

Клеточная селекция каллусных культур моркови на устойчивость к солевому стрессу

Бойко А. А.¹, Бугара И. А.¹, Омельченко А. В.¹, Пуртов Д. С.¹, Грачёв А. А.²

¹ Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского,
Симферополь, Россия

nastia.aap@gmail.com, bia.05@mail.ru, omelchenko_tnu@mail.ru

² Евпатория, Россия
grache-andre@yandex.ru

Представлены результаты исследований по клеточной селекции каллусных культур моркови сортов Нантская 4, Московская зимняя и Ярославна на устойчивость к солевому стрессу при культивировании на питательных средах с содержанием NaCl 50 мМ, 100 мМ и 150 мМ. Установлено ингибирующее действие NaCl в концентрациях 50 мМ, 100 мМ и 150 мМ на энергию прорастания и всхожесть семян моркови. Для индукции каллусообразования и пассирования каллуса применяли питательную среду Мурасиге и Скуга, дополненную кинетином – 0,5 мг/л, 6-БАП – 0,5 мг/л и 2,4-Д – 2,0 мг/л. Культивировали экспланты и каллусные культуры в инкубаторе лабораторном Climacell™ при 16-ти часовом фотoperиоде, температуре световой фазы 26 °C, темновой – 22 °C, освещенности 2–3 клк, влажности 60 %. Один цикл культивирования составлял 75 суток. Селективный отбор устойчивых клеточных линий проводили путем увеличения содержания NaCl в исходной питательной среде от 50 мМ до 150 мМ в цикле пассирования с последующим определением ростового индекса. После снятия солевого стресса каллусные культуры переносили на питательную среду Мурасиге и Скуга, содержащую ИУК и 6-БАП в количестве 0,1 мг/л и 1,0 мг/л для получения растений-регенерантов. Через тридцать суток наблюдались первые признаки органогенеза, связанные с закладкой листьев и последующим развитием корневой системы. Для адаптации растений-регенерантов к условиям *in vivo* микrorастения извлекали из культуральных сосудов, отмывали корневую систему от остатков агаризованной питательной среды и помещали в чашки Петри с проавтоклавированным увлажненным вермикулитом.

Ключевые слова: морковь, клеточная селекция, каллусная культура, солевой стресс, растения-регенеранты.

ВВЕДЕНИЕ

Засоление почвы является одним из наиболее распространенных стрессовых факторов, оказывающих влияние на сельскохозяйственные культуры Крыма. Действие засоления приводит к значительному снижению урожайности и качества продукции растениеводства (Иванищев и др., 2020). Несмотря на то, что наибольшая освоенность почвенных ресурсов Крыма приходится на равнинную часть, где распаханность в среднем составляет около 70 %, засоление, являясь существенным препятствием для возделывания, приводит к тому, что в некоторых районах процент обрабатываемых почв варьирует с 4 % до 95 % от общей площади сельскохозяйственных угодий (Драган, 2004).

По чувствительности к воздействию солей растения делят на две группы: галофиты и гликофиты. Галофиты, являясь растениями солелюбивыми, устойчивы к высоким концентрациям солей. К гликофитам относятся большинство сельскохозяйственных культур. Высокое содержание солей в почве вызывает у гликофитов токсический или ионный стресс, осмотический стресс и метаболический стресс (Tester, 2003; Иванищев, 2021). По современным представлениям, токсическое действие на растения в условиях засоления оказывают ионы Na^+ . Поэтому механизмы адаптации во многом зависят от предела концентрации ионов Na^+ и его распределения в органах растений, при которых возможна их жизнедеятельность, что в конечном итоге определяет и солеустойчивость (Балнокин, 1991; Омельченко и др., 2009; Кабузенко и др., 2013; Иванищев, 2019). У гликофитов, под действием слабых концентраций засоляющих ионов, наблюдается обесцвечивание листьев и снижение прироста сухой массы. Действие солевого стресса в большей степени угнетает развитие корневой системы, что приводит к анатомическим изменениям зоны корневых

волосков, вследствие чего, затрудняется поступление воды и растворенных в ней минеральных солей (Munns, 2008). В итоге наблюдается не только увеличение водного дефицита в тканях, но и ограниченное поступление элементов минерального питания. В этой связи, актуальной задачей является создание устойчивых к солевому стрессу сортов сельскохозяйственных культур.

Являясь гликофитом, морковь растет преимущественно на незасоленных почвах. Имеющийся сортовой материал моркови чувствителен к солевому стрессу и нуждается в тщательном подборе условий для выращивания (Балнокин, 1985). В связи с интенсивным развитием сельскохозяйственной отрасли, проведение работ по созданию устойчивых форм моркови является целесообразным и востребованным.

Наиболее распространённым и перспективным подходом к созданию устойчивых к неблагоприятным условиям сортов является использование метода прямой клеточной селекции на основе культуры изолированных клеток, тканей и органов растений *in vitro*. Метод успешно применяют при отборе мутантных форм каллусных культур, устойчивых к гербицидам, антибиотикам, токсинам патогенов, тяжелым металлам, засухе, засолению (Веселов, 2007). Внесение в состав питательных сред на этапе получения и пассирования каллуса селективных концентраций токсичного веществ обеспечивает выживаемость наиболее приспособленных клеточных линий. В ряде случаев используют ступенчатую селекцию, при которой концентрацию селективного фактора в питательной среде повышают постепенно (Кунах, 2000). Эффективность использования метода прямой клеточной селекции на устойчивость к осмотическому стрессу была продемонстрирована для ряда сортов эфиромасличных культур, выращиваемых в Республике Крым (Егорова, 2009; Егорова, Ставцева, 2013). При этом, для создания селективных условий, многие авторы вводят в состав питательной среды маннит и неионный осмотик NaCl в различных концентрациях.

Цель работы – отобрать устойчивые к солевому стрессу морфогенные клеточные культуры моркови на основе метода прямой клеточной селекции *in vitro* с последующим получением растений-регенерантов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служил семенной материал трех сортов: Нантская 4, Московская зимняя и Ярославна. Для выявления потенциальной устойчивости сортов к солевому стрессу, семена предварительно проращивали в чашках Петри с добавлением растворов NaCl в концентрациях: 50 mM, 100 mM, 150 mM и 200 mM. В условиях ламинарного бокса MSC Advantage™ по 50 семян каждого сорта помещали в чашки Петри на поверхность дисков из фильтровальной бумаги. Поверхность бумажного диска увлажняли растворами NaCl в количестве 5 мл, а в контрольном варианте опыта – дистиллированной водой. Эксперимент проводили в трехкратной повторности. Культивировали семена в термостате при температуре 26 °C в течение 10 суток. Энергию прорастания и всхожесть семян определяли по ГОСТу 12038-84 (ГОСТ 12038-84).

Подготовку посуды, инструментов, питательных сред и растительного материала проводили по методике, общепринятой в работах по культивированию изолированных клеток, тканей и органов растений (Калинин и др., 1980). В качестве культуральных сосудов использовали химические пробирки 16×150 П-1, в которые разливали по 10 мл питательной среды. Приготовленную питательную среду автоклавировали при температуре 115 °C в течение 25 минут.

Для получения каллусных культур моркови семена изучаемых сортов поверхностью стерилизовали в течение 10 минут раствором гипохлорита натрия в концентрации 15 % с последующей трехкратной промывкой в автоклавированной дистиллированной воде и помещали на поверхность агаризованной питательной среды Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962), дополненной кинетином – 0,5 мг/л, 6-бензиламинопурином (6-БАП) – 0,5 мг/л и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) – 2,0 мг/л. Культивирование эксплантов проводили в инкубаторе лабораторном Climacell™ при 16-ти часовом фотопериоде,

температуре световой фазы 26 °С, темновой – 22 °С, освещенности 2-3 клк, влажности 60 %. Один цикл культивирования составлял 75 суток.

Селективный отбор устойчивых клеточных линий проводили путем увеличения содержания NaCl в исходной питательной среде от 50 мМ до 150 мМ в цикле пассивирования. Для получения растений-регенерантов каллусные культуры переносили на питательную среду Мурасиге и Скуга, дополненную 3-индолилуксусной кислотой (ИУК) и 6-БАП в количестве 0,1 мг/л и 1,0 мг/л, не содержащую NaCl.

Для определения ростового индекса в условиях ламинарного бокса каллусные культуры извлекали из химических пробирок, разделяли на фрагменты, помещали каждый фрагмент на поверхность стерильного предметного стекла, взвешивали, используя весы AnD BM-252 и переносили в культуральный сосуд с новой питательной средой. Повторно взвешивание каллусной ткани проводили по окончании цикла культивирования. Расчет ростового индекса проводили по формуле:

$$\left(\frac{M_k - M_n}{M_n} \right) * 100 \%$$

где: Mn – масса каллуса в начале культивирования; Mk – масса каллуса в конце культивирования.

Для цитологических исследований каллусных культур готовили временные давленые препараты участков каллуса размером не более 2,0 мм, которые помещали на предметные стекла и окрашивали в 0,1 % растворе метиленового синего в течение 5 минут. Для лучшего распластывания клеток проводили мацерацию каллуса в 0,1 N HCl при 70 °С в термостате в течение 15 минут. Препараты анализировали под микроскопом NEXCOPE NE910. Объем выборки составлял не менее 30 клеток каждого типа.

Статистический анализ полученных данных и построение диаграмм проводили с помощью пакета прикладных программ Microsoft Office® 2016 для Microsoft Windows®.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение энергии прорастания и всхожести семян моркови сортов Нантская 4, Московская зимняя и Ярославна под действием NaCl в концентрациях 50 мМ, 100 мМ, 150 мМ и 200 мМ показало, что первые признаки прорастания семян были отмечены на вторые сутки культивирования во всех вариантах опыта, за исключением концентрации NaCl 200 мМ (рис. 1).



Рис. 1. Энергия прорастания семян моркови на примере сорта Нантская 4 в зависимости от концентрации NaCl
a – контроль; b – 50 мМ; c – 100 мМ; d – 150 мМ; e – 200 мМ.

В контролльном варианте опыта наибольшая энергия прорастания наблюдалась у сорта Нантская 4 и составляла 66,4 % (рис. 2). С повышением концентрации NaCl у всех сортов было отмечено снижение энергии прорастания. При использовании NaCl в концентрации

50 мМ энергия прорастания семян сорта Нантская 4 составляла 52,1 %, у сорта Московская зимняя – 39,9 %, Ярославна – 34,2 %. Повышение концентрации NaCl до 100 мМ снижало энергию прорастания семян сорта Ярославна до 32,1 %, а у сортов Нантская 4 и Московская зимняя – до 29,8 % и 24,5 % соответственно. Наименьшие значения энергии прорастания семян у всех сортов были зафиксированы при использовании NaCl в концентрации 150 мМ. В этом варианте опыта у сорта Московская зимняя энергия прорастания составила 16,1 %, у сорта Нантская 4 – 14,3 % и у сорта Ярославна 8,1 %.

Результаты определения всхожести семян показали зависимость, аналогичную установленной ранее при определении энергии прорастания. С увеличением концентрации NaCl всхожесть семян всех сортов снижалась. Однако, у сорта Нантская 4 в варианте опыта с использованием концентрации NaCl 100 мМ всхожесть составила 78,5 %, что превышало в 2,2 и 1,6 раза всхожесть у сортов Московская зимняя и Ярославна соответственно (рис. 3).

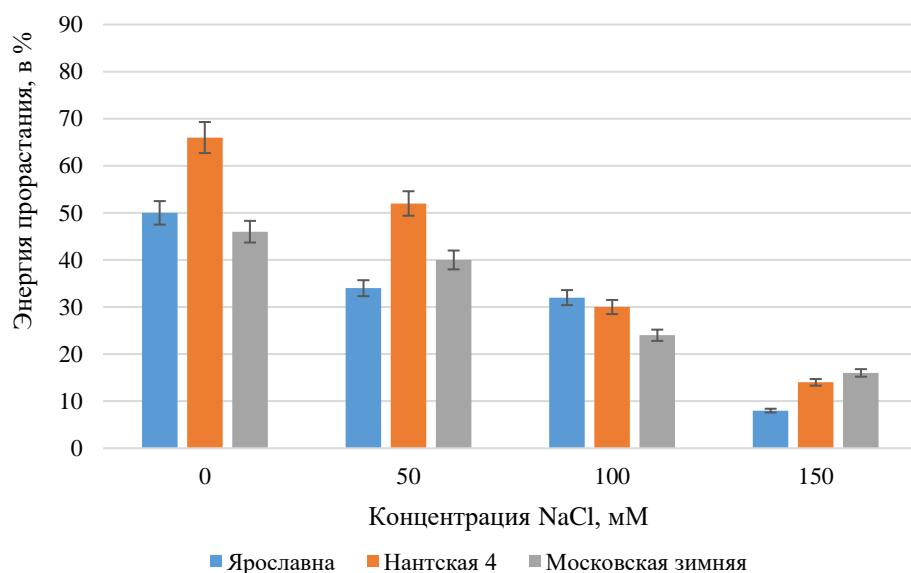


Рис. 2. Энергия прорастания семян моркови в зависимости от сорта и концентрации NaCl

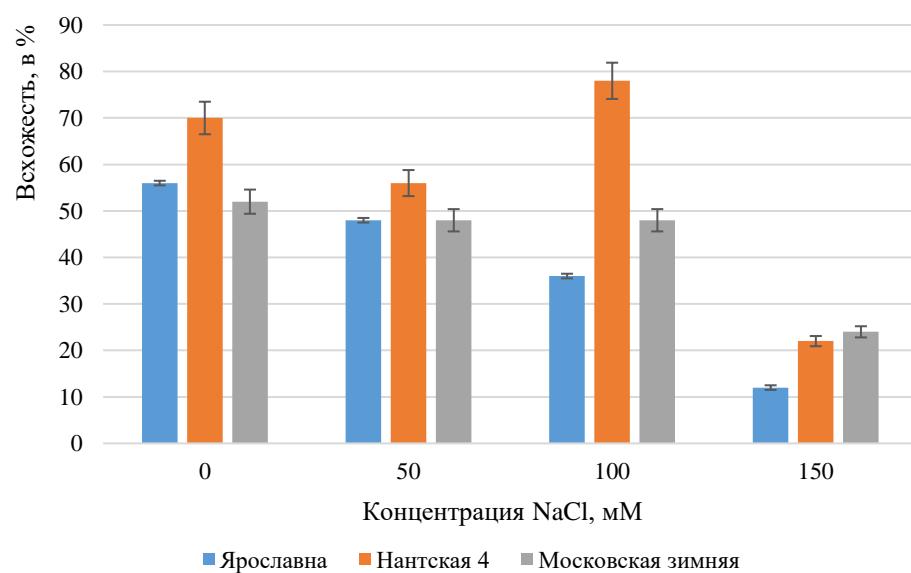


Рис. 3. Всхожесть семян моркови в зависимости от сорта и концентрации NaCl

Таким образом, определение энергии прорастания и всхожести семян сортов Нантская 4, Московская зимняя и Ярославна показало, что лучшие результаты во всех вариантах эксперимента были отмечены у сорта Нантская 4.

При проведении работ по клеточной селекции на устойчивость к осмотическому стрессу была применена схема ступенчатого увеличения содержания NaCl в составе питательных сред, используемых для получения и пассирования каллуса. Схема предполагала получение каллуса 0-пассажа на питательной среде без NaCl, что позволило снизить стрессовое воздействие на исходные экспланты в процессе адаптации к условиям *in vitro*. Субкультивирование каллусных культур проводили на питательные среды с исходным типом и концентрацией фитогормонов, при этом увеличивая содержание NaCl с каждым пассажем от 50 мМ до 150 мМ.

В качестве эксплантов для получения каллусных культур использовали семена изучаемых сортов моркови. При культивировании эксплантов на поверхности агаризованной питательной среды Мурасиге и Скуга, дополненной 0,5 мг/л кинетином, 0,5 мг/л 6-БАП и 2,0 мг/л 2,4-Д, на 10–15 сутки у всех сортов было отмечено прорастание семян, после чего наблюдалось формирование каллусной ткани. Начальные признаки каллусообразования были визуально отмечены с 36 суток по 45 сутки культивирования в зависимости от сорта. Через 75 суток культивирования первичный каллус полностью покрывал поверхность эксплантов. Сформировавшийся каллус 0-пассажа характеризовался высокой скоростью роста, рыхлой консистенцией, зеленовато-желтой окраской (рис. 4).

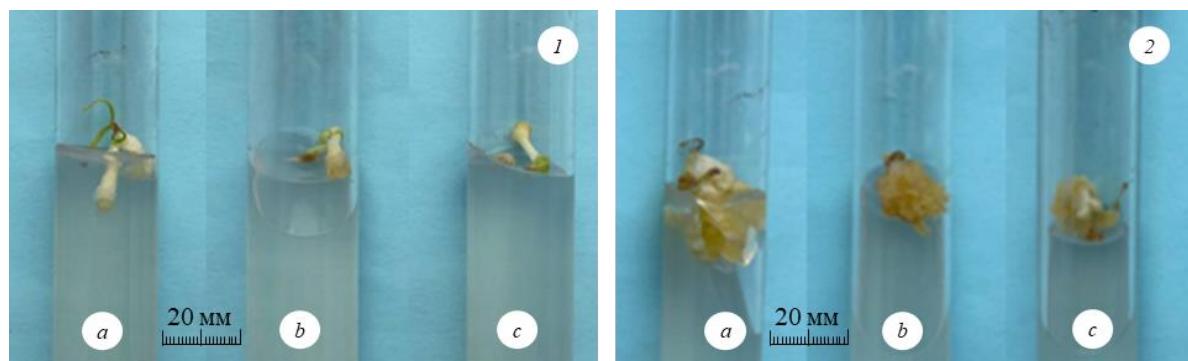


Рис. 4. Каллусные культуры моркови 0-пассажа на 30-е сутки (1)

и 75-е сутки (2) культивирования

a – сорт Нантская 4; *b* – сорт Московская зимняя; *c* – сорт Ярославна.

Через 75 суток культивирования каллусные культуры 0-пассажа пассировали на питательные среды с содержанием NaCl 50 мМ. В течение первых семи суток значительных изменений в размере каллуса не наблюдалось.

За последующие тридцать суток каллус увеличился в 2–3 раза в зависимости от сорта по сравнению с исходным размером (рис. 5). Ростовой индекс каллусных культур для всех сортов составил от 251,6 % до 298,8 %, при этом не была установлена зависимость значения ростового индекса от генотипа исходного сорта. Формирующийся каллус характеризовался светло-зеленой или желто-зеленой окраской и рыхлой консистенцией.

Спустя 75 суток культивирования каллусные культуры I-пассажа пассировали на питательную среду Мурасиге и Скуга, содержащую исходный состав фитогормонов и NaCl в количестве 100 мМ и 150 мМ (рис. 6).

Определение ростового индекса каллусных культур после 75 суток культивирования показало итоговые значения ниже, чем при использовании концентрации NaCl 50 мМ. Добавление в состав питательной среды NaCl в количестве 100 мМ снижало среднее значение ростового индекса для всех изучаемых сортов до 211,7 %, а при использовании NaCl в

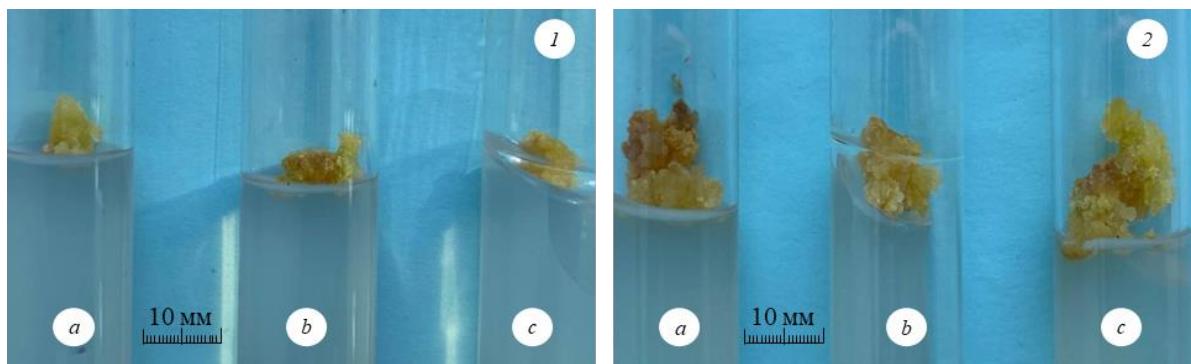


Рис. 5. Каллусные культуры моркови I-пассажа на 10-е сутки (1) и 40-е сутки (2) культивирования на питательной среде с содержанием NaCl 50 mM
a – сорт Московская зимняя; b – сорт Нантская 4; c – сорт Ярославна.

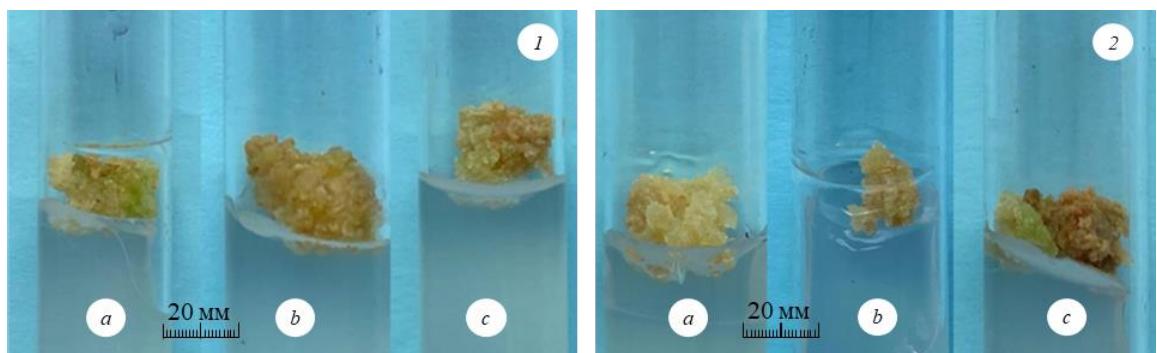


Рис. 6. Каллусные культуры моркови II-пассажа на питательной среде с содержанием NaCl 100 mM (1) и III-пассажа на питательной среде с содержанием NaCl 150 mM (2) на 30-е сутки культивирования
a – сорт Московская зимняя; b – сорт Нантская 4; c – сорт Ярославна.

количество 150 mM – 165,2 %. Наиболее высокие значения ростового индекса наблюдались у сорта Нантская 4 и составили 225,5 % и 175,3 % соответственно.

Цитологические исследования первичных и пассиуемых каллусных культур моркови проводили на примере сорта Нантская 4, отличающихся наиболее высокими значениями ростового индекса в условиях осмотического стресса. В каллусных культурах 0-пассажа отмечено наличие клеток паренхимного и меристематического типов (рис. 7 а, б).

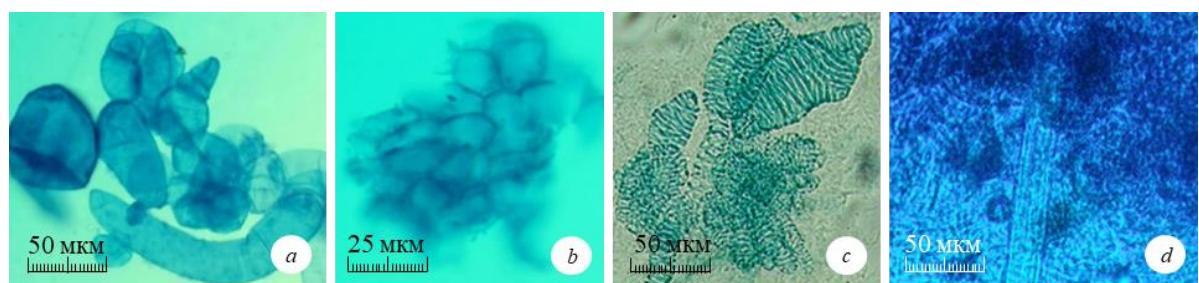


Рис. 7. Цитологические особенности каллусных культур моркови сорта Нантская 4
a – клетки паренхимного типа в каллусной культуре 0-пассажа; b – клетки меристематического типа в каллусной культуре 0-пассажа; c – скопление трахеид в каллусной культуре I-пассажа; d – органогенез *in vitro*.

Клетки паренхимного типа отличались небольшим ядром и крупными размерами. По форме клетки были округлыми или вытянутыми, когда длина в несколько раз превышала ширину. Размер клеток варьировал от 50 мкм до 200 мкм.

Клетки меристематического типа характеризовались небольшими размерами и преимущественно образовывали крупные скопления. Средний размер клеток составлял 30 мкм. По отношению к объему клетки ядро было более крупным, чем у клеток паренхимного типа.

Каллусные культуры I-пассажа, культивируемые на питательной среде с содержанием NaCl 50 мМ, отличались высокой плотностью, наличием клеток меристематического и паренхимного типов, а также больших скоплений адвентивных трахеид. С повышением содержания NaCl в составе питательных сред наблюдалось увеличение размеров и уменьшение количества клеток паренхимного типа на фоне крупных скоплений клеток меристематического типа.

Для индукции морфогенеза каллусные культуры моркови сорта Нантская 4 после культивирования в условиях осмотического стресса при содержании NaCl 100 мМ, пассировали на питательную среду Мурасиге и Скуга с добавлением ИУК и 6-БАП в количестве 0,1 мг/л и 1,0 мг/л (рис. 7 в).

Через тридцать суток мы наблюдали появление первых признаков органогенеза, связанных с закладкой листьев и последующим развитием корневой системы (рис. 8 а, б).

Для адаптации полученных растений-регенерантов к условиям *in vivo* микрорастения извлекали из культуральных сосудов, корневую систему отмывали от остатков агаризованной питательной среды и помещали в чашки Петри с увлажненным вермикулитом (рис. 8 в). Чашки Петри культивировали при температуре 24 °С, освещенности 2–3 клк и 16-ти часовом фотопериоде.



Рис. 8. Морфогенез в культуре каллусных тканей сорта Нантская 4 и адаптация растений-регенерантов
а – 30 суток культивирования; б – 60 суток культивирования; в – растения-регенеранты в чашке Петри.

Таким образом, получение устойчивых к солевому стрессу каллусных культур растений методом прямой клеточной селекции позволяет перевести на новый уровень работу по созданию сортов сельскохозяйственных культур, устойчивых к неблагоприятным факторам среды. Использование в работе метода ступенчатого увеличения содержания NaCl в составе питательной среды дало возможность получить в первом и втором пассажах каллусные культуры, отличающиеся высоким ростовым индексом, несмотря значительную концентрацию хлорида натрия. Данный подход способен значительно повысить эффективность сельскохозяйственного производства и обеспечить устойчивое развитие аграрного сектора Республики Крым.

ВЫВОДЫ

1. Семена моркови сорта Нантская 4 в присутствии 100 мМ NaCl превосходили по всхожести в 2,2 и 1,6 раза сорта Московская зимняя и Ярославна.
2. Ступенчатое увеличение содержания NaCl *in vitro* показало возможность получения каллусных культур сорта Нантская 4 с высоким ростовым индексом в цикле пассирования.
3. После снятия осмотического стресса каллусные культуры моркови сорта Нантская 4 пассировали на питательную среду Мурасиге и Скуга с добавлением ИУК – 0,1 мг/л и 6-БАП – 1,0 мг/л для индукции органогенеза и получения растений-регенерантов, устойчивых к солевому стрессу.

Список литературы

- Балнокин Ю. В., Попова Л. П., Куркова Е. Б. Механизмы ионного гомеостатирования в адаптации растений к высокой солёности среды – Генетические механизмы устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды // Тезисы сообщений (Иркутск, 8–12 июня 1991 г.). – Нововороссийск, 1991. – С. 84.
- Балнокин Ю. В., Строгонов Б. П. Солевой обмен и проблема солеустойчивости растений // Новые направления в физиологии растений. – М.: Наука, 1985. – С. 199–213.
- Веселов Д. С., Маркова И. В., Кудоярова Г. Р. Реакция растений на засоление и формирование солеустойчивости // Успехи современной биологии. – 2007. – Т. 127, № 5. – С. 482–493.
- Драган Н. А. Почвенные ресурсы Крыма. – М.: Доля, 2004. – С. 105–108.
- Егорова Н. А. Исследование устойчивости к солевому стрессу каллусных культур эфиromасличной герани // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т. 41, № 6. – С. 523–530.
- Егорова Н. А., Ставцева И. В. Биотехнологические приемы получения форм шалфея, устойчивых к осмотическому стрессу *in vitro* // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2013. – Вып. 8. – С. 93–100.
- Иванищев В. В. Новые направления исследований в повышении солеустойчивости растений // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2021. – № 2. – С. 47–55. DOI: 10.24412/2071-6176-2021-2-47-55
- Иванищев В. В. О механизмах солеустойчивости растений и специфике влияния засоления // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2019. – № 4. – С. 76–88.
- Иванищев В. В., Евграшкина Т. Н., Бойкова О. И., Жуков Н. Н. Засоление почвы и его влияние на растения // Известия Тульского государственного университета. Науки о Земле. – 2020. – № 3. – С. 28–42.
- Кабузенко С. Н., Омельченко А. В., Михальская Л. Н., Швартау В. В. Накопление и локализация ионов натрия и калия в растениях кукурузы в условиях почвенного засоления // Вестник Днепропетровского университета. Биология, экология. – 2013. – № 21 (1). – С. 28–32.
- Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
- Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. Изменчивость и отбор в процессе адаптации к условиям выращивания *in vitro* // Биополимеры и клетка (Biopolymers and Cell). – 2000. – Т. 16, № 3. – С. 159–185.
- Омельченко А. В., Кабузенко С. Н., Белоусов А. А., Сериков В. А. Локализация натрия в компартментах тканей корней и надземной части гибридов кукурузы нового поколения в связи с их солеустойчивостью // Ученые записки Таврического национального университета имени В. И. Вернадского. Серия: Биология, химия. – 2009. – Т. 22 (61), № 4. – С. 112–121.
- Munns R., Tester M. Mechanisms of Salinity Tolerance // Annu. Rev. Plant Biol. – 2008. – Vol. 59. – P. 651–681.
- Murashige T., Skoog F. A. The revised medium for rapid growth, and bioassays with tobacco tissue culture // Physiologia Plantarum. – 1962. – Vol. 15, N 13. – P. 473–497.
- Tester M., Davenport R. Na⁺ Tolerance and Na⁺ transport in higher plants // Annals of Botany. – 2003. – Vol. 91. – P. 503–527.

Boyko A.A., Bugara I.A., Omelchenko A.V., Purtov D. S., Grachev A.A. Cellular breeding of carrot callus cultures for resistance to salt stress // Ekosistemy. 2025. Iss. 42. P. 103–111.

The article presents the results of studies on cell selection of callus cultures of carrot varieties Nantskaya 4, Moskovskaya Zimnyaya and Yaroslavna for resistance to salt stress during cultivation on nutrient media containing 50 mM, 100 mM and 150 mM NaCl. The inhibitory effect of NaCl at concentrations of 50 mM, 100 mM and 150 mM on the germination energy and viability of carrot seeds was established. To induce callus formation and passaging of callus, the Murashige and Skoog nutrient medium supplemented with kinetin – 0,5 mg/l, 6-BAP – 0,5 mg/l and 2,4-D – 2,0 mg/l was used. Explants and callus cultures were cultivated in a Climacell™ laboratory incubator at a 16-hour photoperiod, a light phase temperature of 26 °C, a dark phase of 22 °C, illumination of 2-3 klx, and humidity of 60%. One cultivation cycle lasted 75 days. Selective selection of resistant cell lines was carried out by increasing the NaCl content in the initial nutrient medium from 50 mM to 150 mM in the passaging cycle with subsequent determination of the growth index. After removing salt stress, the callus cultures were transferred to Murashige and Skoog nutrient medium containing IAA and 6-BAP in an amount of 0,1 mg/l and 1,0 mg/l to obtain regenerated plants. After thirty days, the first signs of organogenesis associated with the formation of leaves and subsequent development of the root system were observed. To adapt the regenerated plants to in vivo conditions, the microplants were removed from the culture vessels, the root system was washed from the remains of the agar nutrient medium and placed in Petri dishes with autoclaved moistened vermiculite.

Key words: carrots, cell selection, callus culture, salt stress, NaCl content, regenerating plants.

Поступила в редакцию 15.05.25

Принята к печати 16.06.25