

В. М. Бурдасов
Л. В. Матюнина

V. Burdasov
L. Matjunina

О СОЗДАНИИ СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ ФОРМ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ МЕТОДАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ

ABOUT CULTIVATION OF SOLTRESISTANCE FORM OF ARBOREOUS PLANT BY BIOTECHNOLOGICAL METHODS

Биологическая рекультивация земель является завершающим этапом в общем процессе восстановления засоленных земель, нарушенных неправильным землепользованием или добычей полезных ископаемых (Куприянов, 1989). Возможности интродукции толерантных диких видов ограничены (Лучник, 1980; Смирнов, 1986). Создание солеустойчивых форм растений методами традиционной селекции - процесс трудоемкий и очень длительный, особенно для древесных видов растений. С развитием биотехнологии потенциально возможным является получение солевыносливых генотипов путем селекции на уровне соматических клеток (Сидоров, 1990). Это также может быть новой технологией расширения ремонтных возможностей зеленых компонентов биосферы при экологическом ухудшении почвы и планеты.

Механизмы адаптации к засолению могут быть разными, до конца они полностью еще не изучены. Принципиально важно, что клеточные механизмы выносливости к засолению являются сходными для культивируемых клеток и целых растений и что селекция на клеточном уровне представляет реальную перспективу получения устойчивых к засолению форм растений (Сидоров, 1990). Методом выделения клеточных линий, устойчивых к различным концентрациям хлорида натрия и регенерации из них растений, сохраняющих толерантность к соли получены солеустойчивые формы люцерны (Stoan и др., 1978; McCoу, 1987) и злаков (Собко, Шамина, Строганов, 1981). В качестве исходного материала для биотехнологической селекции нами выбраны 2 вида древесных растений исходно устойчивые к засухе, резким перепадам температур, а также потенциально способные переносить некоторый уровень засоления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ РАБОТЫ

Тополь

Объектом исследований служил пассируемый каллус тополя бальзамического (*Populus balsamifera hort*). Каллус был иницирован на среде Линсмайера и Скуга (Бутенко, 1989) с добавлением регуляторов роста ИУК (2 мг/л) и КНО (2 мг/л). Полученный каллус пассировали на агаризованной среде MS с ИМК (2 мг/л) и БАП (0,2 мг/л) с интервалом в 3 недели. Каллус выращивали в темноте при $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$. Селекцию на солеустойчивость проводили ступенчато. Пассируемый каллус переносили на ту же среду с добавлением 0,1% NaCl (Na_2SO_4). Затем ежемесячно пересаживали с повышением концентрации соли на 0,1%. Регенерацию побегов проводили на среде MS с 6-БАП (1 мг/л) и ИУК (0,05 мг/л). После регенерации каллус с побегами культивировали на безгормональной среде того же состава для доращивания побегов. Укоренение побегов проводили на среде для доращивания, разбавленной в 2 раза. Адаптацию растений к нестерильным условиям проводили на керамзите при поливе разбавленным раствором солей MS в условиях постепенно снижаемой влажности. С момента регенерации растения выращивали на свету при 16 часовом световом дне, освещенность 4,5-5 тыс. люкс. $t = +20-25^\circ\text{C}$.

Черемуха

Инициация каллуса черемухи Маака (*Padus maackii* (Rupr.) Kom.), была проведена на среде Мурасиге и Скуга (Бутенко, 1982) с добавлением ауксинов и цитокининов в соотношении 10:1 (2 мг/л ИМК и 0,2 мг/л 6-БАП). Каллус пассировали на среде того же состава с интервалом 3-4 недели. Каллус выращивали в темноте и на свету (16 часовый день, освещенность 4,5-5 тыс. люкс) при $t = +25^{\circ}\text{C}$. Селекция на солеустойчивость проводилась на среде того же состава с добавлением NaCl или Na_2SO_4 . Схема аналогична, описанной для тополя. Для инициации морфогенеза каллус переносили на среду MS с тем же ауксином и цитокинином, но в соотношении 1:10 (0,2 мг/л ИМК и 2 мг/л БАП). После формирования морфогенных зон, концентрацию гормонов уменьшали в 2 раза, при этом формировались укороченные побеги с хорошо развитыми листьями. Доращивание побегов и укоренение хорошо происходит на безгормональной среде того же состава. Адаптацию растений к нестерильным условиям проводили на керамзите и в торфяных горшочках в условиях избыточного увлажнения. Условия освещения и температуры аналогичны условиям при выращивании тополя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Тополь

Каллус тополя бальзамического ярко-белый (при культивировании в темноте) имеет плотную структуру, характеризуется хорошим ростом, за 3 недели культивирования увеличивает свою массу в 8-10 раз. При субкультивировании каллус сохраняет эти свойства (а также способность к регенерации) в течение полутора лет. Органогенез в каллусной культуре тополя стимулировался изменением концентраций ауксинов и цитокининов в среде культивирования.

Органогенез может начаться с образования корней или с образования побегов. Второй путь предпочтительнее, так как в результате получают более жизнеспособные растения. Зависимость побегообразования в культуре каллуса тополя бальзамического от состава среды культивирования показана в Таблице 1.

Таблица 1

Образование побегов в каллусной культуре тополя бальзамического на различных средах

Среда гормоны мг/л	Кол-во культур	% побегов	Среднее кол-во побегов за 1п-ж	Максим. кол-во побегов за 1п-ж	Максим. кол-во побегов за время культивирования	Среднее кол-во побегов за время культивирования
MS ИМК 0,05 БАП 1	25	50	11	30	47	15
MS БАП 1	25	60	10	31	51	19
MS ИМК 2 БАП 0,2	100	59	9	19	19	9
LS ИМК 2 KN 0,2	25	26	3	4	12	6
LS ИМК 2 KN 0,2	25	8	5	10	33	25

Наиболее интенсивно морфогенез идет на среде Мурасиге и Скуга, модифицированной в отношении органических компонентов (витамины, глицин, инозит) с добавлением 6-БАП в концентрации 1мг/л, при полном исключении ауксина. Кроме того, органогенез у тополя зависит от условий культивирования. Первый этап органогенеза - образование морфогенных зон и закладка почек лучше идет в темноте. В то время как, для формирования и вытягивания побегов необходимо освещение. Поэтому после пересадки каллуса на среду для регенерации, первые две недели культивирования лучше провести в темноте, затем перенести культуры на свет (16 часовая день, красный свет интенсивностью 4,5-5 тыс. люкс). При последующей пересадке свободные участки каллуса отделялись и культивировались отдельно на питательной среде для пассировки (в темноте). Через 12-25 дней у 43% культур наблюдается вторичный морфогенез, что несколько увеличивает коэффициент размножения (Табл. 1).

В ходе культивирования была обнаружена зависимость между морфогенным потенциалом каллусной ткани и числом пассажей (после инициации органогенеза). С увеличением числа пассажей каллусная культура тополя постепенно теряет способность к морфогенезу. У образования побегов часто наблюдается морфологические изменения, нарастание белого, рыхлого каллуса на нижней части стебля, витрификация. Однако при дальнейшем культивировании возможна коррекция этих отклонений.

Побеги, как правило, развиваются не одновременно. Несколько побегов доминируют, угнетая рост остальных. Поэтому побеги размером 1-1,5 см необходимо удалять и пересаживать на среду для доращивания (McCoу, 1987). Каллус с оставшимися побегами пересаживают на свежую среду того же состава для развития остальных побегов (Собко, 1981). Для доращивания побегов рекомендуется постепенное снижение концентрации цитокининов до полного его исключения. При этом отмечен хороший рост побегов и их укоренение. Для сильных, хорошо развитых побегов возможно укоренение в нестерильных условиях на керамзите, при поливе разбавленным в четыре раза раствором солей MS.

Перенос растений в нестерильные условия необходимо проводить в условиях избыточного увлажнения. При постепенном снижении влажности растения адаптируются к новой среде. В момент адаптации к нестерильным условиям возможен переход растений в состояние покоя. Возможные механизмы этого явления и приемы его нивелирования стоит изучать дополнительно.

Выделение клеточных линий, устойчивых к засолению проводилось на каллусной культуре тополя бальзамического. Селекция велась в двух направлениях на устойчивость к NaCl и Na₂SO₄. Селекцию проводили ступенчато. Ежемесячно повышая содержание соли NaCl (Na₂SO₄) в среде культивирования на 0,1%. При таком отборе возможно выделение клеточных линий устойчивых к засолению. Механизмы такой устойчивости могут быть различны: возможны истинные мутации, эпигенетические изменения, т.е. новации в экспрессии генов - расширение "нормы реакции". Наибольший интерес в работе представляют истинные мутации, хотя адаптация путем расширения "нормы реакции" тоже может представляться ценной при вегетативном размножении потомств.

Важно, что после длительного культивирования на средах с различной степенью засоления, каллус тополя сохранил способность к регенерации. Об этом свидетельствуют отдельные случаи спонтанной регенерации, а и возможность органогенеза на среде для регенерации, даже на более высоком уровне засоления, в частности последней подсоленной среды для культивирования каллуса. Способность к дальнейшему росту, укоренению, переходу в нестерильные условия, а так же реакция на засоление взрослых растений, полученных из солеустойчивого каллуса необходимо дополнительно изучать.

Черемуха

Был получен пассируемый каллус черемухи Маака. Каллус характеризуется быстрым

ростом, имеет рыхлую, зернистую структуру, цвет желтоватый при культивировании в темноте и ярко-зеленый на свету. Селекция на устойчивость к засолению NaCl (Na_2SO_4) проводили по двум различным схемам: прямой отбор и ступенчатый. При прямом отборе каллусные ткани высаживали на селективную среду 1% NaCl или 1,5% Na_2SO_4 и через 30 дней отбирали выжившие колонии. Процент деградации каллуса составил 96% (48 из 50) для NaCl и 88% (44 из 50) для Na_2SO_4 . Жизнеспособный каллус высаживали на среду аналогичного состава и среду для регенерации. Через 20 дней наблюдалось побурение и гибель всех каллусных культур. Опыт был проведен в трех повторностях с аналогичным результатом. Схема ступенчатого отбора подробно описана и выше изложена для тополя. Базовой средой для селекции служила среда MS (2 мг/л ИМК и 0,2 мг/л БАП).

После 10 пассажей получено 10 клеточных линий черемухи Маака способных расти в присутствии 1% NaCl. Аналогично получены линии каллуса способных расти при 1,5% засолении Na_2SO_4 . Полученные каллусные линии сохранили способность к инициации органогенеза. На среде MS (0,2 мг/л ИМК и 2 мг/л БАП) происходит образование морфогенных зон и закладка почек. При снижении концентрации цитокинина в 2 раза формируются укороченные побеги.

ВЫВОДЫ

1. Показана возможность создания солеустойчивых древесных форм растений методами биотехнологии.
2. Для тополя бальзамического и черемухи Маака определены условия каллусогенеза и регенерации растений из каллусной ткани.
3. Проведена ступенчатая селекция на устойчивость к засолению NaCl и Na_2SO_4 на каллусных культурах тополя и черемухи.
4. Необходимы дополнительные испытания реакции на засоление растений, полученных из солеустойчивого каллуса.

ЛИТЕРАТУРА

- Биотехнология растений: культура клеток. - М.: "Агропромиздат", 1989, 280 с.
- Куприянов А.Н. Биологическая рекультивация отвалов в субаридной зоне. - А-Ата, 1989. - 104с.
- Лучник З. И. Интродукция деревьев и кустарников в Алтайском крае. - М., 1980. - 656 с.
- Смирнов И. А. Солеустойчивость древесных растений. Красноярск, 1986. - 216 с.
- Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. - Киев, 1990. - 280 с.
- Собко В. Г., Шамина Э. Б., Строганов Б. П. Получение адаптированной к NaCl клеточной линии *Crepis capillaris*// Физиология растений, 1981. - Т. 28. - вып. 6. - С. 1198-1203.
- Croughan T. P., Stavarec S. J., Rains P. W. Selection of NaCl tolerant line of cultured alfalfa cells//Crop. Sci., 1978. - v. 18. - P. 959-963.
- McCoy T. J. Characterization of alfalfa plants regenerated from selected NaCl tolerant cell lines// Plant cell Reports, 1987. - v. 6. - P. 417-422.

SUMMARY

In this article has described an attempt to create salt-resistant form of arboreal plants for purpose of restoration saline soil. The selection of resistant to NaCl and Na_2SO_4 was conducted with many levels. It was studied conditions of callusogenesis and followed regeneration of *Populus balsamifera* and *Radus maackii*.