

Особенности репродуктивных свойств зрелых семян сахарной свёклы

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

Е.Н. ВАСИЛЬЧЕНКО, ст. научн. сотрудник

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

Перед сельскохозяйственной наукой всё более остро встаёт задача разработки новых технологий создания высокопродуктивных сортов и гибридов сахарной свёклы. Для построения современных селекционных программ большое значение приобретают фундаментальные научные исследования репродуктивной сферы растений.

Решению важнейших селекционных проблем могут способствовать исследования систем репродукции растений. Они включают в себя биологию, морфологию и генетику структурных элементов растений как в процессах их формирования, так и способах реализации в онтогенезе. Данные направления науки позволяют не только максимально обеспечивать разработку новых методов, но и успешно использовать их при создании и размножении исходного селекционного материала.

Сохранение селекционного генофонда сахарной свёклы и получение в кратчайшие сроки новых линий, сортов и гибридов требует более глубоких знаний, касающихся процессов развития от формирования зародыша до образования плодов и семян. В связи с этим репродуктивная биология в настоящий период приобретает большое теоретическое и практическое значение.

Морфологические, биохимические и молекулярно-генетические признаки, характеризующие репродуктивную способность растений сахарной свёклы в естественных условиях обитания, являются основой создания и применения новых методов в селекционной работе. Поэтому для проведения исследований, характеризующих морфогенетический потенциал семенного материала, необходима оптимизация и разработка различных методов, способствующих установлению закономерностей и реализации репродуктивной способности данной культуры.

Целью исследований явилась разработка новых методов, обеспечивающих формирование репродуктивной способности семенного материала сахарной свёклы и стимулирующих создание нового исходного материала.

Материалы и методы

Научные исследования выполнены на базе лаборатории культуры тканей и молекулярной биологии ФГБНУ ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова. Для изучения были выбраны семена рамонской селекции. Фосфор в семенах определяли по методу Беренблюма и Чейна в модификации Вейль-Малерба и Грина, количественное содержание белка – по Брэдфорду, фитина – титрометрическим методом. Электрофоретическое изучение запасного белка 11-11S-глобулина было проведено согласно общепринятой методике Конорева.

Результаты исследований

В системе репродукции сахарной свёклы семена являются основным способом образования нового организма, обеспечивающим воспроизведение и стабильное размножение данной культуры.

Сформированное семя состоит из семенной кожуры и перисперма, который служит хранилищем запасного, сберегаемого крахмала. К специфической части семени относится эндосперм, поставляющий питательные вещества к зародышу. В зрелом семени несколько слоёв клеток эндосперма остаются живыми, осуществляя мобилизацию запасных веществ при прорастании. Нарушения в развитии эндосперма приводят к гибели зародыша.

Основная структура семени – зародыш, возникающий в результате слияния половых гамет при оплодотворении. Развитие зародыша, включающее в себя две фазы – морфогенеза и созревания [9], является

завершающим этапом формирования семени. В фазе морфогенеза в зародышевом мешке происходят активные процессы, вызывающие образование эмбриональных структур, принимающих формы булавки, шара, сердца, торпеды. После этого между семядолями зародыша формируется апикальная меристема стебля, а на нижнем конце — апикальная меристема корня.

В фазу созревания клетки растущих зародышей накапливают питательные вещества (белок, крахмал, липиды). Следует заметить, что поздняя стадия созревания зародышей связана с накоплением LEA-белков (Late Embryogenesis Abundant), являющихся основными регуляторами устойчивости клеток к высыханию и стабильности при разных температурах [6]. Этому способствует также наличие в семенах абсцизовой кислоты (АБК-фитогормон), блокирующей влаго- и газообмен зародыша с окружающей средой, стимулирующей накопление в его тканях питательных веществ, ингибирующей прорастание и переход к длительному периоду покоя. АБК принимает также участие в ответе на высыхание и другие абиотические стрессы, часто синтезируясь в семенной кожуре и околоплоднике и иногда даже в семядолях.

В селекционной практике эти процессы обычно учитывают при проведении летних посевов свежесобранными семенами, выдерживая их 10–14 дней для обезвоживания, поскольку семена, не прошедшие необходимые генетические, морфологические и биохимические изменения, способствующие их дозреванию, не смогут прорасти. После созревания масса 1 тыс. шт. зрелых семян колеблется от 6,06 до 20,0 г, а всхожесть варьирует от 84,0 до 95,0–98,0 % [1]. В результате снижения биохимической активности клеток и перевода запасных веществ в метаболически инертную форму наступает период покоя семян. Период первичного покоя длится от семи и более лет в зависимости от условий хранения. Герметически закрытая тара и температура 7–9 °С позволяют сохранить жизнеспособность семян свёклы со всхожестью 89 % до 30 лет.

Семена в процессе длительной эволюции сконцентрировали в себе специфические морфологические признаки и различный химический состав для воспроизведения вида. Известно, что в зрелом семени свёклы находится до 34 % крахмала, 22 % жира, остальное содержимое, около 40 %, составляет белковый компонент. В семенах содержится также 3,75 % минеральных элементов. При этом в 100 частях золы на долю кальция приходится 3,52 %, фосфора — 55,7, калия — 21,6 %, которые играют важную роль в различных биохимических процессах синтеза запасных веществ. Белковые отложения в клетках зародыша представлены в виде алейроновых зёрен. Последние

состоят из 2–6 глобидов, главным компонентом которых является фитин, содержащий фосфор и гидролитические ферменты, участвующие в метаболических реакциях основных органических соединений. Вокруг глобидов происходит отложение белка. Сначала наблюдается образование аморфного белка, а затем — запасного, высокомолекулярного, в плотно упакованном состоянии.

Высокая биохимическая разнокачественность семенного материала в процессе формирования и последующего покоя постоянно привлекает пристальное внимание исследователей роли запасных веществ в регуляции метаболических реакций при прорастании семян. В это время параллельно с распадом запасных питательных веществ наблюдается синтез новых веществ и клеточных структур с нормальной метаболической активностью, определяющей тип и характер развития проростка [8]. В контроле развития семян при прорастании активную роль выполняют гиббереллины. В сухих семенах они находятся в связанном состоянии. При оводнении семян гиббереллины активизируются, частично образуются вновь под влиянием поступившей воды и участвуют в индукции новообразования ферментов в процессе прорастания. Молекулярные механизмы реализации функции гиббереллинов связаны с деградацией DELLA-белков и генов GIDI, контролирующей передачу сигнала. Однако данные функции гиббереллинов в развитии растений и их роли при прорастании семян требуют дальнейшего изучения.

Регуляцию метаболической активности процесса прорастания семян многих растений осуществляют фосфорсодержащие вещества, особенно фитин [10]. В состав фитина входит свыше 30 % фосфорной кислоты и 16 % инозита. Под действием 6-фитазы (КФ3.1.3.8) начинается гидролиз фитина, его дефосфорилирование, приводящее к высвобождению большого количества энергии, способствующее активизации ростовых процессов. Одновременно с неорганическим фосфором (Pi) образуется миоинозитол, 3-фосфоглицериновая кислота и катионы металлов, которые наряду с адениловыми нуклеотидами обеспечивают прорастание семян. Оказалось, что показатель отношения фитин/Pi можно использовать при отборе растений различных видов по способности семян к активному развитию и проявлению продуктивных свойств растений.

Изучение высокоурожайного гибрида сахарной свёклы РМС-120, выращенного в различных географических зонах — Астраханской и Воронежской областях, Северо-Кавказском регионе, Северной Италии — показало сильное влияние экологических факторов окружающей среды на свойства выращенных семян [2]. Было установлено, что отношение со-

держания фитина к неорганическому фосфору (P_i) в семенах сахарной свёклы влияет на активность их прорастания и накопление биомассы растений. Наибольшим отношением фитин/P_i обладали семена, выращенные в ЦЧР (0,809) и Северной Италии (0,929). Этот показатель семян, выращенных в других зонах, был ниже и составил в условиях Астраханской области 0,334 и Северном Кавказе – 0,255 (рис. 1).

Данные результаты имеют большое значение при определении селекционной ценности семенного материала, определяемой влиянием эколого-морфологических факторов окружающей среды.

Для выявления органических соединений фитина был разработан оригинальный способ определения солей фитиновой кислоты в семенах растений на основе спектрофотометрического анализа [4]. Проведение предварительной очистки исследуемого растительного материала от белков и липидов при оптимизации условий спектрофотометрического анализа проб позволили глубоко оценивать качество семенного материала при прорастании и активном развитии растений.

Многочисленные биохимические исследования показали, что селекционные материалы сахарной свёклы различаются по содержанию в семенах общего белка. Представленные высокомолекулярными 11S-глобулинами, запасные белки характеризуются определённым составом и последовательностью аминокислот в молекуле, что делает их не только видоспецифичными, но и сортоспецифичными. Это позволило проводить классификацию и идентификацию генотипов сахарной свёклы, используя индивидуальный анализ семян.

Генетическое изучение, основанное на полиморфизме запасных белков семян 11S-глобулинов, позволило составлять генетические формулы для идентификации и паспортизации селекционного материала. Генетические дистанции по типу белковых спектров 11S-глобулинов с максимальной частотой встречаемости (35–76 %) явились основой при определении генотипических различий между исходными формами сахарной свёклы и подборе пар для гибридизации [3].

При этом уровень истинного гетерозиса по урожайности гибридов возрастал по мере увеличения генетической удалённости родительских компонентов. Разработанный метод подбора родительских пар путём установления генетических расстояний стал принципиальной основой создания новых высокопродуктивных гибридов сахарной свёклы.

Перспективным оказалось также применение функциональных белков – изоферментов в качестве высокочувствительных маркеров при исследовании неоднородности и физиологического состояния семенного материала. Изоферментные локусы позволяли определять чистоту линий, проводить контроль гибридизации и биохимическую паспортизацию селекционных форм, что способствовало повышению качества семян.

Маркирование по белковым маркерам стало широко использоваться в генетико-селекционных исследованиях, связанных с биохимической паспортизацией и идентификацией селекционного материала сахарной свёклы. Эти методы ускорили отборы по степени раздельноплодности, способам селекционной проработки при определении сортовой чистоты в семенном контроле и идентификации сортов в сортоиспытании и семеноводстве, а также при выявлении их происхождения и возможного родства.

Использование молекулярных маркеров открыло большие перспективы для оценки степени генетических различий семенного материала. Исследования на основе RAPD-профилей геномной ДНК, полученных с одиночными праймерами PAWS 5, PAWS 6, PAWS 16, PAWS 17, позволили составить генетические формулы для осуществления молекулярно-генетической идентификации селекционных материалов сахарной свёклы. С применением произвольных одиночных праймеров были определены генетические дистанции и проведена кластеризация для 33 комбинаций скрещиваний, что дало возможность наиболее обоснованно подбирать родительские компоненты для гибридов. Разработанный метод идентификации селекционных материалов по ДНК-маркерам был рекомендован для использования при регистрации гибридов.

При изучении генетического разнообразия сахарной свёклы оказалось эффективным использование микросателлитных маркеров Unigenes, обладающих высоким уровнем полиморфизма (PIC) – от 0,71 до 0,87 [7]. Применение данных маркеров при анализе семенного материала различных компонентов гибридов сахарной свёклы (МС, О-тип,) послужило инструментом отбора перспективных форм для селекции.

Результаты ПЦР-анализа с 5 SSR-праймерами позволили разделить изучаемые образцы сахарной

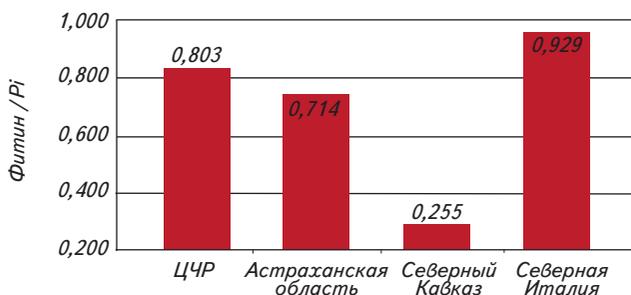


Рис. 1. Отношение фитина к общему неорганическому фосфору в семенах сахарной свёклы

свёклы на кластеры, представленные на дендрограмме (рис. 2).

Образцы, имеющие сходную генетическую структуру по изученным микросателлитным локусам ядерной ДНК, располагаясь в непосредственной близости друг от друга, характеризовались наибольшим родством и не рекомендовались для гибридизации. Линии, имеющие генетические отличия, располагались отдельно, что было благоприятно для проведения скрещиваний. Полученные данные о генетической удалённости семян селекционных образцов могут быть использованы для более обоснованного подбора родительских пар при гибридизации.

Разработка методов молекулярной селекции сахарной свёклы является перспективным направлением в XX в., и её успехи уже в недалёком будущем будут связаны с успехами геномики. Вместе с тем эти методы требуют дальнейшей разработки и совершенствования с учётом эпигенетических механизмов наследования количественных признаков, зависящих от лимитирующих факторов внешней среды, а также от метилирования ДНК в тесной взаимосвязи со структурой хроматина [5]. Начатые исследования по молекулярно-генетическому анализу обещают принести более значительные результаты как для глубокого понимания молекулярной основы этого процесса, так и для тестирования семенного материала при создании новых линий с ценными признаками.

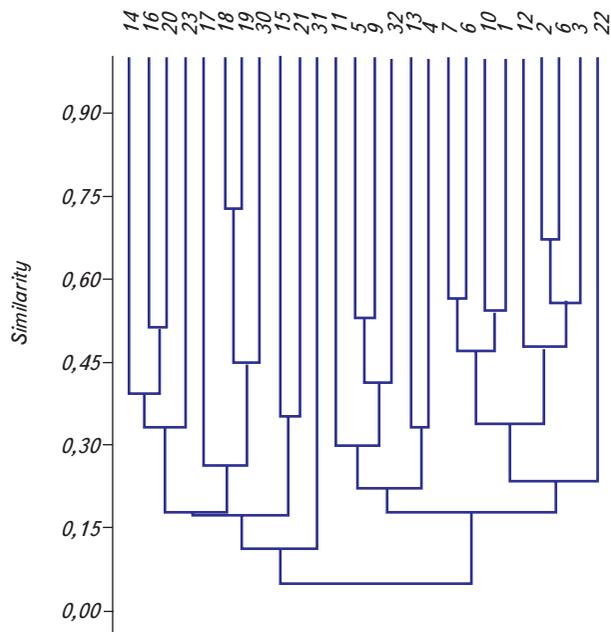


Рис. 2. Генетические взаимоотношения селекционных образцов сахарной свёклы на основе корреляционных связей

Заключение

Накопление запасных питательных веществ в семени является важным этапом в онтогенезе. Находясь длительное время в латентном состоянии, семя может долго сохранять ценные молекулярно-генетические и биохимические свойства культуры для развития проростка и целей репродукции в селекционном процессе.

Список литературы

1. *Бартенев, И.И.* Резервы повышения посевных характеристик семян гибридов сахарной свёклы / И.И. Бартенев, Л.Н. Путилина // Сахарная свёкла. — 2018. — № 2. — С. 18–22.
2. *Землянухина, О.А.* Зависимость энергии прорастания семян сахарной свёклы от способов возделывания и географических зон произрастания / О.А. Землянухина [и др.]. — IX Съезд физиологов растений России «Физиология растений — основа создания растений будущего» : сб. тезисов Всеросс. научн. конф. с междунар. участием. 19–21 сентября 2019 г. — Казань, 2019. — С. 180.
3. *Богачёва, Н.Н.* Изучение генетического разнообразия селекционных материалов сахарной свёклы : дис. ... канд. биолог. наук : 06.01.05 / Богачёва Наталья Николаевна. — Рамонь, 2012. — 119 с.
4. Патент № 2680833 Российская Федерация, МПК G01N 33/00(2006.01), G01N1/34 (2006.01). Способ определения солей фитиновой кислоты в семенах растений : № 2018102663 : заявл. 23.01.2018 : опубл. 28.02.2019 / Вепринцев В.Н., Землянухина О.А., Калаев В.Н., Жужжалова Т.П., Черкасова Н.Н., Васильченко Е.Н., Аль Хачами Фирас Рахи Хандал; заявитель ФГБОУ ВО ВГУ. — 6 с.
5. *Драгавцев В.А.* Эпигенетические механизмы наследования и развития и их роль в селекции растений / В.А. Драгавцев, С.И. Малецкий // Междунар. научн. конф. «Наука — XXI век». Россия, Москва, 27–28 февраля 2015 г. — М., 2015. — С. 33–48.
6. *Лутова, Л.А.* Генетика развития растений / Л.А. Лутова, Т.А. Ежова, И.Е. Додуева, М.А. Осипова. — СПб. : Н.-Л., 2010. — 432 с.
7. *Налбандян, А.А.* Молекулярный отбор селекционного материала сахарной свёклы с генами устойчивости к биотическим стрессам / А.А. Налбандян, Т.П. Федулова, А.С. Хуссейн // Российская сельскохозяйственная наука. — 2019. — № 1. — С. 15–18.
8. *Терёхин, Э.С.* Репродуктивная биология / Э.С. Терёхин // Системы репродукции. — Т. 3. — СПб. : Мир и семья, 2000. — С. 21–24.
9. *Braybrook, S.A.* LEC5 go crazy in embryo development / S.A. Braybrook, J.J. Harada // Trends in Plant Science. — 2008. — Vol. 13. — P. 624–630.

САХАР

SUGAR ■ ZUCKER ■ SUCRE ■ AZUCAR

ISSN 2413-5518
Выходит в свет с 1923 г.

Оформить подписку на журнал «Сахар» в бумажной версии на 2021 и 2022 г. можно по ссылке: <https://podpiska.pochta.ru>. Подписная цена с учётом доставки зависит от региона. Минимальный срок подписки – 1 месяц



Варианты подписки на 2021 и 1 ПГ 2022 г.

1) бумажная версия:

через электронный каталог «Почта России» по адресу: <https://podpiska.pochta.ru> (наш индекс П6305)

2) через редакцию (заявка на sahar@saharmag.com)

с доставкой по России «Почтой России», цена 1000 р. за 1 месяц, 12000 р/год

3) PDF-версия журнала (подписка через редакцию):

для России, стран ближнего и дальнего зарубежья – 3000 р. на полугодие; минимальный срок подписки – 1 месяц, цена 500 р.

Адрес редакции: 121069, Россия, г. Москва, Скатертный пер., д. 8/1, стр. 1.
Тел/факс: +7(495) 690-15-68; +7(985)769-74-01; e-mail: sahar@saharmag.com

Бухгалтерия: +7 (495)695-45-67; e-mail: buh@saharmag.com; официальный сайт: www.saharmag.com

10. Loewus, F.A. Myo-inositol metabolism in plants / F.A. Loewus, P.N. Murhy // Plant Sci. – 2000. – Vol. 150. – № 1. – P. 1–19.

Аннотация. Рассмотрены процессы репродукции ценных свойств зрелых семян сахарной свёклы, сопряжённые с состоянием морфологического покоя и способностью к активному развитию. Показана тесная взаимосвязь морфогенетических, биохимических и физиологических свойств растительных организмов с разнокачественностью и гетерогенностью семенного материала. Установлено, что при длительном хранении семян белковые вещества, представленные запасными 11S-глобулинами и функциональными изоферментами, пригодны для проведения паспортизации и идентификации селекционного материала. Применение молекулярно-генетических маркеров RAPD и SSR (Unigenes), обладающих высоким уровнем полиморфизма, оказалось эффективным для подбора родительских пар при проведении гибридизации. Отражено участие фосфорсодержащих веществ в регуляции

метаболической активности при прорастании семян, темпах развития растений и повышении продуктивной массы корнеплода.

Ключевые слова: сахарная свёкла, репродукция, семена, молекулярные маркеры, белковые вещества, фитин.
Summary. Processes of sugar beet mature seed valuable characteristics' reproduction connected with morphological dormant state and active development ability are considered. Close relationship between morphogenetic, biochemical and physiological properties of organisms with different characteristics and heterogeneity of seed material has been shown. It has been determined that, when seeds are stored for a long time, albumens presented by 11S-globulines and functional isozymes are suitable for certification and identification of breeding material. Use of RAPD and SSR molecular-genetic markers (Unigenes) with high level of polymorphism appears to be effective to select parent pairs for hybridization. Participation of phosphorus-containing substances in regulation of metabolic activity during seed germination, rate of plant development and increase of beet root productive mass is represented.

Keywords: sugar beet, reproduction, seeds, molecular markers, albumens, phytin.