

Корма: культуры, биотехнологии, контроль качества

УДК 635.928:581.143.6:[573.6.086.83+577.21]

doi: 10.15389/agrobiology.2014.4.106rus

ПОЛУЧЕНИЕ МНОГОЛЕТНИХ ТРАВ, УСТОЙЧИВЫХ К ХЛОРИДНОМУ ЗАСОЛЕНИЮ, С ПОМОЩЬЮ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИЕ.А. ГЛАДКОВ^{1, 2, 3}, Ю.И. ДОЛГИХ¹, О.В. ГЛАДКОВА²

Возможность возделывания культурных растений на засоленных землях определяется содержанием и химическим составом солей в корнеобитаемых слоях. Различают сульфатное, сульфатно-хлоридное, карбонатное, хлоридное засоление. Накопление хлорида натрия, хлорида магния и хлорида кальция отмечается как в почвах агроэкосистем, так и в городских условиях из-за использования этих соединений в качестве противогололедных реагентов. Формирование солонцеватости крайне неблагоприятно, поскольку препятствует развитию корневой системы. В настоящей работе мы получали растения овсяницы красной (*Festuca rubra* L.) и полевицы побегоносной (*Agrostis stolonifera* L.) *in vitro*, устойчивые к высоким концентрациям хлорида натрия. Фитотоксичность хлорида натрия, хлорида магния, хлорида кальция оценивали по всхожести семян и росту растений. По нашим данным, исходные растения полевицы и овсяницы демонстрируют повышенную чувствительность к засолению. На модифицированной среде Мурасиге-Скуга (MS) с 1 и 2 % NaCl были отобраны устойчивые клеточные линии овсяницы и полевицы. Для отбора солеустойчивых клеток каллусы (полевица — 2100, овсяница — 750) культивировали в течение двух пассажей на средах MS с добавлением 1 или 2 % NaCl. Регенерацию и укоренение растений из выживших клонов также проводили на средах MS с 1 и 2 % NaCl, затем регенеранты пересаживали в почву. В почве в вариантах с 1 и 2 % NaCl у полевицы укоренилось соответственно 132 и 18 растений, у овсяницы — 26 и 9. Для оценки солеустойчивости в почву вносили NaCl (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 %). У большинства образцов полевицы побегоносной и овсяницы красной этот признак реализовался на уровне целого растения. Показано наследование устойчивости к хлориду натрия и другим солям у полевицы побегоносной. Разработанный метод может быть использован для получения кормовых и городских трав, устойчивых к засолению.

Ключевые слова: овсяница, полевица, солеустойчивость, клеточная селекция.

Засоление почв — серьезная проблема современного растениеводства и городского озеленения (1, 2). Засоленные почвы в России составляют 53 997 тыс. га, или 3,3 % от общей площади (1). Возможность возделывания культурных растений на таких землях определяется концентрацией и химическим составом солей в корнеобитаемых слоях. Различают сульфатное, сульфатно-хлоридное, карбонатное, хлоридное засоление. Последнее особенно токсично для растений. Формирование солонцеватости крайне неблагоприятно, поскольку препятствует развитию корневой системы растений и, как следствие, приводит к снижению урожайности и качества продукции (3).

Для восстановления засоленных естественных кормовых угодий и создания культурных пастбищ используют многолетние травы. Толерантность и урожайность кормовых трав резко различается в зависимости от их биологических особенностей, степени засоленности почвы и экологических факторов. Исследования чувствительности ряда кормовых трав к засолению показало, что между высотой проростков и показателями засоления почвы существует зависимость, близкая к прямолинейной, выявлены изменения роста проростков кормовых культур (преимущественно многолетних трав) на образцах чернозема, увлажненного NaCl (в диапазоне засоления 1-18 г/л), при влажности, близкой к наименьшей влагоемкости (4). Полевица побегоносная и овсяница красная чувствительны к засолению.

Современные биотехнологии позволяют ускорить процесс селекции устойчивых к засолению форм растений. Следует отметить, что клеточная селекция — это экологически безопасная технология создания

адаптивных форм растений, использующая природные резервы их изменчивости. Технологии клеточной селекции хорошо зарекомендовали себя при получении растений, толерантных к засухе, засолению, тяжелым металлам (5-7). У некоторых видов отобраны солеустойчивые клоны. Регенеранты, полученные из них, также толерантны к засолению (8-10). В то же время после регенерации солеустойчивость сохраняется не всегда.

В большинстве случаев в клеточной селекции на солеустойчивость в качестве селективного агента используют хлорид натрия. Также применяют аналоги некоторых аминокислот и осмотически активные вещества (полиэтиленгликоль, маннит, сорбит). Использование NaCl как селективного агента имеет ряд преимуществ, поскольку дает возможность отбирать солеустойчивые клеточные линии независимо от механизма, обеспечивающего адаптацию. Обычно частота солеустойчивых клеток в случае использования NaCl больше, чем с другими, более специфическими селективными системами, так как он в отличие от осмотиков (ПЭГ, пролин и др.) обладает еще и токсическим действием.

Целью настоящей работы было получение растений полевицы и овсяницы, устойчивых к высоким концентрациям хлорида натрия.

Методика. Объектами исследования были два вида многолетних трав: овсяница красная (*Festuca rubra* L.) и полевица побегоносная (*Agrostis stolonifera* L.). Реакцию исходных растений на засоление хлоридом натрия, хлоридом магния и хлоридом кальция оценивали по всхожести семян и росту. Семена обрабатывали марганцовокислым калием, промывали водой, выкладывали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную раствором одной из солей (0,5 и 1 %, контроль — вода).

Каллус получали из семян на модифицированной агаризованной среде Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением 3 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). Семена предварительно стерилизовали коммерческим отбеливателем «Белизна» и трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Для роста каллуса использовали среду MS с добавлением 1 мг/л 2,4-Д. Чувствительность каллусных тканей к засолению определяли по увеличению сырой массы инокулюмов после 1 мес культивирования на средах MS с 1 и 2 % NaCl (контроль — среда MS без NaCl). Регенерацию и укоренение растений проводили на среде MS без гормонов. Для отбора солеустойчивых клеток 2100 каллусов полевицы и 750 овсяницы культивировали в течение двух пассажей на средах с добавлением 1 или 2 % NaCl (контроль — среда MS без NaCl). Регенерацию и укоренение растений из выживших клонов также проводили на средах с 1 и 2 % NaCl, затем 40 растений полевицы и 20 овсяницы пересаживали в почву. После адаптации в грунт вносили NaCl (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 %) и через 1 мес оценивали долю выживших растений и увеличение их высоты, за 100 % принимая средний прирост растений в почве без соли (контроль). Остальные регенеранты использовали для получения семян.

Для оценки устойчивости к засолению у потомков регенерантов семена 10 растений (по 30-100 шт. в каждом опыте) проращивали в водных растворах 1 % хлорида натрия (контроль — вода). Результаты учитывали через 7-14 сут. Потомство наиболее продуктивных клонов использовали для дальнейшего определения солеустойчивости в водных растворах и почвенных условиях при 1 % засолении. Потомство некоторых регенерантов проанализировали в 4 поколениях. Для оценки устойчивости к другим солям семена одного из регенерантов проращивали в водных растворах с 1 % бишофита (хлорид магния) или 1 % хлорида кальция.

Стандартное отклонение рассчитывали с помощью программы

Microsoft Excel 2003.

Результаты. Замедление всхожести растений в чашках Петри на первом этапе исследований наблюдали уже при концентрации хлорида натрия 0,5 %, однако через 10-14 сут большая часть семян начинала прорастать. При содержании бишофита 0,5 % всхожесть овсяницы красной составила 82 %, в варианте с 0,5 % хлорида кальция — 63 %. Засоление существенно влияло и на рост растений полевицы побегоносной, причем наибольшей токсичностью обладал хлорид натрия (табл. 1).

1. Рост побегов (к контролю, %) у полевицы побегоносной *Agrostis stolonifera* L. при разных концентрациях хлоридов в среде (лабораторный опыт)

Анализируемая соль	Концентрация, %	
	0,5	1,0
Хлорид натрия	70±6,7	41±4,1
Хлорид магния	80±8,2	51±5,6
Хлорид кальция	75±7,6	51±5,0

Среди культурных растений наименее солевыносливы кукуруза, сорговые, просо, полевой горох, люцерна, среднеустойчивы хлопчатник, ячмень, рожь, спаржа, кормовая трава тимофеевка, донник, пшеница, из относительно устойчивых можно выделить сахарную свеклу (11). По нашим данным, полевица и овсяница имели повышенную чувствительность к засолению.

Для отбора мутантных клеток, обеспечивающих стабильную солеустойчивость, первичный каллус культивировали на средах с высокой концентрацией хлорида натрия, поскольку при низких значениях у клеток возникает обратимая адаптация с потерей толерантности в отсутствие соли. Засоление снижало жизнеспособность каллусных тканей. При культивировании на среде с 1 % NaCl доля выживших каллусов у овсяницы составила 70±7,4, у полевицы — 68±7,2 %, с 2 % — соответственно 56±5,6 и 50±5,8 % (выживание в контроле — 100 %). Отобранные экспланты вновь помещали на селективную среду с 1 или 2 % NaCl. После двух пассажей на среде, содержащей 1 % NaCl, и у овсяницы, и у полевицы выжило менее половины каллусов. Интенсивность роста отселектированных клонов была сопоставима с таковой у исходных клеток на среде без соли. Стрессовые факторы и длительное культивирование уменьшали регенерационную способность ткани, поэтому необходимо сокращать продолжительность культивирования. После культивирования в течение двух пассажей каллусы пересаживали на среду для регенерации.

Иногда метаболизм устойчивых клеток перестраивается по галофитному типу и они лучше растут на среде с солью, чем в контроле. Для повышения вероятности отбора только устойчивых мутантных вариантов регенерацию растений из отобранных клонов также проводили на среде с NaCl. Только 60 каллусов овсяницы и 200 каллусов полевицы при 1 % засоления сформировали растения, часть которых погибла при пересадке в почву (табл. 2).

2. Результаты отбора in vitro толерантных к NaCl растений полевицы побегоносной *Agrostis stolonifera* L. (П) и овсяницы красной *Festuca rubra* L. (О)

Концентрация NaCl, %	Общее число каллусов, шт.		Число, шт.					
			устойчивых клонов		регенерантов in vitro		регенерантов в почве	
	П	О	П	О	П	О	П	О
1	1500	450	590	180	200	60	132	26
2	600	300	150	86	50	25	18	9

При проведении селекции в более жестких условиях (среда, содержащая 2 % NaCl) значительная часть каллусной ткани теряла жизнеспособность в течение 2 нед. Большинство эксплантов приобретало черты неэмбриогенного каллуса, и лишь некоторые клоны сохраняли эмбриогенную способность и имели прирост биомассы. Из них были получены рас-

тения-регенеранты, однако с меньшей частотой, чем при проведении селекции на среде с 1 % NaCl. Использование высоких концентраций токсиканта привело к существенному увеличению гибели растений при пересадке в почву, около 30 % регенерантов имели морфологические отличия от исходных растений — низкорослость, отсутствие кушения, более жесткие листья, другой оттенок листьев.

Следовательно, применение высоких концентраций токсиканта неэффективно. Более целесообразно использовать схему клеточной селекции с 1 % NaCl, так как в этом случае приживаемость растений в почве была значительно выше по сравнению с таковой в более жестких условиях и мы получили регенеранты, давшие семена.

Для проверки солеустойчивости часть полученных регенерантов (40 растений полевицы и 20 — овсяницы) после селекции в среде, содержащей 1 % хлорида натрия, высаживали в сосуды с почвой и вносили NaCl в концентрациях 0,5-2,0 %. В почве без соли прирост за 1 мес был одинаковым у исходных растений и регенерантов, составив 5 см для овсяницы и 4 см — для полевицы. В варианте с засолением выживаемость регенерантов была выше, чем у исходных растений, при всех концентрациях NaCl. С увеличением концентрации соли разница увеличивалась. При 1,5 % засолении у исходных растений полевицы средний прирост за месяц составлял 18 %, у солеустойчивых регенерантов — 56 %, у исходных растений овсяницы — 20 %, у регенерантов — 50 %. При этом индивидуальные растения демонстрировали различную реакцию на NaCl. Например, при 1,5 % засолении 20 % регенерантов полевицы погибли.

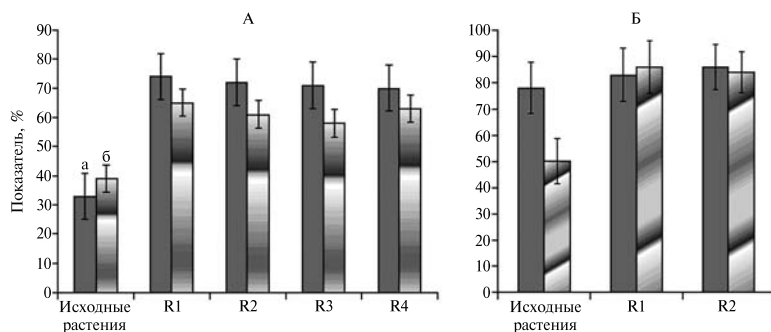
Не у всех растений, полученных из отселектированных клеточных клонов, признак устойчивости проявлялся на уровне целого организма. Возможно, что после относительно непродолжительного культивирования на селективной среде в популяции могли остаться чувствительные клетки, из которых были получены растения. Однако в большинстве случаев признак устойчивости к засолению сохранялся у целого растения.

Поскольку селекционную и экологическую ценность представляет только наследуемая солеустойчивость, необходимо было проверить реакцию на засоление у растений, выращенных из семян регенерантов. Несмотря на отсутствие у большинства растений морфологических отличий от контроля, регенеранты существенно различались по семенной продуктивности. У овсяницы зацвело только одно растение, но число семян оказалось слишком мало для анализа. В первый год у полевицы семена завязались у 10 регенерантов (всего за время наблюдения — у 26). У значительной части регенерантов семенная продуктивность была небольшой.

Семена 10 регенерантов протестировали на устойчивость к NaCl в водных растворах, и 9 из 10 растений продемонстрировали повышенную солеустойчивость, потомство наиболее продуктивных клонов было использовано для дальнейшего определения солеустойчивости.

Потомки регенерантов №№ 32 и 33 продемонстрировали высокую солеустойчивость, всхожесть семян и длина проростков при 1 % NaCl были в 2 раза больше соответствующих показателей у исходных растений. У проростков исходных растений в варианте с солью корни появились только у единичных растений, у большинства регенерантов не отмечали ингибирования корнеобразования по сравнению с контролем. В почвенных условиях 1 % засоление не оказывало влияния на рост потомков регенерантов. Оценка растений четырех семенных поколений в водных растворах хлорида натрия показала, что признак солеустойчивости сохранялся. Однако степень его проявления у потомков регенерантов была различной.

Так, потомки регенеранта № 56 обладали существенно большей толерантностью к засолению, чем потомки регенеранта № 58. Различная степень устойчивости к NaCl была, вероятно, следствием сегрегации генов, контролирующей реакцию на засоление. Всхожесть и прирост при содержании в среде 1 % NaCl оставались неизменными у потомков регенеранта № 56 на протяжении четырех поколений, следовательно, признак устойчивости к засолению у этого регенеранта был стабильным (рис.). Проявление солеустойчивости в потомстве регенерантов, полученных после клеточной селекции, свидетельствует о мутационной природе этого признака.



Всхожесть семян (а) и рост (б) у потомков растения-регенеранта (R) полевицы побегоносной *Agrostis stolonifera* L. № 56 в водном растворе с 1 % NaCl (А) и 1 % MgCl₂ (Б) (лабораторный опыт).

Токсическое действие на растения оказывают не только ионы хлора, но и натрия, поэтому мы оценили толерантность к другим хлоридам. Семена одного из регенерантов проращивали с 1 % хлорида магния или 1 % хлорида кальция. В варианте с водным раствором бишофита исходные растения отставали в росте от потомков регенерантов (см. рис.). В почве 1 % хлорида магния не оказывал существенного влияния рост регенерантов. При действии 1 % хлорида кальция наблюдалось существенное ингибирование корней у нетолерантных растений, у некоторых из них отмечались признаки хлороза (в отличие от устойчивых к хлориду натрия растений).

Таким образом, у большинства полученных из солеустойчивых клеточных линий растений-регенерантов полевицы побегоносной и овсяницы красной признак солеустойчивости реализуется на уровне целого растения. Для полевицы показано наследование толерантности к NaCl и перекрестная устойчивость к другим солям. Следовательно, отбор клеток на среде с NaCl оказалась эффективной селективной схемой, обеспечивающей устойчивость к некоторым другим хлоридам. Большинство полученных растений существенно увеличили предел толерантности к засолению, продемонстрировав способность переносить высокое содержание солей в среде, в отличие от исходных растений, у которых даже при средней степени засоления наблюдалось существенное ингибирование роста и снижение декоративных качеств. Использование клеточной селекции позволяет повысить предел толерантности растений к засолению почвы, что существенно увеличивает вероятность их выживания в неблагоприятных условиях.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Казакова Л.А. Комплексная мелиорация орошаемых солонцовых и засоленных почв Нижнего Поволжья. Докт. дис. Волгоград, 2007.
2. Доклад о состоянии окружающей среды в городе Москве в 2011 году (Департамент природопользования и охраны окружающей среды города Москвы). М., 2012.
3. Шихмуратов А.З. Устойчивость образцов твердой пшеницы *Triticum durum* L. к засолению почвы хлоридом натрия. Сельскохозяйственная биология, 2009, 1: 34-37.

4. Зайцева Р.И., Желнакова Л.И., Никитина Н.С. Характеристика солеустойчивости кормовых культур в начальной фазе вегетации при засолении чернозема хлоридом натрия. Бюл. Почвенного института им. В.В. Докучаева (М.), 2009, 63: 25-40.
5. Гладков Е.А. Оценка фитотоксичности комплексного воздействия тяжелых металлов и определение ориентировочно допустимых концентраций для цинка и меди. Сельскохозяйственная биология, 2010, 6: 33-36.
6. Гладков Е.А., Гладкова О.В. Оценка комплексной фитотоксичности тяжелых металлов и получение растений, обладающих комплексной устойчивостью. Биотехнология, 2007, 1: 81-85.
7. Gladkov E.A., Gladkova O.N., Glushetskaya L.S. Estimation of heavy metal resistance in the second generation of creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*) obtained by cell selection for resistance to these contaminants and the ability of this plant to accumulate heavy metals. Applied Biochemistry and Microbiology, 2011, 47(8): 776-779.
8. Губанова Н.Я., Дубровная О.В., Чугункова Т.В. Отбор и сравнительный анализ устойчивых к солевому стрессу каллусных культур кормовой свеклы, полученных из эксплантов различной плоидности. Физиология и биохимия культурных растений, 2000, 32(5): 362-369.
9. Серазеидинова Л.Д., Полимбетова Н.С., Лесова Ж.Т., Жуловчинова С.О., Каниев Б.К., Аликулов З.А., Карабаев М.К., Жардемали Ж.К. Действие хлорида натрия и полиэтиленгликоля в различных концентрациях на рост суспензионных клеток пшеницы. Физиология и биохимия культурных растений, 2000, 32(4): 302-309.
10. Lupotto E., Locatelli F., Lusardi M.C. In vitro selection for salt tolerance in maize. In: Biotechnology in agriculture and forestry. V. 25. Maize /Y.P.S. Bajaj (ed.). Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg, 1994, 25: 314-330.
11. Косулина Л.Г., Луценко Э.К., Аксенова В.А. Физиология устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды. Ростов-на-Дону, 1993.

¹Институт физиологии растений РАН
им. К.А. Тимирязева,
127276 Россия, г. Москва, ул. Ботаническая, 35,
e-mail: gladkovu@mail.ru;

²Московский государственный
машиностроительный университет,
105066 Россия, г. Москва, ул. Старая Басманная, 21/4;

³Московский государственный технический
университет им. Н.Э. Баумана,
105005 Россия, г. Москва, 2-я Бауманская ул., 5, стр. 1

Поступила в редакцию
25 апреля 2013 года

In vitro SELECTION FOR TOLERANCE TO SOIL CHLORIDE SALINIZATION IN PERENNIAL GRASSES

E.A. Gladkov^{1, 2, 3}, Yu.I. Dolgikh¹, O.V. Gladkova²

¹K.A. Timiryazev Research Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, 35, ul. Botanicheskaya, Moscow, 127276 Russia, e-mail gladkovu@mail.ru;

²Moscow State University of Mechanical Engineering, 21/4, ul. Staraya Basmannaya, Moscow, 105066 Russia;

³N.E. Bauman Moscow State Technical University, 5, str. 1, ul. 2-ya Baumanskaya, Moscow, 105005 Russia

Received April 25, 2013

doi: 10.15389/agrobiol.2014.4.106eng

Abstract

Plant cultivation under soil salinity depends on the level and composition of salts in the root zone. Of sulphates, sulphate-chlorides, carbonates and chlorides exactly chlorides are the most toxic causing root growth violation. Accumulation of NaCl, MgCl₂ and CaCl₂ occurs in agroecosystems and also in urban soils if anti-icing agents are used. The article presents the results of *Festuca rubra* L. and *Agrostis stolonifera* L. in vitro selection for tolerance to the high NaCl levels. Phytotoxicity of NaCl, MgCl₂ and CaCl₂ was estimated basing on the seed germination and plant growth parameters. It was found out an enhanced sensitivity to the salinization in parental plants of these grasses if compared to another cultivated plants. Resistant cell lines were selected after two passages of 2100 calli of the bent grass and 750 calli of the fescue on modified MS medium with 1 or 2 % NaCl. For regeneration and rooting plants of the survived clones, the MS media with 1 or 2 % NaCl were used. To assess a tolerance level, the regenerants were planted into the soil containing 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 % NaCl. The obtained rooted regenerants (132 and 18 plants of the bent grass at 1 and 2 % NaCl, respectively, and 26 and 9 plants of fescue at 1 and 2 % NaCl, respectively) were tolerant. The possessed tolerance to NaCl and other salts were shown to be inherited. The developed method can be used to select in vitro the fodder and urban grass resistant to salinity.

Keywords: *Festuca rubra* L., *Agrostis stolonifera* L., cell selection, salt-tolerance.