

# 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

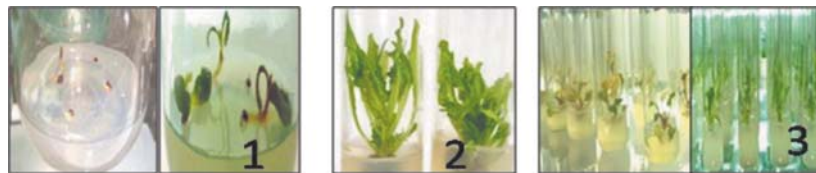


Рисунок 1. Проведение селективного отбора (0,45М сорбит, pH 3,5) растений-регенерантов сахарной свеклы: 1 – первичный отбор; 2 – микро-размножение; 3 – повторный отбор.

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.

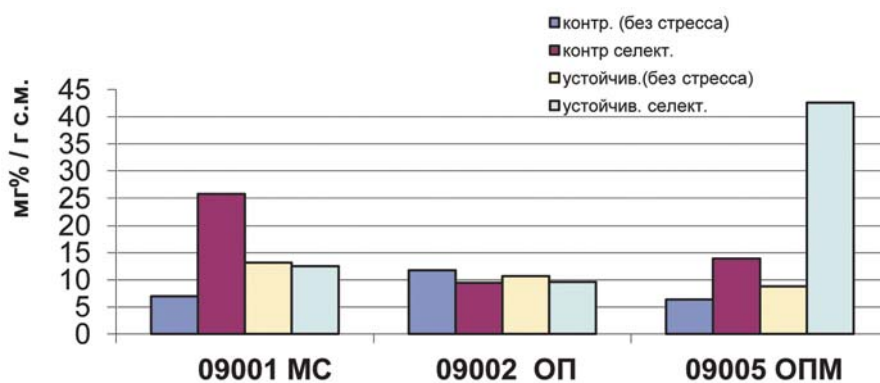


Рисунок 2. Содержание пролина в микроклонах сахарной свеклы в условиях абиотического стресса

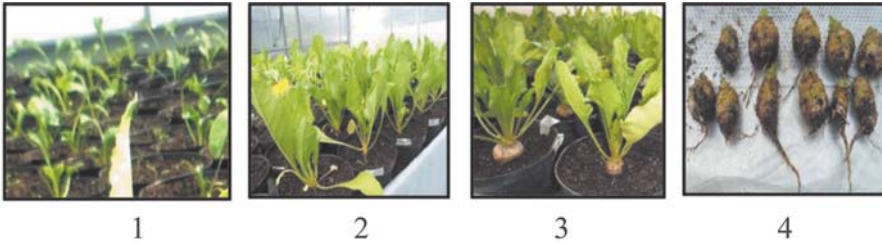


Рисунок. 3. Развитие микроклонов в условиях теплицы от регенеранта до штеклинга (1–4).

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. Хлебцова, 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.