

Растениеводство

УДК 633.12:631.527:581.143.6

DOI: <https://doi.org/10.31857/S2500-2627201953-6>**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА КУЛЬТУРЫ ТКАНИ
ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ФОРМ *Fagopyrum esculentum* MOENCH*****Е.Н. Барсукова¹**, кандидат сельскохозяйственных наук,
А.Г. Клыков¹, член-корреспондент РАН, **Е.Л. Чайкина²**¹Федеральный научный центр агробιοтехнологий Дальнего Востока имени А.К. Чайки,
692539, Приморский край, Уссурийск, пос. Тимирязевский, ул. Воложенина, 30²Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, пр. 100-летия Владивостока, 159/2

E-mail: alex.klykov@mail.ru

Приведены результаты использования метода культуры ткани на гречихе посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench) с применением в качестве селективных факторов повышенных концентраций ионов тяжелых металлов в питательной среде. На основе сортов Изумруд (Россия), Китаваэ (Япония), гибрида Изумруд x Китаваэ получены регенерантные линии, толерантные к меди и цинку. Отрицательный эффект действия ионов меди отмечен со второго поколения в потомстве растений, регенерированных из каллуса, в виде появления бесхлорофильных мутантов. Установлено положительное действие тяжелых металлов на увеличение содержания рутина у растений-регенерантов *in vitro*. Проведенная в полевых условиях селекционная оценка образцов, толерантных к тяжелым металлам, позволила отобрать наиболее адаптированные из них к муссонным условиям Приморского края, сочетающие ценные признаки крупнозерности (масса 1000 зерен – 36-38 г), высокой семенной продуктивности растения (1,9-3,2 г) и повышенного содержания рутина в надземной массе (2,8-4,3%).

**USAGE OF THE TISSUE CULTURE METHOD FOR THE DEVELOPMENT
OF NEW FORMS OF *Fagopyrum esculentum* MOENCH****Barsukova E.N.¹, Klykov A.G.¹, Chaikina E.L.²**¹Federal scientific center of agribiotechnology in the Far East. A.K. Chaika,
692539, Primorskij kraj, Ussurijsk, pos. Timiryazevskij, ul. Volozhenina, 30²Pacific institute of Bioorganic Chemistry. G.B. Elyakov FEB RAS,
690022, Vladivostok, pr. 100-letiya Vladivostoka, 159/2

E-mail: alex.klykov@mail.ru

The article presents results of usage of the tissue culture method on buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) together with the selective factor – increased concentrations of heavy metal ions in the nutrient medium. On the basis of Izumrud (Russia), Kitavase (Japan), hybrid Izumrud x Kitavase there were developed regenerant lines tolerant to copper and zinc. Negative action effect of copper ions was observed from the second generation in the second posterity of the plants-regenerants, developed from the callus, in the form of the chlorophyll-free mutants. Positive effect of the heavy metals was observed on increasing of rutin content of the plants-regenerants *in vitro*. Selective evaluation in the field conditions of the samples tolerant to heavy metal let to choose from them the most adaptive to monsoon conditions in Primorskykrai, which combine valuable traits of big grain (weight of 1000 grains – 36-38 g), high seed productivity (1,9-3,2 g) and high rutin content in aboveground mass of plants (2,8-4,3 %).

Ключевые слова: гречиха, *Fagopyrum esculentum* Moench, культура ткани, селективный фактор, ионы меди и цинка, регенерант, толерантность, селекция, рутин, крупнозерность, продуктивность, адаптивность

Key words: buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench, tissue culture, selective factor, ions of copper and zinc, regenerant, tolerance, selection, rutin, big-grained, productivity, adaptability

Развитие и применение в сельском хозяйстве современных технологий, в том числе и биотехнологии, для создания продовольственной базы страны является одним из государственных приоритетов [1]. Широкое внедрение в селекционный процесс методов биотехнологии дает практические результаты. В Государственном реестре селекционных достижений Российской Федерации за 2018 г. находятся сорта сельскохозяйственных культур, выведенные с использованием метода культуры клеток и тканей: ярового ячменя – сорта Вулкан, Прерия, Эльф, Рахат, Суздалец, БИОС 1; гречихи – Темп; риса – Крепыш; сои – Приморская 81, стевии – Приморская сладена [2]. В 2017 г. в Государственное сортоиспытание передан новый сорт гречихи Уссуруч-

ка с повышенным содержанием флавоноидов (рутин), полученный с использованием методов биотехнологии в Федеральном научном центре – ФНЦ агробιοтехнологий Дальнего Востока имени А.К. Чайки.

Создание сортов гречихи с повышенным содержанием рутина, устойчивых к стрессовым ситуациям, обусловленным абиотическими и биотическими факторами, актуально в настоящее время [3]. Стрессовое состояние у растений может быть индуцировано ионами тяжелых металлов. Присутствие их высоких концентраций приводит к увеличению хромосомных aberrаций и появлению мутаций [4-8]. Клеточная селекция с использованием летальных доз ионов этих токсикантов может быть перспективным методом получения расти-

* Работа выполнена в рамках комплексной программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» на 2018-2020 гг. проект № 18-5-025.

тельных форм с улучшенными характеристиками [9].

Цель настоящей работы состояла в изучении и оценке в лабораторных и полевых условиях регенерантных линий гречихи, полученных методом культуры ткани на селективных средах с повышенным содержанием меди и цинка.

Методика. Исследования по получению толерантных к ионам тяжелых металлов растений гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench) проведены на базе лаборатории сельскохозяйственной биотехнологии ФНЦ агробиотехнологий Дальнего Востока имени А.К. Чайки. Толерантные к ионам тяжелых металлов образцы гречихи созданы на основе сортов Китаваэ (Япония), Изумруд (Россия) и гибрида Изумруд х Китаваэ. Применяли метод клеточно-тканевой селекции – культивировали микропобеги и каллус на селективных средах с высокими дозами тяжелых металлов [10,11]. Семенное потомство регенерантов после размножения изучали в полевых условиях селекционного питомника (СП). Содержание рутина в растительных пробах определяли по М.Н. Запрометову [12] в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Адаптивные свойства образцов гречихи оценивали по стрессоустойчивости и генетической гибкости [13], расчет показателей экологической пластичности проводили по методике В.З. Пакудина [14].

Результаты и обсуждение. Культура *in vitro* служит удобной моделью для исследования влияния ионов тяжелых металлов на клетки и органы растений. Применение селективных сред с высоким содержанием ионов меди и цинка для получения толерантных к этим токсикантам форм гречихи начато нами с 2006 г. Эксперименты показали, что зрелые семена, клеточные культуры (каллус), микропобеги гречихи посевной характеризуются различной, но достаточно высокой степенью устойчивости к действию повышенных концентраций сульфатов меди и цинка. Изученные генотипы гречихи проявили избирательную степень устойчиво-

сти к этим металлам. Цинк оказывает более негативное действие на жизнеспособность всех изученных объектов, чем медь. Сернистая медь в количестве 9,2-23,0 мг/л стимулирует регенерационные процессы гречихи *in vitro* [15]. Отрицательный мутагенный эффект выявлен при воздействии на клетки каллуса гречихи сернистой меди в количестве 24-60 мг/л в виде появления в потомстве летальной бесхлорофилльной мутации с частотой 1,5-9,6 %.

Культивирование растений-регенерантов гречихи сорта Изумруд в стрессовых условиях при повышенном содержании сульфата меди (161, 184 мг/л) и сульфата цинка (606 мг/л) в питательной среде *in vitro* увеличило (до 10% в сравнении с исходным сортом) в растительных тканях содержание ценного биологически активного вещества из группы флавоноидов – рутина. Вероятно, такая реакция стала откликом растений на действие ионного стресса. Это предположение согласуется с мнением других исследователей о том, что усиление синтеза фенолов в растениях служит неспецифической реакцией на стресс и играет важную роль в защите, адаптации клеток и их способности выживать в стрессовых условиях [16-18].

Испытание толерантных к тяжелым металлам образцов в полевых условиях селекционного питомника показало наличие у них положительных изменений отдельных признаков по сравнению с исходными сортами. Так, продуктивность семян оказалась выше на 3,2 и 1,9 г у форм, полученных при обработке семян сорта Изумруд повышенными концентрациями сульфата цинка, а также на 2,09 г у микропобегов сорта Китаваэ после культивирования *in vitro* на среде с 606 мг/л сульфата цинка (табл.1). Данные формы также характеризовались высокой крупностью зерна (масса 1000 зерен составляла 36-38 г). Показатели содержания рутина в надземной массе растений, взятых для анализа в фазе цветения, у пяти образцов превысили значения исходных сортов. Максимальное количество рутина (4,3%)

Табл. 1. Селекционная характеристика образцов гречихи, толерантных к повышенным концентрациям сульфата меди и цинка

Сорт (образец)	Содержание соли тяжелого металла, мг/л	Продуктивность семян с растения, г	Масса 1000 зерен, г	Содержание рутина, % в надземной массе в фазе цветения
Изумруд (исходный сорт)	0	1,12±0,30	34,0	2,6 ± 0,1
Изумруд (СЦ)	404,0	3,20±0,24*	36,2	3,5 ± 0,1*
Изумруд (СЦ)	606,0	1,92±0,28*	38,0	2,4 ± 0,2
Изумруд х Китаваэ (ММ)	161,0	1,20±0,48	30,4	3,6 ± 0,3*
Китаваэ (исходный сорт)	0	1,60 ± 0,21	32,0	2,0 ± 0,2
Китаваэ (МЦ)	101,0	1,13±0,26	25,0	2,8 ± 0,2*
Китаваэ (МЦ)	606,0	2,09±0,33*	36,0	2,5 ± 0,2
Китаваэ (ММ+К)	46,0	0,85±0,12	29,6	4,3 ± 0,1**
Китаваэ R30 (КМ)	60,0	0,91±0,12	32,0	2,8 ± 0,1*
Китаваэ R62 (КМ)	60,0	1,81±0,40	31,0	2,0± 0,2
$\bar{x} \pm S_x$		1,58±0,22	32,4± 1,2	2,85± 0,23
V, %		45,7	11,7	25,9

Примечание. СЦ – семена проращивали в растворе сульфата цинка, МЦ – микропобег на среде с сульфатом цинка, КМ – регенерант получен из каллуса на среде с сульфатом меди, ММ+К – микропобег на среде с сульфатом меди + колхицин *in vitro*. Различия достоверны при *P<0,05, ** P<0,01 по сравнению с исходным сортом.

Табл. 2. Параметры адаптивных свойств семенной продуктивности у толерантных к тяжелым металлам форм гречихи

Происхождение образца	Содержание соли тяжелого металла, мг/л	Продуктивность семян растения, г			Стрессоустойчивость $Y_1 - Y_2$	Генетическая гибкость $(Y_2 + Y_1)/2$	Коэффициент регрессии b_i	Варианса стабильности S^2d
		\bar{x}	$Y_{(min)}$	$Y_{(max)}$				
Изумруд (исходный сорт)	0	1,6	0,4	3,9	-3,5	2,15	0,79	0,05
Китаваэс (исходный сорт)	0	1,7	0,4	2,8	-2,4	1,60	0,39	0,57
Китаваэс (ММ)	11,5	1,7	0,4	3,9	-3,5	2,15	1,07**	0,22**
Китаваэс (ММ)	23,0	1,1	0,4	1,6	-1,2	1,0	0,1	0,22
Китаваэс (ММ)	46,0	2,0	0,6	6,3	-5,7	3,45	1,28	1,02
Китаваэс R29 (КМ)	60,0	2,4	0,2	5,7	-5,5	2,95	1,09**	0,14**
Китаваэс R30 (КМ)	60,0	2,3	0,4	5,7	-5,3	3,05	1,11**	0,02**
Китаваэс R62 (КМ)	60,0	1,8	0,2	4,3	-4,1	2,25	0,8	0,56
Китаваэс (МЦ)	101,0	2,5	0,4	4,4	-4,0	2,40	1,29	0,31
Китаваэс (МЦ)	202,0	2,2	0,5	5,3	-4,8	2,90	1,02**	0,05**
Китаваэс (МЦ)	606,0	1,9	0,8	4,3	-3,5	2,55	0,85	0,19
Китаваэс (МЦ)	1010,0	1,9	0,3	4,4	-4,1	2,35	1,02	2,3
Изумруд х Китаваэс (ММ)	11,5	2,4	0,3	6,0	-5,7	3,15	1,26*	0,01*
Изумруд х Китаваэс (ММ)	23,0	1,5	0,2	3,4	-3,2	1,8	0,68	0,03
Изумруд х Китаваэс (ММ)	161,0	2,6	0,2	6,7	-6,5	3,5	1,43*	0,01*
Изумруд х Китаваэс (ММ)	184,0	2,9	0,3	7,3	-7,0	3,8	1,52*	0*

Примечание. ММ – микропобег на среде с сульфатом меди, МЦ – микропобег на среде с сульфатом цинка, КМ – регенерант, полученный из каллуса на среде с сульфатом меди. * Высокопластичные и стабильные, ** Пластичные и стабильные.

обнаружено в растениях сорта Китаваэс, полученных в результате клеточной селекции на среде с 46 мг/л сульфата меди и обработкой колхицином *in vitro*.

Уровень устойчивости к стрессам – генетически контролируемый и наследуемый признак и в то же время – потенциальный. В оптимальных условиях он скрыт и проявляется лишь тогда, когда растения оказываются под действием экстремального фактора [19]. Проблема устойчивости сортов к экологическим факторам среды, лимитирующим формирование потенциально возможной продуктивности, актуальна для Приморского края как региона с муссонным климатом. Стрессовое влияние ежегодно наблюдающихся в Приморском крае тайфунов и циклонов отрицательно сказывается на продуктивности гречихи. Уровень устойчивости к стрессу растений определяли по разности между минимальной и максимальной урожайностью ($Y_2 - Y_1$). Этот параметр имеет отрицательный знак, и чем его величина меньше, тем выше стрессоустойчивость образца. Самую высокую устойчивость к стрессу проявили две формы – Китаваэс (ММ) и Изумруд х Китаваэс (ММ), полученные в условиях *in vitro* на среде с

23 мг/л сульфата меди (табл. 2). Средняя урожайность сортов в контрастных (стрессовых и нестрессовых) условиях $(Y_1 + Y_2)/2$ характеризует их генетическую гибкость [13]. Высокие значения этого показателя указывают на большую степень соответствия между генотипом сорта и факторами среды. Максимальные соотношения между ними отмечены у растений-регенерантов гибрида Изумруд х Китаваэс, толерантных к высокому содержанию сернокислой меди (161 и 184 мг/л). Генетической гибкостью также выделялись регенеранты сорта Китаваэс, толерантные к сульфату меди (46 мг/л).

Экологическую пластичность образцов определяли, оценивая показатели коэффициента регрессии (b_i) и варианты стабильности (S^2d) по результатам выращивания в селекционном питомнике в течение трех лет. Полученные толерантные к тяжелым металлам формы различались по адаптивности как от исходных сортов, так и между собой. Расчет параметров экологической пластичности позволил выделить из них наиболее ценные для селекции – формы со значениями коэффициента регрессии (b_i) больше единицы и вариансой ста-

бильности (S^2d), близкой к нулю. К высокопластичным и стабильным образцам относятся три регенерантные линии, полученные на основе гибрида Изумруд х Китава-сэ, толерантные к соли меди (11,5; 161; 184 мг/л). Они наиболее перспективны для селекции сортов интенсивного типа и отзывчивы на высокий уровень агротехники. Четыре образца (исходный сорт Китава-сэ), толерантные к сульфату меди (11,5; 60 мг/л) и сульфату цинка (202 мг/л), у которых значение показателя b_1 близко к единице, S^2d близко к нулю, отнесены к пластичным и стабильным. Они способны хорошо адаптироваться к изменяющимся условиям выращивания.

Таким образом, применение метода культуры ткани в сочетании с селективным фактором – повышенными концентрациями ионов меди и цинка в среде позволяет улучшать селекционно-ценные показатели исходных сортов. В результате лабораторной и полевой оценки толерантных к ионам тяжелых металлов форм гречи-хи отобраны образцы, представляющие интерес для дальнейшей селекции: по продуктивности и крупно-зерности – Изумруд (СЦ 404, 606 мг/л), Китава-сэ (МЦ 606 мг/л), высокому содержанию рутина в надземной массе – Китава-сэ (ММ 46 мг/л+К), Изумруд х Китава-сэ (ММ 161 мг/л), адаптивности к климатическим особенностям Приморского края – Изумруд х Китава-сэ (М 11,5; 161; 184 мг/л), Китава-сэ (ММ 11,5; 60 мг/л), (МЦ 202 мг/л).

Литература.

1. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года : утв. Правительством РФ от 24.04.2012 № 1853н-П8 [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.consultant.ru> (дата обращения 17.04.2019).
2. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т.1. Сорта растений. – М., 2018. – 508с.
3. Клыков А.Г., Парская Н.С., Чайкина Е.Л., Анисимов М.М. Продуктивность и качество сортов *Fagopyrum esculentum* Moench в условиях Приморского края // Российская сельскохозяйственная наука. – 2018. – № 3. – С. 3-6.
4. Maksymiec W. Effect of copper on cellular processes in higher plants // *Photosynthetica*. – 1997. – V. 34. – P. 132 - 342.
5. Gebhart E. Chromosome damage in individuals exposed to heavy metals // *Toxicological & Environmental Chemistry*. – 1984. – V. 8. – P. 253-266.
6. Цмокалюк Н.М. Оценка влияния загрязнения почвы тяжелыми металлами на развитие и продуктивность сои в условиях Уссурийского района Приморского края : автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Владивосток, 2004. – 19с.
7. Бессонова В.П. Состояние пыльцы как показатель загрязнения среды тяжелыми металлами // *Экология*. – 1992. – № 4. – С.45-50.
8. Барсукова В.С. Физиолого-генетические аспекты устойчивости растений к тяжелым металлам : аналит. обзор. – Новосибирск, 1997. – 63 с.
9. Сергеева Л.Е., Бронникова Л.И. Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов: новые аспекты комплексной устойчивости // X Международная конференция «Биология клеток растений in vitro и биотехнология» : сб. тез., Казань, 14-18 Октября 2013 г. – Казань, 2013. – С. 82-83.
10. Барсукова Е.Н. Клеточная селекция гречихи посевной в условиях ионного стресса // *Аграрная Россия*. – 2013. – № 10. – С. 2-4.
11. Klykov A.G., Moiseenko L.M., Barsukova E.N. Biological Resources and Selection Value of Species of *Fagopyrum* Mill. // *Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat*. – Elsevier, Academic Press, 2016. – P. 51-60.
12. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. – М.: Наука. – 272с.
13. Гончаренко А.А. Об адаптивности и экологической устойчивости сортов зерновых культур // *Вестник Россельхозакадемии*. – 2005. – № 6. – С. 49-53.
14. Пакудин В.З. Параметры оценки экологической пластичности сортов и гибридов // *Теория отбора в популяциях растений*. – Новосибирск, 1976. – С. 178-189.
15. Пат. 2538167 RU, МПК А01 4/00. Способ размножения гречихи in vitro / Е.Н. Барсукова; патенто-обладатель ГНУ Приморский НИИСХ Россельхозакадемии. – № 2013135431; заявл. 26.07.2013; опубл. 10.01.2015, Бюл. № 1.
16. Калашиникова Е.А. Биологические основы клеточной селекции растений // *Доклады ТСХА*. – 2003. – Вып. 275. – С. 110-112.
17. Pasqualini V., Robles C., Garzino S., Bousquet-Melou A., Bonin G. Phenolic compounds content in *Pinushalepensis* Mill. Needles: a bioindicator of air pollution // *Chemosphere*. – 2003. – Vol. 52. – P. 239-248.
18. Костюк В. А., Потапович А. И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. – Минск: Изд-во БГУ, 2004. – 179 с.
19. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям : метод. руководство / сост. С.Н. Дроздов, Г.В.Еремин, Э.Л. Климашевский и др. – Л.: ВИР, 1988. – 228с.

Поступила в редакцию 27.05.19
Принята к публикации 07.06.19