

УДК 633.63.581

## ВИКОРИСТАННЯ КЛІТИННОЇ СЕЛЕКЦІЇ ДЛЯ СТВОРЕННЯ СТІЙКИХ ФОРМ БУРЯКІВ

Т.В. ЧУГУНКОВА

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17*

Наведено результати досліджень з клітинної селекції цукрових і кормових буряків на стійкість до стресів. Методами прямої і ступінчастої селекції *in vitro* отримано калюсні лінії й рослини-регенеранти, стійкі до хлоридного й сульфатного засолення. Перевірено клітинні лінії та рослини-регенеранти на стабільність стійкості до комплексу стресових чинників.

*Ключові слова:* *Beta vulgaris* L. калюсні лінії, рослини-регенеранти, стресові чинники, клітинна селекція.

З використанням різноманітних біотехнологічних прийомів, зокрема таких, як клітинна селекція, можна створювати генетично різноманітні форми на рівні соматичних клітин. В умовах *in vitro* на селективних середовищах добирають мутантні клітини й індукують із них рослини-регенеранти, стійкі до селективного чинника. Після скринінгу генотипів їх можна залучати у селекційний процес як джерела стійкості до біотичних та абіотичних стресів [4]. Із практичного погляду найефективнішим є використання методу клітинної селекції у тих культур, для яких розроблено прийоми масової регенерації рослин із клітин калюсів, суспензій чи протопластів [7, 9].

Дослідження природи адаптивних реакцій рослин щодо дії різних стресів свідчить про існування як специфічних, так і загальних механізмів стійкості. Звідси випливає, що стійкість до одного несприятливого чинника може зумовлювати підвищення стійкості до інших [1, 2]. Так, доведено, що резистентні рослини, а також клітинні лінії в умовах *in vitro* можуть виявляти стійкість до кількох стресових чинників [12].

Метою роботи було отримання клітинних ліній і рослин-регенерантів цукрових і кормових буряків, стійких як до окремих, так і до комплексу стресових чинників.

### Методика

Для створення стійких до засолення клітинних ліній цукрових і кормових буряків як селективні агенти використовували хлорид натрію, сульфат натрію, які додавали до поживного середовища Мурасіге і Скуга у різних концентраціях [10]. В якості матеріалу досліджень було обрано калюсні лінії цукрових і кормових буряків із високою регенераційною здатністю.

## Результати та обговорення

**Отримання клітинних ліній, стійких до сольового стресу.** Зрошення земель та інші чинники призводять до вторинного засолення ґрунтів. Основними іонами при цьому є катіони натрію, аніони хлору, сульфату. За ступенем стійкості до засолення ґрунтів буряки належать до факультативних галофітів. Ця ознака у рослин генетично детермінована і передається під час статевого розмноження. Виявлено, що механізми стійкості культивованих *in vitro* клітин, отриманих із них рослин-регенерантів та інтактних рослин подібні [11]. Це свідчить про можливість добору солестійких рослин в умовах культури тканин на штучних поживних середовищах.

Дослідженням реакції калюсних тканин на введення різних концентрацій солей у поживні середовища виявлено, що за низьких доз спостерігається пасивне виведення іонів та їх розбавлення, яке супроводжується оводненням і збільшенням маси сирої речовини калюсів. Концентрування солі до 2—2,5 % призводить до змін у білковому обміні, появи стресових білків та амінокислоти проліну [3]. За стресових умов у цукрових буряків з'являється бетаїн, який є гідрофільним агентом, що підтримує колоїдні властивості цитоплазми.

Визначенням чутливості ліній кормових буряків до хлоридного засолення доведено, що наявність у селективному середовищі 2 % NaCl сильно пригнічувала проліферацію клітин. До кінця третього пасажу виживало до 6—13 % калюсів (табл. 1). За тієї ж концентрації  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  здатними до виживання виявились близько 13 % калюсів лінії № 25/2.

Для цукрових буряків сублетальними дозами були 2,5 % NaCl і 3,0 %  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , летальним для калюсних культур цукрових і кормових буряків — вміст у середовищі 3 % хлориду натрію і 3,5 % сульфату натрію.

Для відбирання резистентних клітинних ліній використовували метод ступінчастої селекції за схемами: 1,5 % NaCl (3 пасажі) — 2,0 % NaCl (3 пасажі) — 2,5 % NaCl (3 пасажі) — основне середовище МС (3 пасажі); 2,0 %  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (3 пасажі) — 2,5 %  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (3 пасажі) — 3,0 %  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (3 пасажі) — основне середовище МС (3 пасажі). Так було проведено кілька циклів добору й отримано 2 калюсні лінії цукрових буряків, резистентних до хлоридного засолення, і 3 — до сульфатного.

Клітинною селекцією кормових буряків отримано по 3 лінії, які зберігали здатність рости на селективних середовищах з високою концентрацією солей. Стійкі калюсні лінії характеризувались повільним ростом (тривалість пасажу 6 тижнів), дрібнозернистою пухкою структурою, бурим або світло-жовтим забарвленням калюсу. Із резистентних калюсних ліній були індуковані рослини-регенеранти.

Для отримання форм буряків, стійких до засолення, використовували також метод прямої регенерації пагонів з експлантатів листка з черешком. Матеріалом дослідження були сорти, самозапильні лінії та гібриди цукрових буряків. NaCl додавали в основне середовище в концентрації 1,5—4,0 %,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  — 2,5—4,0 %.

Регенерацію мікропагонів ініціювали на основному середовищі МС, збагаченому амінокислотами й вітамінами. Для визначення чутливості до хлоридного і сульфатного засолення, а також встановлення концентрації селективних агентів, які чинять летальну дію, висаджували по 10 мікропагонів кожного генотипу на селективне середовище з певною кон-

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ

ТАБЛИЦЯ 1. Вживання ліній кормових буряків на селективних середовищах

Калюсна лінія	Концентрація солі в середовищі, %	Кількість калюсів, що вижили, %
	NaCl	
25 (вихідна)	1,5	10
	2,0	6,7
	2,5	0
25/1	1,5	13,3
	2,0	6,7
	2,5	3,3
	3,0	0
25/2	1,5	16,7
	2,0	13,3
	2,5	3,3
	3,0	0
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
25 (вихідна)	2,0	5,6
	2,5	4,5
	3,0	0
25/1	2,0	11,1
	2,5	8,9
	3,0	2,2
	3,5	0
25/2	2,0	13,3
	2,5	7,8
	3,0	3,3
	3,5	0

Примітка. В кожному варіанті в чашки Петрі висаджували по 30 калюсів у трьох повторностях.

центрацією солі. В процесі пасажування визначали темпи росту, кількість листків, особливості укорінення пагонів, їх виживання.

Мікропагони, відібрані на селективних середовищах з 2,0 % NaCl і 2,5 % Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3—4 рази пересаджували на контрольне середовище для зняття селективного навантаження, виключення можливої адаптації і мікроклонально розмножували. Вживання пагонів було доволі високим — до 50 %. Для продовження селективного процесу мікропагони з контрольного середовища знову пересаджували на селективні з вищими концентраціями солей (3,0 % NaCl, 3,5 % Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Вживало у середньому до 16 % рослин-регенерантів. За морфологією рослини, стійкі до сольового стресу, відрізнялись від контрольних. Вони мали дрібніші листки, їх кількість була меншою, здатність до утворення бічних бруньок і ризогенезу — пригніченою.

**Клітинна селекція буряків на комплексну стійкість до біотичних та абіотичних стресів.** На підставі уявлення про існування специфічних і загальних систем стійкості [5, 8] проводили селекцію *in vitro* на комплексну

стійкість клітинних ліній буряків до двох і більше видів стресів. Раніше ми отримали калюсні лінії кормових буряків, резистентні до токсину збудника бактеріозу *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, які виявились стійкими і до низьких плюсових температур [6]. Досліджено реакцію цих клітинних ліній із перехресною стійкістю на сольовий стрес методами прямої та ступінчастої селекції.

Для прямого добору стійких ліній як селективні агенти використано 2,0 % NaCl і 2,5 % Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Часточки калюсної тканини масою 15—20 мг вміщували в чашки Петрі із сублетальними дозами солей. Стійкі клони відбирали через 6 тижнів. Виявлено, що до кінця першого пасажу виживало до 32 % калюсів на середовищі з NaCl і до 37 % — з Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Згідно зі стандартною схемою клітинної селекції, калюси перевіряли у селективних і неселективних умовах. Після трьох пасажів у селективних умовах із сублетальними дозами солей кількість життєздатних калюсів зменшувалась у середньому до 20 %. Після наступних двох пасажів на середовищі без селективного чинника і перевірки росту в селективних умовах було виділено від 2,6 до 4,8 % резистентних клонів.

Поряд з експериментами з перенесення калюсних ліній із перехресною стійкістю до токсину збудника бактеріозу і низьких плюсових температур відразу на середовища з сублетальними дозами солей проводили селекцію цих ліній на середовищах із поступовим підвищенням концентрації селективного чинника (ступінчасту селекцію). В результаті послідовних доборів виділено калюси, які здатні рости на селективних середовищах із 2,5 % NaCl, 3,0 % Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> і стабільно зберігати стійкість. Виявлено, що на відміну від ліній, стійких тільки до хлоридного або сульфатного типу засолення, концентрація в середовищі 2,5 % NaCl, 3,0 % Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> не призводила до загибелі калюсів із перехресною стійкістю.

Отримані клітинні лінії, стійкі до трьох стресових чинників, мали такі морфологічні характеристики: щільний калюс із глобулярною структурою світло-жовтого чи брунатного кольору на середовищі з NaCl і темно-жовтого — на середовищі з Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Брунатний і темно-жовтий калюси виявились здатними до регенерації пагонів. Частота регенерації в отриманих клітинних ліній, стійких до комплексу стресових чинників, була на рівні 17 %. Іноді проростки морфологічно істотно різнились від контрольних варіантів.

**Перевірка стабільності ознак стійкості у клітинних ліній і рослин-регерантів.** Стабільність ознак стійкості до комплексу стресових чинників отриманих ліній визначали з використанням системи пересадок на поживні середовища зі стресовими чинниками і без них. Селективні середовища містили сублетальні дози токсину збудника бактеріозу (40 мг/л), хлориду натрію (2,5 %) або сульфату натрію (3,0 %). Застосовували таку загальну схему перевірки стабільності ознаки стійкості до комплексу стресових чинників: стійка лінія — МС-МС (низькотемпературний стрес, 2 пасажі) — селективне середовище (2 пасажі) — МС-МС — селективне середовище (2 пасажі) — МС.

Часточки калюсної тканини кожного варіанта переносили в чашки Петрі (по 30 шт. у трьох повторностях) і витримували на середовищі МС за низьких плюсових температур. Після двократного пасажування калюси повертали на селективні середовища з концентраціями стресових чинників: токсин (40 мг/л) + NaCl (2,5 %) або Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3,0 %). Клітинні лінії, що вижили, культивували на середовищі МС і далі за схемою.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ

ТАБЛИЦЯ 2. Вживання клітинних ліній кормових буряків із комплексною стійкістю в процесі перевірки стабільності ознаки

Клітинна лінія	Висаджено калюсів, шт.	Зберігання нормального росту після			
		2-разового пасажування на МС, %	2-разового пасажування на селективному середовищі, %	2-разового пасажування на МС, %	10 пасажів, %
3к/1	90	85,5	77,7	67,7	63,3
8к/1	90	87,7	80,0	70,0	65,5
11к/1	90	86,6	81,1	68,8	66,6
3к/2	90	90,0	83,3	78,3	73,3
8к/2	90	92,2	86,6	81,1	74,4
11к/2	90	88,8	87,7	85,5	75,5

Примітка. Розрахунки проведено, виходячи з кількості первинно висаджених калюсів (90 шт.).

Стабільність вияву ознаки резистентності до комплексу стресових чинників у клітинних ліній була високою і становила 65–74 % (табл. 2).

Слід зазначити, що калюсні культури, стійкі до комплексу стресових чинників і сульфатного засолення (3к/2, 8к/2, 11к/2), краще перенесли перевірку стабільності ознак протягом 10 пасажів (до 75,5 % висаджених калюсів). У ліній, стійких до низьких температур, бактеріального токсину та хлоридного засолення (3к/1, 8к/1, 11к/1), на кінець пересаджень життєздатними залишилось до 66,6 % калюсів. Із клітинних ліній, що стабільно росли на середовищах із різними стресовими чинниками, отримано значну кількість рослин-регенерантів.

За наведеною схемою з перевірки стабільності ознак у клітинних ліній відбирали й перевіряли індуковані з них рослини-регенеранти. Виявлено, що після пасажування на селективні й неселективні середовища виживало до 46,7 % мікропагонів (табл. 3), отриманих із клітинних ліній з комплексною стійкістю, у тім числі до хлоридного засолення (3 п/1, 8п/1, 11 п/1).

Вживання мікропагонів, стійких до сульфатного засолення (3п/2, 8п/2, 11п/2), становило 50,0–54,2 %. Отримані результати можуть свідчити про те, що клітинні лінії та рослини-регенеранти, які зберігали життєздатність після багаторазового перенесення на селективні середовища

ТАБЛИЦЯ 3. Кількість мікропагонів, стійких до комплексу стресових чинників після перевірки на стабільність ознаки

Лінія	Кількість висаджених мікропагонів, шт.	Зберігання нормального росту після 10 пасажів	
		шт.	%
3п/1	18	8	44,4
8п/1	20	9	45,0
11п/1	15	7	46,7
3п/2	27	14	51,9
8п/2	30	15	50,0
11п/2	24	13	54,2

з комплексом стресових чинників, зазнали певних генетичних змін, які й обумовили в них ознаки стійкості.

У рослин-регенерантів буряків, отриманих на середовищах із сублетальними дозами солей і токсину збудника бактеріозу й висаджених у ґрунт (вегетаційні посудини) перевіряли стійкість до бактеріальної плямистості листків. Ураженість відібраних регенерантів бактеріозом (збудник *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*) оцінювали за п'ятибальною шкалою. Концентрація збудника у суспензії становила  $10^7$  клітин/мл. Зараження збудником проводили на стадії 8—10 пар листків. Контролем слугували рослини-регенеранти, отримані з нестійких клітинних ліній.

Встановлено, що контрольні рослини уражувались хворобою на 80—90 %, ступінь ураженості становив 4—5 балів. Ступінь ураженості бактеріозом листків рослин-регенерантів із комплексною стійкістю був на рівні 1—2 балів, а розвиток хвороби становив 15—20 %.

Отже, в результаті послідовної комплексної роботи методами клітинної селекції отримано калюсні лінії цукрових і кормових буряків, стійкі як до окремих, так і до комплексу стресових чинників, у тім числі токсину збудника бактеріозу, низьких плюсових температур, а також до одного з типів засолення — хлоридного чи сульфатного. Перевірка стабільності ознак стійкості до комплексу стресових чинників засвідчила резистентність більшості калюсних ліній та отриманих із них рослин-регенерантів.

1. Кузнецов В.В., Хыдыров Б.Т., Рошупкин Б.В., Борисова Н.Н. Общие системы устойчивости хлопчатника к засолению и высокой температуре // Физиология растений. — 1990. — 37, № 5. — С. 987—991.
2. Литюнова Г.Н., Жукова Н.П., Яценко И.А., Кузнецов В.В. Изменение экспрессии генома в проростках *Arabidopsis thaliana* в ответ на засоление и действие тяжелых металлов // Тез. докл. 3-го съезда Всерос. о-ва физиологов растений (Санкт-Петербург, 24—29 июня, 1993). — Санкт-Петербург, 1993. — С. 653.
3. Редько В.В., Редько В.И. Особенности реакции сахарной свеклы на солевой стресс // Генетические исследования сахарной свеклы. — Киев, 1991. — С. 68—75.
4. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. — Киев: Наук. думка, 1990. — 280 с.
5. Таланов В.В., Титов А.Ф., Минаева С.В., Солдатов С.Е. Раздельное и комбинированное действие засоления и закалывающих температур на растения // Физиология растений. — 1993. — 40, № 4. — С. 584—588.
6. Чугункова Т.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Селекція *Beta vulgaris* L. на стійкість до стресових чинників // Матеріали ІХ Укр. біохім. з'їзду (Харків, 24—27 жовтня, 2006). — Харків, 2006. — С. 232.
7. Чугункова Т.В., Дубровна О.В. Особенности регенерации растений инбредных линий сахарной свеклы в культуре in vitro // Биополимеры и клетка. — 1997. — 13, № 4. — С. 303—307.
8. Шевякова Н.И. Метаболизм и физиологическая роль пролина в растениях при водном режиме и солевом стрессе // Физиология растений. — 1983. — 30, вып. 4. — С. 768—783.
9. De Greef W., Jacobs M. In vitro of the sugar beet — description of a cell line with high regeneration capacity // Plant Sci. Lett. — 1979. — 17, N 1. — P. 55—61.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. plant. — 1962. — 15, N 13. — P. 473—497.
11. Smith M., McComb Y. Effect of NaCl on the growth of whole plants and their corresponding callus cultures // Austral. J. Plant Physiol. — 1981. — 8, N 3. — P. 267—275.
12. Swaaij A., Jacobsen E., Keil I., Feenstra W. Selection, characterization and regeneration of hydroxyproline-resistant cell lines of *Solanum tuberosum*: tolerance to NaCl and freezing stress // Physiol. plant. — 1986. — 68, N 3. — P. 359—366.

Отримано 20.05.2009

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ УСТОЙЧИВЫХ  
ФОРМ СВЕКЛЫ

*Т.В. Чугункова*

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Представлены результаты исследований по клеточной селекции сахарной и кормовой свеклы на устойчивость к стрессам. Методами прямой и ступенчатой селекции *in vitro* получены каллюсные линии и растения-регенеранты, устойчивые к хлоридному и сульфатному засолению. Проведена проверка клеточных линий и растений-регенерантов на стабильность устойчивости к комплексу стрессовых факторов.

THE USING OF CELL SELECTION FOR CREATION OF RESISTANT FORMS  
OF BEET

*T.V. Chugunkova*

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The results of cell selection of sugar and mangel beet for resistance to stresses are presented. The resistant to NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> callus lines and plant-regenerants have been obtained by means of direct and step by step selection. The stability of resistance of cell lines and plant-regenerants to the complex stress factors was investigated.

*Key words:* *Beta vulgaris* L., callus lines, plant-regenerants, stress factors, cell selection.