

## ОПТИМИЗАЦИЯ СЕЛЕКТИВНЫХ ПРИЕМОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ, ПОВЫШАЮЩИХ КОМПЛЕКСНУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ К ОСМОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ

**Н.Н. Черкасова**

**Т.П. Жужжалова**, доктор биологических наук  
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт  
сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»  
e-mail: biotechnologiya@mail.ru

**Аннотация.** Оптимизирован состав питательной среды для получения регенерантов сахарной свеклы с комплексной устойчивостью к стрессовым факторам в условиях *in vitro*. Двукратный отбор в селективных условиях повысил толерантность регенерантов к ионному стрессу. Выявлены селективные концентрации для эффективного ризогенеза микроклонов. Отобраны линии сахарной свеклы с устойчивостью к осмотическому и ионному стрессам.

**Ключевые слова:** стресс, растения-регенеранты, *in vitro*, маннит, ацетат кадмия, селективная питательная среда, сахарная свекла, ионная токсичность.

Разработка методов на основе селективных систем *in vitro* позволяет проводить испытание и отбор устойчивых форм на клеточном уровне, создавая новый исходный материал за более короткий период. Данный прием значительно сокращает сроки создания высокопродуктивных сортов, приспособленных к возделыванию в стрессовых условиях [1, 2]. Если в качестве селективного фактора использовать стрессор, отличающийся широким спектром токсического воздействия, можно отобрать варианты с комплексной устойчивостью. Этому условию отвечают ионы тяжелых металлов (ИТМ), токсичные в следовых количествах, характеризующиеся широким спектром патологического действия [3]. Поэтому использование ИТМ для отбора клеточных вариантов, устойчивых к абиотическим стрессам нашло широкое применение [4, 5]. Разносторонним отрицательным действием обладают ионы кадмия, что позволяет использовать их для проведения отбора форм, устойчивых к осмотическому стрессу.

Достижения последнего времени подтвердили перспективность использования комплекса стрессовых факторов для получения устойчивых форм растений. Получены линии: пшеницы, кукурузы, табака, льна-

долгунца, ячменя с устойчивостью к ионам кадмия и осмотическому стрессу [6, 7, 8]. Отбор форм сахарной свеклы, обладающих устойчивостью к ионной токсикации и осмотическому стрессу, не проводился. В связи с чем разработка условий для построения эффективных систем *in vitro*, направленных на отбор толерантных к комплексу стрессовых факторов форм для использования их в селекции, является одним из перспективных и важных направлений биотехнологии растений.

Цель исследований заключалась в разработке селективных систем *in vitro* для получения форм сахарной свеклы с комплексной устойчивостью к ионной токсичности и осмотическому стрессу.

Исследования проведены в лаборатории культуры тканей и молекулярной биологии отдела генетики и биотехнологии ФГБНУ «ВНИИСС имени А.Л. Мазлумова».

Питательные среды готовились с использованием макро- и микросолей в количествах, соответствующих прописям Гамборга и Мурасиге-Скуга, витамины – в среде Уайта. Культивирование регенерантов проводилось при 16-часовом фотопериоде и температуре 23–26 °С, освещенности 5 тыс. люкс и влажности воздуха 70 % [9].

Выявление параметров селективного отбора для индукции регенерации проводили на питательных средах В5 и MS, дополненных необходимыми регуляторами роста (БАП, кинетин, ИУК, ИМК, ГБ). В качестве эксплантов использовали микроклоны, зрелые зародыши семян сахарной свеклы. Для изучения действия ионов кадмия к основной среде добавляли ацетат кадмия  $Cd(CH_3CO_2)_2$  в различных концентрациях (1–6мМ), маннит (0,25–0,40М). Ризогенез проводили на питательных средах с добавлением 1 мг/л НУК (контроль), кадмия. Оценка устойчивости осуществлялась по комплексу морфотопографических изме-

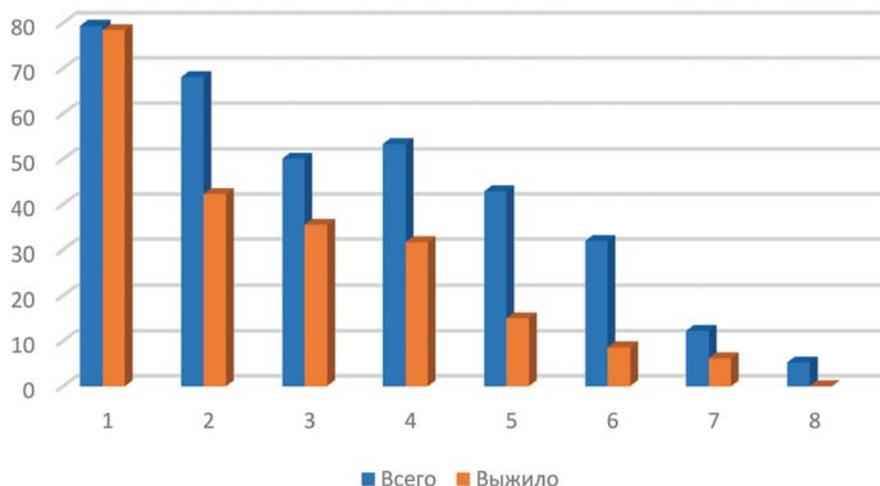


Рисунок 1. Влияние различных концентраций ионов кадмия на прорастание семян (среднее для генотипов) сахарной свеклы *in vitro*: 1—0мМ; 2—1мМ; 3—2мМ; 4—4мМ; 5—6мМ; 6—8мМ; 7—11мМ; 8—15мМ.

нений (деформаций) корневой системы по сравнению с контролем. В течение всего периода вегетации проводились фенологические наблюдения.

Результаты проведенных исследований позволили выявить летальные дозы селективного фактора (ацетат кадмия), вызывающие полную гибель проростков и дозы, соответствующие 50%-ной выживаемости регенерантов. Так, относительно низкие концентрации селективного агента (1мМ) не оказывали негативного действия на прорастание семян, которое составило 58,3–77,7 %, при выживаемости проростков 40,0–44,4 % (рис. 1).

Однако при высоких концентрациях селективного агента (6мМ), процесс прорастания существенно замедлялся, образовывались проростки небольшого размера, при этом выживаемость варьировала от 13,3 до 16,7 %. При 8мМ содержании ацетата кадмия количество выживших проростков уменьшалось в 2 раза и составило 8,3–8,7 %.

При увеличении концентрации селективного агента было заметно его ингибирующее действие при прорастании. Семена начинали прорастать, а при увеличении селективной нагрузки ростки погибали через несколько дней, что приводило к уменьшению выжи-

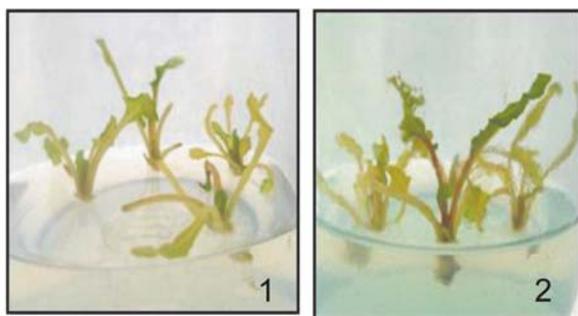


Рисунок 2. Регенеранты сахарной свеклы на питательных средах с различным содержанием маннита: 1 — 0,40М; 2 — 0,45М

ваемости до 5,6 % при 11мМ ацетата кадмия, а в дальнейшем к полной их гибели (15мМ).

Оптимальным компонентом среды для отбора устойчивых к ионной токсикации регенерантов, полученных из проростков, оказалось содержание кадмия 6мМ. В этом опыте всхожесть семян *in vitro* составила 38,9–46,7 %, а выживаемость проростков — 13,3–16,7 %.

Для сохранения признака устойчивости, целесообразным оказалось проведение повторного отбора на идентичных селективных средах. Проведение повторного отбора в селективных условиях, идентичных первичному отбору (2–6мМ), показало высокую адаптивную спо-

собность регенерантов. Количество выживших микроклонов составило от 34,7 до 74,8 %.

Ионы кадмия оказывают воздействие на белки дегидринов. Защитная роль дегидринов состоит в предупреждении коагуляции молекул и поддержании целостности клеточных мембран. Это становится особенно актуальным в условиях осмотического стресса [10]. В связи с этим регенеранты с устойчивостью к ионам кадмия после повторного отбора испытывали в условиях моделирования засухи. Для этого использовали высокие концентрации маннита, так как рост и развитие регенерантов в таких условиях адекватно указывает на их устойчивость. Результаты исследований показали, что устойчивые к ионам кадмия регенеранты росли в условиях осмотического стресса, где они показали высокую толерантность (рис. 2).

Выживаемость при этом варьировала от 65,0–70 %. Поэтому можно высказать предположение о системности адаптационных процессов, поддерживающих рост клеток при водном стрессе.

Заключительным этапом было проведение отбора в селективных условиях при корнеобразовании. Исследования показали, что ионы кадмия и маннит оказывали более выраженное ингибирующее действие в отношении роста корней, чем в отношении роста надземных органов. Было выявлено, что при содержании 1мМ ацетата кадмия в питательной среде только 8–10 % регенерантов имело слабую корневую систему, дальнейшее повышение селективного агента приводило к гибели регенерантов. Снижение селективного агента до 0,5мМ позволило активизировать процесс корнеобразования до 56–60 % (табл.1). Контрольные растения в данных условиях не имели корней или образовали мелкие единичные корни.

При содержании маннита 0,40М в питательной среде контрольные растения погибали, всего 12 % устойчивых растений имело единичную корневую си-

стему. Снижение селективного агента до 0,30–0,25М, позволило получить 68–70% регенерантов с хорошей корневой системой. Контрольные растения корней не имели, но точка роста оставалась зеленой (рис. 3).

Для эффективного развития ризогенеза микроклонов сахарной свеклы были выявлены оптимальные концентрации селективных агентов: ацетата кадмия 0,5мМ, маннита 0,25М. В результате исследований были отобраны регенеранты с устойчивостью к осмотическому и ионному стрессам.

Полученные микроклоны нормально адаптировались в условиях закрытого грунта, выживаемость их составила 85,2–90,7 % в зависимости от генотипа (табл. 2).

Растения активно развивались и формировали штеклинги за 2–3 месяца, которые могут быть использованы для получения нового исходного материала (рис. 4).

В результате исследований был оптимизирован состав селективной питательной среды для получения регенерантов сахарной свеклы с комплексной устойчивостью к стрессовым факторам в условиях *in vitro*. Выявлена сублетальная доза ацетата кадмия (4мМ–6мМ) для отбора регенерантов. Двукратный отбор в селективных условиях повысил толерантность регенерантов к ионному стрессу до 34,7–74,8 %. Для эффективного ризогенеза выявлены селективные питательные среды с содержанием ацетата кадмия 0,5мМ и маннита 0,25М. Проведенные исследования позволили отобрать линии сахарной свеклы с устойчивостью к ионной токсичности и осмотическому стрессу для дальнейшей селекционной работы.

#### Список литературы

1. 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 госуниверситета. - 2014. - Т. 2. - № 3. - С. 50-54.
2. Дубровная, О.В. Селекция *in vitro* пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам / О.В. Дубровная // Физиология растений и генетика. - 2017. - Т. 49. - № 4. - С. 279-292.
3. Nies, D.H. Microbial heavy-metal resistance / D.H. Nies // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1999. - Т. 51. - Р. 730–750.
4. Сергеева, Л.Е. Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов: новые аспекты комплексной устойчивости / Л.Е., Сергеева, Л.И. Бронникова, Е.Н. Тищенко. - Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология // X Международная конференция. - Казань, 2013. - С. 82.
5. Губанова, Н.Я. Клеточная селекция кормовой свеклы 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.

Таблица 1. Влияние селективных условий на эффективность ризогенеза микроклонов сахарной свеклы

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



Рисунок 3. Развитие корневой системы в селективных условиях: 1, 2 – контроль; 3, 4, 5, 6 – устойчивые.

Таблица 2. Адаптация микроклонов сахарной свеклы в условиях закрытого грунта

Генотип	Посажено (шт.)	Количество линий	Количество регенерантов	
			шт.	%
МС 2113	54	4	49	90,7
О-10	27	4	23	85,2



Рисунок 4. Микроклоны сахарной свеклы в условиях закрытого грунта

6. Сергеева, Л.Е. Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов для отбора форм пшеницы и кукурузы, устойчивых к осмотическим стрессам / Л.Е. Сергеева, Л.И. Бронникова // Фактори експериментальної еволюції організмів.- 2018. - Т. 22. - С. 318-322.
7. Гончарук, Е.А. Реакция клеток контрастных по устойчивости сортов льна-долгунца на действие ионов кадмия / Е.А. Гончарук, Н.В. Загоскина // Вісник харківського нац. аграрного університету серія біологія. - 2016 - Вип. 3 (39). - С. 27-38.

8. Шуплецова, О.Н. Повышение устойчивости ячменя к токсичности металлов и осмотическому стрессу путем клеточной селекции // О.Н. Шуплецова, И.Г. Широких // Зерновое хозяйство России. - 2015. - № 1. - С. 124-135.

9. Знаменская, В.В. Микроклонирование *in vitro* как метод поддержания и размножения линий сахарной свеклы / В.В. Знаменская // Энциклопедия рода *Beta*: Биология, генетика и селекция свеклы. - Новосибирск, 2010. - С. 420-437.

10. Аллагулова, Ч.Р. Дегидрины растений: их структура и предполагаемые функции / Ч.Р. Аллагулова, Ф.Р. Гималов, Ф.М. Шакирова, В.А. Вахитов // Биохимия. - 2004. - С. 1157-1165.

**Optimization of selective methods of cultivation of sugar beet, increasing integrated resistance to osmotic stress**

**N.N. Cherkasova, T.P. Zhuzhzhlova**

**Summary.** *The composition of the nutrient medium for obtaining sugar beet regenerants with complex resistance to stress factors under in vitro conditions has been optimized. Double selection under selective conditions increased the tolerance of regenerants to ion stress. Selective concentrations for effective rhizogenesis of microclones were revealed. Sugar beet lines with resistance to osmotic and ionic stress were selected.*

**Key words:** *stress, plants-regenerants, in vitro, mannitol, cadmium acetate, selective nutrient medium, sugar beet, ion toxicity.*

**ИНФОРМАЦИЯ**

**В России планируют создать Национальный центр генетических ресурсов растений**



В феврале 2022 г. Президент РФ подписал указ об образовании Национального центра генетических ресурсов растений на базе Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, который является одним из крупнейших в мире генбанков растений и насчитывает более 320 тыс. образцов генресурсов. Правительству поручено разработать и утвердить программу развития центра.

Реализация проекта позволит укрепить приоритет России в сфере современной генетики растений на мировом уровне, усилить продовольственную безопасность страны, в перспективе – расширить ассортимент отечественной продукции. Такое мнение высказала ТАСС директор ВИР Елена Хлесткина, подчеркнув, что благодаря масштабной работе с коллекциями генетических ресурсов растений уже в ближайшей перспективе на прилавках магазинов появятся новые продукты для здорового и функционального питания. В перспективе создание Национального центра благотворно повлияет на деятельность сельхозпроизводителей. Ученые смогут активнее работать с биоресурсными коллекциями на базе центра, что, в частности, позволит через ускоренную селекцию и богатый выбор исходного материала быстрее доводить до потребителей семена новых разнообразных сортов.

В ближайшее время будет создана сеть из более 20 научных институтов, которые консолидируют работу по изучению генресурсов растений. Соблюдая единые стандарты работы и регламенты доступа к генресурсам растений, научные институты смогут гораздо быстрее раскрывать потенциал российских биоресурсных коллекций.

Внимание государства к коллекциям генетических ресурсов растений обусловлено заботой о развитии отечественной науки и экономики, стремлением укрепить продовольственную безопасность страны и гарантировать стабильное производство качественного продовольствия.

tass.ru

**Что думают россияне об уровне аграрной науки и образования в стране**

Около 70 % опрошенных россиян считают российских ученых одними из лучших в мире. Такие данные приводит ВЦИОМ. При этом 69 % респондентов уверены, что Россия никогда не догонит развитые страны в сфере науки и технологий, и сельское хозяйство как раз явно не в числе прорывных областей.

По мнению россиян, российская наука лидирует в военной сфере (28 %), в области здравоохранения (18 %) и в космической отрасли (17 %). Среди приоритетных сфер для развития научных знаний респонденты назвали, прежде всего, здравоохранение (44 %), образование (17 %). На долю сельского хозяйства пришлось 10 % ответов.

Ситуацию в аграрной науке и образовании россияне интуитивно определили верно. По данным Минсельхоза, в мировой авторитетный рейтинг THE Impact Rankings 2021 вошли только два российских вуза. РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева – лучший российский аграрный вуз занимает позицию 401-600 среди 1115 университетов (по данным Times Higher Education). Другой российский аграрный вуз – Саратовский ГАУ имени Н.И.Вавилова расположился на 801-1000 позиции. В министерстве отмечают, что российские аграрные вузы вошли в рейтинг впервые.

По мнению представителей сельскохозяйственной отрасли, российской аграрной науке и образованию не хватает связи с практикой. В результате выпускники аграрных вузов не идут работать в отрасль, а руководители агропредприятий находят квалифицированные кадры с большим трудом.

Директор по развитию платформы «Авито Работа» Дмитрий Пучков отметил в интервью inforo54.ru, что сельское хозяйство в числе отраслей, которые крайне остро нуждаются в персонале. На сельское хозяйство приходится одна из самых заметных долей размещенных вакансий 16 %. При этом отклики на них составляют 14 % от общего количества. И это несмотря на то, что зарплаты в аграрной сфере не самые низкие. По данным «Авито Работа», например, в Новосибирске в 2021 г. сельское хозяйство вошло в топ вакансий с самыми высокими зарплатами – около 40 тыс. рублей. Такой же доход предлагают в транспорте, логистике, IT и телекоме, банках и на госслужбе.

<https://agrotrend.ru/>