

МОДИФИКАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ПРИ ДЕПОНИРОВАНИИ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ В КУЛЬТУРЕ *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. Представлены результаты биотехнологических исследований по модификации питательных сред при депонировании сахарной свеклы в культуре *in vitro*. Выявлены оптимальные условия сохранения до 75 % микроклонов сахарной свеклы в течение 5 месяцев на питательных средах с добавлением 0,4 мг/л абсцизовой кислоты; совместном добавлении АБК 0,4 мг/л + БАП 0,2 мг/л при температуре 11–13 °С. При последующей пересадке регенерантов в стандартные условия культивирования их рост возобновлялся в течение 2–3 недель.

Ключевые слова: сахарная свекла, растения-регенеранты, *in vitro*, абсцизовая кислота, питательная среда, депонирование.

Разработка технологии длительного беспересадочного депонирования растений *in vitro* является одним из перспективных направлений биотехнологии. Использование метода длительного культивирования позволяет с минимальными затратами сохранить селекционно ценный исходный материал в неизменном виде, сократить продолжительность и увеличить эффективность селекционного цикла, что является важным направлением исследований.

Следует отметить, что одни и те же приемы замедления ростовых процессов не всегда можно использовать для разных видов растений в виду их высокой видоспецифичности. Поэтому проведение поиска веществ, одновременно замедляющих рост растений и поддерживающих их жизнеспособность длительный период времени, отработка способов их применения являются актуальной задачей [1, 2].

Одним из наиболее активных эндогенных ингибиторов ростовых процессов является абсцизовая кислота (АБК), которая рассматривается как антистрессовый фактор, усиливающий адаптацию растений к различным неблагоприятным воздействиям.

Установлено, что добавление в питательную среду АБК тормозит рост культуры *in vitro*, но не влияет на жизнеспособность эксплантов [3, 4].

Цель работы – изучить возможности длительного беспересадочного культивирования *in vitro* микроклонов сахарной свеклы на средах, дополненных АБК, в том числе на фоне включения 6-БАП (6-бензиламинопурин).

В качестве материала для введения в культуру *in vitro* использовали хорошо развитые генотипы сахарной свеклы с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС), фертильные опылители с закрепительной способностью ЦМС (О-тип), сростноплодные фертильные опылители, способные в первом поколении стимулировать формирование эффекта гетерозиса (ОП). В процессе исследований применяли общепринятую технику стерилизации растительного материала и приготовления питательных сред Гамборга (В5). Культивирование регенерантов осуществляли при температуре 24–26 °С, 16-часовом фотопериоде с освещенностью 5000 люкс и относительной влажностью воздуха 70 % в климатической камере Фитотрон ЛиА-2 [5].

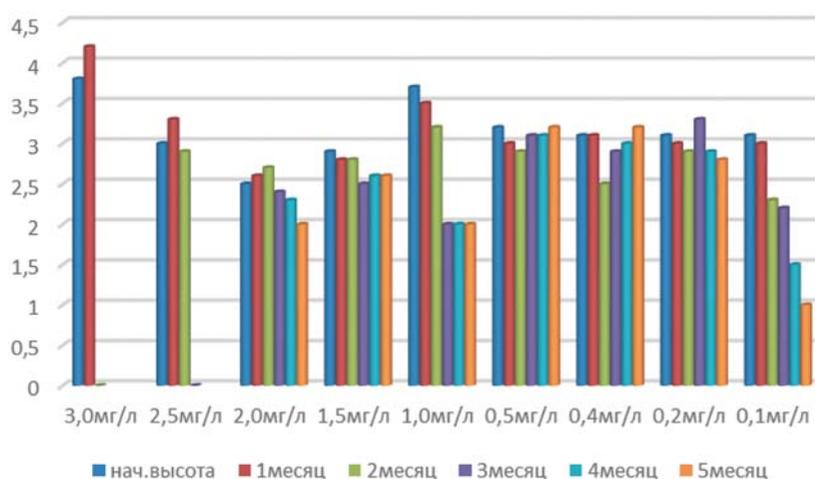


Рисунок 1. Динамика роста микроклонов сахарной свеклы в течение 5 месяцев культивирования при действии абсцизовой кислоты



Для выявления жизнеспособности микроклонов сахарной свеклы при длительном культивировании использовали абсцизовую кислоту в концентрации от 0,1 до 3 мг/л. Жизнеспособность оценивали с периодичностью один раз в месяц по количеству некрозов тканей листьев и побегов: 0 баллов – визуальная гибель растения, 1 балл – некроз более 50 % тканей растения, 2 балла – некроз менее 50 % тканей, 3 балла – растения без некроза [6].

Проведенные исследования показали, что развитие микроклонов сахарной свеклы зависело от состава среды и длительности культивирования. Так, в первый месяц культивирования наблюдалось формирование полноценных микроклонов во всех вариантах сред. На второй месяц индуцирования отмечали гибель микроклонов при концентрации 3 мг/л, на третий – при 2,5 мг/л (рис. 1).

Вероятно, АБК активирует ферменты, катализирующие распад цитокининов, и ингибирует экспрессию генов биосинтеза цитокининов, что, в свою очередь, приводит к снижению активности клеточных делений и торможению ростовых процессов [7].

К пятому месяцу культивирования на питательной среде с содержанием АБК 0,4–0,5 мг/л было отмечено замедление роста микроклонов и сохранение жизнеспособности до 65 %, что составило 1,9–2,0 балла (табл.).

В остальных вариантах питательных сред отмечалось угнетение ростовых процессов у микроклонов сахарной свеклы (рис. 2).

В результате проведенных исследований выявлена оптимальная концентрация АБК – 0,4–0,5 мг/л в питательной среде для длительного культивирования микроклонов в культуре *in vitro*.

На следующем этапе изучали влияние состава модифицированных питательных сред (АБК на фоне включения 6-БАП) и температурного режима на жизнеспособность микроклонов сахарной свеклы при депонировании.

Анализ результатов исследования показал, что в течение 1 месяца культивирования при температуре 23–26 °С во всех вариантах сред сохранялась 100 % жизнеспособность растений-регенерантов (рис. 3).

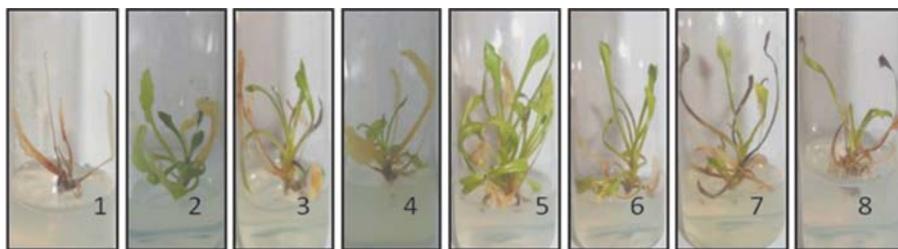


Рисунок 2. Влияние различной концентрации абсцизовой кислоты при депонировании микроклонов сахарной свеклы: 1 – 3,0 мг/л; 2 – 2,0 мг/л; 3 – 1,5 мг/л; 4 – 1,0 мг/л; 5 – 0,5 мг/л; 6 – 0,4 мг/л; 7 – 0,2 мг/л; 8 – 0,1 мг/л

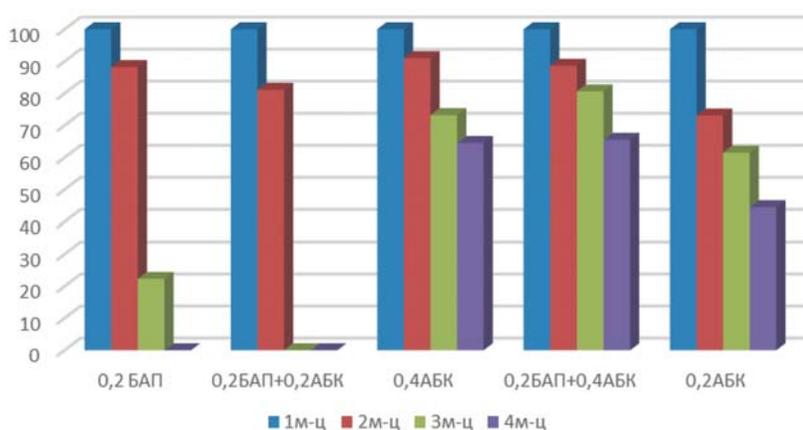


Рисунок 3. Влияние модифицированных питательных сред на жизнеспособность микроклонов сахарной свеклы при депонировании (23–26 °С)

К 4 месяцу индуцирования совместное действие 0,2 мг/л 6-БАП + 0,2 мг/л АБК и 0,2 мг/л БАП негативно влияло на рост микроклонов, что приводило к их гибели.

Наибольшей жизнеспособностью (64,5–65,5 %) обладали микроклоны на среде с содержанием 0,4 мг/л АБК и совместном действии 0,4 мг/л АБК + 0,2 мг/л БАП.

При депонировании в условиях климакамеры при пониженной температуре (11–13 °С) наблюдали выживаемость микроклонов во всех вариантах сред. Следует отметить, что к пятому месяцу культивирования отмечалось незначительное отмирание листового аппарата из-за усыхания питательной среды, однако, микроклоны оставались жизнеспособными (рис. 4).

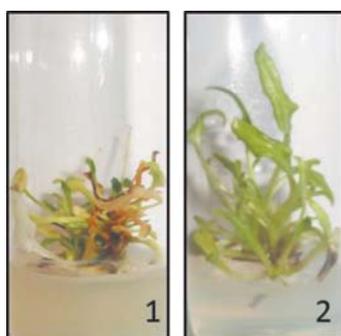


Рисунок 4. Микроклоны сахарной свеклы после 5 месяцев культивирования: 1 – в обычных условиях, 2 – при понижении температуры

При пониженной температуре отмечалось меньше инфицированных и обводненных растений-регенерантов в отличие от микроклонов при повышенной температуре. Наибольшая жизнеспособность к пятому месяцу культивирования составила 70–75 % на питательной среде с добавлением АБК 0,4 мг/л и АБК 0,4 мг/л + БАП 0,2 мг/л (рис. 5).

Таблица. Влияние абсцизовой кислоты на жизнеспособность микроклонов сахарной свеклы при депонировании в культуре *in vitro* (среднее по генотипам)

Количество АБК, мг/л	Высота растений, см		Жизнеспособность	
	начальная	5 месяц	%	баллы
3,0	3,8	0	0	0
2,5	3,0	0	0	0
2,0	2,5	2,0	40,0	1,2
1,5	2,9	2,6	56,3	1,7
1,0	3,7	2,0	54,0	1,6
0,5	3,2	3,2	62,3	1,9
0,4	3,1	3,2	65,0	2,0
0,2	3,1	2,8	53,2	1,6
0,1	3,1	1,0	49,0	1,4

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить оптимальные условия длительного беспересадочного хранения микроклонов сахарной свеклы в культуре *in vitro*. Изучено влияние абсцизовой кислоты на снижение скорости роста и сохранение жизнеспособности микроклонов.

Выявлена оптимальная концентрация абсцизовой кислоты 0,4 мг/л в питательной среде, приводящая к замедлению роста и сохранению до 75 % микроклонов. Экспериментальные исследования позволили установить возможность беспересадочного культивирования растений без снижения жизнеспособности в течение 5 месяцев на питательной среде с добавлением АБК 0,4 мг/л и АБК 0,4 мг/л + БАП 0,2 мг/л при понижении температуры до 11–13 °С. Это дает возможность более успешно решать проблему поддержания и сохранения в живом виде селекционно ценных образцов сахарной свеклы в контролируемых условиях среды. Данные исследования имеют огромную практическую ценность, так как позволяют в неограниченном количестве сохранять и поддерживать

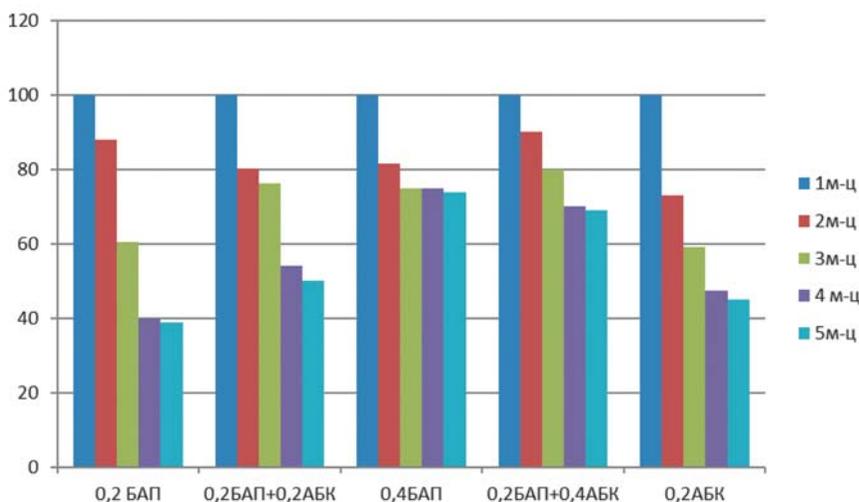


Рисунок 5. Влияние модифицированных питательных сред при депонировании микроклонов сахарной свеклы в климаткамере

в культуре *in vitro* ценные генотипы сахарной свеклы и компоненты перспективных гибридов.

Список использованной литературы

1. Молканова, О.И. Генетические банки растений: проблемы формирования, сохранения и использования / О.И. Молканова, О.И. Коротков, Е.М. Ветчинкина, Н.А. Мамаева., О.Г. Васильева // Вестник Удмуртского университета. Биология. Науки о Земле. - 2010. - № 3. - С. 33-39.
2. Кашина, М.С. Биотехнологические методы в селекции растений / М.С. Кашина // IX Межд. студ. науч. конф. Саратов. - 2017. - С. 15-20.
3. Концевая, И.И. Модификация питательных сред при депонировании березы в культуре *in vitro* / И.И. Концевая // Достижения науки и образования. - 2018. - Т. 1. - С. 9-12.
4. Концевая, И.И. Эффект абсцизовой кислоты при депонировании карельской березы в культуре *in vitro* / И.И. Концевая // Бюллетень науки и практики. - 2018. - Т.4. - № 7. - С. 11-16.
5. 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.
6. Дорошенко, Н.П. Влияние сахарозы на замедление роста и сохранение растений винограда в коллекции *in vitro* / Н.П. Дорошенко, А.С. Куприкова, В.Г. Пузырнова // Плодоводство и виноградарство Юга России. - 2017. - № 46(4). - С. 33-48.
7. Веселов, Д.С. Роль цитокининов в стресс-устойчивости растений / Д.С. Веселов, Г.Р. Кудоярова, Н.В. Кудрякова, В.В. Кузнецов // Физиология растений. - 2017. - Т. 64. - № 1. - С. 19-32.

Modification of nutrient media when depositing sugar beet in *in vitro* culture

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

Summary. The results of biotechnological research on modification of nutrient media when depositing sugar beets in *in vitro* culture are presented. Optimal preservation conditions for sugar beet microclones up to 75 % for 5 months on nutrient media with the addition of abscisic acid – 0.4 mg/l have been identified; joint addition of ABA 0.4 mg/l + BAP 0.2 mg/l at a temperature of 11–13°C. When the regenerants were subsequently transplanted into standard cultivation conditions, their growth resumed within two to three weeks.

Key words: sugar beet, regenerating plants, *in vitro*, abscisic acid, nutrient medium, deposition.