

Селективные приёмы создания форм сахарной свёклы, устойчивых к комплексу стрессовых факторов

Т.П. ЖУЖАЛОВА, гл. научн. сотрудник, д-р биолог. наук, профессор

Н.Н. ЧЕРКАСОВА, ст. научн. сотрудник

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

(e-mail: biotechnologiya@mail.ru)

Введение

В условиях изменений климата и ухудшения окружающей среды создание растений с комплексной устойчивостью к абиотическим стрессам является особенно актуальной и важной частью селекционного процесса. Для повышения стрессоустойчивости растений активное применение нашли биотехнологические методы [4, 3]. Разработка методов на основе селективных систем *in vitro* позволила проводить испытание и отбор устойчивых форм на клеточном уровне. Это дало возможность создавать новый селекционный материал в более короткий период, тем самым сокращая сроки создания высокопродуктивных сортов, приспособленных к возделыванию в стрессовых условиях [5]. Использование в качестве селективных факторов абиотических стрессоров, отличающихся широким спектром токсического воздействия, позволяет отбирать варианты растений с комплексной стрессоустойчивостью. В этом случае данная характеристика может оказаться следствием генетических изменений, но не физиологической адаптацией. Указанному условию отвечают ионы тяжёлых металлов (ИТМ), токсичные в следовых количествах, характеризующиеся широким спектром патологического действия. Однако, как правило, ИТМ, действуя совместно с неблагоприятными абиотическими факторами, усиливают

стрессовое давление окружающей среды, и тем самым расширяется спектр стрессовых поражений растения. С другой стороны, устойчивость к ИТМ может сочетаться с устойчивостью к абиотическим стрессам, где наиболее агрессивным считается влияние осмотического фактора [6, 2]. Поэтому целесообразно использовать их взаимодействие для отбора устойчивых клеточных вариантов.

Исследования по проведению отбора форм сахарной свёклы с устойчивостью к совместному действию ионной токсикации и осмотического стресса отсутствуют. В связи с этим разработка условий для построения эффективных систем *in vitro*, направленных на отбор форм, толерантных к комплексу стрессовых факторов, для использования их в селекции является одним из перспективных и важных направлений биотехнологии растений.

Цель исследований — разработать селективные условия *in vitro* для получения форм сахарной свёклы с комплексной устойчивостью к ионной токсичности и осмотическому стрессу.

Материалы и методы

Научные исследования выполнены на базе лаборатории культуры тканей и молекулярной биологии ФГБНУ ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова с использованием биотехнологических методов культуры *in vitro* [9]. В качестве ис-

ходного материала в опытах были использованы генотипы сахарной свёклы Рамонской селекции.

Культивирование микроклонов проводили при 16-часовом фотопериоде, температуре 23–26 °С, освещённости 5 тыс. люкс и влажности воздуха 70 %. В качестве эксплантов использовали микроклоны — зрелые зародыши сахарной свёклы. В качестве селективного агента к основной среде добавляли ацетат кадмия $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$ в различной концентрации (1–30 мМ), маннит (0,25–0,60 М). Ризогенез проводили на питательной среде с добавлением кадмия и маннита.

Результаты исследований

Изучение реакции микроклонов сахарной свёклы на совместное воздействие ионов кадмия и маннита позволило выявить оптимальные дозы селективных агентов для отбора устойчивых регенерантов. Исследования показали, что при невысоких концентрациях маннита (0,25 М) и содержании кадмия (1–2 мМ) проявлялось действие стрессового фактора: у микроклонов желтели боковые листья, варьировал прирост высоты от 14,7 до 22,5 %. Выживаемость при этом составила 45–51,2 % (рис. 1).

Количество маннита 0,30 М и 1 мМ ионов кадмия вызывало угнетение роста, некрозы, хлорозы микроклонов при выживаемости 25,6–27,1 %. Дальнейшее повышение содержания как маннита, так и кадмия приводило к полной ги-

бели микроклонов. Вероятно, одновременное присутствие стрессовых факторов в среде повышало жёсткость селективных условий. В основе действия на растения токсических свойств кадмия лежит его высокое сродство с клеточными белками сульфгидрильных групп [7]. Это позволило предположить, что кадмий, встраиваясь в молекулу структурного белка или фермента, вызывает замедление клеточного деления, изменяет структуру и проницаемость мембран, снижает активность ферментов. В результате при взаимодействии с маннитом усиливаются многочисленные изменения физиологических процессов, что приводит к торможению роста и развития растений, в конечном счёте — к значительному снижению их продуктивности, а в отдельных случаях даже к гибели.

Исследования показали, что оптимальная концентрация селективной питательной среды для отбора микроклонов сахарной свёклы к комплексу стрессовых факторов содержит 0,25 М маннита + 1–2 мМ $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$.

Данная селективная система позволила отобрать регенеранты в условиях стресса. После размножения регенерантов при проведении повторного отбора на идентичных селективных средах была выявлена их высокая адаптивная способность. Количество выживших экземпляров варьировало от 46,15 до 63,6 % (рис. 2).

Прирост высоты у регенерантов с устойчивостью варьировал от 12,5 до 22,0 %. У контрольных растений он был значительно меньше, что в течение 10–25 дней приводило к пожелтению листьев, некрозу точек роста, а в дальнейшем — к гибели микроклонов. Возможно, это связано с повышением концентрации кадмия в среде до определённых критических величин, когда клеточная оболочка перестаёт сдерживать поток токсичных ионов и металл попа-

дает в цитозоль клетки [1]. В цитозоле ионы кадмия связываются различными хелатирующими соединениями, часть из которых в составе комплексов затем удаляется в вакуоль. Ионы кадмия оказывают воздействие на белки дегидрины. Защитная роль дегидринов состоит в предупреждении коагуляции молекул и поддержании целостности клеточных мембран, что становится особенно актуальным в условиях осмотического стресса. В связи с этим регенеранты с устойчивостью к ионам кадмия после повторного отбора испытывали в условиях моделирования засухи.

Как показали результаты исследований, устойчивые к ионам кадмия регенеранты росли в условиях осмотического стресса, проде-

монстрировав высокую толерантность. Выживаемость варьировала от 65 до 70 %, что позволило высказать предположение о системности адаптационных процессов, поддерживающих рост клеток при водном стрессе. Для этого использовали сублетальные концентрации маннита (0,45 М), которые были отобраны нами ранее [8].

Отбор регенерантов в селективных условиях при корнеобразовании показал, что ионы кадмия и маннита оказывают более выраженное ингибирующее действие в отношении роста корней, чем в отношении роста надземных органов. Снижение ацетата кадмия до 0,5 мМ, а маннита до 0,30–0,25 М позволило активизировать процесс корнеобразования

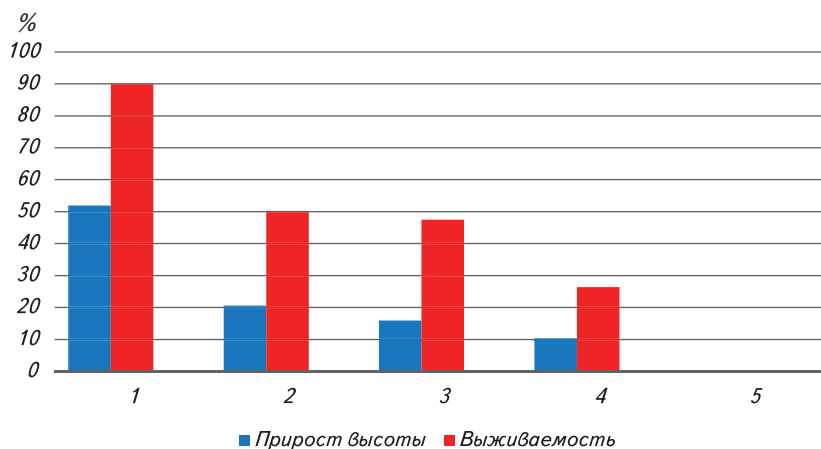


Рис. 1. Развитие микроклонов сахарной свёклы на питательных средах с различным содержанием маннита (М) и $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$ (мМ): 1 – 0 М + 0 мМ; 2 – 0,25 М + 1 мМ; 3 – 0,25 М + 2 мМ; 4 – 0,30 М + 1 мМ; 5 – 0,35 М + 2 мМ

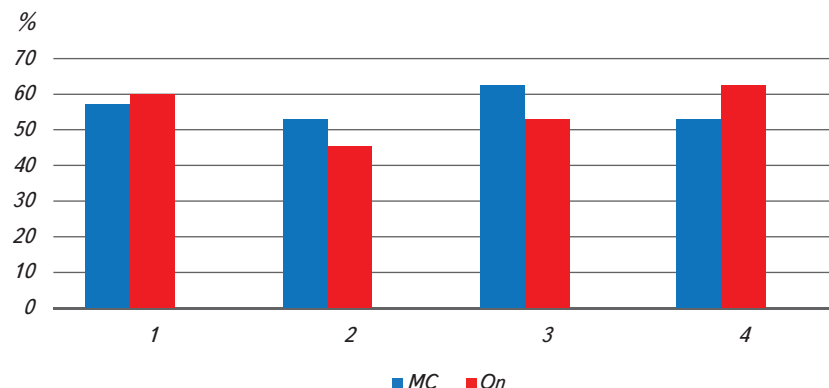


Рис. 2. Количество выживших регенерантов сахарной свёклы (%) при повторном отборе в селективных условиях (маннита (М) + $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$ (мМ)): 1 – 0,25 М + 1 мМ; 2 – 0,25 М + 2 мМ; 3 – 0,30 М + 1 мМ; 4 – 0,30 М + 2 мМ



Рис. 3. Развитие корневой системы у регенерантов в селективных условиях: 1, 2 – контроль; 3–5 – микроклоны, обладающие устойчивостью

до 56–70 % (см. табл.). Контрольные регенеранты корней не имели, но точка роста оставалась зелёной, где иногда появлялись мелкие единичные корни (рис. 3).

В результате опытов были выявлены оптимальные концентрации селективных агентов, содержащих ацетат кадмия – 0,5 мМ, маннит – 0,25 М, что обеспечивало эффективный ризогенез микроклонов сахарной свёклы. Это позволило отобрать регенеранты сахарной свёклы с устойчивостью к осмотическому и ионному стрессам.

Созданный материал хорошо адаптировался в условиях закрытого грунта, показав приживаемость 85,2–90,7 % в зависимости от генотипа. Растения активно развивались и за два-три месяца формировали штеклинги (корнеплоды), масса которых варьировала от 12,5 до 50,1 г (рис. 4).

В итоге проделанной работы выделен наиболее морфологически выравненный и устойчивый материал для селекционного

Влияние селективных условий на эффективность ризогенеза микроклонов сахарной свёклы

Условия отбора	Корнеобразование, %		
	Контроль	МС-2113	О-10
нормальные	80,0	79,0	81,0
0,5 мМ ацетат кадмия	0	60,0	56,0
0,30–0,25 М маннит	0	70,0	68,0

использования. Это свидетельствует о возможности применения селективной системы *in vitro* при отборе регенерантов сахарной свёклы, толерантных к комплексу стрессовых факторов.

Заключение

Проведённые исследования позволили оптимизировать состав селективной питательной среды для получения регенерантов сахарной свёклы с комплексной устойчивостью к стрессовым факторам в условиях *in vitro*. Выявлены оптимальные дозы совместного действия маннита 0,25–0,30 М и 1–2 мМ кадмия для микроклонов. Двукратный отбор в селективных условиях повысил толерантность регенерантов

к ионному стрессу до 34,7–74,8 %. Определены селективные концентрации ацетата кадмия 0,5 мМ и маннита 0,25 М для эффективного ризогенеза микроклонов. Отобраны растения сахарной свёклы, устойчивые и к осмотическому стрессу, и к ионной токсичности. Получены штеклинги для использования в селекционном процессе. Проведение отборов в культуре клеток с использованием селективных систем *in vitro* позволит повысить устойчивость материала и ускорить селекционный процесс.

Список литературы

1. Аллагулова, Ч.Р. Дегидрины растений: их структура и предполагаемые функции / Ч.Р. Аллагулова,



Рис. 4. Этапы развития микроклонов в условиях теплицы (от микроклона до штеклинга)

БОЛЕЕ
30 ЛЕТ

УСТОЙЧИВОГО РАЗВИТИЯ

Лапрол® ПЕНОГАСИТЕЛИ

- Высокая пеногасящая способность
- Отличный эффект на разных стадиях производства
- Безопасны для продукции, биоразлагаемы

Реонол® / Макромер® АНТИНАКИПИНЫ

- Высокое содержание активного вещества
- Обеспечивают транзит солей неорганических кислот
- Снижают образование накипи до 95 %

Ф.Р. Гималов, Ф.М. Шакирова, В.А. Вахитов // Биохимия. — 2004. — С. 1157–1165.

2. Губанова, Н.Я. Клеточная селекция кормовой свёклы на устойчивость к нескольким стрессовым факторам / Н.Я. Губанова, О.В. Дубровная, Т.В. Чугункова // Биополимеры и клетка. — 2002. — Т. 18. — № 3. — С. 565–571.

3. Калашникова, Е.А. Биологические основы клеточной селекции растений / Е.А. Калашникова // Докл. ТСХА. — 2003. — № 275. — С. 110–112.

4. Кошкин, Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных растений / Е.И. Кошкин. — М.: Дрофа, 2010. — 638 с.

5. Никитина, Е.Д. Разработка отдельных элементов технологии клеточной селекции яровой пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессам / Е.Д. Никитина, Л.П. Хлебцова, О.В. Ерещенко // Известия Алтайского государственного университета. — 2014. — Т. 2. — № 3. — С. 50–54.

6. Сергеева, Л.Е. Клеточная селекция с ионами тяжёлых металлов: новые аспекты комплексной устойчивости / Л.Е. Сергеева, Л.И. Бронникова, Е.Н. Тищенко // Тезисы докладов на X Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». — Казань: КИББ КазНЦ, 2013. — С. 82.

7. Устойчивость растений к тяжёлым металлам / А.Ф. Титов, В.В. Таланова, Н.М. Казнина, Г.Ф. Лайдинен // Институт биологии КарНЦ

РАН. Петрозаводск: Карельский научный центр, 2007. — 172 с.

8. Черкасова, Н.Н. Разработка оптимальных условий *in vitro* для повышения устойчивости регенерантов сахарной свёклы к засухе / Н.Н. Черкасова, Т.П. Жужалова, О.В. Ткаченко // Сахар. — № 9. — 2020. — С. 50–52.

9. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.З. Кочиева [и др.]. — М.: Высшая школа, 2008. — 710 с.

Аннотация. Выявлены оптимальные дозы совместного действия маннита и кадмия для создания регенерантов сахарной свёклы с комплексной устойчивостью к стрессовым факторам в условиях *in vitro*. Двукратный отбор в селективных условиях повысил толерантность регенерантов к стрессам. Отобраны регенеранты для создания линий с устойчивостью к осмотическому стрессу и ионной токсичности.

Ключевые слова: маннит, ацетат кадмия, засуха, стресс, селективная питательная среда, сахарная свёкла, микроклоны.

Summary. The optimal doses of the combined action of mannitol and cadmium for the creation of sugar beet regenerants with complex resistance to stress factors under *in vitro* conditions have been identified. Double selection under selective conditions increased the tolerance of regenerants to stress. Regenerants were selected to create lines with resistance to osmotic stress and ionic toxicity.

Keywords: mannitol, cadmium acetate, drought, stress, selective nutrient medium, sugar beet, microclones.