

ПОЛУЧЕНИЕ И БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАНТОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ЭДАФИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

О.А. Землянухина¹, Н.Н. Черкасова², Т.П. Жужалова², В.Н. Калаев¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, *oz54@mail.ru*

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова (ВНИИСС), Воронежская область, п. ВНИИСС, Россия, *biotechnologiya@mail.ru*

Аннотация. На основе селективного отбора в условиях *in vitro* разработан способ получения устойчивых регенерантов сахарной свеклы разных генотипов. Стрессовыми факторами являлись одновременное пониженное содержание влаги и повышенная кислотность (использование соли алюминия) питательной среды Гамборга. Первый этап включает культивирование *in vitro* зрелых зародышей семян с добавлением в питательную среду селективного агента сорбита в концентрации 0.45 М при кислотности pH 3.5. На данной среде проводят первичный и повторный отборы регенерантов с устойчивостью к эдафическим факторам. Дана биохимическая характеристика отобранного устойчивого материала.

Ключевые слова: сахарная свекла, комплексные эдафические факторы, устойчивость, ферменты

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-354-357

Использование селективных сред при культивировании в условиях *in vitro* позволяет имитировать естественные стрессовые условия, что обеспечивает экспрессию генов устойчивости и позволяет проводить отбор толерантных форм на клеточном уровне. При этом за более короткие сроки создается исходный материал с высокими адаптивными свойствами для дальнейшей селекции. Ранее было изучено раздельное влияние кислотности среды и пониженного содержания влаги на рост и развитие микрорастений сахарной свеклы [Землянухина и др., 2009; Zemlianukhina et al., 2017]. Стрессовое воздействие эдафических (почвенных) факторов при культивировании *in vitro* представляет как научный, так и практический интерес, в связи с чем разработка условий для отбора толерантных к засухе и повышенной кислотности форм для использования их в селекции является одним из перспективных и важных направлений в биотехнологии растений и представляется актуальным.

Целью работы явилось создание линий сахарной свёклы с комплексной устойчивостью к эдафическим факторам (к повышенной кислотности и недостатку влаги (осмотическому стрессу)).

Материалы и методы. В качестве растительных материалов использовали стерильные зародыши компонентов гибридов сахарной свёклы лаборатории исходного материала ФГБНУ ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова: генотип №1 - мужскостерильный компонент гибрида; № 2 - фертильная линия гетерозисного опылителя; генотип № 3 - закрепитель мужской стерильности.

Основной питательной средой для проведения селективных экспериментов была классическая среда Гамборга, дополненная ростовыми гормонами. Условия недостатка влаги достигались добавлением неионного и неметаболизируемого осмотика сорбита в концентрации 0.40-0.45 М, условия пониженной кислотности - добавлением 0.02 или 0.05% $AlCl_3$, что создает pH 3.8 и 3.5, соответственно.

Для получения ферментативных препаратов растения сахарной свеклы растирали со стеклянным песком в 0.1 М трис-НС1-буфере, pH 7.5 и центрифугировали в

эппендорфах в течение 7 минут при 20000 g, 4 °С, на центрифуге CM50 ELMi (Латвия). Надосадочные жидкости в процессе работы сохраняли в твердотельном термостате BIOSAN CH-100 (Латвия) при -3 °С. Анализировали следующие ферменты: глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа (гл.-6-Ф-ДГ; КФ 1.1.1.49), пероксидаза (ПО; КФ 1.11.17), изоцитратлиаза (ИЦЛ; КФ 4.1.3.1), малик-энзим (NAD-МЭ; КФ 1.1.1.39). Активность ферментов определяли с использованием коэффициента экстинкции, а единица активности определена как количество фермента, превращающего 1 мкм субстрата в 1 мин при 25 °С. Все измерения проведены на спектрофотометра UNICO 2800 (США). Содержание белка определяли по стандартному методу Bradford, в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (Sigma).

Измерения активности ферментов и содержания белка проводили в 4-х биологических повторностях. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ «Stadia». Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе Калаевой [2016]. Влияние генотипа и типа эксперимента (недостаток влаги и пониженная кислотность) на активность ферментов устанавливали с использованием двухфакторного дисперсионного анализа. Силу влияния фактора вычисляли по Снедекору (в %). Кластерный анализ проводили с использованием метрики нормированный Эвклид, стратегия классификации – группового соседа. При кластеризации в матрицу данных вносили значения активностей ферментов и содержание белка в образцах. Достоверность разделения на группы в кластерном анализе определяли с помощью дискриминантного анализа на основании критерия Махаланобиса.

Результаты и обсуждение. Получение адаптированных микроклонов сахарной свеклы. Проращение стерильных семян на селективных средах с двумя стрессовыми факторами (сорбит 0.45 М, рН 3.5) составляет 7.3-8.6 % при последующей выживаемости и сохранения регенерационной способности регенерантов 3.7-4.3 %. Добавление бензиламинопурина (БАП) в концентрации 0.2 мг/л приводит к повышению выживаемости семян до 15.0-22.7 % и регенерантов – до 6.0-8.6 %, что в 1.6-2.3 раза выше контрольных значений (различия достоверны (P<0.05)). В течение активного формирования листового аппарата и побегов используют селективную питательную среду, дополненную БАП, кинетином и гиббереллином в концентрации 0.2 мг/л каждый. Регенерация на данной среде проводится в два пассажа продолжительностью каждый в 25-30 суток, после чего растения переносятся на селективные среды. После этого проводится отбор устойчивых клонов по высоте и способности образовывать адвентивные побеги. При повторном отборе регенерантов в селективных условиях обнаруживается высокая толерантность к эдафическим стрессам, где количество устойчивых регенерантов варьирует от 58.0 до 66.0 % в зависимости от генотипа. При этом наблюдается образование нормальных черешковых листьев с цельной пластинкой, тупой верхушкой и клиновидным основанием. После адаптации к нестерильным тепличным условиям были получены небольшие корнеплоды - штеклинги, используемые в дальнейшем для получения семенного потомства (рисунок).

Биохимический отбор регенерантов. Механизмы адаптации растений к стрессовым факторам включают изменения в экспрессии генов, которые приводят к повышению или снижению активности целого ряда ферментов основных циклов клетки, общего белка, изменению изоферментного спектра. Поэтому использование биохимических методов для оценки регенерантов может способствовать более эффективному отбору генотипов с устойчивостью к стрессам. Результаты по измерению активности ферментов представлены в таблице.

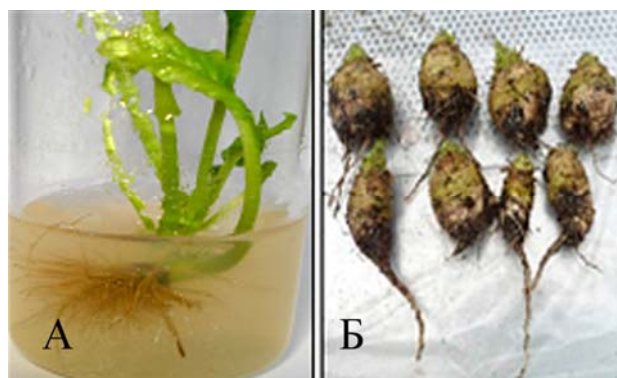


Рисунок. Развитие адаптированных микроклонов сахарной свеклы: А - формирование корней в селективных условиях при pH 4.0 и содержании сорбита 0.35 М; Б - образование штеклингов в условиях теплицы.

Таблица.

Удельные активности ферментов в контрольных и устойчивых регенерантах сахарной свеклы

Генотип №	Условия опыта	Удельная активность (мкм/мин/мг)			
		Гл.-6.-Ф-ДГ, $\times 10^{-3}$	ИЦЛ, $\times 10^{-3}$	МЭ, $\times 10^{-3}$	ПО
1	контроль	57.27±3.86	6.56±0.56	28.09±1.53	6.48±0.38
	устойч.	34.60±5.70*	6.56±0.56	20.25±3.47*	5.21±1.94
2	контроль	45.48± 4.21	9.26±0.30	30.12±3.77	6.27±0.83
	устойч.	44.12±4.14	12.21±2.30	41.61±3.98*	8.63±0.88*
3	контроль	44.01±1.61	11.69±0.38	32.56±0.57	8.02±0.60
	устойч.	50.19±3.62*	17.20±1.86*	40.73±0.87*	5.71±0.43*

* - различия с контролем достоверны ($P < 0.05$).

Результаты показывают, что адаптация к эдафическим факторам сопровождается достоверным снижением у двух из трех генотипов активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы – ключевого фермента пентозо-фосфатного цикла. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил влияние генотипа (сила влияния – 15.7 % ($P < 0.05$)) и совместное влияние генотипа и типа эксперимента (сила влияния – 15.6 % ($P < 0.05$)) на активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы. Как ранее было показано [Zemlianukhina et al., 2017], водный дефицит и условия засоления приводят к уменьшению K_M от 0.15 до 0.12 mM для разных генотипов сахарной свеклы, т.е. повышается сродство фермента к субстрату ($NADP^+$). Некоторым исследователями показано, что изменение активности фермента связано с защитными функциями растений от действия стрессовых факторов [Pugin et al, 1997].

Одной из первых реакций на неблагоприятный фактор является активация ферментов окислительного стресса, к которым относится пероксидаза. Выявлено влияние типа эксперимента (сила влияния – 23.4 % ($P < 0.01$)) на активность пероксидазы. Считается, что в стрессовых условиях активность энзима повышается. Однако в данном случае активность её увеличивается только у генотипа № 2 в 1.4 раза, для генотипов №1 и №2, наоборот, наблюдалось снижение в 1.4 раза.

Установлено влияние генотипа (сила влияния – 12,5 % ($P < 0,05$)) и типа эксперимента (сила влияния – 10,7 % ($P < 0,001$)) на активность ИЦЛ. Активность цитоплазматической изоцитратлиазы (ИЦЛ) увеличилась в 1.5 раза лишь у генотипа № 3. Ранее было показано, что в условиях водного дефицита (при добавлении сорбитола) K_M фермента увеличивается почти в 8 раз, что говорит о конформационных изменениях в активном центре молекулы [Землянухина и др., 2009].

Показано влияние генотипа (сила влияния – 7.1 % (P<0.01)) и влияние типа эксперимента (сила влияния – 11.2 % (P<0.001)) на активность МЭ. Показано достоверное увеличение активности одного из четырех ферментов малатдегидрогеназного комплекса – малик энзима (МЭ) у опытных растений генотипа № 2 примерно в 1.4 раза. Для генотипа № 3 наблюдается такой же эффект: увеличение активности МЭ у устойчивых растений в 1.3 раза.

Кластерный анализ показал, что ферменты образуют два кластера. В первый входят глюкозо-6-Ф-дегидрогеназа и малик энзим, во второй - ИЦЛ и пероксидаза, к ним примыкает белок.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что биохимические изменения, выражающиеся в активации или ингибировании синтеза ферментов целого ряда метаболических циклов: ЦТК, пентозо-фосфатного, цитоплазматической изоцитратлиазы, а также фермента окислительного стресса – пероксидазы позволяют отбирать регенеранты с повышенной устойчивостью к эдафическим факторам. Проведённые исследования позволили разработать способ получения устойчивых к двум эдафическим факторам регенерантов с высокой регенерационной способностью, которые в дальнейшем будут изучены и использованы для создания линий в селекционных испытаниях.

Литература

Землянухина О.А., Черкасова Н.Н., Жужжалова Т.П. Метаболическая адаптация растений сахарной свеклы *in vitro* к условиям водного дефицита // Организация и регуляция физиологических и биохимических процессов. – Воронеж: изд-во ВГУ, 2009. – Вып. 11. – С. 96–102.

Калаева Е.А., Артюхов В.Г., Калаев В.Н. Теоретические основы и практическое применение математической статистики в биологических исследованиях и в образовании: учебник. – Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2016. – 284 с.

Pugin A., Frachisse J. M., Tavernier E., Bligny R., Gout E., Douce R., Guern J. Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway // *Plant Cell* – 1997. – V. 9, № 11 – P. 2077–2091.

Zemlianukhina O.A., Cherkasova N.N., Zhuzhzhhalova T.P., Kalaev V.N. Biochemical and morphological characteristics of acid-resistant regenerants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // *Journal of Agricultural Science and Technology A*. – 2017. – V. 7. – P. 383–392, doi: 10.17265/2161-6256/2017.06.003

OBTAINING AND BIOCHEMICAL EVALUATION OF SUGAR BEET REGENERANTS WITH RESISTANCE TO EDAPHIC FACTORS

O.A. Zemlyanuhina¹, N.N. Cherkasova², T.P. Zhuzhzhhalova², V.N. Kalaev¹

¹Voronezh State University, Voronezh, Russia, oz54@mail.ru

²The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar (VNIISS), vil. VNIISS, Voronezh region, Russia, biotechnologiya@mail.ru

Abstract. Based on stress selection, a method to obtain resistant sugar beet regenerants of different genotypes under *in vitro* conditions has been developed. Stress factors are low moisture content and high acidity level (use of chloraluminite) of Gamborg's nutrient medium. First stage includes *in vitro* cultivation of mature seed embryos with addition of the selective agent sorbite in concentrations of 0.45 M and with pH 3.5 to nutrient medium. Original and secondary selections of regenerants with resistance to edaphic factors are carried out on this medium. Biochemical evaluation of the selected resistant material is conducted.

Keywords: sugar beet, complex edaphic factors, resistance, enzymes