

СКРИНИНГ УСТОЙЧИВЫХ К ХЛОРИДУ НАТРИЯ ТКАНЕВЫХ ЛИНИЙ МАЛИНЫ

С.Л. Расторгуев, Мичуринский государственный аграрный университет

Перспективное направление прикладной биотехнологии для создания стрессоустойчивых растений — выращивание и селекция *in vitro* соматических клеток в условиях селективных питательных сред. Выбор селективной системы *in vitro* основывается на механизмах устойчивости растений к тому или иному стрессовому воздействию. Добавленные в питательную среду селективные агенты могут вызывать у определенной части клеток индуцированные мутации, определяющие устойчивость к конкретным стрессорам. В культуре изолированных клеток в значительной степени усиливается размах изменчивости, что расширяет возможности отбора.

Селекция на уровне соматических клеток позволяет целенаправленно отбирать в жестких селективных системах стабильные клеточные и тканевые линии, которые могут быть использованы для получения устойчивых растений. При этом сохраняются основные хозяйственно ценные показатели сортов и сокращаются сроки селекции. Однако следует учитывать, что устойчивые клетки необязательно дают начало устойчивому растению — регенеранту, т.к. процессы адаптации клеток и целого организма к стрессам могут быть различными [2]*. Механизмы, связанные с передачей признака с клеточного уровня на уровень растения, еще до конца не изучены.

Чрезвычайно важное практическое значение имеет создание методом тканевой селекции форм растений, которые были бы устойчивы к действию таких факторов внешней среды, как экстремальные температуры, солевой и водный стрессы, поражение вредителями и болезнями, загрязнение природной среды токсическими веществами и ряд других факторов.

Несмотря на трудности, связанные, прежде всего, с регенерацией растений, использование тканевой селекции позволило получить резистентные к селективным факторам тканевые линии и растения риса, пшеницы, табака, картофеля и некоторых других культур. Растения — регенеранты проявляют устойчивость к высоким концентрациям солей [1, 6], патогенам [7], низким температурам [5] и другим стрессорам [3]. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности работ по селекции растений на клеточном уровне, что позволит исправлять «недостатки» существующих сортов по отдельным признакам. Важность проведения исследований в данном направлении у плодовых и ягодных культур очевидна, поскольку процесс создания сортов традиционными методами у них довольно длительный.

В работе рассмотрены некоторые методические вопросы тканевой селекции малины на устойчивость к высоким концентрациям хлорида натрия (NaCl).

В экспериментах использовали сорта малины красной (Новость Кузьмина, Молинг промис и Карнавал). Исходными эксплантами для индукции первичной каллусной ткани служили листовые диски, которые культивировали на агаризованной питательной среде по прописи Андерсона, дополненной ауксином 2,4-Д в концентрации 4 мг/л. В опытах по отбору устойчивых клеток каллуса в среду каллусогенеза вводили NaCl в различных концентрациях (0,25; 0,5; 1,0; 1,5%). Каллусную ткань выращивали в темноте при температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

Для проведения исследований по выделению стрессоустойчивых тканевых линий существует несколько способов — жесткая, мягкая и ступенчатая селекции [4]. Жесткий

отбор основан на применении сублетальных концентраций стрессового агента и многократного субкультивирования в селективных условиях. При мягкой селекции используют адаптивные дозы селективного фактора в течение 3—4 пассажей. Ступенчатая селекция заключается в постепенном повышении концентрации стрессового фактора и чередовании культивирования тканей в селективных и неселективных условиях. Преимуществом жесткого и ступенчатого отбора является тот факт, что наблюдается полная элиминация чувствительных клеток, но при этом резко снижается морфогенетический потенциал таких культур. Регенеранты, полученные после применения приема мягкой селекции обычно устойчивы к ингибиторам лишь в некоторых случаях.

Для индукции первичной каллусной культуры листовые диски размером 0,7—0,8 см² помещали на питательную среду с содержанием ауксина 2,4-Д в количестве 4 мг/л. Уровень каллусообразования при этом достигал 82—100% (в зависимости от сорта). В экспериментах по тканевой селекции полученный каллус примерно через 30—40 дн. после введения эксплантов в культуру пересаживали на селективные питательные среды, дополненные NaCl (табл.).

Каллусогенез у сортов Новость Кузьмина и Молинг промис более активно протекал на селективной питательной среде с добавлением NaCl в концентрации 0,5%. Частота каллусообразования в четвертом пассаже достигала 44%. До четвертого пассажа этот показатель, как и масса каллуса, имели тенденцию к увеличению. Очевидно, тканевые культуры лучше адаптировались к росту и развитию в данной селективной системе.

Частота каллусообразования (%) при различной концентрации NaCl в среде

Сорт	Концентрация NaCl, %	Первый пассаж	Второй пассаж	Третий пассаж	Четвертый пассаж
Новость Кузьмина	0	27,8	40,0	75,0	81,0
	0,5	35,3	50,0	55,6	44,4
	1,0	31,6	33,3	50,0	20,0
	1,5	5,6	0	—	—
Молинг промис	0	38,9	57,1	88,9	77,8
	0,5	27,8	40,0	50,0	40,0
	1,0	11,1	50,0	25,0	33,3
	1,5	17,6	33,3	0	—

Пролиферационные процессы в каллусе протекали и на среде, содержащей 1,0% хлорида натрия, но с несколько меньшей частотой (11—33%) и интенсивностью образования. Каллусные культуры опытных вариантов с 0,5 и 1,0% NaCl находились в условиях солевого стресса в течение 200 дн. Введение в среду селективного агента в концентрации 1,5% резко снижало жизнеспособность и ингибировало новообразование каллусной ткани у сорта Новость Кузьмина уже во втором пассаже, а у сорта Молинг промис — в третьем.

В эксперименте по ступенчатому культивированию каллусных тканей на селективных средах. Предвари-

* Со списком литературы можно ознакомиться на сайте www.agroxxi.ru

тельно индуцированный каллус сорта Карнавал сначала выращивали на среде с 0,25% NaCl, а затем через каждые 35–50 дн. субкультивировали на среды с возрастающей концентрацией селективного агента (0,5; 1,0; 1,5%). Весь цикл последовательных пассажей тканевых культур составил свыше 200 дн. После проведения первого и второго пассажей способность каллусных культур к пролиферации возрастала. Так, на селективной среде с 0,25% NaCl частота каллусогенеза составляла 65,9%, а на среде с 0,5% NaCl — 82,7%.

Дальнейшее субкультивирование показало, что с увеличением концентрации селективного фактора от 1,0% до 1,5% происходило некоторое подавление развития тканевых культур. Однако частота пролиферации каллусов была довольно высокой, и в третьем–пятом пассажах резистентность сохранялась у 62,8–57,4% клеток. Возможно, такие клеточные колонии могли возникнуть в результате физиологической адаптации или определенного состояния дифференцировки кле-

ток [6], но не исключено и проявление мутационной изменчивости.

Отдельные каллусные ткани, устойчивые к высоким концентрациям NaCl, были пересеяны на среду морфогенеза с 10 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ИУК для регенерации растений. В культуре *in vitro* от тканей, растущих на средах с концентрацией 0,5 и 1,0% селективного агента, были получены единичные адвентивные побеги с пониженной жизнеспособностью (в основном наблюдали формирование морфогенных структур).

Таким образом, созданные в искусственной культуре селективные условия позволили отобрать каллусные линии сортов малины, пролиферирующие на питательных средах с 0,5, 1,0 и 1,5% NaCl. При этом проявляются некоторые различия между сортами Новость Кузьмина и Молинг промис в реакции на солевой стресс. Ступенчатая селекция позволяет отбирать пролиферирующие ткани на средах с более высокой концентрацией хлорида натрия. ❏

Литература

1. Бургутин А.Б. Селекция картофеля *in vitro* на устойчивость к хлористому натрию: Тез. докл./II Российский симпозиум. Пушкино, 1993. — С. 117.
2. Бутенко Р.Г. Клеточные технологии в селекционном процессе: Мат. докл./ Всесоюзн. конф., Ленинград, 1986. — С. 29–38.
3. Гонзалес Р.А., Уидхолм Дж.М. Отбор клеток растений по требуемым признакам: устойчивость к ингибиторам // Биотехнология растений: культура клеток. — М: Агропромиздат. — 1989. — С. 83–96.
4. Долгих Ю.И. Принципы скрининга клеток *in vitro* с целью получения устойчивых к абиотическим стрессам форм растений: Тез. докл./ II Российский симпозиум. Пушкино, 1993. — С. 103.
5. Никифорова И.Д., Чернов В.А., Швидченко В.Н., Бутенко Р.Г. // Рост и морфогенез клеток яровых пшениц в стрессовых условиях и отбор устойчивых вариантов: Тез. докл./Межд. конф. Новосибирск, 1988. — С. 178–179.
6. Ошмарина В.И., Шамина З.Б., Бутенко Р.Г. Получение резистентных к NaCl и этионину клеточных линий *Nicotiana sylvestris* и их характеристика // Генетика. 1983. №5. — С. 822–827.
7. Рассадина Г.В. Эффективность клеточной селекции на устойчивость к кольцевой гнили картофеля: Тр. НИИ КХ. М., 1987.