

- дохранилищах // Природа Симбирского Поволжья: сб. науч. тр. Ульяновск, 2002. Вып. 3. С. 198-199.
7. *Аникин В.В.* К распространению *Apterona helicoidella* Vall., 1827 (Lepidoptera; Psychidae) в Нижнем Поволжье // Энтомол. и паразитол. исследования в Поволжье: сб. науч. трудов. Саратов: Изд-во Саратов. гос. ун-та, 2008. Вып. 7. С. 107-109.
 8. *Anikin V.V., Sachkov S.A., Zolotuhin V.V.* «Fauna Lepidopterologica Volgo-Uralensis» 150 years later: changes and additions. Part 2. Bombyces and Sphingidae (Insecta, Lepidoptera) // *Atalanta*. 2000. V. 31. № 1/2. P. 265-292.
 9. *Аникин В.В.* К распространению бражника облепихового – *Hyles hipporphaes* (Esper, 1793) (Lepidoptera, Sphingidae) в Нижнем Поволжье // Энтомол. и паразитол. исследования в Поволжье. Саратов, 2004. Вып. 3. С. 40-41.
 10. *Burton J.F.* Birds and Climate Change. L., 1995. 376 с.
 11. *Формозов А.Н.* География населения наземных животных и методы его изучения // Изменения границ распространения млекопитающих и птиц. М.: Изд-во АН СССР, 1959. С. 176-195.
 12. *Переведенцев Ю.П., Матвеев Ю.Л., Тудрий В.Д.* Основы экологии атмосферы. Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2000. Ч. 2. С. 1-60.
 13. *Израэль Ю.А., Груза Г.В., Катцов В.М., Мелешко В.П.* Изменения глобального климата. Роль антропогенных воздействий // Метеорология и гидрология. 2001. № 5. С. 5-21.
 14. *Krivenko V.G.* Modern dynamics of bird ranges in Eurasia as a result of cyclical variations in climate // *Abstr. 22nd Int. Ornithol. Congr. Ostrich*, 1998. V. 69. № 3-4. P. 294.
 15. *Туткова Т.Б.* Изменения климата полупустынь Прикаспия и Турция в XX в. // Изв. РАН. Сер. геогр. 2003. № 1. С. 106-117.
 16. *Денисов В.П.* О гибридизации видов рода *Citellus* Oken // Зоол. журн. 1963. Т. 12. Вып. 12. С. 1887-1889.
 17. *Ермаков О.А.* Большой и малый суслики в Поволжье: их распространение и взаимоотношения: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1996. 24 с.
 18. *Ермаков О.А., Тутов С.В., Быстракова Н.В.* Сведения о современном состоянии зоны контакта ареалов малого (*Spermophilus rugtaeus* Pallas, 1778) и крапчатого (*S. suslicus* Guldensstaedt, 1770) сусликов в Поволжье // Биоресурсы и биоразнообразие экосистем Поволжья: прошлое, настоящее и будущее: материалы Междунар. совещ. Саратов, 2005. С. 153-154.
 19. *Опарин М.Л., Тихонов И.А., Опарина О.С., Ковальская Ю.М.* Изменение распространения некоторых видов млекопитающих в саратовском Заволжье в конце XX столетия // Поволжский экол. журн. 2002. № 1. С. 72-76.
 20. *Богданов М.Н.* Птицы и звери черноземной полосы Поволжья и долины Средней и Нижней Волги (биогеографические материалы) // Труды общества естествоиспытателей при императорском Казанском университете. Казань, 1871. Т. 1. Вып. 1. С. 4-158.
 21. *Житков Б.М.* Материалы по фауне млекопитающих Симбирской губернии // Известия Императорского общ-ва любителей естествознания, антропологии и этнографии. 1889. Т. 86. С. 1-3; 10-12.
 22. *Федорович Ф.Ф.* Звери и птицы Пензенской губернии // Труды общ-ва любителей естествознания. Пенза, 1915. Вып. 2. С. 43-76.
 23. *Гурылева Г.М.* Экологические зональные комплексы млекопитающих Ульяновской, Пензенской и Правобережья Саратовской области // *Вопр. биогеографии Среднего и Нижнего Поволжья*. Саратов, 1968. С. 259-267.
 24. *Елатвевский В.С., Ларина Н.И., Голикова В.Л.* Млекопитающие Саратовской области // *Ученые записки Саратовского университета*. Саратов: Изд-во СГУ, 1950. Т. 26. С. 37-46.
 25. *Тутов С.В.* Взаимоотношения крапчатого и большого сусликов в недавно возникшей зоне симпатрии: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1999. 24 с.
 26. *Тутов С.В.* Современное распространение и изменение численности крапчатого суслика в восточной части ареала // Зоол. журн. 2001. Т. 80. Вып. 2. С. 230-235.
 27. *Шилова С.А., Шекарова О.Н.* Суслики Евразии. Проблема охраны // *Степной бюллетень*. 2005. № 18. С. 20-25.
 28. Красная книга Саратовской области. Саратов: Изд-во Торгово-промышленной палаты Саратов. обл., 2006. 528 с.

Поступила в редакцию 20 сентября 2012 г.

Shlyakhtin G.V., Anikin V.V., Mosolova E.Y. CLIMATE CHANGE AND BIODIVERSITY OF FAUNA OF NORTHERN PART OF LOWER VOLGA REGION

Climate change in northern part of Lower Volga is the most important factor in determining the current state of communities of insects, birds and mammals. One of the features of a modern functioning of natural systems and the individual species present in them, is their significant destabilization. Along with climate fluctuations the majority of animal species are affected by anthropogenic factors. The systems of animals from different landscapes of region, greatly "changed" their border areas over the past 50–100 years are established. The appearance of previously non-noted species from the southern and northern adjacent areas are given.

Key words: climate; biodiversity of animals; north of Lower Volga region; Russia.

УДК 631.524:631.95

УСИЛЕНИЕ СПЕКТРА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ АГРОЭКОСИСТЕМ

© Д.Г. Шорников, Н.В. Соловых, М.Б. Янковская,
О.А. Олейникова, А.В. Будаговский, О.В. Поротикова

Ключевые слова: тканевая селекция; соматклональная изменчивость; андрогенез; культура тканей; *in vitro*.

Целью исследований является разработка методических приемов расширения генетического разнообразия некоторых плодовых и ягодных культур с применением культуры тканей и экспериментальной гаплоидии *in vitro*. В результате проведенных исследований оптимизированы условия скрининга и регенерации стрессоустойчивых форм, изучено влияние амитотика и отдельных факторов культивирования на уровень пролиферации и интенсивность андрогенеза ягодных культур *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ

Масштабная хозяйственная деятельность человека в настоящее время представляет одну из причин серьезного смещения экологического равновесия в биосфере Земли. Как отмечает В.В. Моргун с соавторами [1], основным фактором глобального изменения климата

является увеличение концентрации CO₂ в атмосфере, вследствие чего повышаются среднегодовые температуры, изменяется количество и характер распределения осадков. В этой связи специалисты прогнозируют существенное снижение влажности почвы в отдельных регионах, преимущественно с умеренным климатом, и повышение вероятности возникновения засух, при этом

наиболее уязвимыми к действию негативных факторов окружающей среды оказываются созданные самим же человеком агроэкосистемы, занимающие более 37 % суши. Одной из основных причин слабой адаптивности агрофитоценозов является низкий уровень генетического разнообразия культивируемых сортов и гибридов как результат селекции преимущественно на максимальную продуктивность в ущерб прочим адаптивно значимым качествам. В то же время известно, что именно высокий полиморфизм особей и широкая гетерозиготность популяции являются важнейшими факторами экологической устойчивости в изменяющихся условиях окружающей среды [2–3].

Таким образом, расширение генетического разнообразия сельскохозяйственных растений представляет собой важную задачу, решение которой способствует усилению адаптивного потенциала на уровне отдельных организмов и антропогенных экосистем в целом. Это особенно важно, поскольку роль общей адаптивности растений в обеспечении стабильной урожайности в будущем будет только возрастать [2]. Учитывая, что адаптивная ценность заключается не в максимальном проявлении отдельных признаков, а в их взаимодействии на уровне средних проявлений [4], современный генотип сельскохозяйственного растения должен сочетать стабильную, пусть и несколько меньшую, урожайность с комплексной устойчивостью к стресс-факторам окружающей среды.

Современная биология располагает методами управления наследственным аппаратом растительной клетки, эффективность которых различна, а целесообразность применения определяется общим направлением селекционной работы. В первую очередь, это методы классической селекции, направленные на создание новых организмов на основе генетического материала родительских пар, и биотехнологические методы, позволяющие избирательно модифицировать сорт по какому-либо одному или комплексу признаков, повышая его экологическую пластичность. Наиболее широкие возможности при этом открывает культура каллусов, т. к. в процессе дедифференцировки нарушаются механизмы контроля генетической стабильности, что приводит к формированию группы клеток, несущих разный набор хромосом либо отличающихся от материнской ткани иной экспрессией генов. Используя на данном этапе различные селективные факторы, можно изменять направление отбора в нужную сторону, усиливая желаемые качества растительного организма. Большое значение имеет исходная плоидность ткани, из которой индуцируют каллус. Так, особый интерес представляют микрорастения, полученные в культуре каллусов, индуцированных из незрелой пыльцы высших растений. Такие генотипы могут являться источниками хозяйственно-значимых признаков и должны включаться в селекционные программы для дальнейшей работы с ними.

Целью нашей работы являлась разработка методических приемов расширения генетического разнообразия некоторых плодовых и ягодных культур с применением культуры каллусной ткани и экспериментальной гаплоидии *in vitro*.

В качестве растительного материала на различных этапах исследования использовали сегменты и целые листовые пластинки, взятые со стерильных микропобегов, культивируемых *in vitro*, каллусные ткани, микрочеренки с апикальной меристемой, а также пыльники, выделенные из бутонов интактных плодовых и ягодных растений *in vivo*. Культуру органов и тканей вели при освещенности 3500 лк и фотопериоде 16 часов день/8 часов ночь или в темноте при температуре +22...24 °C на базовых средах по прописям Murashige-Skoog [5], Quorin-Lepoivre [6] в модификации Standardi-Catalano [7] и в собственной модификации с использованием таких регуляторов роста, как 6-бензиламинопурин (6-БАП), зеатин, кинетин, β -индолил-3-масляная (ИМК) и 2,4-дихлорфеноксиуксусная (2,4-D) кислоты. В качестве амитотика применяли колхицин в концентрации 0,001 и 0,01 мг/л, добавляя непосредственно в питательную среду. Для усиления жизнеспособности экспланты обрабатывали низкоинтенсивным когерентным излучением (НКИ) гелий-неонового лазера ЛГ-113 (длина волны – 632,8 нм, плотность мощности – 10–12 Вт/м²). Эффективность культивирования оценивали по следующим показателям: процент каллусообразования, процент выживших каллусов, процент регенерации и коэффициент размножения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В основе успешной индукции и скрининга стрессоустойчивых регенерантов лежит совокупность отработанных методических приемов, включающих получение и культивирование каллусной ткани на селективных средах, а также регенерацию микропобегов из отселектированных каллусов. Каждый этап предполагает индивидуальную оптимизацию условий для группы сортов или отдельного сорта с учетом генотипических требований данного организма к химическим и физическим факторам культуры *in vitro*.

Ранее было установлено, что оптимальной питательной средой для каллусогенеза и отбора каллусов *in vitro* на резистентность к селективным факторам для представителей рода *Rubus* является среда по прописи Murashige-Skoog (1962), содержащая 2 мг/л ИМК, или 2,4-D. Оптимальные концентрации хлорида натрия для отбора изолированных тканей на устойчивость к избыточному засолению для сортов ежевики, малины красной и малино-ежевичных гибридов составили 50–60 мМ. Для исходно менее солеустойчивой культуры малины черной необходимо снизить концентрацию хлорида натрия до 40 мМ. При таком содержании стрессора погибает примерно 50 % эксплантов, что обеспечивает наиболее эффективный отбор солеустойчивых каллусов (рис. 1). Концентрации хлорида натрия выше 40 мМ снижали жизнеспособность эксплантов до 10–15 % или приводили к полной гибели материала.

Увеличение количества пассажей на селективных средах является действенным приемом усиления пролиферации каллусных культур на средах, содержащих высокие концентрации NaCl (рис. 2). За счет элиминации неустойчивых клеток в гетерогенных каллусных

тканях формируется резистентная к данному стрессору клеточная популяция, что и является реализацией основного этапа тканевой селекции.

Следующим этапом тканевой селекции является регенерация адвентивных побегов из отобранных на устойчивость каллусов. Индукция морфогенеза была успешно осуществлена на питательных средах по прописям MS и QL в присутствии 2 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л ИМК.

Положительное влияние на частоту регенерации у ежевики и малино-ежевичных гибридов оказало применение тиадазурона вместо 6-БАП. Замена 6-БАП на зеатин в аналогичной концентрации усиливала регенерацию с 18,5 до 32,0 % у малины черной (рис. 3).

Наличие надежных приемов регенерации адвентивных побегов из выживших каллусов является залогом успешной тканевой селекции на устойчивость к тому или иному стрессору. При этом сами по себе процессы дедифференциации и последующего формирования меристематических зон в недифференцированной ткани также могут служить источником изменчивости у вегетативного потомства.

Так, адаптированные *in vivo* и высаженные в открытый грунт регенеранты жимолости сорта Длинноплодная, индуцированные из каллусной ткани в отсутствие каких-либо стресс-факторов, в двухлетнем возрасте демонстрировали существенные различия по количеству и силе роста сформированных побегов

(рис. 4). При этом были выделены формы как уступающие исходным растениям, так и превосходящие их по данным показателям.

Дополнительным фактором, индуцирующим генетические изменения, являются амитотики, из которых наиболее широко применяются колхицин и аценафтен. Мы культивировали микропобеги двух сортов ежевики на среде размножения, содержащей 0,01 (B1) и 0,001 мг/л (B2) колхицина. Поскольку данное вещество даже в невысоких концентрациях существенно угнетает рост и развитие микропобегов, мы использовали его совместно с лазерным излучением – фактором, обладающим ярко выраженным антистрессовым воздействием на растительный организм. Как показали результаты эксперимента, чувствительность к колхицину в разных концентрациях обусловлена сортовой специфичностью растительного материала, тем не менее, депрессия ростовых процессов была четко выражена у эксплантов, не подвергавшихся дополнительной обработке лазерным излучением.

При совместном применении стрессора (колхицин) и антистрессора (лазерное излучение) коэффициент размножения сортов ежевики возрастал, существенно превышая контрольные значения (рис. 5).

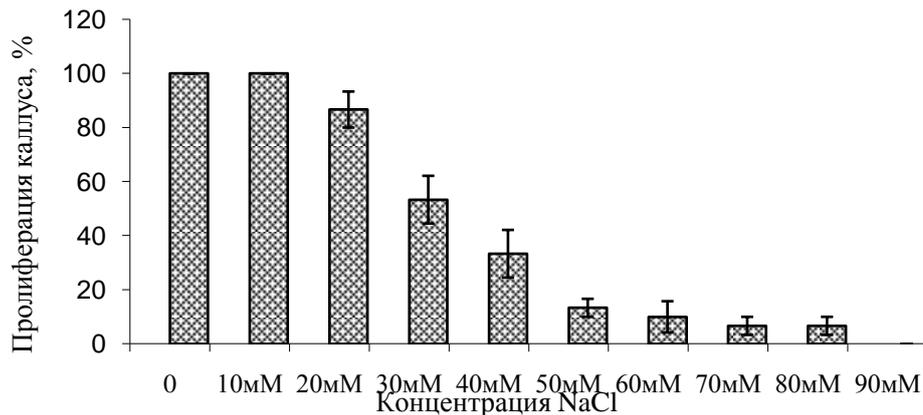


Рис. 1. Пролиферация каллуса малины черной сорта Кумберленд на средах с различными концентрациями хлорида натрия

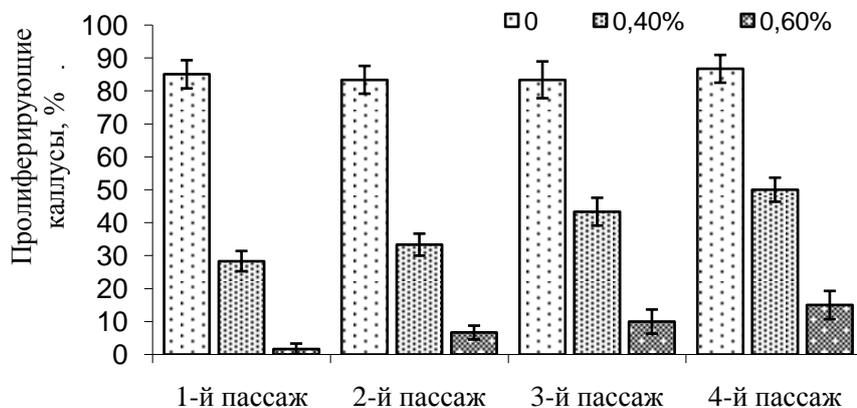


Рис. 2. Влияние числа пассажей на пролиферативную активность каллусной ткани малины черной на селективной среде

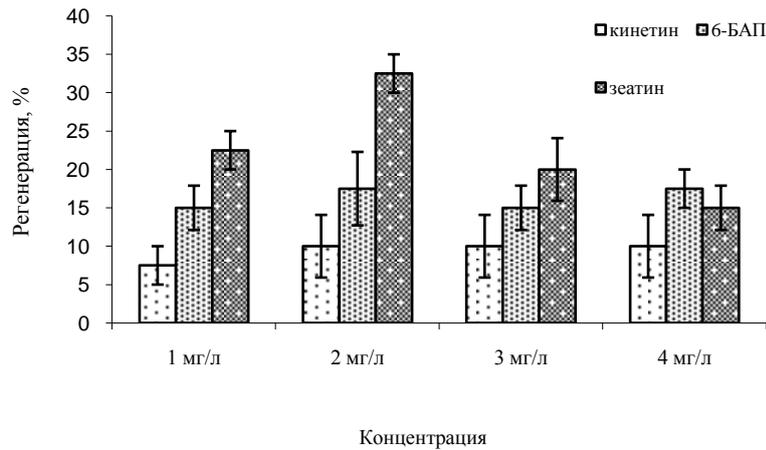


Рис. 3. Влияние концентрации и типа цитокинина на регенерацию адвентивных побегов в культуре каллусов малины черной

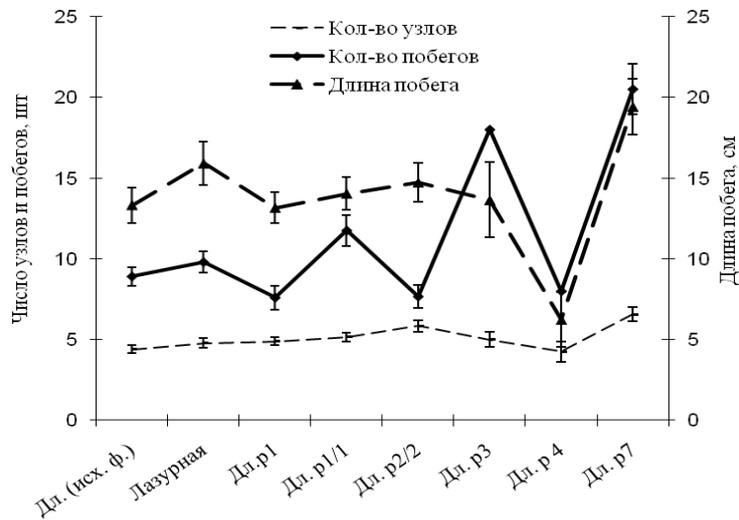


Рис. 4. Варьирование морфологических параметров у 2-летних растений жимолости сорта Длинноплодная, полученных в результате индукции морфогенеза в культуре каллусов (Дл. (исх. ф.) и Лазурная – контрольные формы, полученные клонированием меристем)

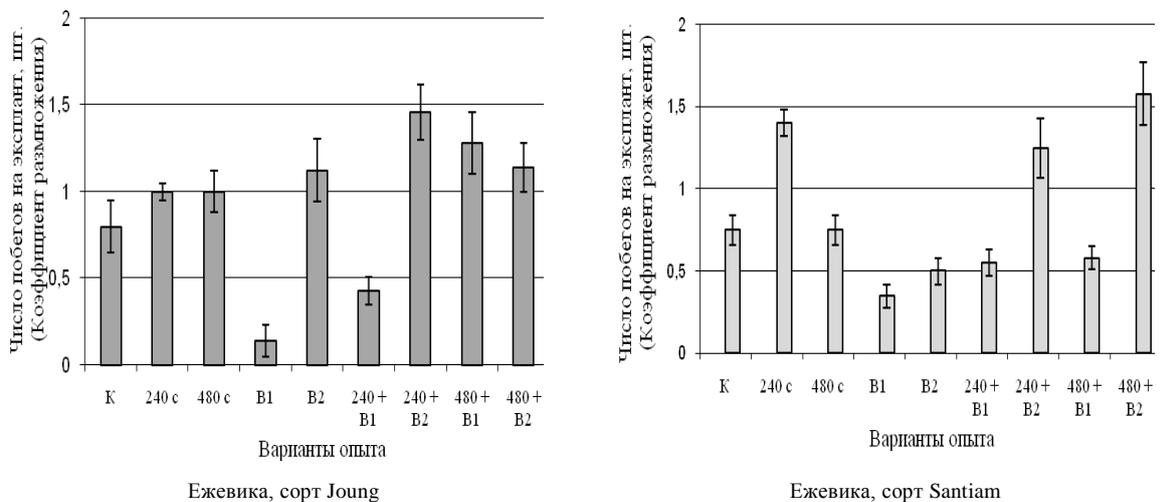


Рис. 5. Совместное действие колхицина и лазерного излучения на пролиферацию микропобегов ежевики (К – необработанный контроль; B1и B2 – концентрации колхицина 0,01 и 0,001 мг/л соответственно; 240 и 480 – время облучения, с)

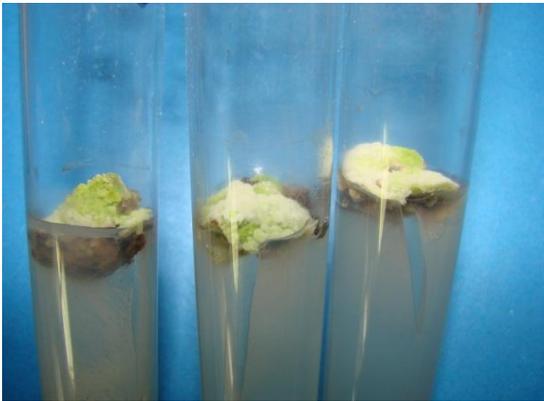
В ряду: колхицин 0,01 мг/л; колхицин 0,01 мг/л + лазерное облучение 240 с; колхицин 0,01 мг/л + лазерное облучение 480 с уровень пролиферации сорта *Joung* изменялся с 0,1 до 1,3 новых побега на эксплант, различия существенны при $\alpha = 0,10$. Очевидно, пониженная концентрация колхицина (0,001 мг/л) не оказывает существенного токсического влияния на данный генотип, вследствие чего стимуляционный эффект НКИ был менее выражен в соответствии с принципом несамодостаточности действия лазерного излучения.

Напротив, у сорта *Santiam* при практически равном угнетении побегообразования на двух концентрациях колхицина без лазерной обработки облучение НКИ существенно усиливало пролиферацию микрочеренков, культивируемых на среде, содержащей 0,001 мг/л колхицина, с 0,5 до 1,6 новых побегов на эксплант. Негативное действие высокой концентрации амитотика преодолено не было, хотя и была выявлена тенденция активизации пазушных меристем, выраженная в незна-

чительном росте коэффициента размножения с 0,4 до 0,6.

Таким образом, несмотря на различные генотипические реакции растений, дополнительное применение НКИ повышает жизнеспособность обработанных амитотиком объектов, обеспечивая выживание потенциально измененных генотипов и повышая эффективность отбора на данном этапе культивирования.

Принципиально иной путь реализуется при получении андрогенных растений-регенерантов *in vitro*. Изолированная гаплоидная пыльца формирует каллус, содержащий клетки различного уровня плоидности, в т. ч. и гаплоидные, способные дать начало регенерантам с редуцированным набором хромосом. После перевода на диплоидный уровень такие генотипы являются гомозиготами по ряду хозяйственно ценных признаков, передающими эти качества потомству с высокой частотой. Использование гомозиготных растений в селекционном процессе позволяет значительно, на несколько



А)



Б)



В)



Г)

Рис. 6. Андрогенные каллусы и побеги-регенеранты на этапе пролиферации: А) андрогенные каллусы груши сорта Северянка; Б) формирование морфогенных зон в каллусах груши сорта Северянка; В) укорененные андрогенные регенеранты вишни Владимирской; Г) андрогенные регенеранты гибрида 1–2 (Памяти Вавилова Ч Вишня Пенсильванская) гибридных поколений, ускорить процесс получения новых сортов и повысить эффективность генетических

исследований, т. к. при этом легче рассчитать характер расщепления в гибридном потомстве и быстрее получить формы с нужным сочетанием генов.

В нашей работе мы использовали пыльники сортов яблони, несущих доминантные гены моногенной устойчивости к парше и колоннообразного габитуса кроны, сортов и гибридов вишни с генами устойчивости к коккомикозу и сдержанного роста дерева. Исследования позволили выявить специфику и разработать универсальную методику получения андрогенных каллусов практически у всех исследуемых генотипов яблони и вишни. Частота образования морфогенных каллусов колеблется от 3 до 72 % с высокой долей гаплоидных клеток в них, достигающей 20–60 % (рис. 6).

На основе полученных данных была разработана методика индукции побегов из каллусов и получены андрогенные растения-регенеранты сортов яблони Витязь, NHOS, Успенское, Скала, Соколовское и вишни Владимирской, Памяти Вавилова, вишни степной и черемухо-вишневых и вишне-черешневых гибридов. Эффективность регенерации составляла от 20 до 30 % в зависимости от генотипа растения. Цитологические исследования показали, что 80 % регенерантов являются диплоидами, а 20 % составляют гаплоиды, анеуплоиды и полиплоиды, при этом значительная часть изученных растений имеет химерное строение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований оптимизированы условия скрининга и регенерации стрессоустойчивых форм малины черной и ряда представителей рода *Rubus*, изучено влияние амитотика и лазерного излучения на данном этапе на уровень пролиферации некоторых сортов ежевики, получены андрогенные растения регенеранты плодовых культур различных уровней плоидности, несущие гены, контролируемые ряд хозяйственно значимых признаков. Применение биотехнологических методов позволяет расширить спектр генетического разнообразия существующих

сортов и форм, избирательно повышая резистентность к абиотическим стрессорам, создавая новые формы, способные ускорить селекционный процесс и повысить экологическую пластичность искусственных экосистем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Моргунов В.В., Киризи Д.Р., Шадчина Т.М. Экофизиологические и генетические аспекты адаптации культурных растений к глобальным изменениям климата // Физиология и биохимия культурных растений. 2010. Т. 42. № 1. С. 3-22.
2. Жученко А.А. Адаптивное растениеводство (эколого-генетические основы): теория и практика. М.: Агрорус, 2008. Т. 1. 814 с.
3. Боронникова С.В., Мандрица С.А., Светлакова Т.Н., Назаров А.В., Суслонов А.В. Изучение генетического разнообразия растений, произрастающих в условиях нефтяного загрязнения почв, с использованием ISSR-маркеров на примере *Poa Pratensis* L. // Экологическая генетика. 2010. Т. 8. № 1. С. 59-63.
4. Дубинин Н.П. Общая генетика. М.: Наука, 1986. 559 с.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 5. № 95. P. 473-497.
6. Quoirin M., Lepoivre P. Improved medium for in vitro culture of *Prunus* sp. // *Acta Hort.* 1977. V. 78. P. 437-442.
7. Standardi A., Catalano F. Tissue culture propagation of kiwifruit // *Comb. proc. Intern. plant propagators' soc.* 1984. V. 34. P. 236-243.

Поступила в редакцию 12 сентября 2012 г.

Shornikov D.G., Solovykh N.V., Yankovskaya M.B., Oleinikova O.Ya., Budagovskiy A.V., Porotikova O.V. STRENGTHENING OF SPECTRUM OF GENETIC VARIABILITY OF CROPS IN ORDER TO IMPROVE THE ENVIRONMENTAL PLASTICITY OF AGROECOSYSTEMS

The purpose of research is the development of techniques increase of the genetic diversity of some fruit and berry crops with the use of tissue culture and experimental haploidy *in vitro*. The research resulted in optimized conditions screening and stress-resistant forms of regeneration, the influence of individual factors amitotics and culture to the level of proliferation and intensity berry androgenesis *in vitro*.

Key words: fabric selection; somaclonal variation; androgenesis; tissue culture; *in vitro*.