

На правах рукописи



Хассан Али Мохаммед Аль-Холани

**Получение стресс-толерантных растений кукурузы
методом клеточной селекции.**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в лаборатории генетики культивируемых клеток Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН и на кафедре ботаники, физиологии растений и агrobiотехнологии аграрного факультета Российского университета дружбы народов, г. Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Долгих Юлия Ивановна

Научный консультант

чл.-корр. РАН

Кузнецов Владимир Васильевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Поляков Алексей Васильевич

доктор биологических наук,
академик РАЕН
Обручева Наталья Владимировна

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН

Защита состоится « 08 » июня 2010 г. в 15:00 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (495) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждении Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан « 5 » мая 2010г.

Ученый секретарь

совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций
кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

На протяжении онтогенеза растение подвергается действию различных факторов окружающей среды, негативно влияющих на его рост, развитие и урожай. Низкая температура почвы весной задерживает прорастание семян, делая их в это время особенно уязвимыми для заражения почвенными патогенными микроорганизмами. Поздние заморозки повреждают и даже губят проростки. Основным негативным фактором, влияющим на взрослые растения, является засуха. Засушливые периоды характерны для климата 110 стран мира¹. Засуха наносит больший урон растениеводству, чем все остальные стрессовые факторы вместе взятые (Шевелуха, 2003). Она влияет на все физиологические процессы и, в конечном счете, приводит к снижению продуктивности растений. Например, потери зерна кукурузы от засухи в период цветения составляют в среднем 17%, а в отдельные годы достигают 80 % (Edmaedes et al., 1992).

Засуха может провоцировать засоление почвы. Согласно сведениям FAO, изданным в 2000 г., площадь засоленных почв, включая щелочное засоление, составила 831 миллион гектаров². Процесс накопления в почвах солей (чаще хлоридов и сульфатов натрия, кальция и магния, карбоната и нитрата калия), приводящий к образованию солонцеватых и солончаковых почв, может происходить в естественных условиях засушливых районов в результате капиллярного поднятия соленых и солёных вод, а также под влиянием техногенных факторов - вследствие излишнего поступления поливной воды и плохой работы водосборной и дренажной сетей в оросительных системах. В последнем случае происходит смыкание оросительных и грунтовых вод, что вызывает подъем солей по капиллярам к поверхности и засоление орошаемых земель. Часто растения подвергаются действию одновременно нескольких стрессоров, при этом их негативное влияние усиливается.

Для снижения потерь, вызванных неблагоприятными природными условиями, есть несколько способов. Одним из них является создание новых толерантных сортов. Для ускорения селекционного процесса применяют биотехнологические подходы, в частности, клеточную селекцию *in vitro*. Многими авторами на различных видах

¹ <http://faostat.fao.org>

² www.fao.org/

растений показано, что культивирование изолированных тканей *in vitro* повышает уровень генетической изменчивости, создавая материал для отбора (Karp, 1995). Эффективность использования культивируемых тканей в селекции значительно возрастает, если отбор желаемых вариантов проводить также в культуре *in vitro*. В настоящее время разработаны селективные системы для получения форм, толерантных к различным биотическим и абиотическим стрессорам (Van den Bulk, 1991; Pedrieri, 2001). При использовании селективных сред с полиэтиленгликолем (ПЭГ) и маннитом получены толерантные к засухе линии у нескольких видов растений (Mohamed, 2000; Vajrabhaya, 2001; Gatilestari, 2006). Существуют полученные методом клеточной селекции солеустойчивые и холодоустойчивые растения (Zair, 2003; Tantau et al., 2004).

Однако задача создания растений, толерантных одновременно к нескольким стрессам пока не решена.

Результатом действия ряда природных факторов является возникновение у растений водного дефицита. Стресс, вызванный водным дефицитом, может быть первичным в случае засухи, а также вторичным при низкотемпературном, тепловом или солевом стрессах. Естественно предположить, что осмоустойчивые растения будут иметь повышенную толерантность и к засухе, и к засолению, и к неблагоприятным температурам. Исходя из этого предположения, был выбран подход, предусматривающий получение методом клеточной селекции растений, толерантных к водному стрессу, и их последующее тестирование в условиях засухи, засоления и низких температур.

Целью работы было получение новых линий важнейшей сельскохозяйственной культуры кукурузы, обладающих устойчивостью одновременно к нескольким стрессорам: засухе, засолению и низким температурам.

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

- выбрать селективную систему и определить концентрации селективных факторов;
- методом клеточной селекции отобрать осмоустойчивые клеточные линии и растения кукурузы;
- оценить устойчивость растений – регенерантов к засухе и к засолению;

- проверить толерантность к засухе, засолению и низким положительным и отрицательным температурам в следующем поколении, чтобы оценить наследуемость признака.

Научная новизна работы

Разработана селективная система *in vitro*, направленная на создание растений, толерантных к водному стрессу. Показано, что применение маннита в качестве селективного фактора, позволяет отобрать растения с повышенной устойчивостью к дефициту воды, засолению и низким температурам. Впервые получены растения кукурузы, сочетающие толерантность к нескольким абиотическим стрессам: засухе, засолению, низким положительным и отрицательным температурам.

Практическая ценность работы

Полученные растения кукурузы, толерантные одновременно к засухе, засолению и низким температурам, могут служить исходными линиями для создания новых сортов с повышенной устойчивостью, а также материалом для изучения физиологических механизмов устойчивости. Предложенная селективная система с использованием маннита в качестве селективного фактора может быть рекомендована для отбора толерантных форм других видов растений.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены на IX Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Звенигород, 8-12 сентября 2008г.) и на совместном семинаре отдела биологии клетки и биотехнологии и лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации ИФР РАН.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 3 работы.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материал и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы. Работа изложена на 129 страницах машинописного текста, содержит 23 рисунка, 14 таблиц, список литературы включает 246 наименований, из которых 204 на иностранном языке.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе были использованы каллусные ткани и растения кукурузы (*Zea mays* L.) линий R91 и A188, F2 гибрида между ними (A188xR91), а также линий N4 и N31,

производных от коммерческого сорта Лучистая. Растения выращивали в сосудах с почвой объемом 5 л в теплице при длине светового дня 12 часов.

Каллус получали из незрелых зародышей, изолированных на 10-12-е сутки после опыления. Для его индукции и культивирования использовали агаризованную среду Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с 1 мг/л 2,4-Д и 30 г/л сахарозы. Каллус выращивали в камере фитотрона при температуре $26\pm 1^\circ\text{C}$, влажности 70%, освещённости 2000-3000 лк при длине светового дня 16 часов. Рост каллуса оценивали по увеличению сырой массы за один цикл выращивания, равный 4 неделям. Индекс роста рассчитывали как отношение конечной сырой массы ткани к начальной.

Для определения селективных концентраций маннита и ПЭГ каллус выращивали на среде с селективными факторами в следующих концентрациях: манит - 0, 0,6; 0,8; 1,0 и 1,2 М; ПЭГ - 0, 10, 15, 20, 25%. После 4 недель выращивания оценивали увеличение массы каллуса и долю каллусов, сохранивших способность к морфогенезу. Каждый опыт повторяли не менее трёх раз.

Для клеточной селекции *in vitro* свежеполученный каллус высаживали на питательную среду, содержащую один из селективных факторов: ПЭГ-25% или манит- 0,8 М. Выжившие каллусы переносили на свежую питательную среду, содержащую селективный фактор в той же концентрации. Этот процесс повторяли 3-4 раза.

Регенерацию растений проводили на среде МС без селективных факторов. Для стимуляции регенерации добавляли антибиотик цефотаксим в концентрации 150 мг/л (Данилова, Долгих, 2004). Каллус пассировали на этой среде на протяжении 2-3 пассажей, отсаживая образовавшиеся регенеранты на среду МС без гормонов. Подросшие побеги с корнями адаптировали к условиям почвы, инкубируя их сначала 2 недели на половинной среде МС без витаминов с 10 г/л сахарозы, а потом один день в воде с 5 мг/л НУК. Пересаженные в почву растения первые дни закрывали пластиковыми стаканчиками для сохранения влажности.

Растения-регенеранты или их семена высаживали по одному в пятилитровые сосуды с почвой. Влажность почвы в сосудах поддерживалась в соответствии с условиями эксперимента от 25 до 70% от полного влагонасыщения (ПВП). В качестве

контроля использовали растения исходных линий того же возраста, выращиваемые в тех же условиях.

Относительное содержание воды определяли в третьем сверху листе по методу (Catský, 1974). Общее содержание воды определяли в том же листе как отношение разницы между сырой и сухой массой к сухой массе.

Для определения интенсивности транспирации отрезали среднюю часть третьего листа сверху и сразу заклеивали места среза парафином. Определяли массу отрезка листа, выдерживали при комнатной температуре и через 30 мин взвешивали его еще раз. Разницу в массе, то есть массу испаренной воды, рассчитывали на единицу площади листа (мг воды/дм²).

Определение свободного пролина проводили по методу (Bates et al., 1973).

Степень устойчивости к высокой температуре определяли по методу Иванова (2004).

Для определения всхожести семена проращивали на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Всхожесть в опыте рассчитывали относительно всхожести в контроле.

Для оценки морозоустойчивости растения на стадии 2-3 листьев инкубировали в морозильной камере (Sanyo MIR-153) при температуре -1 или -2°C в течение суток. Через 10 дней после переноса в условия нормальной температуры определяли степень повреждения листьев и долю выживших растений.

Для анализа солеустойчивости растения выращивали на протяжении всего онтогенеза в почве с 0,5% NaCl, оценивая выживаемость, рост и семенную продуктивность.

Полученные данные обработаны компьютерной программой Excel и Genstat 3. В таблицах и на диаграммах приведены средние значения со стандартной ошибкой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор селективного фактора

С целью имитации *in vitro* стрессового эффекта обезвоживания могут применяться питательные среды, которые дополнены осмотически активными веществами, понижающими внешний водный потенциал, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ) или маннит. Для ряда растений, в том числе и кукурузы,

была показана положительная корреляция между ростом культивируемых тканей на средах с ПЭГ и засухоустойчивостью растений (Долгих и др., 1994; Duncan et al., 1995; Biswas et al., 2002). В селективной системе с ПЭГ были получены солеустойчивые растения риса (Белянская, Шамина, 1993), толерантные к заморозкам растения пшеницы (Никифорова и др., 1988), засухоустойчивые растения люцерны (Dragiska et al., 1996), а с использованием маннита – солеустойчивые растения табака и пшеницы (Левенко и др., 1989; Levenko et al., 1990). Данные о возможности использования маннита для отбора толерантных к абиотическим стрессам форм кукурузы в литературе отсутствовали.

Поскольку каждый вид растений имеет свою чувствительность к осмотикам, рекомендуемые в литературе селективные концентрации ПЭГ и маннита существенно различаются. Поэтому нужно было подобрать дозы селективных факторов именно для используемых нами линий кукурузы. Это было сделано на примере линии кукурузы R91.

На средах с ПЭГ ингибирование роста было отмечено уже при концентрации ПЭГ 10%. При увеличении концентрации ПЭГ прирост каллуса уменьшался, и на среде с самой высокой концентрацией ПЭГ – 25% выживало около 40% посаженных каллусов. Таким образом, при использовании селективной среды с ПЭГ не удалось достичь полного ингибирования роста каллуса. Однако при наибольшей концентрации было отмечено существенное уменьшение способности к морфогенезу. При использовании маннита добавление 0,6 М осмотика вызывало снижение прироста каллуса примерно в 2,5 раза, однако клетки оставались живыми и сохраняли способность к регенерации растений. При увеличении концентрации маннита до 0,8 М угнетение роста было выражено еще сильнее, на части каллусов появились зоны некроза. Маннит, начиная с концентрации 0,8 М, полностью ингибировал морфогенез. На средах с 1,0 и 1,2 М маннита роста каллуса практически не было, отмечена массовая гибель клеток. Выборочное тестирование показало, что чувствительность к селективным факторам других линий и гибрида кукурузы была примерно такой же, как у проверенных линий.

На основании полученных результатов для отбора засухоустойчивых растений кукурузы была выбрана концентрация ПЭГ 25% и маннита 0,8 М.

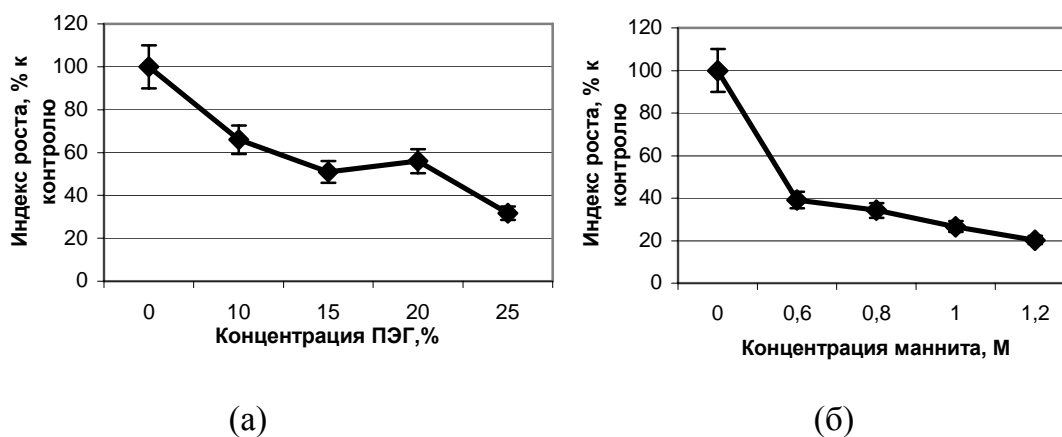


Рис. 1. Индекс роста каллуса кукурузы на средах с ПЭГ (а) и маннитом (б)

Отработка метода клеточной селекции

Для подбора условий проведения клеточной селекции *in vitro* был использован свежеполученный каллус линии R91. Каллусные инокулюмы высаживали на питательную среду, содержащую один из селективных факторов: ПЭГ в концентрации 25% или манит в концентрации 0,8 М. После месяца культивирования растущие каллусы пересаживали вновь на селективную среду, содержащую селективный фактор в той же концентрации. Этот процесс повторяли 3-4 раза.

После трех циклов селекции выжило 18% каллусов в системе с ПЭГ и 7% каллусов в системе с маннитом. Из устойчивых клеток были регенерированы растения – 60 после отбора каллусов на среде с ПЭГ и 29 после селекции на манните. Большая часть полученных растений имела нормальную морфологию, однако встречались регенеранты с деформированными листьями и высоким уровнем витрификации. Чаще аномальные растения получались после селекции на среде с ПЭГ. Они имели более низкую жизнеспособность - большая часть погибала в почве на ранних этапах онтогенеза. Регенеранты, полученные после селекции на среде с маннитом, наоборот, хорошо приживались в почве, часть из них дала потомство.

На основании этих предварительных опытов для проведения массовой селекции была выбрана система отбора на среде с маннитом.

Отбор устойчивых к манниту клонов

Для отбора устойчивых клеток каллусы трех линий и гибрида кукурузы инкубировали на среде с маннитом в концентрации 0,8 М. После трех

субкультивирований были отобраны растущие каллусные линии всех использованных генотипов кукурузы. Наибольшую устойчивость к манниту и количество полученных растений-регенерантов показали культивируемые ткани гибрида А188хR91. Эти регенеранты хорошо приживались в почве и давали потомство.

Таблица 1

Получение клеточных линий, толерантных к 0,8М маннита, и регенерация из них растений.

Генотипы кукурузы	Общее число посаженных каллусов	Доля выживших каллусов %	Число регенерантов <i>in vitro</i>	Число регенерантов <i>in vivo</i>
R91	233	9,9	20	11
A188xR91	172	16,8	35	26
N4	40	2,5	1	0
N31	72	6,9	16	6

Группу регенерантов гибрида А188хR91 как самую многочисленную разделили на две части, одну из которых тестировали в условиях засухи, а вторую – в условиях засоления.

Оценка засухоустойчивости растений-регенерантов

Для имитации засухи растения-регенеранты на стадии развития, предшествующей появлению метелки, переводили на ограниченный полив. В течение недели влажность почвы поддерживалась на уровне 25-30% от ПВП. Относительное содержание воды (ОСВ) определяли перед ограничением полива и после недельной засухи. Во время определения температура в теплице была 30-35°C.

Относительное содержание воды является одним из основных показателей, характеризующих водный статус растений в условиях водного стресса. Оно отражает баланс между поступлением и испарением воды и показывает, насколько сильный водный дефицит испытывает растение в данном состоянии по сравнению с состоянием полного водонасыщения его тканей. Под действием засухи происходит снижение ОСВ, которое тем сильнее, чем интенсивнее и продолжительнее засуха (Sinclair and Ludlow, 1985, Omae et al., 2005). Для многих видов растений, в том числе,

для злаковых, показана положительная корреляция между засухоустойчивостью и величиной ОСВ (Schonfeld et al., 1988).

При нормальном поливе ОСВ регенерантов линии R91 почти не отличалось от этого показателя исходных растений. Недельная засуха вызвала у исходных растений уменьшение ОСВ с 87 до 68%, что свидетельствует о существенном стрессе. Среди регенерантов у двух растений снижение ОСВ под действием засухи было минимальным (Рис.2).

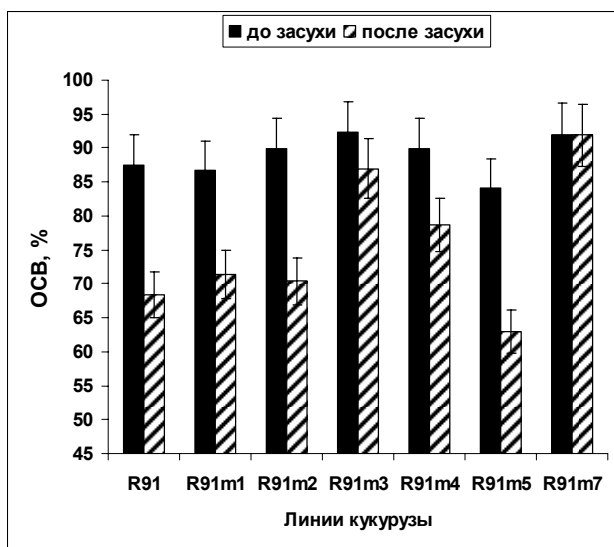


Рис.2 Относительное содержание воды в листьях кукурузы линии R91 до и после кратковременной засухи. R91m1-7-регенеранты, полученные из линии R91 после клеточной селекции

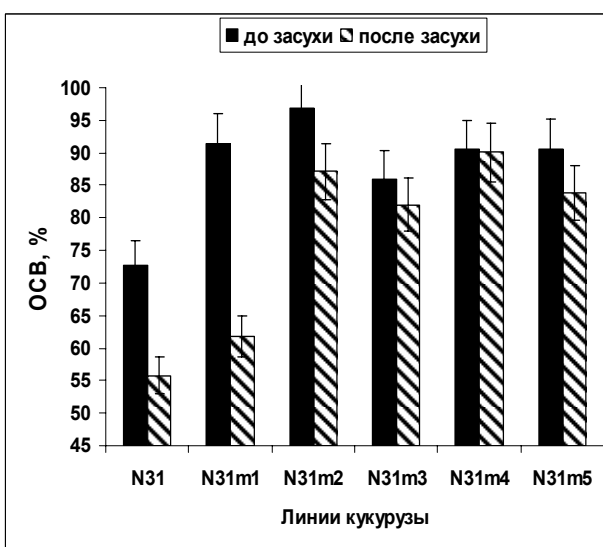


Рис.3 Относительное содержание воды в листьях кукурузы линии N31 до и после кратковременной засухи. N31m1-5 - регенеранты, полученные из линии N31 после клеточной селекции

Исходные растения линии N31 имели заметно меньшую оводненность листьев, по сравнению с линией R91. После засухи относительное содержание воды упало до 55%. Большая часть регенерантов линии N31 превосходила исходные растения по оводненности листьев как до, так и после засухи, ОСВ у них не уменьшалось ниже 80% (Рис.3).

Содержание воды в листьях гибрида A188xR91 в период засухи оставалось высоким, более 80%. На таком фоне регенеранты не имели преимущества перед исходными растениями. Тем не менее, кратковременная засуха не прошла бесследно и для гибридных растений, она вызвала уменьшение урожая семян. При этом 12 из 16 проверенных регенерантов, полученных после селекции, существенно

превосходили исходные растения или по числу завязавшихся семян, или по их массе, или по обоим показателям (Табл.2).

Наши результаты показали, что чувствительность исходных линий к дефициту воды была различна. Как и культивируемые клетки, растения гибрида A188x91 оказались самыми устойчивыми, а растения линии N31 самыми чувствительными к засухе. По относительному содержанию воды и семенной продуктивности полученные после селекции растения были более устойчивы к засухе, чем исходные линии. Судя по реакции на обезвоживание растений-регенерантов, клеточная селекция была более эффективной для исходно более чувствительной линии N31.

Таблица 2

Семенная продуктивность гибрида A188xR91 и производных от него регенерантов

Линии кукурузы	Число семян	Вес семян одного растения, г	Вес 100 семян, г
AR*	75±8,1	11,0±2,1	14,67
ARm1	118	26,8	22,73
ARm3	15	3,4	22,47
ARm4	65	14,8	22,82
AR22	181	38,0	21,0
ARm23	125	28,6	22,9
ARm25	126	18,7	14,84
ARm26	128	22,6	17,69
ARm27	161	30,8	19,1
ARm28	138	33,7	24,4
ARm29	226	32,1	14,22
ARm30	198	42,1	21,24
ARm31	96	25,4	26,5
ARm32	13	4,2	32,46
ARm33	133	30,7	23,1
ARm34	118	13,3	11,29
ARm35	126	33,0	26,16

* AR - исходный гибрид A188xR91, ARm1-35 – регенеранты, полученные после клеточной селекции

Определение солеустойчивости растений – регенерантов

В засоленной почве около 30% исходных растений погибло через неделю после посадки, а остальные либо не зацвели, либо из-за разрыва между цветением метелки и початки не образовали семян. На регенеранты, полученные из устойчивых к манниту клеточных линий, засоление также повлияло негативно: заметно уменьшилась вегетативная масса и урожай семян, но они все-таки смогли дать потомство. (Табл. 3)

Таблица 3

Урожай семян растений, выращиваемых в почве с 0,5% NaCl.

Линии регенерантов	Число семян	Средний вес 100 семян, г
AR	0	-
ARm13	39	13,6
ARm14	44	10,7
ARm15	75	14,5
ARm16	11	17,6
ARm17	20	24,6
ARm18	31	21,0
ARm19	51	15,7
ARm20	9	24,4

Определение общего и относительного содержания воды в листьях растений, подвергнутых солевому стрессу, подтвердило наше предположение, что увеличение солеустойчивости связано с лучшей способностью клеток удерживать воду. В то время как относительное содержание воды у исходных растений снизилось до 63%, у регенерантов оно составляло от 70 до 88% (Рис.4.) В условиях жесткого солевого стресса проявилась разница между исходными растениями и регенерантами, полученными после селекции, которую мы не смогли выявить после кратковременной засухи.

Среди механизмов адаптации растений к абиотическим стрессам важную роль отводят накоплению совместимых осмолитов, одним из которых является пролин. Увеличение содержания этой аминокислоты в клетках растений способствует

повышению устойчивости к водному, солевому и температурному стрессам. (Кузнецов, Шевякова, 1999).

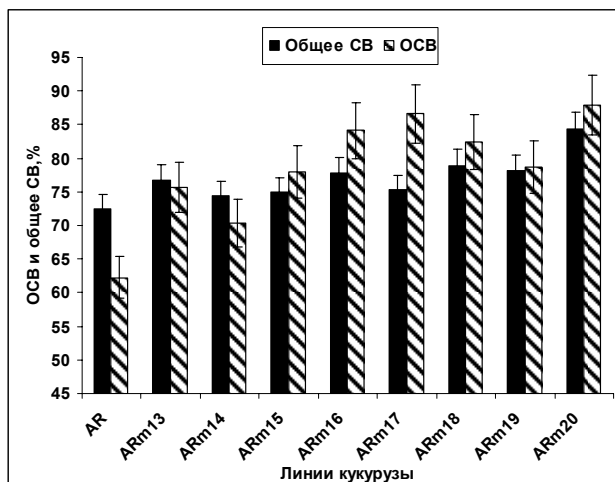


Рис.4 Относительное и общее содержание воды в листьях растений кукурузы, растущих в условиях засоления.

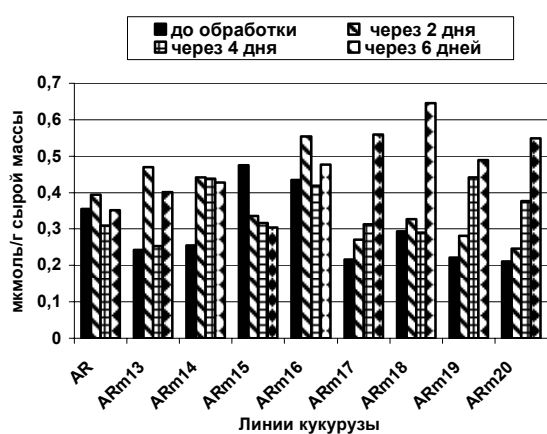


Рис. 5 Содержание пролина в листьях растений кукурузы, растущих в условиях засоления

Содержание пролина было определено в листьях растений-регенерантов гибрида A188xR91 перед, а также через 2, 4 и 6 дней после внесения в почву хлорида натрия до концентрации 0,5% от сухого веса почвы. У исходных гибридов засоление не вызвало увеличения концентрации пролина. У большинства полученных после селекции регенерантов уровень пролина увеличивался в 2-2,5 раза. У растений ARm13, ARm14 и ARm16 увеличение наблюдали уже на второй день после внесения соли. У растений ARm19 и ARm20 увеличение началось на четвертый день, а у регенерантов ARm17 и ARm18 – на шестой (Рис.5).

Таким образом, по четырем показателям: относительное и общее содержание воды в листьях, динамика накопления пролина и семенная продуктивность полученные после селекции регенеранты превосходили исходные растения по толерантности к засолению.

Проверка засухоустойчивости потомства растений-регенерантов

Чтобы доказать мутационную природу повышения засухоустойчивости регенерантов, необходимо было проверить их реакцию на стрессы в следующем поколении.

Из группы регенерантов, выращиваемых в почве с NaCl, были выбраны семьи растений ARm17, ARm18 и ARm19. Они характеризовались хорошей семенной продуктивностью, имели высокие показатели относительного и общего содержания воды и показали существенное повышение уровня пролина в стрессовых условиях. Из второй группы регенерантов, производных от A188xR91, были взяты семьи ARm22, ARm29 и ARm30, образовавшие больше семян. Семена этих шести регенерантов были высажены в сосуды с почвой. Начиная с 7 дней после появления всходов, для проверки устойчивости растения выращивали в режиме очень жесткой засухи (30% ПВП) в течение 70 дней. Для определения физиологического состояния растений на 70-ый день были определены относительное и общее содержание воды в листьях.

В потомстве регенерантов наблюдали сегрегацию признака толерантности. Среди растений R1 были случаи и более высокой, и более низкой, чем у исходного гибрида, оводненности листьев. По показателям относительного и общего содержания воды в листьях в семьях ARm19, ARm22, ARm29 ARm30 были растения, которые имели более высокие значения по сравнению с исходными растениями (Рис.6), что свидетельствует о сохранении признака засухоустойчивости в потомстве регенерантов.

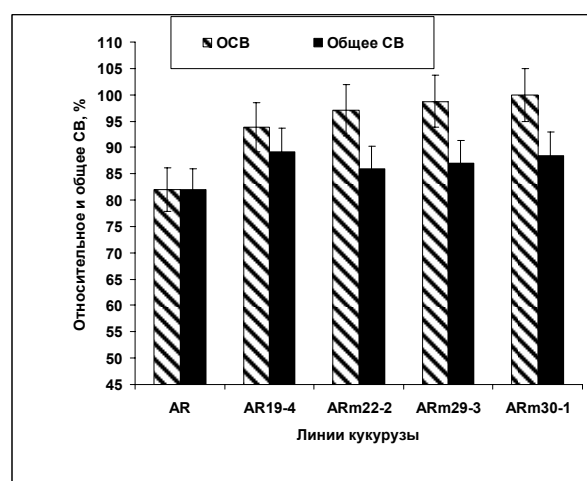


Рис. 6 Относительное и общее СВ в листьях растений кукурузы, растущих в условиях водного стресса

Растения, производные от регенерантов линий R91m7 и N31m4, выращивали в условиях нормального и ограниченного полива (50% ПВП) и анализировали на двух стадиях развития: через 30 дней после появления проростков на стадии 5-6 листьев и через 80 дней перед появлением метелки. Во время первого определения температура в теплице была 20-22°C, а во время второго повысилась до 30°C.

После 30-дневной засухи не было явных отличий потомков регенерантов от исходных растений. При увеличении продолжительности засухи до 80 дней и повышении температуры до 30°C величина ОСВ снизилась у обеих исходных линий.

У большинства потомков N31m4 и R91m7 на этой стадии развития величина ОСВ была больше, чем у исходной линии. При 50%-ном поливе разница между ОСВ исходной линии N31 и лучшего растения N31m4-2 превысила 30%. Среди потомков регенеранта R91m7 эта разница превысила 20% (Рис.7).

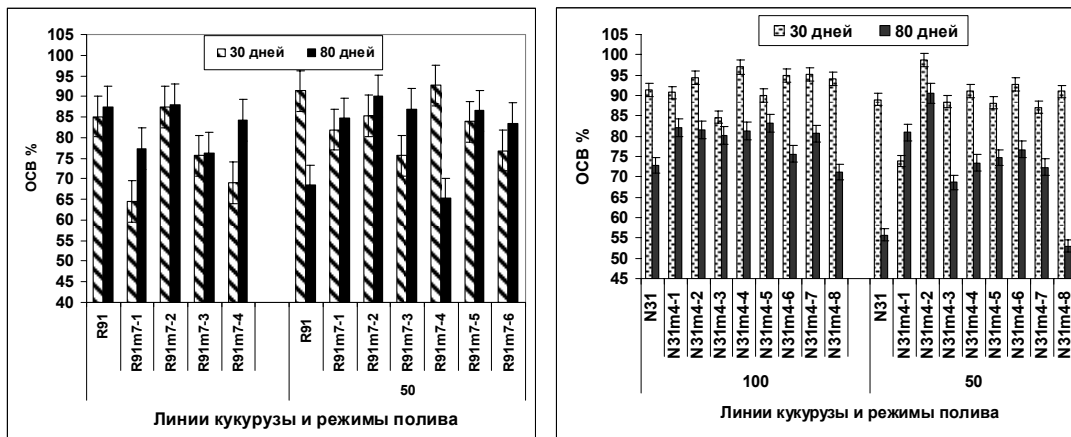


Рис. 7. Относительное содержание воды в листьях кукурузы после 80-дневной засухи

В возрасте 80 дней у всех растений, полученных после клеточной селекции, общее содержание воды было больше, чем у исходных линий, как при полном, так и при 50%-ном поливе. Для некоторых образцов N31m4 оводненность листьев при 100%-ном поливе была на 10% больше, чем у исходной линии, а при засухе эта разница достигала 17%.

Растения R91m7, производные от линии R91, также содержали больше воды, но их отличие от контроля было менее выражено.

Более высокая оводненность листьев отселектированных растений по сравнению с исходными нашла отражение в характере их роста. При дефиците воды листья полученных после селекции растений дольше сохраняли тургор, чем листья исходных растений. При нормальном поливе средняя высота взрослых растений исходной линии N31 и потомков регенеранта была одинаковой и составляла в среднем 156 см. В условиях водного стресса средняя высота исходных растений уменьшилась до 90 см, а растения N31m4 имели среднюю высоту 114 см.

Среди потомства линии N31m4 наибольшую толерантность проявили растения N31m4-1 и N31m4-2, а среди растений, производных от R91m7 лучшие показатели были у растений R91m7-5 и R91m7-6.

Причиной более высокой оводненности листьев полученных после селекции растений могло быть менее интенсивное испарение воды в условиях засухи. Однако

анализ интенсивности транспирации не подтвердил это предположение. В условиях дефицита воды общее количество испаряемой воды уменьшилось как у исходных линий, так и у опытных растений, но при засухе величина транспирации у отселектированных растений была выше, чем у исходных. Вероятно, большее содержание воды в листьях достигается не только путем уменьшения испарения, но и другими способами, например, лучшим развитием корневой системы или увеличением всасывающей способности корней.

Учитывая протекторную роль пролина при различных стрессах, вызывающих обезвоживание клеток, у полученных после селекции растений с лучшими показателями относительного и общего содержания воды была определена концентрация этой аминокислоты при нормальном поливе и в условиях засухи. У исходных растений R91 количество пролина при водном стрессе не изменилось, а у исходных растений линии N31 – снизилось.

Возможно, у этой более чувствительной к водному стрессу линии произошли серьезные нарушения метаболизма, вызвавшие ингибирование синтеза аминокислот. У потомков как N31m4, так и R91m7 содержание пролина в условиях засухи возросло, что также свидетельствует о сохранении активности физиологических процессов и включении защитных механизмов (Рис.8).

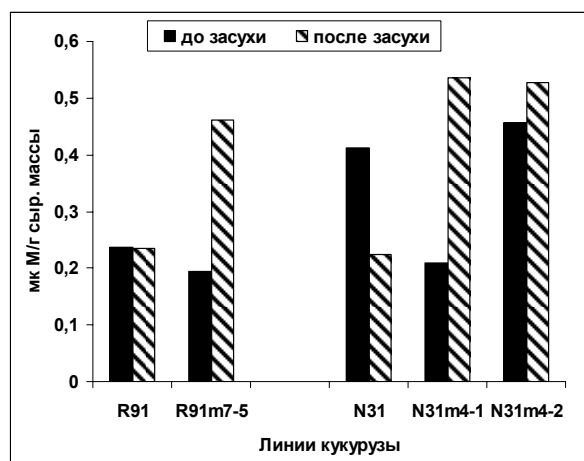


Рис.8 Содержание свободного пролина в листьях кукурузы в нормальных условиях и при засухе

Результаты анализа относительного и общего содержания воды и динамики накопления пролина потомками регенерантов, полученных в результате клеточной селекции, подтвердили сохранение повышенной толерантности к засухе в следующем поколении. Это позволяет говорить о мутационной природе засухоустойчивости проанализированных растений. Различия между исходными и отобранными растениями проявлялись сильнее в условиях более жестокого водного и температурного стресса.

Проверка солеустойчивости потомства растений-регенерантов

Для проверки реакции на засоление в потомстве регенерантов, полученных после клеточной селекции, их семена проращивали в водном полупроцентном растворе соли. Семена линии R91 в этих условиях не проросли, а всхожесть семян линии N31 и гибрида не превышала 7,5%. Почти во всех семьях регенерантов доля проросших семян была существенно выше, чем у исходных генотипов. Особенно можно выделить потомства регенерантов ARm13, ARm19, ARm30, N31m2, N31m3 и R91m7 (Табл.4).

Таблица 4

Всхожесть семян регенерантов в 1,5% водном растворе NaCl

Генотип	Всхожесть, %	Генотип	Всхожесть, %	Генотип	Всхожесть, %
	от контроля		от контроля		от контроля
AR	1,7	N31	7,5	R91	0
ARm13	38,3	N31m2	96	R91m1	26,5
ARm14	9,4	N31m3	6,2	R91m4	28,5
ARm19	41,6	N31m4	99,2	R91m5	11,2
ARm22	27,6	N31m5	0	R91m7	42
ARm29	15,2				
ARm30	48,5				

Для оценки влияния продолжительного засоления потомство регенерантов, полученных от гибрида A188xR91, выращивали в засоленной почве. Хлорид натрия

до концентрации 0,5% вносили в почву, когда проростки были на стадии 2-3 листьев. Действие соли дополнялось влиянием холода, так как во время проведения опыта температура в теплице опускалась по ночам до 10°C. Под действием двойного стресса все исходные растения погибли через 3 дня. Потомки регенерантов также страдали от засоления, но в меньшей степени. Наибольшую толерантность показали растения линии ARm19, которые оставались живыми в течение 3 недель.

Учитывая неблагоприятные температурные условия, при проверке других линий регенерантов концентрация соли была уменьшена до 0,3%. Как видно из таблицы 5, выживаемость растений, прошедших селекцию, была выше, чем у исходных растений. Выжившие растения, продолжая расти в засоленной почве, нормально развиваются и цветут.

Таблица 5

Влияние 0,3% NaCl на рост проростков кукурузы

Генотип	Число посаженных растений	Число выживших растений	Выживаемость, %
AR	7	2	28,6
ARm22	10	5	50,0
ARm29	10	6	60,0
ARm30	12	6	50,0

Приведенные результаты показывают, что в семенном потомстве подтвердилась повышенная солеустойчивость, отмеченная у регенерантов.

Проверка холодоустойчивости потомства растений-регенерантов

Целью данной работы было получение растений кукурузы, обладающих комплексной устойчивостью к нескольким абиотическим стрессам. Поэтому потомство отобранных в результате клеточной селекции растений было тестировано в условиях не только засоления, но и низкой температуры.

Для нормального прорастания семян кукурузы нужна температура выше 15°C. При более низких температурах зерновки или только набухают, но не прорастают, или процесс появления всходов растягивается на длительное время. Например, при 5°C скорость роста первичного корня кукурузы в 100 раз меньше, чем при 20°C

(Зауралов, Лукаткин, 1996). В холодной и влажной почве семена очень уязвимы для различных грибных инфекций.

Чтобы оценить холодоустойчивость, семена опытных и контрольных растений проращивали при температуре 10-11°C. В этих условиях доля проросших семян у исходного гибрида A188xR91 снизилась на 38,5% по сравнению со всхожестью при нормальной температуре. Процент прорастания семян у четырех (ARm13, ARm19, ARm22 и ARm30) из шести проверенных регенерантов был выше, чем у исходных растений. Семьи ARm13, ARm19 и ARm30 оказались наиболее устойчивыми, их всхожесть при неблагоприятных условиях составила 100% (табл.6).

У линии R91 при температуре 10-11°C проросло меньше половины замоченных семян, а всхожесть в трех из четырех проверенных семей регенерантов была выше 67%. В потомстве растения R91m7 снижение всхожести по сравнению с нормальной температурой составило всего 2 % (Табл.6).

Исходная линия N31 была наиболее чувствительна к низкой температуре: всхожесть семян при 10-11°C составила только 18% от контрольного уровня. В семьях большинства растений-регенерантов доля проросших семян была больше и составляла около 50% (Табл.6).

Таблица 6

Доля семян, проросших при температуре 10-11°C, %

Генотип	Всхожесть, % от контроля	Генотип	Всхожесть, % от контроля	Генотип	Всхожесть, % от контроля
AR	61,9	N31	18	R91	38
ARm13	100	N31m2	43,7	R91m1	67,3
ARm14	43,7	N31m3	0	R91m4	9,8
ARm19	100	N31m4	51,9	R91m5	70,3
ARm22	77	N31m5	53,4	R91m7	80,33
ARm29	30,2				
ARm30	100				

Другим фактором, ограничивающим ареал выращивания кукурузы, являются весенние заморозки. Будучи теплолюбивым растением, кукуруза не выносит даже кратковременного действия отрицательных температур.

Для проверки морозоустойчивости потомство полученных после селекции растений на стадии 3-4 листьев подвергали действию заморозков. Инкубация при 0°C в течение суток уже вызвала гибель части растений. Через 10 дней, после того, как растения восстановили рост после этой обработки, их подвергли новому температурному стрессу – инкубировали в течение суток при температуре -1°C. Только 25% исходных гибридов выжило после этого воздействия. В линиях регенерантов выживаемость варьировала от 0 до 100%. Четыре из шести проверенных линий показали более высокую по сравнению с исходными растениями морозоустойчивость, лучшими были растения линий ARm19 и ARm20.

Таблица 7

Выживаемость растений гибрида A188x R91 после инкубации при отрицательной температуре

Генотип	Число растений	После 0°C		После -1°C	
		число	%	число	%
AR	12	5	41,7	3	25,0
ARm13	6	1	12,5	1	12,5
ARm19	4	3	75,0	3	75,0
ARm20	4	4	100	4	100
ARm22	7	6	85,7	0	0
ARm29	10	7	70,0	6	60,0
ARm30	10	10	100	6	60,0

Растения из потомства регенерантов R91m7 и N31m4 были подвергнуты еще более жесткой обработке: их инкубировали сначала при 0°C, а затем через 10 дней при -2°C в течение суток. Инкубация при нулевой температуре не повлияла на жизнеспособность растений N31, но вызвала гибель почти половины как исходных, так и отселектированных растений линии R91. После замораживания при -2°C все исходные растения погибли, а выживаемость растений R91m7 и N31m4 составила, соответственно, 14,3 и 18,2%.

Полученные результаты показывают, что путем клеточной селекции с использованием маннита как селективного фактора можно отбирать не только засухо

– и солетолерантные растений, но и растения с повышенной устойчивостью к низким положительным и отрицательным температурам.

Заключение

В основу работы легло предположение, что повышение осмоустойчивости на клеточном уровне может обеспечить толерантность растений одновременно к нескольким абиотическим стрессам, вызывающим обезвоживание клеток, в том числе к засухе, засолению и заморозкам. Для получения толерантных растений был использован хорошо зарекомендовавший себя метод клеточной селекции *in vitro*. С целью подбора конкретных условий проведения клеточной селекции были апробированы два осмотически активных вещества: высокомолекулярный не проникающий в клетку полиэтиленгликоль и низкомолекулярный проникающий маннит, который ранее не использовали в работе с кукурузой. Селективная система с маннитом обеспечила более полную элиминацию чувствительных клеток; выживаемость растений, регенерированных из резистентных к манниту клеток, была выше, чем в системе с ПЭГ. Негативное влияние ПЭГ на выживаемость регенерантов уже отмечалась ранее другими авторами (Matheka et al, 2008). Предположительно это связывали с присутствием в ПЭГ токсичных примесей (Plaut and Federman, 1985).

Используя разработанную селективную систему, мы получили устойчивые к сублетальной дозе маннита каллусные клоны двух линий и гибрида кукурузы, из которых были регенерированы растения. Следует отметить, что одна из линий была коммерческой, представляющей большой практический интерес. Полученные регенеранты были тестированы в нормальных и стрессовых условиях. В первом случае они не отличались от исходных растений. В условиях засухи по таким показателям как относительное и общее содержание воды, динамика накопления пролина и семенная продуктивность большая часть регенерантов была более устойчива, чем исходные формы. Проверка реакции на засуху семенного потомства регенерантов показала сохранение признака устойчивости, что указывает на мутационную природу признака.

Тестирование регенерантов и их потомства в условиях хлоридного засоления и при низких температурах показало, что среди них есть формы, сочетающие засухоустойчивость с повышенной толерантностью к солевому и температурному стрессам. Среди лучших форм можно назвать линии R91m7, ARm19, ARm29, ARm30 и N31m4.

Результаты работы подтвердили возможность использования клеточной селекции *in vitro* для отбора растений с улучшенными полигенными признаками. Осмоустойчивость отобранных *in vitro* клеток сохранилась в целых растениях и на организменном уровне обеспечила повышение толерантности к абиотическим факторам, вызывающим водный стресс. Разнообразие реакций регенерантов на непермиссивные условия позволяет предположить многовариантность причин и механизмов устойчивости у разных растений.

Впервые получены растения кукурузы, обладающие повышенной устойчивостью одновременно к засухе, засолению и заморозкам. Эти растения могут быть использованы в качестве исходных линий в селекции толерантных к нескольким стрессам сортов.

ВЫВОДЫ

1. С целью отбора методом клеточной селекции толерантных к нескольким абиотическим стрессам растений кукурузы апробированы два селективных агента – ПЭГ и маннит. Показано, что селективная система с маннитом является более эффективной, так как обеспечивает более полную элиминацию чувствительных клеток и более высокую жизнеспособность растений-регенерантов.
2. Методом клеточной селекции получены растения кукурузы, которые по относительному и общему содержанию воды, интенсивности роста и семенной продуктивности имели более высокую устойчивость к засухе, чем исходные растения. Это свидетельствует о возможности использования селективной системы с маннитом для отбора толерантных к дефициту воды линий кукурузы.
4. Подтверждено сохранение повышенной толерантности к засухе в потомстве большинства полученных после клеточной селекции линий, что указывает на мутационную природу толерантности.

5. Различия между исходными и отобранными растениями проявлялись сильнее в условиях более жестокого водного и температурного стресса.
6. Среди растений, регенерированных из устойчивых к манниту клеток, отобраны образцы с повышенной толерантностью не только к засухе, но и к засолению и низким положительным и отрицательным температурам: **R91m7, N31m4, A188xR91m19, 29, 30**. Таким образом, показано, что путем селекции *in vitro* на средах с осмотиком маннитом можно получить растения, толерантные к нескольким абиотическим стрессорам, вызывающим обезвоживание тканей.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Аль-Холани Х.А.М., Долгих Ю.И.**(2007) Определение концентрации маннита для использования в процессе клеточной селекции на устойчивость к засухе у кукурузы. Вестник РУДН, сер. Агронимия и животноводство, 1-2, 38-42.
2. **Аль-Холани Х.А.М., Долгих Ю.И.**(2008) Сравнение эффективности селективных систем с маннитом и полиэтиленгликолем для отбора засухоустойчивых растений кукурузы. В сборнике IX Международной конференции “ Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология” Звенигород, 18-19.
3. **Аль-Холани Х.А.М., Тоайма В.И.М., Долгих Ю.И.**(2010) Получение растений кукурузы с повышенной устойчивостью к засухе путем клеточной селекции на среде с маннитом. Биотехнология, 1, 60-67.