

**Биотехнология
в селекции растений
Часть 3.
Устойчивость к абиотическим
стрессам**

Стрессовым может быть любой внешний фактор, вызывающие у растений химические или физические **изменения**, оказывающие негативное влияние на их **рост и развитие**, а также приводит к снижению **продуктивности и качества** урожая сельскохозяйственных культур.

Клеточная селекция растений

- Прямая (позитивная) селекция
- Непрямая (негативная) селекция
- Тотальная селекция
- Визуальная селекция и неселективный отбор

- каллусные культуры,
- суспензионные культуры,
- изолированные протопласты

Первичная или пересадочная **каллусная культура**

Медленный рост ткани, **неравноценное** действие

токсичных веществ, **постепенная** потеря

регенерационной способности

Целесообразно проведение селекции на **одиночных клетках**

Построение дозовой кривой

4-6 субкультивирований на селективной среде – проверка стабильности

2-3 пассажа на среде без селективного фактора

Отбор растений-регенерантов после возвращения на селективную среду

Устойчивость клетки и растения может **не коррелировать**

Прямая корреляция есть для низких температур, устойчивости к гербицидам, к высоким концентрациям алюминия и др.

Положительные результаты – растения пшеницы, риса, картофеля, устойчивых к NaCl

- соматические и андрогенные эмбриониды
- сегменты листьев
- фрагменты стеблей
- культура изолированных зародышей

При культивировании **пыльников яровой пшеницы** на средах с повышенным содержанием солей **хлорида натрия** получены соматические эмбриониды и растения-регенеранты с повышенной солеустойчивостью

Генетические, эпигенетические и морфофизиологические изменения клеток при селекции *in vitro*

Соматональная вариабельность

Различия плоидности

Хромосомные абберации

Соматический кроссинговер

Использование RFLP, RAPD

Фенотипические (эпигенетические) изменения

Нарушение гормонального баланса среды

Метилирование ДНК

Транспозиции ДНК-фрагментов

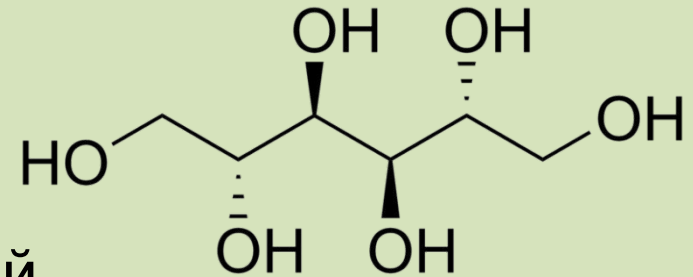
Генетические, эпигенетические и морфофизиологические изменения клеток при селекции *in vitro*

Кукуруза (Ю.И. Долгих):

- Ненаследуемые модификации
- Изменения экспрессии генов (не(наследуемые))
- Истинные мутации

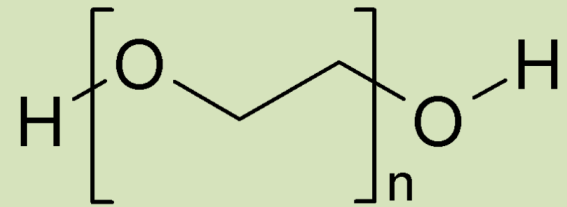
Засуха

- Инактивация ферментов
- Нарушение биохимических путей
- Накопление токсических веществ
- Утечка ионов
- Дефицит питания



Водный стресс может быть вторичным при низкотемпературном, тепловом и солевом стрессе.

- ПЭГ (осмотически активное вещество)
- маннитол

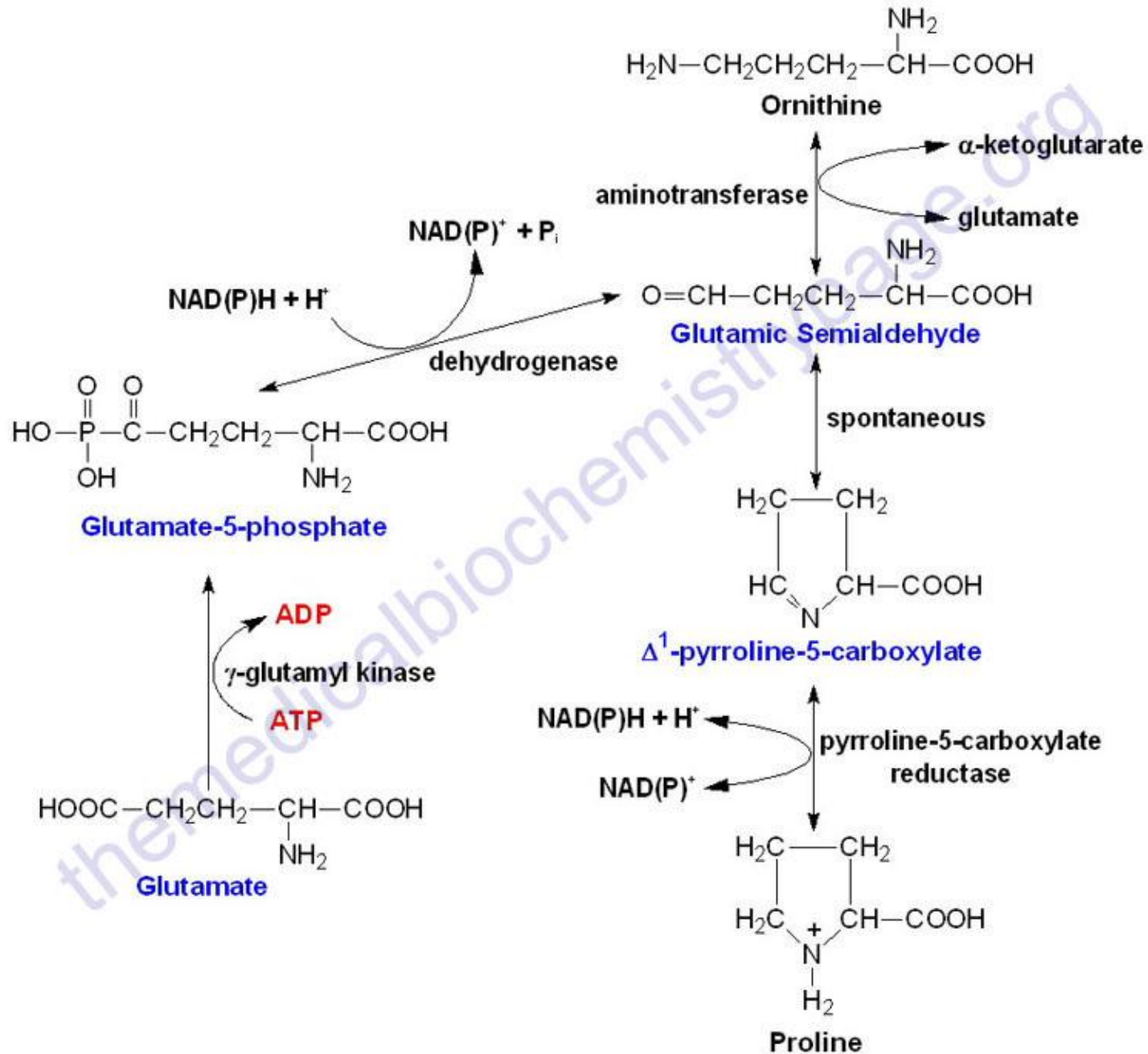


1979 – первые устойчивые к стрессу ПЭГ линии **табака**

Клеточные линии **томата** – каллус – ПЭГ 6000 в концентрации 15 %. Но устойчивость быстро уменьшалась в отсутствие осмотика – физиологическая адаптация

Каллусные линии **сои** на средах с 0, 15, 20 % ПЭГ 8000 – корреляция засухоустойчивости у растений и культивируемых клеток

Из *E. coli* выделили гены **proBosm** и **proA**, кодирующие ферменты пути биосинтеза пролина, аккумуляция которого происходит в ответ на осмотический стресс. Трансгенные побеги табака росли на 20 г/л соли



Получение стресс-толерантных растений кукурузы методом клеточной селекции Хассан Али Мохаммед Аль-Холани, 2010

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** к засолению и низким положительным и отрицательным температурам: R91m7, N31m4, A188xR91ml5, 19, 22, 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.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У РАСТЕНИЙ *Ctenanthe setosa* ПРИ ПОВТОРНОМ ДЕЙСТВИИ ЗАСУХИ

А. Саглам, А. Кадиоглу, Р. Терци, Н. Сарухан
Турция

Изучали способность растения *Ctenanthe setosa* (Rossc.) Eichler (Marantaceae) после сильной засухи адаптироваться к новым засушливым условиям. В листьях ВСП **содержание растворимых белков** в начальный период стресса **понижалось**, но в более поздний период **повышалось**. Содержание редуцирующих сахаров постепенно снижалось по мере развития засухи. **Содержание пролина заметно повышалось в течение засушливого периода**. Активность пероксидазы повышалась к 60-му дню, а затем снижалась.

**Соматоклональная изменчивость растений и
возможности ее практического использования: на
примере кукурузы
доктор биологических наук Долгих, Юлия
Ивановна**

Разработанный способ клеточной селекции был впоследствии успешно использован нами для выделения **толерантных к засолению и солям тяжелых металлов газонных трав** [Гладков и др., 2003; 2004], а также **устойчивых к гипоксии, вызванной корневым затоплением растений пшеницы** [Степанова и др., 2002]. Применение клеточной селекции для создания засухоустойчивых форм было осуществлено в нашей работе впервые. Большое значение для получения желаемого результата имел сделанный на основании **сопоставления реакций на обезвоживание**

Выделенные в результате клеточной селекции на среде с NaCl растения характеризовались **повышенной солеустойчивостью** на всех этапах онтогенеза. В условиях засоления они превосходили исходную линию по всхожести в 2,5 раза, по выживаемости проростков - в 4-5 раз.

При 0,3% засолении, летальном для контрольных растений, полученные после клеточной селекции регенеранты проходили **полный жизненный цикл** и давали семена. Растения, полученные из устойчивых к ПЭГ клонов, развивались в **условиях ограниченного полива** (30% ПВП) так же, как при оптимальном увлажнении.

Наследование признаков толерантности к NaCl и засухе было прослежено на протяжении трех поколений. Показано, что устойчивость регенерантов не всегда проявляется у их потомства. Вероятно, только у части полученных после селекции растений устойчивость обусловлена **мутациями**. В результате отбора, проводившегося в каждом поколении, была выделена **группа растений, стабильно сохраняющих ценные признаки**.

С целью выяснения причины солеустойчивости было проведено сравнение физиологических и биохимических показателей устойчивых и чувствительных к NaCl каллусных тканей. **Клетки солерезистентного клона № 88** в условиях засоления характеризовались несколько **более высокой скоростью накопления осмотически значимых веществ** (ионов натрия, сахаров, пролина), хотя их абсолютное количество не сильно отличалось от

Проведенный анализ не позволяет выделить какую-то одну причину устойчивости. По-видимому, культивирование *in vitro* индуцировало **множественные изменения метаболизма**, которые в сумме обеспечили сохранение способности к росту и морфогенезу в стрессовых условиях.

Полученные из устойчивых к ПЭГ клеток растения характеризовались более высокой по сравнению с исходными гибридами **способностью удерживать воду при недостаточном поливе**. Толерантные растения в условиях засухи накапливали больше **АБК**, что могло иметь значение для активации других защитных реакций.

Мобилизация адаптивных изменений метаболизма у отобранных растений, наиболее выраженная на стадии цветения, позволила избежать характерного для засухи **большого интервала между цветением мужских и женских соцветий**, который является существенной причиной потери урожая при недостатке влаги.

В ряде случаев засухоустойчивость полученных растений сопровождалась **толерантностью к высоким и низким температурам и засолению**. Вероятно, это обусловлено подобием защитных механизмов, так как в основе действия всех этих стрессовых факторов лежит обезвоживание клеток. Поэтому **селективная система с ПЭГ**, направленная на отбор клеток с повышенной способностью противостоять потере воды, может быть использована для получения растений, толерантных к нескольким абиотическим стрессам.

Засоление

900 млн. га в России имеет повышенное содержание солей

Увеличение содержания солей в почве в результате орошения

Нарушение осмотического баланса

Токсическое влияние ионов натрия, хлора

Уменьшение тургора, **ингибирование** функции мембран, активности ферментов, **подавление** фотосинтеза, **нехватка** ионов, **использование** большого количества энергии

Устойчивость **коррелирует** на растения и клетках

Выделение *in vitro* клеток, **толерантных** к содержанию NaCl (табак 1 % NaCl)

Наборе и др. обработали суспензионную культуру **табака** мутагеном (0,15 % ЭМС, 60 мин.), выделили линии, устойчивые к 0,5 % NaCl

РГАУ-МСХА:

солеустойчивые растения **яровых пшениц**;

незрелые зародыши, репродуктивные органы;

селекцию проводили на каллусной ткани на среде с 0,3 % NaCl или Na_2SO_4 5-6 пассажей;

фотосинтетический аппарат регенерантов

превосходил исходный сорт

Корреляция с устойчивостью к осмотическому стрессу

Клетки томата, адаптированные к водному стрессу, индуцированному ПЭГ, обладали повышенной устойчивостью к NaCl

Клеточные линии моркови – маннитол – NaCl

Необходимо изучать взаимодействие двух видов устойчивости

Ген бетаинальдегиддегидрогеназы (BADH) – катализ синтеза глицинбетаина

Трансгенные растения табака обладали повышенной **солеустойчивостью**

Выделены через культуру тканей растения **льна-долгунца, устойчивых к высоким концентрациям солей** (2,5-3 %). Каллусные ткани получали из сегментов гипокотилей, высаживали на селективную среду, а через 32 дня среди массы погибших клеток отбирали зеленые колонии, из которых генерировали растения, выносливые к засолению.

Селекция к высоким концентрациям (0,43 M) позволяет получать клеточные линии, характеризующиеся **как нестабильной, так и стабильной толерантностью**. Причиной обратимой нестабильной адаптации клеток к NaCl является **физиологическая адаптация, обусловленная изменением экспрессии генов**. Изменения экспрессии генов, в частности синтез протеина 24 кД, могут быть индуцированы **абсцизовой кислотой**, которая аккумулируется в солеадаптированных клетках.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ОСНОВ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ ЛАВАНДЫ *IN VITRO* НА УСТОЙЧИВОСТЬ К NaCl

Егорова Н.А. Институт эфиромасличных и лекарственных растений НААНУ, Симферополь

Выявлены **сублетальные концентрации** NaCl (0,7–0,8%) и отобраны устойчивые клеточные линии.

Показано **преимущество использования для отбора *in vitro* каллусов 4-го пассажа**, по сравнению с первым, а также **влияние на степень солеустойчивости** каллусов сорта, мутагенной обработки колхицином и длительности действия стрессового фактора.

Установлено, что при **сублетальной концентрации** NaCl возможно культивирование каллусных тканей не более трех пассажей, а при **селективных** – в течение 6-ти пассажей.

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ ПОЛЕВИЦЫ ПОБЕГОНОСНОЙ С КОМПЛЕКСНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ И ЗАСОЛЕНИЮ МЕТОДАМИ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ Е.А. ГЛАДКОВ

Разрабатывали биотехнологические методы получения клеточных линий и регенерантов полевицы побегоносной (*Agrostis stolonifera*), **устойчивых к комплексному воздействию тяжелых металлов и засоления**. Для получения растений, обладающих устойчивостью к меди и хлориду натрия, применяли **ступенчатую схему селекции**. Растения, устойчивые к ионам меди и цинка, получали методом **прямой клеточной селекции**.

Семена проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной водой (контроль), растворами сульфата меди (концентрации в пересчете на чистый металл 50; 75; 100 и 150 мг/л), сульфата цинка (150 мг/л), хлорида натрия (0,3 и 0,6 %). Начиная с 4-х сут., **определяли всхожесть** семян и степень развития проростка.

Каллус получали на агаризованной среде МС с добавлением 3 мг/л 2,4-Д.

Для выделения устойчивых к меди и хлориду натрия растений применяли **ступенчатую схему селекции**. Были использованы различные концентрации токсикантов в комплексе (меди — 50; 75 и более 100 мг/л, хлорида натрия — 0,3; 0,5 и более 0,6 %).

На первом этапе каллус высаживали на среду МС, содержащую 50 мг/л Cu и 0,3 % NaCl. **На стадии регенерации и укоренения** концентрацию токсикантов увеличивали соответственно до 75 мг/л и 0,5 %. **Выжившие растения-регенеранты** первоначально выращивали в почве без добавления токсикантов.

Затем их подстригали до высоты 16 см, а в почву в виде водных растворов вносили соль меди и хлорид натрия до конечного содержания (в расчете на сухую массу почвы) соответственно 75 мг/кг и 0,5 % или 150 мг/кг и 0,7 %. **Оценивали прирост регенерантов** в сравнении с обычными растениями. Контролем служили растения, высаженные на субстрат, не содержащий токсикантов.

В экспериментах по созданию растений, устойчивых к меди и цинку, применяли **прямую схему клеточной селекции** — культивирование каллусных культур в течение двух пассажей на селективной среде МС с последующей регенерацией и укоренением.

На каждом этапе в среду добавляли соли меди и цинка (соответственно 75 и 150 мг/л). **Для оценки токсичности** меди и цинка первичный каллус высаживали на питательную среду МС с различным содержанием токсикантов (медь — 75, 150 мг/л; цинк — 100, 200, 300, 450 мг/л). Через месяц оценивали **устойчивость каллусных культур к ионам тяжелых металлов** по изменению сырой массы.

Получение газонных трав, толерантных к засолению и ионам меди, методами биотехнологии
к.б.н. Гладков Евгений Александрович, 2003

1. Подобраны условия индукции и культивирования каллусных тканей и регенерации растений газонных трав овсяницы красной и полевицы побегоносной. Активный рост тканей и наибольшая частота регенерации получены при использовании среды МС с 3 мг/л 2,4-Д для индукции, с 1 мг/л - для пролиферации каллуса и среды МС без гормонов для регенерации растений.

2. Определена реакция растений и культивируемых тканей полевицы и овсяницы на хлористый натрий и ионы меди. Концентрации 1 и 2% NaCl и доза меди 150 мг/л определены как селективные как для клеток *in vitro*, так и для растений.

3. Разработаны условия клеточной селекции каллусных культур и растений, толерантных к хлориду натрия и ионам меди. Предложенная схема предусматривает проведение всех этапов отбора (культивирование тканей в течение двух циклов выращивания и регенерацию растений) в селективных условиях.

4. Из устойчивых к 1 и 2% хлорида натрия каллусов получены растения полевицы и овсяницы, толерантные к соли. У полевицы показано наследование признака солеустойчивости в двух поколениях.

5. Проведена экологическая оценка новых противогололедных материалов. Показано, что наименьшей фитотоксичностью обладают бишофит и хлорид кальция. Применение ацетата аммония и НКММ нежелательно из-за их выраженного отрицательного действия на растения.

6. Выявлена перекрестная устойчивость к 1% бишофита у растений, толерантных к соли.

7. Получены растения полевицы с наследуемой толерантностью к 150 мг/л меди.

8. Устойчивые к стрессовым факторам растения не уступали исходным по таким газонным качествам как габитус, кустистость и скорость роста.

БЕККУЖИНА Сара Сабденовна
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ АНДРОГЕНЕЗ И
КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ ПШЕНИЦЫ НА
УСТОЙЧИВОСТЬ К СТРЕССАМ, к.б.н., 1993

1. Впервые предпринята попытка проведения гаметной селекции яровой пшеницы (*Triticum aestivum*) на устойчивость к засолению, используя культуру пыльников.- Полученные результаты позволяют рассчитывать на успешную разработку комплексной технологии создания новых устойчивых-форм пшеницы.

2. Установлены концентрации селектирующего Фактора при селекции на гаплоидном уровне. Обнаружено, что концентрация 0,05% NaCl является полублетальной для сортов пшеницы использованных в эксперименте.

3. Выявлена роль физиологического состояния донорного растения на процесс формирования гаплоидных структур в культуре пыльников к предложены способы повышения уровня регенерации растений из этих структур путем предобработки опорных растений.

4. Предложен способ сочетающий возможности одновременного тестирования на солеустойчивость на уровне целого растения с возможностью размножения устойчивых генотипов.

5. Показано, что растения-регенеранты, полученные из устойчивых клеточных линий проявляет большую толерантность к стрессам, чем исходные сорта, что указывает на перспективность развития работ по клеточным технологиям для селекции яровой пшеницы.

6. Гомозиготные формы, полученные в культуре пыльников переданы в Каз. НШЗернового хозяйства для испытаний и получения на их основе новых сортов.

ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ МЕТОДАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ НГУЕН ТХИ ЛИ АНЬ, к.б.н., 1995

1. На основании изучения влияния ионов кадмия на рост и морфогенез каллусных тканей пшеницы испытанные в данной работе сорта можно расположить в ряд в порядке возрастания устойчивости: Беэенчукская-139, Дамсинская-90, Целинная-21.
2. Оценка устойчивости к тепловому стрессу на клеточном уровне позволила ранжировать испытанные сорта а порядке возрастания устойчивости: Целинная-21, Дамсинская-90, Беаенчукская-139.

3. Клеточная селекция на устойчивость к ионам кадмия позволяет создавать формы, у которых признак устойчивости экспрессируется на клеточном уровне и на уровне целого растения и передаётся следующему поколению.

4. Трёхкратное прогревание каллусных тканей пшеницы при температуре 46 С в течение 45 минут, чередующееся с субкультивированием в обычных условиях, позволяет создать стабильные, наследуемые температуротолерантные формы.

5. На базе соматической вариабельности возможно создание генотипов с комплексной устойчивостью к абиотическим стрессам.

Диас Фердинандез Тамара

Клеточная селекция яровых твердых и мягких пшениц на устойчивость к засолению (к.б.н., 2002)

1. Формирование каллусной ткани из незрелых зародышей двух видов пшеницы в нормальных и стрессовых условиях существенным образом зависит от генотипа и физиологического состояния исходного растения.
2. Изменение содержания 2,4 Д в среде позволило создать систему для длительного культивирования тканей тетраплоидной пшеницы без потери ими способности к морфогенезу.
3. При работе с сортовым материалом необходимо иметь ввиду генетическую неоднородность некоторых сортов, для чего предпочтительнее вести работу не колосовом материале.

4. Изучение влияния хлоридного и сульфатного засоления на индукцию и пролиферацию каллуса выявило различия по чувствительности между сортами к разным типам солей.

5. В результате проведенной клеточной селекции на устойчивость к засолению на сортах тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы получены устойчивые клеточные линии и растения-регенеранты.

6. Тестирование на солеустойчивость первого семенного поколения растений-регенерантов методом регистрации замедленной флуоресценции показало, что фотосинтетический аппарат некоторых растений-регенерантов по устойчивости к засолению превосходит исходный сорт.

Металлы

Влияние **токсических ионов металлов**, недостаток питательных веществ – причина ионного (минерального) стресса

тяжелые металлы: *Zn, Cd, Cu, Hg*

Cd²⁺ при нейтральной реакции может образовывать **труднорастворимые комплексы** с сульфатами, фосфатами и гидроокислами;

высокоподвижен, активно переходит между фазами, **накапливается** преимущественно в корнях, в репродуктивных органах чаще всего содержание низкое

Защитные системы запускают процесс детоксикации, их эффективность определяет возможность **гипераккумуляции** и **устойчивости**.

В защитных реакциях клетки в стрессах участвуют **фенольные соединения** – вторичные метаболиты

РГАУ-МСХА - Лен

Ионы кадмия тормозят рост стеблевой и корневой частей, сокращают на 7-9 суток онтогенетические фазы, культурные виды накапливают в вегетативной массе, дикие – нет

Негативное влияние на анатомическое строение стебля – **уменьшение** количества клеток элементарных волоконцев в пучке, **некомпактное расположение** клеток элементарных волоконцев в пучках, формирование клеток **неодинаковых размеров** в пределах пучка, **различные сроки** формирования вторичной клеточной стенки

Влияние кадмия на морфогенез, анатомию стебля и процесс регенерации льна-долгунца из клеточных и тканевых культур *in vitro* (к.б.н. Гончарук Е.А., 2000)

1. Установлено, что внесение кадмия в почву приводит к торможению роста стеблевой и корневой частей растения льна-долгунца на 9-13% с одновременным уменьшением надземной массы растений на 10-15% по сравнению с контролем.
2. Показано, что выращивание растений льна-долгунца в стрессовых условиях приводит к сокращению онтогенетических фаз развития, следующих за фазой "елочки" на 7-10 дней по сравнению с контролем.
3. Выявлено, что культурные виды растений льна поглощают ионы кадмия, но не накапливают ионы хрома и никеля, в то время как дикие виды поглощают ионы хрома и никеля, не накапливая при этом кадмий в вегетативной массе.

4. Мезо- и ультраструктурный анализ стеблей льна-долгунца показал, что присутствие кадмия в субстрате негативно влияет на формирование лубяных пучков, что выражается в уменьшении количества клеток элементарных волоконцев в пучке, в формировании нитевидных лубяных пучков, некомпактном расположении клеток элементарных волоконцев в лубяном пучке, а также в неравномерности размеров клеток элементарных волоконцев в пределах одного пучка и в сроках формирования вторичной клеточной стенки. Изменений ультраструктуры различных слоев клеточной стенки, пластид, цитоплазмы и ядра не выявлено.

5. Установлено, что присутствие кадмия в субстрате вызывает одревеснение срединных пластинок клеток элементарных волоконцев большей части лубяного пучка относительно контрольного варианта, в котором лигнификации были подвержены всего 2-3 срединные пластинки всех клеток лубяного пучка.

6. Отмечено, что процессы каллусогенеза и морфогенеза наиболее интенсивно происходят на сегментах гипокотилей, изолированных с 5-7-дневных проростков льна, культивируемых на питательной среде, содержащей 2,4-Д и БАП в концентрациях по 1 мг/л.

7. Присутствие дополнительно в питательной среде нитрата серебра, аспарагина, кокосовой воды или эпина не приводит к повышению морфофизиологического потенциала каллусной ткани, культивируемой в нормальных и стрессовых условиях.

8. Разработана и проведена клеточная селекция льна-долгунца к содержанию кадмия в питательной среде. Установлено, что присутствие кадмия в питательной среде в концентрации 15 мг/л позволяет провести клеточную селекцию и получить растения-регенераты, обладающие устойчивостью к воздействию данного металла.

**Сальва Елсайед Морси Мохамед, 2011
ПОЛУЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ
МЕТОДАМИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ,
ТОЛЕРАНТНЫХ К ИОНАМ КАДМИЯ, И ИХ
ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА**

1. Определена чувствительность к хлориду кадмия нескольких сортов пшеницы российской и египетской селекции. По реакции на кадмий сорта можно разделить на две группы: для первой группы (Кинельская-59, Энита, Гиза-167) характерна высокая выживаемость и торможение роста, что можно рассматривать как адаптивную реакцию, а для вторых (Гиммеза-1, Гиммеза-9, Сидз-1, Новосибирская-22) на фоне гибели большинства растений отмечен активный рост выживших. Вероятно сорта второй группы неоднородны и включают как чувствительные, так и устойчивые растения.

2. Установлены ингибирующие рост и сублетальные концентрации кадмия для растений и каллусных тканей пшеницы. В водной культуре сублетальной является концентрация 300 мкМ кадмия. Сублетальной концентрацией для культивируемых тканей является 100 мкМ.

3. Отмечены существенные различия между сортами по способности их тканей к морфогенезу *in vitro*. Отобраны сорта с наибольшей способностью к регенерации растений (Новосибирская-22, Энита, Гиммеза-1 и Саха-69) и, следовательно, обладающие бóльшим биотехнологическим потенциалом.

4. Методом клеточной селекции получены регенеранты сортов Энита, Гиммеза-1 и Саха-69, более толерантные к кадмию, чем исходные растения. В двух поколениях показано наследование признака устойчивости.

5. Толерантные растения в присутствии кадмия отличались от исходных более высоким содержанием пролина и фотосинтетических пигментов, а также были менее чувствительны к окислительному стрессу.

6. Трансгенные растения пшеницы с увеличенным содержанием эндогенного пролина характеризовались большей продуктивностью и меньшим накоплением кадмия в зерновках в присутствии кадмия по сравнению с контрольными растениями.

7. На примере полученных после клеточной селекции и трансгенных растений показано, что повышение уровня эндогенного пролина способствовало увеличению устойчивости растений к кадмию и влияло на поглощение и транспорт по растению ионов металла.

Прямая селекция

Но в природе действуют и другие факторы: наличие других веществ, кислотность

Петуния – ртуть

Сорго – алюминий

Морковь – алюминий и марганец

Дурман – кадмий

ИФР им. К.А. Тимирязева РАН, 2006

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТОЛЕРАНТНЫХ К
КОМПЛЕКСНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ
МЕТАЛЛОВ ОДНОДОЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ IN VITRO**

Гладков Евгений Александрович (RU),

Гладкова Ольга Викторовна (RU)

Способ получения толерантных к комплексному воздействию тяжелых металлов однодольных растений in vitro, предусматривающий получение каллуса из семян, культивирование, регенерацию и укоренение на питательной среде Мурасиге-Скуга, причем культивирование каллуса проводят в течение одного пассажа при концентрации кадмия 5-10 мг/л, цинка 100-200 мг/л, свинца 325-650 мг/л, затем проводят регенерацию и укоренение на среде при концентрации кадмия 10-18 мг/л, цинка 200-300 мг/л, свинца 650-1100 мг/л.

Экстремальные температуры

Высокие и низкие температуры

Белки теплового шока

Холодостойкость

Холодостойкость обусловлена способностью липидов мембран оставаться в жидком состоянии благодаря наличию ненасыщенных жирных кислот и/или стеролов

Внеклеточный лед

Водный стресс

Предотвращение: **Аккумуляция** антифризных веществ, **уменьшение** количества несвязанной воды при обезвоживании и увеличение способности переохлаждаться

Прямая селекция *in vitro*



Рис. 1 Возможные пути выживания и устойчивости растений при морозах (цит. по Левитт, 1983).

У **морозостойких** древесных растений – накопление большого количества **жиров**,
у **менее устойчивых** – **сахаров**.

1976 – суспензионные культуры табака и перца – 21 сут. при -3 и -40 °С – среди отобранных клонов были холодостойкие линии

Устойчивость к высоким температурам связана с геном *Fad7*, белок которого влияет на метаболизм жирных кислот.

Инактивация гена привела к росту устойчивости к повышенным температурам.

Изучение физиолого-биохимических механизмов устойчивости растений картофеля к высокой температуре с использованием клеточной технологии

кандидат биологических наук Авганова Х.Х., 2006

1. Показано, что первичные каллусы образуются на срезах междоузлий и/или кусочках листа картофеля в среде МС, содержащей глутамин, зеатин и кинетин. Образовавшиеся каллусы отличались по размеру и цвету. В варианте +37°С наблюдалось увеличение роста каллусов, в варианте +41°С наблюдалась стимуляция роста каллусов, в варианте +45°С отмечалось резкое ингибирование роста каллусов.

2. Активная пролиферация наблюдалась у каллусов контрольного варианта и каллусов, образовавшихся при температуре +41 С и +45°С. После перенесения их

3. Количество образовавшихся растений-регенерантов было самое высокое в контрольном варианте. Единичные растения-регенеранты образовались при +45°C и +47°C. Наиболее сильное угнетение роста и наименьшее количество корней наблюдалось в варианте +47°C. При постепенном воздействии высокой температуры (+47°C) на уровне растений-регенерантов наиболее устойчивыми оказались регенеранты, полученные из каллусов, подвергавшихся воздействию высокой температуры.

4. Давление на уровне неорганизованной пролиферации выявила ряд форм растений, резистентных к высокой температуре (+47°C). Стабильными оказались изменения, вызванные действием более высокой (+47°C) температуры, тогда как у соматоклональных линий при более низкой температуре (+37°C, +41°C) они со временем терялись.

5. Обнаружены различия между контрольными - исходными и температуроустойчивыми растениями-регенерантами по высоте стебля, количеству листьев, содержанию хлорофиллов и УПП листа. Растения, полученные методом клеточной технологии, имеют красноватый стебель и листья. Листья этих растений более плотные и опушенные.

6. Выявлены различия между контрольными растениями и температуроустойчивыми (ТУ растения-регенеранты) при действии засухи. Так, содержание воды у ТУ-регенерантов при засухе было значительно выше, чем у контрольных растений, и они оказались более выносливыми к обезвоживанию и перегреву почвы - засухи.

7. Анализ температуроустойчивых растений показал, что содержание пролина в них существенно выше, чем у исходного в нормальных условиях и при искусственно созданной засухе. Содержание пролина у ТУ-регенерантов было в 10-18 раз больше при засухе и в 2-3 раза у исходных контрольных растений. Количество амидов также увеличилось при засухе у ТУ-регенерантов. У исходной формы растений их количество при засухе изменилось незначительно.

8. Показано, что адаптированные к температурному стрессу регенеранты картофеля, полученные в результате клеточной селекции, характеризуются более высоким содержанием свободного пролина по сравнению контрольными растениями, и это можно использовать как тест - признак при оценке уровня устойчивости генотипов картофеля к температурному стрессу и другим природным неблагоприятным

9. Полученные результаты и разработанные биотехнологические методы способствуют расширению генетического базиса селекции картофеля путем создания ценных генотипов исходной формы, а также выяснению физиолого-биохимических механизмов устойчивости растений к стрессовым факторам среды.

УФ-излучение

Антропогенное влияние усиливается, озоновый слой уменьшается

Растет уровень излучения в диапазоне волн 280-320 нм (средний участок, УФ-Б)

УФ

- прямые повреждения ДНК,
- окислительный стресс, в результате образуются радикалы, повреждающие структуры и молекулы клетки
- физиологические нарушения,
- анатомические нарушения, повышенный уровень мутаций

Устойчивость может быть обусловлена

- абсорбцией падающей радиации эпидермальными клетками,
- морфологическим строением растений, защищающим чувствительные клетки,
- системами фоторепарации,
- аккумуляцией в клетке флавоноидов, абсорбирующих часть УФ-радиации.

Суспензионные или каллусные культуры – 250 Дж/м². Колонии сохраняли устойчивость. Клетки в 2,2-2,8 раза больше в размере и имели вдвое увеличенное количество ДНК. На поздних стадиях большие количества фенольных соединений, особенно флавоноидов; на 10-е сутки в 4 раза больше нефлавоноидных полифенолов и в 14 раз флавоноидов, чем у родительских.

ИФР РАН

T. aestivum – УФ-Б – изменение морфофизиологических (размеры клеток, параметры клеточной стенки) и биохимических (содержание фенольных соединений, лигнина, изменения баланса аминокислот) характеристик

В результате клеточной селекции получены культуры пшеницы, сохраняющие способность к неорганизованному росту в присутствии УФ-Б в течение длительного культивирования в стрессовых