

УДК 632.521.122

## К РАЗРАБОТКЕ МЕТОДИКИ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ ПОЛУЧЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ ЭКСПЛАНТОВ ЛЬНА К АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ

**Е.Г. Виноградова**

Институт льна – филиал Федерального научного центра лубяных культур,  
Торжок  
Тверской государственной университет, Тверь

Для получения эксплантов льна и растений-регенерантов на их основе, устойчивых к токсичным ионам алюминия, разработана методика клеточной селекции. В качестве селективного агента использовали  $AlCl_3$  и  $Al_2(SO_4)_3$ . Полученные растения-регенеранты превышали по хозяйственно-ценным признакам, как исходные генотипы, так и сорта стандарты на кислом и на оптимальном по pH фоне.

*Ключевые слова:* лен, ионы алюминия, незрелые зародыши, селективные среды.

DOI: 10.26456/vtbio92

**Введение.** В настоящее время биотехнология располагает методами клеточной и генетической инженерии, позволяющими манипулировать с изолированными клетками, органами, тканями растений, а также с геномом растений. Привлекательность этих работ заключается в доступности селективного агента, в качестве которого используются химические вещества (Искакова и др., 2005; Богуспаев и др., 2005; Jordan, McNughen, 1987). Селекция на клеточном уровне позволяет ускорить получение генотипов растений с заданными параметрами.

По данным о длительном применении минеральных удобрений (в течение 40 лет) в стационарном опыте выявлено увеличение кислотности почвы с 5,2 до 3,6 (актуальной, обменной и гидролитической), снижение суммы поглощенных оснований, падение плодородия почвы и общее снижение продуктивности севооборота в 5 ротаций на 32 % по сравнению с первой (Петрова, 1995). Следует также отметить, что закисление пахотных почв происходит значительно быстрее, чем в природе.

Около 50% пахотных земель имеют кислую реакцию почвенного раствора (Kochianetal.,2004). Дерново-подзолистые почвы содержат огромные валовые количества Al (в среднем 9%) (Небольсин, Небольсина, 1997) и при усилении кислотности почвенного раствора

ниже pH 5 из глинистых минералов высвобождаются ионы алюминия, которые перемещаясь в обменные позиции поступают в раствор (Толпешта, Соколова, 2009). Фитотоксичность Al становится одной из наиболее серьезных проблем, являющейся лимитирующим фактором для большинства сельскохозяйственных культур. Высокая степень токсичности для льна подвижного алюминия обусловлена тем, что по интенсивности поглощения его ионов лен превосходит подсолнечник горох овес пшеницу и другие растения (Мещеряков, 1937; Голубев, 1954).

Алюмотоксичность является общемировой проблемой в сельскохозяйственной практике, в связи с этим на понимание механизмов и генов, обеспечивающих толерантность растений к этому стрессовому фактору, сфокусировано внимание многих ученых в последнее десятилетие (Liao et al., 2006; Лисицын, 2007; Кишлян, Рожмина, 2013).

Целью работы было изучение возможности получения форм льна-долгунца, устойчивых к стрессовым факторам (повышенная кислотность), методами клеточной селекции.

**Методика.** В качестве исходных эксплантов использовались асептически изолированные незрелые зародыши (рис. 1) и пыльники (Виноградова, Пролетова, Кудрявцева, 2014). Культивирование осуществлялось на питательных средах Sh-2 в условиях *in vitro*, в качестве селективного агента использовали  $AlCl_3$  и  $Al_2(SO_4)_3$ . В изучение были включены 8 генотипов льна: Светоч, Алексим, Hermes, Лира, Symfonia, Д 1444-6, Оршанский 2, Nike различающиеся по реакции на изменение pH почвенного раствора. Донорные растения были выращены в сосудах Митчерлиха из семян, полученных от лаборатории селекционных технологий Института льна - филиала ФГБНУ ФНЦ ЛК и Национальной коллекции Русского льна.



Рис. 1. Незрелые зародыши (на 10 день после опыления) на питательной среде

**Результаты и обсуждение.** В предстоящие годы исследований нами была определена эффективная селективная нагрузка, которая составила 235 мг/л  $AlCl_3$  (Пролетова, Виноградова, 2015). При этом pH среды доводилось до 5,5, т.е. оптимальном для эксплантов льна. Однако в полевых провокационных питомниках pH почвенного раствора составляет около 4,5. В связи с этим мы включили в исследования вариант с pH селективной среды, равной 4,5.

Многие авторы, работающие по устойчивости к ионам алюминия, в качестве их источника используют  $AlCl_3$ , однако это не всегда удобно из-за того, что он сильно гидролизуется, и возможного негативного влияния ионов хлора на экспланты. В качестве альтернативного селективного агента мы использовали  $Al_2(SO_4)_3$ .

В эксперименте используемые генотипы льна сильно различались по ответу на стресс по переносу эксплантов на питательную среду (контрольный вариант). У незрелых зародышей генотипа Д 1444-6 гибели не наблюдалось, а у сорта Алексим - была наибольшей и составила 24,6%.

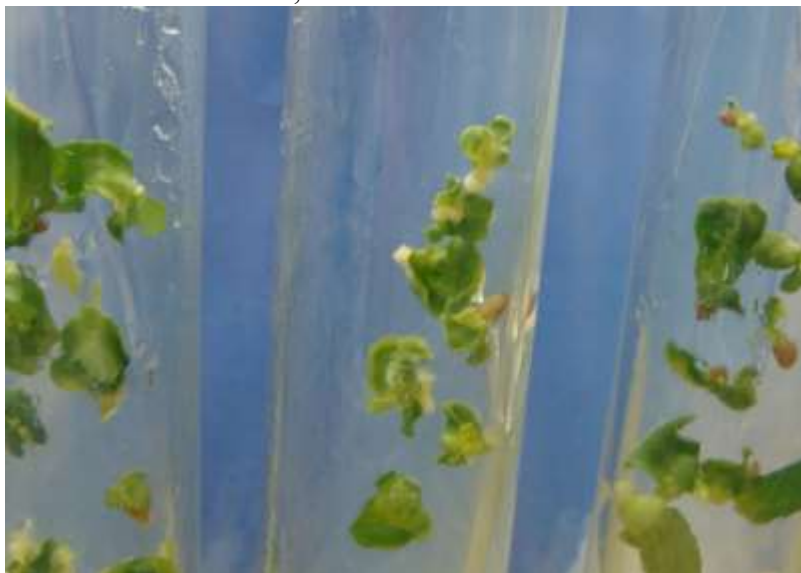


Рис 2. Изменения незрелых зародышей при культивировании в условиях *in vitro* на питательной среде

Наибольшую селективную нагрузку испытывали экспланты на среде с  $Al_2(SO_4)_3$ , где их количество с новообразованиями составило от 24,7 % у сорта Nike, до 45,2 – Symfonia (таблица 1). Реакция на культивирование на среде, содержащей  $AlCl_3$  с pH среды 4,5 изменялась от 28,4 % (эксплантов с новообразованиями) – Nike, до 46,5 % -Д 1444-6. На селективной среде с  $AlCl_3$  и pH среды 5,5 самую

устойчивую реакцию показали экспланты сорта Лира (52,5 % эксплантов с новообразованиями), самую низкую сорта Nike (32,8 %).

Следует отметить, что использование  $Al_2(SO_4)_3$  предпочтительнее, так как позволяет получить большее количество морфогенного материала (калусы, почки) (рис. 2).

Для получения форм устойчивых к селективным агентам используют в качестве первичных эксплантов различные объекты. Мы в качестве альтернативного первичного экспланта использовали пыльники (рис. 3).



Рис. 3. Пыльники *in vitro* на питательной среде

Таблица 1  
Морфогенетическая активность незрелых зародышей льна на селективных средах с ионами Al

Генотип	Контроль (без Al), %		$AlCl_3$ pH 5,5, %		$AlCl_3$ pH 4,5, %		$Al_2(SO_4)_3$ pH 5,5 %	
	Без н/о	Морфогенных	Без н/о	Морфогенных	Без н/о	Морфогенных	Без н/о	Морфогенных
Д 1444-6	24	76	49,5	50,5	53,4	46,5	59,4	40,1
Symfonia	24	76	49,1	50,1	55,6	44,3	54,9	45,1
Алексим	53,4	46,6	51,9	48,1	58,2	41,8	59,8	40,2
Светоч	43,8	56,2	54,5	45,5	63,1	36,9	49,6	50,4
Лира	47	53	47,5	52,5	57,8	42,2	59,9	40,1
Оршанский 2	44,1	55,9	58,6	41,4	68,0	32,0	65,6	35,4
Hermes	49,1	50,9	56,6	43,4	65,4	34,6	62,6	38,4
Nike	49,3	50,7	67,1	32,9	71,6	28,4	75,3	24,7

Полученные данные показали, что ряд потомств растений-регенерантов (ПР-Р) не уступают исходным формам как на оптимальном фоне, а на кислом фоне существенно их превосходят. Так, показатели ПР-Р Светоч R-4 (кислый фон) существенно превосходили исходную форму на оптимальном фоне по всем изучаемым показателям (от 7,8 % до 16,9 %) (табл. 3).

Наиболее высокий коэффициент устойчивости к эдафическому фактору у данной формы был по признакам: количество семян (189,6) и коробочек (158,9), массе технической части (142,9) и волокна (145,9).

Таблица 2

Влияние селективных сред с ионами Al на морфогенетическую активность пыльников льна *in vitro*

Гено-тип	Контроль (без Al)		AlCl <sub>3</sub>						Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (Al - 38,5 мг/л)	
	пыльн., шт.	из них калу-сирующих, %	90 мг/л		140 мг/л		190 мг/л		пыльн., шт.	из них калу-сирующих, %
			пыльн., шт.	из них калу-сирующих, %	пыльн., шт.	из них калу-сирующих, %	пыльн., шт.	из них калу-сирующих, %		
Nike	140	7,1	140	5	150	4	150	2,7	180	0
Светоч	100	8	110	5,5	110	5,5	130	1,5	130	1,5
Д-1444-6	100	12	100	8	100	8	100	2	130	1,5
Hermes	120	5	120	5	120	3,3	130	1,5	120	1,7

Таблица 3

Устойчивость растений-регенерантов в полевом провокационном питомнике, полученных на основе сорта Светоч в условиях *in vitro*

Генотип	Высота, см	Техн. дл., см	Кол-во кор., шт	Кол-во семян, шт	Масса техн. части, г	Масса волокна, г	Содержание волокна, %
Светоч исх. опт.ф.	68,1	53,8	4,1	26	300,2	82,1	28,2
Св. R 4 к.ф.	76,9	61,2	6,2	47,4	393,6	136,6	34,5
Св. R 4 опт.ф.	71,4	60,1	3,9	25	275,5	93,6	34,3
% к исх. опт.ф.	112,9	113,7	151,2	182,3	131,1	166,4	122,3
Устойчивость	107,7	101,8	158,9	189,6	142,9	145,9	100,6
Св. R 5 к.ф.	76	58,7	5,9	49,9	386,9	124,5	32,8
Св. R 5 о.ф.	63,7	56,7	2,4	17,8	227,1	66,5	29,6
% к исх. опт.ф.	111,6	109,1	143,9	191,9	128,9	151,6	116,3
Устойчивость	119,3	103,5	245,8	280,3	170,4	187,2	110,8
Св. R13 к.ф.	74,6	54,1	9,1	74,3	434,3	114,8	27,8
Св. R 13 о.ф.	63,3	52,1	3,3	20,4	201,1	60,8	30,3
% к исх. опт.ф.	109,6	100,6	221,9	285,8	144,7	139,8	98,6
Устойчивость	117,8	103,8	275,7	364,2	215,9	188,1	91,7
Станд.откл.	6,046	6,54	3,34	27,023	149,59	48,78	4,76

Культивирование пыльников, при достаточной их морфогенетической активности, позволяет получать константный материал за короткое время, что весьма привлекательно.

В результате культивирования пыльников были получены новообразования (калусы), однако морфогенетическая активность (%) первичных эксплантов была невелика и составила от 9,0 до 0 (табл. 2). Наибольшая морфогенетическая активность наблюдалась при культивировании пыльников сорта Д-1444-6 (в контроле 9,0 %), что коррелирует с большей устойчивостью этого сорта в культуре незрелых зародышей. У эксплантов сортов Symfonia, Nike, Лира калусообразование не наблюдалось. Использование  $Al_2(SO_4)_3$ , в качестве селективного агента приводило к полному ингибированию новообразований у пыльников сортов Лира, Nike и Symfonia. При культивировании эксплантов сортов Светоч, Д-1444-6 и Hermes количество полученных калусов снизилось от 80 до 65 % по сравнению с контролем. К сожалению, морфогенетическая активность калусов была крайне низкой и регенеранты не были получены.

**Выводы:** 1. Установлена эффективность использования  $AlCl_3$  и  $Al_2(SO_4)_3$  ( $Al - 47,7$  мг/л) в качестве селективного агента при культивировании незрелых зародышей *in vitro* для получения устойчивого материала к ионам алюминия

2. Выявлено что, использование пыльников изученных генотипов для отбора устойчивых эксплантов к ионам алюминия не эффективно.

3. Изучены потомства растений-регенерантов, полученных на основе незрелых зародышей в полевых условиях на кислых и оптимальных фонах по основным хозяйственно-ценным показателям; выявлены формы с повышенной устойчивостью к эдафическому фактору среды, не уступающие, а в ряде случаев превосходящие исходные генотипы.

### Список литературы

- Богуснаев К.К., Валиханова Г.Ж., Надиров Б.Т. 2005. Предварительная обработка семян водной вытяжкой биогумуса (WBH) для получения солеустойчивых форм пшеницы (*T. aestivum*) // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы Третьего Московского международного конгресса (Москва, 14-18 марта, 2005 г.) М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии». РХТУ им. Д.И. Менделеева. Ч. 1. С. 232.
- Голубев Б.А. 1954. Кислые почвы и их улучшение. М.: Сельхозгиз. 164 с.
- Искакова А.Б., Терлецкая Н.В., Искаков А.Р. 2005. Использование методов биотехнологии в селекции ячменя на засухоустойчивость // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы Третьего Московского международного конгресса (Москва, 14-18 марта, 2005г.) М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии». РХТУ им. Д.И. Менделеева. Ч. 1. С. 249-250.
- Кишлян Н.В., Рожмина Т.А. 2013. Метод оценки генотипов льна-долгунца на

- алюмоустойчивость - Научные разработки селекцентра – льноводству. Результаты научных исследований по льну-долгунцу и льну масличному научно-исследовательских учреждений селекцентра за 2001-2012 годы. Тверь: ТвГУ. С. 34-35.
- Лисицын Е.М.* 2007. Химизм растворов и оценка потенциала алюмоустойчивости растений (вопросы методики) // *Агрохимия*. № 1. С. 81-91.
- Методы создания *in vitro* растений-регенерантов льна-долгунца, устойчивых к антракнозу (*Colletotrichum lini Manns et Bolley*) и токсичным ионам алюминия. Методические рекомендации. 2014 / *Виноградова Е.Г., Пролетова Н.В., Кудрявцева Л.П.* Тверь: ТвГУ. 19 с.
- Мещеряков А.М.* 1937. Опыты по изучению влияния алюминия на рост растений // *Химизация социалистического земледелия*. № 9. С. 92-99.
- Небольсин А.Н., Небольсина З.П.* 1997. Оптимальные для растений параметры кислотности дерново-подзолистой почвы // *Агрохимия*. № 6. С. 19-26.
- Петрова Л.И.* 1995. Изменение содержания микроэлементов в дерново-подзолистой почве льняного севооборота в результате последействия извести // *Агрохимия*. № 1. С. 3-10.
- Пролетова Н.В., Виноградова Е.Г.* 2015. Методика создания *in vitro* растений-регенерантов льна-долгунца, устойчивых к антракнозу (*Colletotrichum lini Manns et Bolley*) и токсичным ионам алюминия // *Материалы международной междисциплинарной научной конференции с элементами научной школы для молодежи. Десятые Курдюмовские чтения «Синергетика в естественных науках»*. Тверь: ТвГУ. С. 67-70.
- Толпешта И.И., Соколова Т.А.* 2009. Соединения алюминия в почвенных растворах и его миграция в подзолистых почвах на двучленных отложениях // *Почвоведение*. № 1. С. 29-41.
- Kochian L.V., Hoekenga O.A., Pineros M.A.* 2004. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency // *Annu Rev Plant Biol*. V. 55. P. 459-943.
- Liao H., Wan H., Saff Y., Wang X., Yan X., Kochian L.V.* 2006. Phosphorus and aluminum interactions in soy bean in relation to aluminum tolerance. Exudation of spocifie organic acids from different regions of the intact root system // *Physiol Plant*. V. 141(2). P. 674-84.
- Jordan M.C., McHughen A.* 1987. Selection for chlorsulfuron resistance in flax (*Linum usitatissimum*) cell cultures // *J. Plant Physiol*. V. 131. P. 333-338.

**TO THE DEVELOPMENT OF A METHOD OF CELL  
SELECTION FOR OBTAINING FLAX EXPLANTS STABLE TO  
ABIOTIC FACTORS OF THE ENVIRONMENT**

**E.G. Vinogradova**

Institute of Flax – a Branch of the Federal Scientific Center  
for Bast Crops, Torzhok  
Tver State University, Tver

We developed a cell selection technique to obtain resistant to toxic aluminum ions flax explants and regenerative plants based on them.  $AlCl_3$  and  $Al_2(SO_4)_3$  were used as selective agents. The received regenerating plants exceeded the original genotypes as well as varieties of standards, based on economically valuable characteristics, on acidic and optimal pH backgrounds.

**Keywords:** *flax, aluminum ions, immature embryos, selective media.*

*Об авторах:*

ВИНОГРАДОВА Елена Григорьевна – кандидат сельскохозяйственных наук, руководитель лаборатории биотехнологии, ФГБУН Институт льна – филиал Федерального научного центра лубяных культур, 172002, Тверская область, Торжок, ул. Луначарского, д. 35, e-mail: [egv.vinogradova@yandex.ru](mailto:egv.vinogradova@yandex.ru).

Виноградова Е.Г. К разработке методики клеточной селекции получения устойчивых эксплантов льна к абиотическим факторам среды / Е.Г. Виноградова // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2019. № 2(54). С. 289-296.