

# Создание регенерантов сахарной свёклы с комплексной устойчивостью к абиотическим стрессам в условиях *in vitro*<sup>5</sup>

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

**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

Разработка биотехнологических методов получения устойчивых к стрессам форм сахарной свёклы — неотъемлемая часть современного селекционного процесса. Среди актуальных методов биотехнологии одним из эффективных подходов к решению этой проблемы является клеточная селекция, позволяющая отбирать резистентные клетки и ткани в селективных условиях *in vitro* [5].

Абиотические стрессы провоцируют комплекс взаимосвязанных реакций, протекающих одновременно или поочередно. Поэтому для первичной селекции целесообразно задействовать агент, оказывающий как общее патологическое давление, так и специфическое воздействие. Если стрессовый фактор отличается высокой токсичностью в относительно малых количествах и вызывает существенные нарушения в клетке, клеточная селекция может стать приоритетным методом получения новых форм растений. Этому условию отвечают ионы тяжёлых металлов (ИТМ), токсичные в следовых количествах. ИТМ действуют совместно с неблагоприятными абиотическими факторами, усиливая

стресс от окружающей среды, и тем самым расширяют спектр поражений растения от стрессов. Клеточная селекция с использованием летальных доз ИТМ может быть перспективным методом получения растительных форм с улучшенными показателями. Линии, отобранные на селективных средах с ИТМ, и их растения-регенеранты отличаются комплексной устойчивостью. Они хорошо адаптируются в условиях различных осмотических стрессов (засоление, водный стресс) независимо от условий (стресс или норма) их предыдущего выращивания. При этом жизнеспособность клеток поддерживается за счёт адаптации к конкретному стрессовому агенту [3, 6].

Достижения последнего времени подтвердили перспективность метода клеточной селекции для получения устойчивых к ИТМ форм растений на различных культурах [2, 10]. Однако в отношении сахарной свёклы подобные сведения отсутствуют. В связи с этим исследование по созданию регенерантов сахарной свёклы с комплексной устойчивостью к ионной токсикации и осмотическому стрессу в культуре *in vitro* являются актуальными.

**Цель исследования** — оптимизировать параметры для создания новых форм сахарной свёклы с комплексной устойчивостью к стрессам и получить новый материал с изменёнными признаками для включения в селекционный процесс.

## Материалы и методы исследования

Научные исследования выполнены на базе лаборатории культуры тканей и молекулярной биологии ФГБНУ ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова с использованием биотехнологических методов культуры *in vitro* [4].

В работе были использованы генотипы сахарной свёклы рамонской селекции, в качестве эксплантов — зрелые зародыши семян, микроклоны сахарной свёклы.

Для моделирования селективного агента к основной среде добавляли ацетат кадмия  $Cd(CH_3CO_2)_2$  в различной концентрации (1–15 мМ) и маннит (0,40–0,45 М).

Проведённые исследования показали, что относительно низкие концентрации ацетата кадмия (1 мМ) не оказывали негативного действия на прорастание семян, которое составило 58,3–77,7 %

<sup>5</sup> Выбор спонсора научных публикаций осуществляется по усмотрению редакции, любая взаимосвязь между видами деятельности спонсора и результатами научной работы исключается

при выживаемости проростков 40,0–44,4 % (табл. 1).

Однако при высоких концентрациях селективного агента (6 мМ) процесс прорастания существенно замедлялся, образовывались проростки небольшого размера, при этом выживаемость варьировала от 13,3 до 16,7 %. При содержании ацетата кадмия 8 мМ количество выживших проростков уменьшалось в два раза и составило 8,3–8,7 % (рис. 1).

С увеличением концентрации селективного агента было заметно его ингибирующее действие при прорастании. Семена начинали прорастать, а по мере повышения селективной нагрузки ростки погибали через несколько дней, что приводило к уменьшению выживаемости до 5,6 % при 11 мМ ацетата кадмия, а в дальнейшем – к полной их гибели (при 15 мМ).

По-видимому, этапы набухания семени и прорастания корешка менее чувствительны к ионам кадмия, чем последующий рост проростков. Это связано с тем, что оболочка семян практически непроницаема для металла, и его проникновение в зародыш возможно только на заключительной стадии набухания, когда семенные покровы нарушаются. Высокое содержание ионов кадмия существенно замедляет или полностью останавливает процесс прорастания, что, вероятно, связано с непосредственным действием металла на процесс деления и растяжения клеток [8]. Поэтому для отбора устойчивых к ионной токсичности регенерантов оказалась среда с содержанием кадмия 6 мМ. При этом всхожесть семян *in vitro* составила 38,9–46,7 %, а выживаемость проростков – 13,3–16,7 %.

В процессе эволюции растения выработали различные приспособительные механизмы, которые защищают клеточный метаболизм от присутствующих в среде

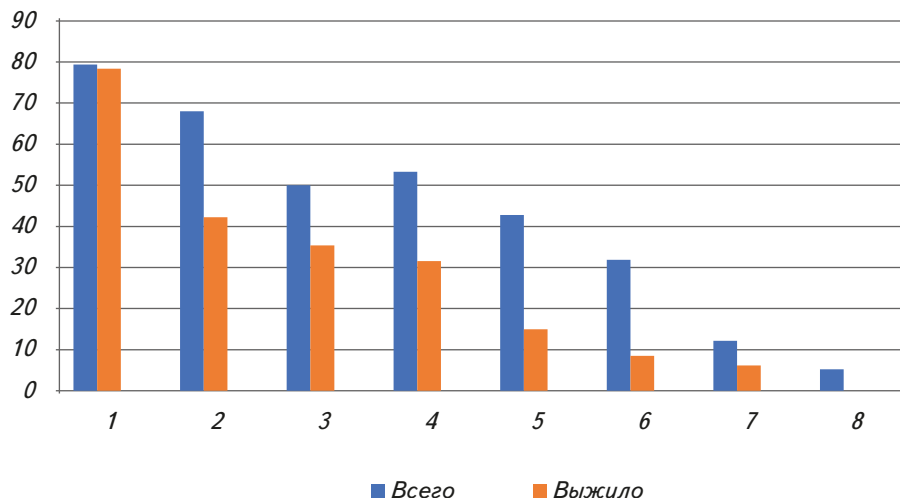


Рис. 1. Влияние различных концентраций ионов кадмия на прорастание семян (среднее для генотипов) сахарной свёклы *in vitro*: 1 – 0 мМ; 2 – 1 мМ; 3 – 2 мМ; 4 – 4 мМ; 5 – 6 мМ; 6 – 8 мМ; 7 – 11 мМ; 8 – 15 мМ

Таблица 1. Влияние ионов кадмия на прорастание семян сахарной свёклы *in vitro*

Генотип	Концентрация Cd(CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> мМ	Количество проростков, %	
		Всего	Выжило
МС-2113	0	80,4	80,4
ОП-14044		78,3	78,3
МС-2113	1	77,7	44,4
ОП-14044		58,3	40,0
МС-2113	2	55,6	33,3
ОП-14044		44,4	37,5
МС-2113	4	52,4	38,1
ОП-14044		54,2	25,0
МС-2113	6	46,7	13,3
ОП-14044		38,9	16,7
МС-2113	8	33,3	8,3
ОП-14044		30,4	8,7
МС-2113	11	13,3	6,7
ОП-14044		11,1	5,6
МС-2113	15	5,5	0
ОП-14044		5,0	0



ионов металлов и способны снижать их токсическое действие или ликвидировать его последствия. Эти механизмы направлены на выживание растений-регенерантов при стрессовых воздействиях.

Поскольку не все отобранные в селективных условиях регенеранты сохраняют признак устойчивости, после нахождения их в обычных условиях целесообразно проводить повторный отбор на идентичных селективных средах. Повторный отбор полученных в селективных условиях регенерантов, идентичных первичному отбору (2–6 мМ), показал их высокую адаптивную способность. Количество выживших экземпляров составило от 34,7 до 74,8 % (табл. 2).

Наименьшее количество выживших регенерантов было в более жёстких условиях. Прирост высоты к начальной у устойчивых регенерантов варьировал от 12,5 до 22,0 % в отличие от контрольных растений, у которых она была значительно меньше, что в течение 10–25 дней приводило к пожелтению листьев, некрозу точек роста, а в дальнейшем – к гибели микроклонов (рис. 2).

Возможно, что с повышением концентрации кадмия в среде до

**Таблица 2.** Повторный отбор регенерантов на селективных средах с различным содержанием ионов кадмия

Генотип	Вариант	Концентрация ацетата кадмия, мМ	Прирост высоты, %	Получено устойчивых, %
МС-2113	Контроль	0	8,1	0
МС-2113	Устойчивое	2	22,0	74,8
МС-2113	Устойчивое	4	18,3	58,3
МС-2113	Устойчивое	6	12,5	34,7
0-10	Контроль	0	9,2	0
0-10	Устойчивое	2	20,2	65,0
0-10	Устойчивое	4	17,5	53,8
0-10	Устойчивое	6	13,6	35,7

определённых критических величин клеточная оболочка перестаёт сдерживать поток токсичных ионов и металл попадает в цитозоль клетки [9]. В цитозоле ионы кадмия связываются различными хелатирующими соединениями, часть из которых в составе комплексов затем удаляется в вакуоль. Ионы кадмия оказывают воздействие на белки – дегидрины [1]. Защитная роль дегидринов состоит в предупреждении коагуляции молекул и поддержании целостности клеточных мембран, что становится особенно актуальным

в условиях осмотического стресса. 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 [7]. Результаты исследований показали, что устойчивые к ионам кадмия регенеранты росли в условиях осмотического стресса, где они продемонстрировали высокую толерантность (рис. 3).

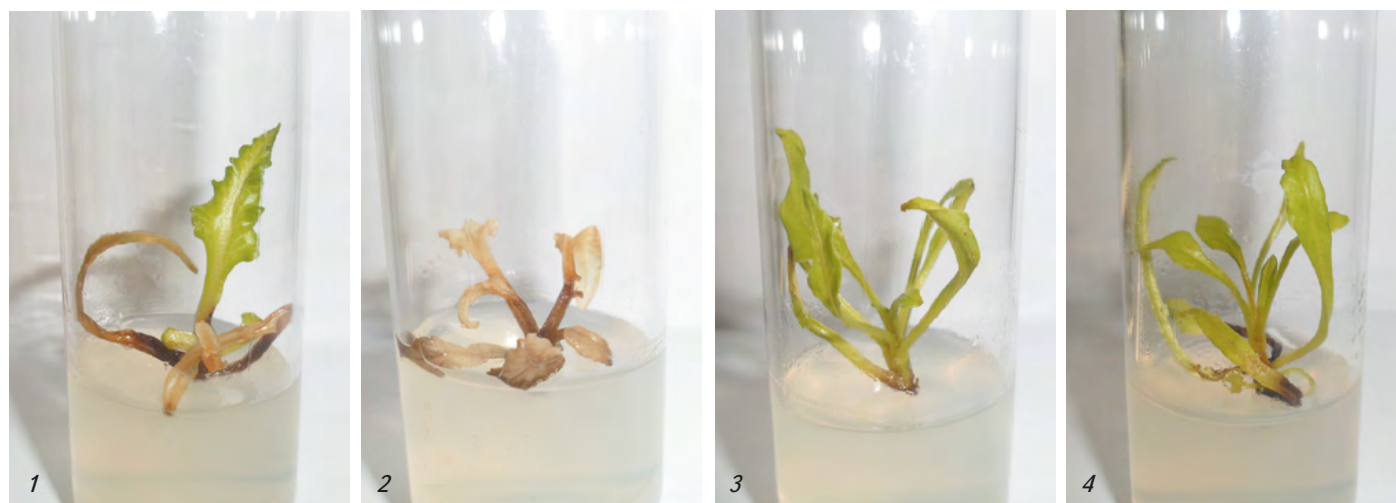


Рис. 2. Повторный отбор регенерантов: 1, 2 – контроль; 3, 4 – устойчивые

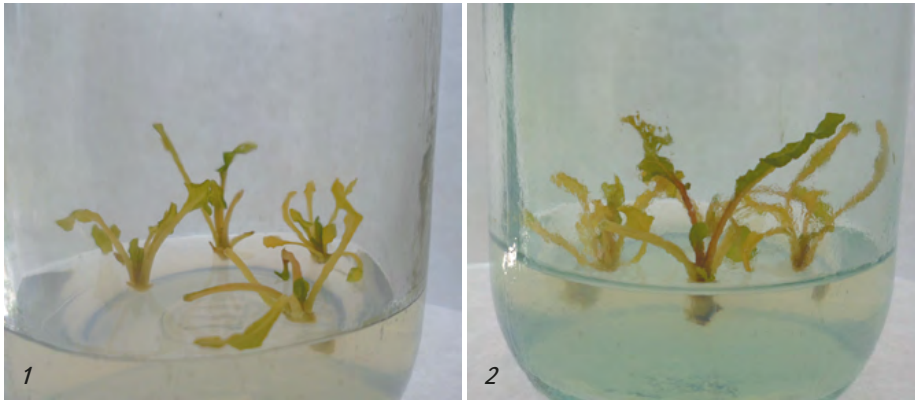


Рис. 3. Регенеранты сахарной свёклы на питательных средах с различным содержанием маннита: 1 – 0,40 М; 2 – 0,45 М

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

#### Заключение

Проведённые исследования позволили оптимизировать состав селективной питательной среды для получения регенерантов сахарной свёклы с устойчивостью к ионной токсичности в условиях *in vitro*. В результате выявлена сублетальная концентрация ацетата кадмия (6 мМ) для отбора устойчивых регенерантов из семян. Повторный отбор в селективных условиях повысил толерантность регенерантов к ионному стрессу до 34,7–74,8 %. Регенеранты с ионной устойчивостью к металлам показали высокую толерантность в условиях осмотического стресса 65,0–70 %, что свидетельствовало о комплексной их устойчивости к стрессовым факторам. Получены регенеранты сахарной свёклы с комплексной устойчивостью к стрессам.

#### Список литературы

1. Аллагулова, Ч.Р. Дегидрины растений: их структура и предполагаемые функции / Ч.Р. Аллагулова, Ф.Р. Гималов, Ф.М. Шаки-

рова, В.А. Вахитов // Биохимия. – 2004. – С. 1157–1165.

2. Гончарук, Е.А. Реакция клеток контрастных по устойчивости сортов льна-долгунца (*linum usitatissimum* L.) на действие ионов кадмия / Е.А. Гончарук, Н.В. Загоскина // Вісник харківського національного аграрного університету. Серія біологія. – 2016. – Вип. 3 (39). – С. 27–38.

3. Духовский, П. Реакция растений на комплексное воздействие природных и антропогенных стрессов / П. Духовский, Р. Юкнис, А. Бразайтите, И. Жукаускайте // Физиология растений. – 2003. – № 2. – С. 165–173.

4. Знаменская, В.В. Микроклонирование *in vitro* как метод поддержания и размножения линий сахарной свёклы / В.В. Знаменская // Энциклопедия рода Beta: биология, генетика и селекция

свёклы. – Новосибирск, 2010. – С. 420–437.

5. Кошкин, Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных растений. Клеточная селекция с ионами тяжёлых металлов: новые аспекты комплексной устойчивости / Е.И. Кошкин // Матер. X Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». – Казань, 2013. – С. 82.

7. Сергеева, Л.Е. Клеточная селекция с ионами тяжёлых металлов для получения генотипов растений с комплексной устойчивостью к абиотическим стрессам / Л.Е. Сергеева, Л.И. Бронникова, Е.Н. Тищенко. – Киев : Логос, 2013. – 211 с.

8. Титов, А.Ф. Устойчивость растений к тяжёлым металлам / А.Ф. Титов, В.В. Таланова, Н.М. Казнина, Г.Ф. Лайдинен / Институт биологии КарНЦ РАН; Карельский научный центр. – Петрозаводск, 2007. – 172 с.

9. Титов, А.Ф. Устойчивость растений к кадмию (на примере семейства злаков) : учеб. пособие / А.Ф. Титов, Н.М. Казнина, В.В. Таланова. – Петрозаводск, 2012. – 55 с.

10. Щуплецова, О.Н. Повышение устойчивости ячменя к токсичности металлов и осмотическому стрессу путём клеточной селекции / О.Н. Щуплецова, И.Г. Широких // Зерновое хозяйство России. – 2015. – № 1. – С. 124–135.

**Аннотация.** Представлены результаты создания в условиях *in vitro* регенерантов сахарной свёклы с комплексной устойчивостью к ионной токсикации и осмотическому стрессу. Выявлены сублетальные концентрации ацетата кадмия, позволяющие проводить отбор устойчивых регенерантов. Получены устойчивые растения-регенеранты.

**Ключевые слова:** регенеранты, сахарная свёкла, стресс, адаптация, *in vitro*, питательная среда, ионная токсичность, маннит, ацетат кадмия.

**Summary.** The results of *in vitro* creation of sugar beet regenerants with complex resistance to ionic toxicity and osmotic stress are presented. Revealed sublethal concentrations of cadmium acetate, allowing the selection of stable regenerants. Resistant plants-regenerants were obtained.

**Keywords:** regenerants, sugar beet, stress, adaptation, *in vitro*, nutrient medium, ionic toxicity, mannitol, cadmium acetate.

