	T, период всходы – колошение, сут.	V, скорость развития	I, индекс устойчивости <i>in vitro</i>	P, коэффициент жесткости среды
Асар	45	0,20	60,00	0,96
Степная 75	43	0,20	65,00	0,92
Степная 1583-08	53	0,21	60,00	1,00
ГВК 2033-7	50	0,17	16,67	0,98
ГВК 2036-15	49	0,18	57,89	0,75

ГВК 2055-1	44	0,18	60,00	0,78
Лютесценс 342	45	0,20	22,22	0,96
Лютесценс 823	50	0,20	55,00	0,92
Лютесценс 2	46	0,18	25,00	0,75
Лютесценс 4	45	0,20	20,00	0,88
Эритроспермум 5	49	0,20	16,67	0,92
Лютесценс 1558	49	0,18	20,00	0,78
Лютесценс 1569	45	0,18	25,00	0,78
Лютесценс 1614	47	0,20	55,56	0,92
Лютесценс 9-33	52	0,19	45,00	0,84
Пиротрикс 35-86	45	0,17	77,59	0,69
Линия 165	44	0,20	50,00	0,92
Линия 18001	54	0,20	60,00	0,96
Фитон 43	55	0,17	57,89	0,64
Фитон С 50 ЧС	54	0,16	33,33	0,62
Экада 113	49	0,20	46,67	0,92
Владимир	46	0,18	36,84	0,78
Целина 50	47	0,20	55,56	0,88
Солгустык Север)	46	0,19	15,00	0,84
Стандарт раннес.	42	0,20	65,00	0,88
Стандарт средн.	45	0,21	66,67	1,00
Стандарт поздн.	48	0,20	80,00	0,92
Памяти Азиева	44	0,19	66,67	0,81
Терция	47	0,20	52,63	0,96
Астана 2	45	0,19	44,44	0,84
Степная волна	47	0,20	55,56	0,92
Лютесценс 697	45	0,19	50,00	0,84
Лютесценс 844	46	0,20	44,44	0,92
П-23-14	46	0,20	58,33	0,88
П-89А	48	0,20	27,78	0,88
П-40	45	0,19	52,94	0,81
Линия 96/99-14	47	0,20	36,84	0,92
Линия 241-00-4	48	0,19	38,89	0,84
Новосибирская18	50	0,19	27,78	0,81
Новосибирска 31	49	0,18	28,57	0,75
Лютесценс 89-06	45	0,18	26,32	0,78
Лютесценс172-01	44	0,20	22,22	0,92
Эритроспермум 95-07	49	0,20	41,18	0,96
Омская 41	46	0,18	52,94	0,78
Лютесц.151/03-85	48	0,20	50,00	0,88
Лютесц. 311/00-22-6	49	0,19	33,33	0,81
Лютесц. 23490	45	0,18	61,11	0,78

Результаты показали, что, в основном, изученные сорта характеризуются средней и повышенной устойчивостью к селективным условиям *in vitro*. Только 2 образца – Линия Пиротрикс 35-86 (селекции Павлодарского НИИСХ) и местный раннеспелый стандарт показали высокую степень устойчивости к культивированию *in vitro*.

Менее устойчивыми к воздействию селективных агентов были такие образцы как ГВК 2033-7, Лютесценс 342, Лютесценс 2, Лютесценс 4, Эритроспермум 35, Лютесценс 1558, Лютесценс 1569, Солгустык (Север), Лютесценс 172-01.

Корреляционный анализ полученных данных показал, что наиболее высокая обратная взаимосвязь ($k=-0,993$) выявлена между показателем скорости развития (V) и периодом всходы - колошение, также высокая положительная корреляция ($k=0,812$) обнаружена между скоростью развития и коэффициентом жесткости среды. Если по скорости развития генотипы отличались между собой незначительно, то коэффициент жесткости среды показал, что среди коллекционных образцов имеются генотипы, которые могут выдержать более жесткие условия культивирования *in vitro* в присутствии осмотиков – это сорта Пиротрикс 35-86, Фитон 43, Фитон С 50 ЧС, Лютесценс 24, Новосибирская 31, показатель которых был меньше 0,75. Данные сортообразцы могут представлять интерес для дальнейших исследований с целью получения осмотолерантных форм методами биотехнологии.

Полученные результаты дают основание предположить, что тестирование *in vitro* может быть одним из способов отбора селекционного материала на устойчивость к неблагоприятным абиотическим факторам среды, в частности к засухе.

Прямая оценка засухоустойчивости в поле при всей ее объективности требует многолетних наблюдений. Засуха бывает не каждый год, изменяется и ее характер. Для ускорения селекционного процесса в последнее время все чаще прибегают к косвенной оценке засухоустойчивости с помощью лабораторных физиологических методов. Особый интерес представляют методы ранней диагностики на семенах и проростках в растворах осмотиков, иммитирующих недостаток влаги, поскольку они позволяют проводить оценку круглый год и анализировать большое количество селекционного материала.

Способность семян прорасти в этих условиях отражает, с одной стороны, наследственное свойство прорасти при относительно меньшем количестве воды, с другой – наличие высокой сосущей силы, обеспечивающей быстрое поглощение нужного количества воды.

Отмечена положительная корреляция между способностью семян прорасти в растворах осмотиков и засухоустойчивостью [14]. Высокая сосущая сила семян обуславливает не только лучшее прорастание при недостатке влаги, но и формирование более мощной первичной корневой системы, что имеет большое значение для дальнейшей жизнедеятельности растений, особенно в засушливые годы или в засушливых регионах. Таким образом, проявление свойств проростка в значительной мере влияют на формирование засухоустойчивости у взрослого растения.

Семена каждого сорта разнообразны, одни способны прорасти при более высоком осмотическом давлении, другие при низком, поэтому, чем больше первых семян, тем выше процент их прорастания при какой-то одной средней концентрации осмотика.

Для мягкой пшеницы осмотическое давление составляет 16 ат, концентрация раствора сахарозы 17,6%. Предварительно простерилизованные семена пшеницы раскладывали на фильтровальную бумагу в чашки Петри по 50 штук в каждую в 2-кратной повторности в опытном и контрольном варианте. В каждую чашку наливали эквивалентное количество раствора сахарозы (опыт) или воды (контроль). По истечении 5 суток проводили подсчет проросших семян, определяли биометрические характеристики проростков.

Показателем устойчивости генотипов к осмотическому стрессу являлась степень депрессии в накоплении сухой массы проростками при повышенном осмотическом давлении. Чем меньше подавлялся рост и накопление биомассы проростков пшеницы в растворе сахарозы по сравнению с контролем, тем устойчивее образец.

Реакцию устойчивости генотипов определяли в соответствии со следующей градацией:

Z ≤ 5% – высокоустойчивые;

Z ≤ 20% – устойчивые;

Z ≤ 40% – слабоустойчивые;

Z ≤ 60% – восприимчивые.

Суммарная оценка устойчивости учитывала все 3 показателя устойчивости - *in vitro*, лабораторную и полевую оценки (таблица 2).

Таблица 2. Результаты оценки засухоустойчивости сортов яровой мягкой пшеницы *in vitro*, в лабораторных и полевых условиях

Генотип	I, индекс устойчивости <i>in vitro</i>	Полевая устойчивость, балл	Z, степень депрессии (%)	Характеристика признака устойчивости
Асар	60,00	4,3	2,86	Высокая
Степная 75	65,00	4,0	15,00	Повышенная
Степная 1583-08	60,00	4,5	25,30	Высокая
ГВК 2033-7	16,67	3,8	44,71	Слабая
ГВК 2036-15	57,89	3,8	54,12	Повышенная
ГВК 2055-1	60,00	4,0	73,87	Повышенная
Лютесценс 342	22,22	3,5	82,00	Слабая
Лютесценс 823	55,00	3,8	64,29	Повышенная
Лютесценс 2	25,00	4,0	53,20	Слабая
Лютесценс 4	20,00	3,5	87,80	Слабая
Эритроспермум 35	16,67	4,0	77,78	Слабая
Лютесценс 1558	20,00	4,0	32,14	Слабая
Лютесценс 1569	25,00	4,3	78,67	Слабая
Лютесценс 1614	55,56	3,8	86,39	Повышенная
Лютесценс 9-33	45,00	4,5	73,68	Повышенная
Пиротрикс 35-86	77,59	4,0	7,83	Высокая

Линия 165	50,00	3,3	63,64	Средняя
Линия 18001	60,00	3,3	46,67	Повышенная
Фитон 43	57,89	4,0	93,33	Повышенная
Фитон С 50 ЧС	33,33	4,0	89,01	Средняя
Лютесценс 24	55,00	4,0	82,19	Повышенная
Экада 113	46,67	3,5	79,52	Средняя
Владимир	36,84	4,3	84,82	Средняя
Целина 50	55,56	3,8	73,33	Повышенная
Солгустык (Север)	15,00	3,5	70,37	Слабая
Стандарт ранес.	65,00	4,0	90,28	Повышенная
Стандарт сред.	66,67	4,0	79,61	Повышенная
Стандарт позд.	80,00	4,0	7,23	Высокая
Памяти Азиева	66,67	4,0	89,47	Повышенная
Терция	52,63	4,0	88,24	Повышенная
Астана 2	44,44	3,8	91,11	Средняя
Степная волна	55,56	3,8	84,00	Повышенная
Лютесценс 697	50,00	3,8	53,62	Средняя
Лютесценс 844	44,44	3,5	90,80	Средняя
П-23-14	58,33	3,3	75,61	Повышенная
П-89А	27,78	3,8	82,61	Средняя
П-40	52,94	3,3	88,75	Повышенная
Линия 96/99-14	36,84	3,5	2,78	Повышенная
Линия 241-00-4	38,89	3,8	84,62	Средняя
Новосиб.18	27,78	4,0	94,69	Средняя
Новосиб. 31	28,57	4,0	90,67	Средняя
Лют. 89-06	26,32	3,8	73,68	Средняя
Лют. 172-01	22,22	3,3	84,44	Слабая
Эритросп. 95-07	41,18	3,8	91,67	Средняя
Омская 41	52,94	3,8	48,28	Повышенная
Лют.151/03-85	50,00	3,5	60,00	Средняя
Лют.311/00-22-6	33,33	4,0	81,98	Средняя
Лют. 23490	61,11	3,8	46,91	Повышенная

В целом, можно отметить, что показатели устойчивости, проведенные на различных уровнях организации (клетки, проростки и взрослые растения) в основном совпадали для большинства исследованных генотипов, что позволяет сделать вывод о том, что для оценки селекционного материала необходимо использовать все 3 метода.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты дают основание утверждать, что при проведении оценки на засухоустойчивость необходимо использовать комплекс методов, с помощью которых можно было бы оценивать не только различные стороны засухоустойчивости сортов пшеницы на ранних этапах развития растений, но и прогнозировать их потенциальную урожайность. Это важно еще и потому, что засухоустойчивые формы, как правило, являются низкоурожайными вследствие противоречия этих двух свойств растений. Поэтому необходимо отбирать формы, сочетающие их на определенном уровне в одном генотипе.

Оценку селекционного материала на засухоустойчивость необходимо проводить с использованием методов оценки *in vitro*, а также лабораторных и полевых испытаний.

В результате проведенных исследований было установлено, что показатели устойчивости, проведенные на различных уровнях организации (клетки, проростки и взрослые растения) в основном совпадали для большинства исследованных генотипов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tardieu F. Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress // *Com.Rend.Geosci.* - 2005. - Vol. 337. - P. 57-67.
2. Россеев В.М. Реакции клеточных систем зерновых культур *in vitro* и биотестирование селекционного материала на устойчивость к неблагоприятным абиотическим факторам среды: автореф. ... канд. с.-х. наук. - Омск, 2001. - 16 с.

3. Мелехов Е.И. Принцип регуляции скорости процесса повреждения клетки и реакция защитного торможения метаболизма (РЗТМ) // Журнал общей биологии. – 1985. - № 46. – С. 174-189.
4. Атимощае М.В., Мустяуа Н.В. Способ определения засухоустойчивости пшеницы / Институт физиологии и биохимии растений АН Молдавии, опубли. 28.02.87, Бюлл. №8.
5. А.с. 1494878 СССР, МКИ⁴ АО1G7/00. Способ оценки засухоустойчивости яровой пшеницы / Игнатъев Л.А. / Институт почвоведения и агрохимии СО АН СССР N427-2555/30-13: заявл. 10.04.87; опубли. 23.07.89; Бюлл. №27.
6. А.с. 1209097 СССР, АО1G7/00 АО1Н1/04. Способ оценки устойчивости растений к низким положительным температурам на ранних этапах онтогенеза / Родченко О.П., Бурбанова Р.С. / Сиб. ин-т физиол. и биох. растений. 3673802/30-15; заявл. 15.12.83; опубли. 07.02.86; Бюлл. №5.
7. Калоша О.И., Шматько И.Г., Полтарев Е.И. Унифицированные методы оценки селекционного материала на зимостойкость и засухоустойчивость. - Киев: ИФР АН УССР, 1976. – С. 30.
8. Калашикова Е.А. Клеточная селекция растений на устойчивость к грибным болезням: дис. ... докт. биол. наук. – М., 2003. – С. 282.
9. Россеев В.М., Белан И.А., Россеева Л.П. Тестирование *in vitro* яровой мягкой пшеницы на засухоустойчивость // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. - 2011. - №2 (76). – С. 32-34.
10. Россеев В.М. Реакции клеточных систем зерновых культур *in vitro* и биотестирование селекционного материала на устойчивость к неблагоприятным абиотическим факторам среды: автореф. ... канд. с.-х. наук: 06.02.01. – Омск, 2001. – С. 16.
11. Зыкин В.А., Россеева Л.П., Белан И.А., Кадиков Р.К. Методика оценки селекционных форм и сортов мягкой пшеницы при испытании на отличимость, однородность и устойчивость к факторам среды: метод. рекоменд. – Уфа, 2004. – С. 39.
12. Россеев В.М. Реакции клеточных систем зерновых культур *in vitro* и биотестирование селекционного материала на устойчивость к неблагоприятным абиотическим факторам среды: автореф. ... канд. с.-х. наук: 06.02.01. – Омск, 2001. – С. 16.
13. Веселова Т.В. Стресс у растений (биофизический подход). - М.: Изд-во Моск. ун-та, 1993. – С. 144.
14. Россеев В.М., Белан И.А., Россеева Л.П. Тестирование *in vitro* яровой мягкой пшеницы на засухоустойчивость // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. - № 2(76). - С. 32-34.

ТҮЙІН

Құрғақшылық өсімдіктер өнімділігі азаюының негізгі себепшісі болып табылады. Құрғақшылық жылдары ауыл шаруашылығын шығындардан сақтау үшін ылғалдың тапшылығына төзімді бидай, қара бидай және басқа дақылдардың сорттары болуы қажет. Құрғақшылыққа төзімді өсімдіктер ауаның жоғары температурасы, топырақтың төмен ылғалдылығы кезінде суды тиімді пайдаланып, жоғары әрі сапалы өнім бере алады.

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде селекциялық материалды құрғақшылыққа төзімділікке бағалау жүргізілді. Селекциялық материалды құрғақшылыққа төзімділікке бағалау үшін бидайды *in vitro* тестілеудің модификацияланған әдіснамасын қолданылды. Эксплант ретінде бидай дәндерінің піскен ұрықтары пайдаланды.

Үлгілердің қатаң селективті жағдайда өркен түзе алу қабілеті төзімділіктің белгісі болып саналды. Зерттеуге алынған сорттар *in vitro* жағдайында селективті факторға орташа және жоғары төзімділік танытты.

Зертханалық әдістер құрғақшылыққа төзімділікті анықтаудың қарапайым әдістері болып табылады. Генотиптердің осмотикалық стресске төзімділігінің белгісі ылғалдың жеткіліксіздігін туғызатын жағдайда дәндердің өніп-өсуге қабілеті мен құрғақ массаны жинақтаудағы депрессия дәрежесі болып табылады. Неғұрлым өсу қабілеті мен бидай өскіндері биомассасының жинақталуы тежелген сайын, соғұрлым алынған үлгі төзімдірек болды.

Кілтті сөздер: жаздық жұмсақ бидай, *in vitro*, құрғақшылық, тестілеу.

SUMMARY

Drought - one of the main reasons why the productivity of plants. To ensure that agriculture from losses during drought years, you need to have resistant to moisture deficit varieties of wheat, barley and other crops. Plants under drought meant their ability to most efficiently use the water at high temperature, low humidity, soil and air, and in these conditions give high yield and good quality products. In terms of agronomic drought - is not the survival of plants under drought conditions, and the ability to maintain a relatively high level of productivity in the shortage of water [1]. Throughout the world, there are many publications devoted to the problem of obtaining varieties of spring wheat that are resistant to drought. The studies assessed the breeding material for drought tolerance. To assess the sustainability of breeding material for drought used a modified test procedure wheat *in vitro*. Used as explants mature embryos of wheat seeds. An indicator of the stability of the samples in this experiment was the manifestation

of shoot in harsh selective conditions. Characterized studied variety of medium and high resistance to selective conditions in vitro. Laboratory methods are the most simple methods of mass estimation of drought. An indicator of the stability of genotypes to osmotic stress is a degree of depression in the accumulation of dry matter sprouts with increased osmotic pressure. The less inhibited growth and biomass accumulation wheat seedlings in a sucrose solution as compared with the control, the more stable the sample.

Keywords: spring wheat, variety, in vitro, drought tolerance, testing