

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ ПОЛУЧЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ ФОРМ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ *IN VITRO*

Черкасова Н.Н., Васильченко Е.Н., Ткаченко О.В.

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

e-mail: biotechnologiya@mail.ru

Аннотация. Изучено влияние селективных систем *in vitro* при культивировании зрелых зародышей семян сахарной свеклы. Проведен отбор устойчивых к абиотическим стрессам регенерантов. Созданы устойчивые линии сахарной свеклы. Разработана схема получения устойчивых регенерантов к комплексу стрессовых факторов.

Ключевые слова: сахарная свекла регенеранты, питательная среда, сорбит, пролин, *in vitro*, селективный агент.

Введение. Одним из главных направлений селекции сахарной свеклы в современных условиях развития сельскохозяйственного производства является создание высокопродуктивных гибридов на линейной основе. Однако используемые методы селекции являются долговременными и трудоемкими. Это обусловлено, прежде всего, двухлетним циклом развития растений, инбредной депрессией, явлением само- и перекрестной несовместимости, вызывающих трудности при сохранении генетической однородности созданного исходного материала. В связи с этим для создания, стабилизации и сохранения ценных признаков и свойств селекционного материала наиболее перспективными являются биотехнологические методы, основанные на культивировании репродуктивных органов и тканей в условиях изолированной культуры *in vitro*.

В настоящее время перспективным направлением биотехнологии в селекции сахарной свеклы оказалось также использование селективных систем *in vitro*, способствующих получению растений с высокой устойчивостью к абиотическим стрессам [1].

Данный прием основан на способности растительных организмов к созданию адаптивных механизмов защиты от неблагоприятных факторов среды на клеточном уровне [2]. Поэтому воздействия селективных агентов при культивировании *in vitro* органов и тканей растений позволили создавать сорта многих сельскохозяйственных культур, в том числе и сахарной све-

клы, с высокой устойчивостью и повышенной продуктивностью в условиях стресса [3].

Целью исследований явилась разработка селективных систем *in vitro* и получение на их основе исходного селекционного материала сахарной свеклы, адаптированного к неблагоприятным абиотическим стрессам.

В качестве материала для введения в культуру *in vitro* использовали хорошо развитые генотипы с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС), фертильные опылители с закрепительной способностью ЦМС (О-тип), фертильные опылители, способные в первом поколении стимулировать формирование эффекта гетерозиса (ОП). Для эксплантации и культивирования *in vitro* использовали генеративные и вегетативные органы и ткани семенных растений (семязачатки, незрелые зародыши, семена, черешки листьев, листовые пластинки, верхушечные и пазушные меристемы) в период бутонизации, начала цветения и созревания семян.

Методы исследований. В процессе исследований применяли общепринятую технику стерилизации растительного материала и приготовления питательных сред Гамборга (B5) и Мурасиге-Скуга (MS) [4]. Культивирование регенерантов осуществляли при температуре 24–26°C, 16-ти часовом фотопериоде с освещенностью 5000 люкс и относительной влажности воздуха 70 %. Для моделирования абиотического стресса применяли селективные агенты: сорбит (0,40–0,45 М) (неионный и неметаболизируемый осмотик). В качестве селективной среды использовали подкисление до pH 4,0. Уровень устойчивости оценивали по величине индекса длины корня [5].

Биохимические исследования проводили с использованием гомогенатов растительных тканей и целого ряда методик по определению белка и активности ферментов, по содержанию пролина [6].

В результате проведенных исследований разработан метод селективного отбора *in vitro* форм сахарной свеклы, позволяющий создавать оригинальный се-

лекционный материал с устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды. Основой метода явилось двукратное пассирование регенерантов в жестких селективных условиях.

Первый этап метода включал культивирование *in vitro* зрелых зародышей семян с добавлением в питательную среду селективного агента-сорбита в концентрации 0,45 М при кислотности pH 3,5.

Прорастание стерильных семян на селективных средах составило 7,3–8,6 % при последующей выживаемости и сохранение регенерационной способности регенерантов 3,7–4,3 %. Этот период сопровождался медленным формированием ростовых побегов и листового аппарата выживших эксплантов.

Эффективным приемом оказалось использование повторного отбора, позволившего в жестких селективных условиях увеличить степень устойчивости регенерантов от 58,0 до 72,0 % (рис. 1).

Исследования показали, что формирование адаптивных свойств культивируемых растений под влиянием селективных факторов часто сопровождалось замедлением процессов роста и развития. Это приводило к появлению листьев уменьшенного размера с различной толщиной, а также к гибели листового аппарата. В связи с этим двукратное пассирование материала и проведение отборов по морфологическим признакам обеспечивало надежное выделение генотипов, наиболее устойчивых к стрессовым факторам среды. Выявленные изменения в условиях стресса, по-видимому, были связаны с пониженным растяжением клеток и замедленностью клеточных делений, что приводило к торможению развития регенерантов. При этом соль не накапливалась в меристемных тканях, а активно поступала внутрь вакуолей, не ингибировала рост новых листьев, а лишь ускоряла процесс гибели более старых листьев [7].

Выявленные особенности морфологического развития регенерантов сахарной свеклы связаны с изменением целого ряда биохимических процессов как по стимулированию дифференциации и пролиферации культивируемых тканей, так и по выработке адаптивных механизмов защиты. В условиях абиотического стресса в клетках многих видов растений происходят биохимические изменения, вызывающие активацию работы ферментов, окислительного стресса, увеличение интенсивности синтеза белка, а также накопление свободного пролина, который в условиях водного дефицита повышает осмотическое давление клеточного сока. Это приводит к формированию устойчивости растений на фоне

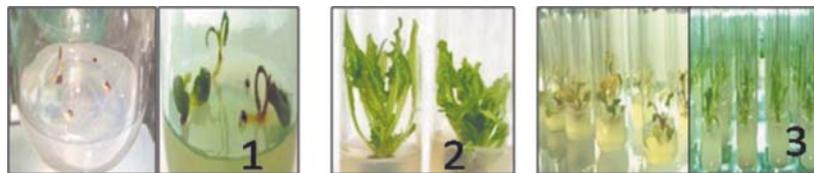


Рисунок 1. Проведение селективного отбора (0,45М сорбит, pH 3,5) растений-регенерантов сахарной свеклы: 1 – первичный отбор; 2 – микро-размножение; 3 – повторный отбор.

снижения водного потенциала почвенного раствора. Такое воздействие пролина свидетельствует о его осморегуляторной функции [8].

Изучение контрольных и устойчивых микроклонов как на стрессовом, так и контрольном фоне (без стресса) показало различные изменения пролина в зависимости от генотипа. Так, у устойчивых микроклонов МС формы в селективных условиях содержание его незначительно уменьшается, а в контроле происходит увеличение в 3,7 раза ($25,74 \pm \text{мг \% / г с.м.}$) (рис. 2).

Наиболее нестабильным оказались устойчивые растения генотипа сростноплодного ОПМ, помещенные в селективные условия: содержание свободного пролина у них возрастает в 4,8 раза ($42,73 \pm \text{мг \% / г с.м.}$) в сравнении с другими генотипами. Увеличение его содержания у контрольных и устойчивых растений данного генотипа позволяет предполагать довольно устойчивую способность клеток к увеличению содержания стрессового агента. Для генотипа ОП растения всех четырех вариантов показывают примерно одинаковое значение содержания пролина.

Динамика колебаний пролина на стрессовом уровне может указывать на различную активность и направленность физиологических процессов при комплексной устойчивости.

Следует отметить, что формирование адаптивных свойств растений под влиянием селективных факторов часто сопровождается разбалансированностью показателей ростовых процессов [9]. В связи с этим проведение отборов по морфофизиологическим признакам обеспечивает надежное выделение генотипов, наиболее устойчивых к стрессовым факторам среды.

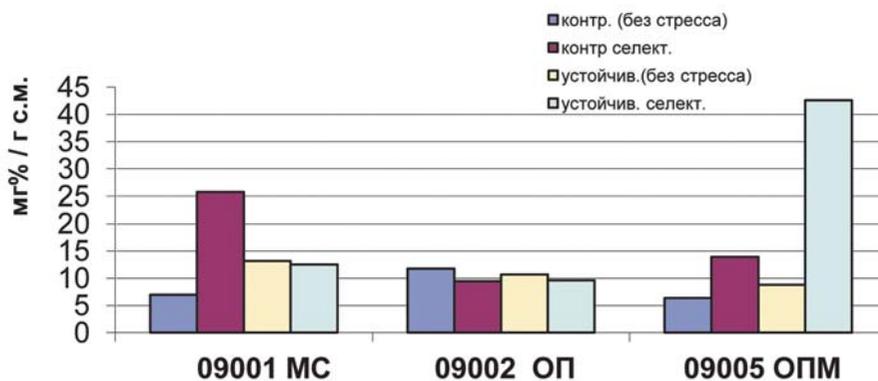


Рисунок 2. Содержание пролина в микроклонах сахарной свеклы в условиях абиотического стресса



Рисунок. 3. Развитие микроклонов в условиях теплицы от регенеранта до штеклинга (1–4).

Эффективным оказалось дальнейшее проведение системного массового отбора регенерантов по индексу длины корней.

Регенеранты, прошедшие отбор в селективных условиях, моделирующих повышенную кислотность почвы при pH 3,5, характеризовались, наряду с выравненностью листового аппарата, хорошо развитой корневой системой. Этому способствовал системный массовый отбор регенерантов по индексу длины корня, или отношению длины корня в опыте к контролю, который варьировал от 1,0 до 1,2. В результате отбора количество выживших толерантных регенерантов повысилось от 87,5 % до 89,2 %. Процесс формирования корней в условиях стресса был менее подвержен изменению, чем развитие листьев. После воздействия осмолитиков скорость удлинения корней восстанавливалась быстрее. Активное развитие корневой системы в условиях осмотического стресса было обусловлено усилением роста тонких боковых корней, обеспечивающих более активный доступ к воде и питательным веществам [10].

Отобранные микроклоны хорошо адаптировались в условиях закрытого грунта (теплица) при выживаемости 82,6–88,2 %. Растения активно развивались и за 2–3 месяца формировали штеклинги (рис. 3).

Результаты исследований. Проведенные исследования позволили: разработать методику проведения селективного отбора регенерантов сахарной свеклы с устойчивостью к абиотическим факторам внешней среды; создать линии сахарной свеклы с устойчивостью к стрессовым абиотическим факторам среды. Это имело большое значение в процессе селекции при создании новых гибридов.

Внедрение в селекционно-семеноводческий процесс сахарной свеклы предлагаемых методов является приоритетным и инновационным направлением исследований, позволяющим повышать качественные признаки семенного материала при сохранении высокой продуктивности создаваемых гибридов.

Список использованной литературы

1. Никитина, Е.Д. Разработка отдельных элементов технологии клеточной селекции яровой пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессам / Е.Д. Никитина, Л.П. Хлебова, О.В. Ерещенко // Известия

Алтайского государственного университета. - 2014. - В. 3. - Т. 2. - С. 50-54.

2. Духовский, П., Юкнис, Р. Реакция растений на комплексное воздействие природных и антропогенных стрессов. / П. Духовский, Р. Юкнис // Физиология растений. - 2003. - № 2. - С. 165-173.

3. Lamaoui M. Heat and Drought Stresses in Crops and Approaches for Their Mitigation. / M. Lamaoui. // Agricultural Biological Chemistry. - 2018. - P. 234-238.

4. Знаменская, В.В. Микроклонирование *in vitro* как метод поддержания и размножения линий сахарной свеклы / В.В. Знаменская // В сб.: Энциклопедия рода *Beta*. Биология, генетика и селекция свеклы: Сб. науч. тр. ИЦиГ СО РАН, Россия; ВНИС, Украина, Новосибирск: «Изд. Сова». - 2010. - С. 420-437.

5. Косарева, И.А. Изучение коллекции сельскохозяйственных культур и диких родичей по признакам устойчивости к токсическим элементам кислых почв / И.А. Косарева // Доклады РАСХН. - 2012. - Т. 170. - С. 35-45.

6. Bates, L.S. Rapid determination of free proline for water-stress studies / L.S. Bates, R.P. Waldren, I.D. Teare // Plant and Soil. - 1973. - V. 39. - P. 205-207.

7. Shabala, S. Salinity stress: physiological constraints and adaptive mechanisms. / S. Shabala, R. Munns // Plant stress physiology 2nd edition (ed. S. Shabala), CABI. - 2017. - P. 24-64.

8. Сошникова, Т.Н. Пролин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Thellungiella salsuginea* при окислительном стрессе / Т.Н. Сошникова, Н.Л. Радюкина., Д. В. Королькова, А.В. Носов // Физиология растений. - 2013. - Т. 60. - № 1. - С. 47-60.

9. Лисицын, Е.М. Потенциальная алюмоустойчивость сельскохозяйственных растений и ее реализации в условиях европейского Северо-Востока России: автореф. дисс. д-ра биол. наук / Е.М. Лисицын // Москва, 2005. - 48 с.

10. Rahnama, A. A screening method to identify genetic variation in root growth response to a salinity gradient / A. Rahnama, R. Munns, K. Poustint, M. Matt // Journal of Experimental Botany. - 2011. - P. 69-77.

Development of biotechnological methods for obtaining sustainable forms of sugar beet to stress factors *in vitro*

N.N. Cherkasova, Vasilchenko E.N, Tkachenko O.A.

Summary. The influence of selective systems *in vitro* during the cultivation of mature embryos of sugar beet seeds was studied. A selection of regenerants resistant to abiotic stress was carried out. Sustainable sugar beet lines have been created. A scheme for obtaining regenerants resistant to a complex of stress factors has been developed.

Key words: sugar beet, regenerants, nutrient medium, sorbitol, proline, *in vitro*, selective agent.