

Клеточная селекция кормовой свеклы на устойчивость к нескольким стрессовым факторам

Н. Я. Губанова, О. В. Дубровная, Т. В. Чугункова

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
Ул. Васильковская, 31/17, Киев, 03022, Украина

Изучена реакция на хлоридное и сульфатное засоление каллусных линий кормовой свеклы, имеющих перекрестную устойчивость к токсину возбудителя бактериоза и низким температурам. Отобраны клеточные линии, резистентные к трем стрессовым факторам — токсину возбудителя бактериоза, низким температурам, а также к одному из типов засоления — хлоридному или сульфатному. Из них получены растения-регенеранты и проведен их цитогенетический анализ.

Введение. Наряду с использованием традиционных генетико-селекционных методов получения высокопродуктивных сортов и гибридов сельскохозяйственных культур все более широкое распространение получают биотехнологические приемы при создании исходного селекционного материала, устойчивого к различным стрессовым факторам. Одним из таких приемов является метод клеточной селекции, позволяющий в условиях *in vitro* получать формы растений, резистентные к неблагоприятным условиям окружающей среды.

У сахарной свеклы с помощью данного метода получены клеточные линии, устойчивые к церкоспорозу [1], вирусу мозаики [2, 3], некротического пожелтения листьев [4], некоторым гербицидам [5] и солям [6, 7]. Нами получены каллусные линии и растения-регенеранты кормовой свеклы, устойчивые к токсину возбудителя бактериоза [8], а также каллусные линии кормовой и сахарной свеклы, устойчивые к хлоридному и сульфатному типам засоления [9, 10].

Сравнительное изучение природы адаптивных реакций растений на воздействие различных стрессовых факторов указывает на существование как специализированных, так и общих механизмов устойчивости к ним [11, 12]. В пользу наличия последних свидетельствуют данные о том, что резистентность к одному неблагоприятному фактору может приводить к повышению устойчивости к другому [13], а также что отобранные клеточные линии иногда проявляют перекрестную устойчи-

вость к нескольким стрессовым факторам [14, 15]. Это подтвердили и наши исследования — каллусные линии кормовой свеклы, резистентные к токсину возбудителя бактериоза, проявили перекрестную устойчивость и к низким положительным температурам [16].

В связи с увеличением количества орошаемых площадей и, как следствие этого, вторичного засоления почв возникает потребность в селекции сортов, обладающих комплексной устойчивостью к нескольким стрессовым факторам, в том числе и засолению. Задачей наших исследований было изучение реакции на солевой стресс клеточных линий кормовой свеклы, обладающих комплексной резистентностью к токсину возбудителя бактериоза и низким температурам.

Материалы и методы. Материалом исследования служили каллусные линии кормовой свеклы 3п, 8п, 11п, имеющие перекрестную устойчивость к токсину возбудителя бактериоза (*Pseudomonas syringae* pv. *artata*) и низким положительным температурам. Данные линии получены методом клеточной селекции от исходной высокоорганогенной каллусной линии № 25, инициированной из листовых эксплантов диплоидных растений кормовой свеклы сорта Панфильская, предварительно выращенных в условиях *in vitro*. Абсолютный возраст каллусных линий составлял 5 пассажей.

Питательной средой служила DS-2 без фитогормонов [17]. Опыты на комплексную устойчивость экспериментального материала проводили на средах с использованием NaCl (хлоридное засоление) и Na₂SO₄ (сульфатное засоление). В исходную

питательную среду добавляли различные концентрации солей — 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 % NaCl и 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 % Na₂SO₄. Кусочки каллусной ткани массой 15—20 мг в возрасте 30 сут помещали на чашки Петри с питательной средой. Повторность опытов — трехкратная.

Отбор клонов с комплексной устойчивостью вели методом прямой и ступенчатой селекции. Массу каллусной ткани в процессе культивирования определяли по Кучеренко [18]. Микророзетки регенерировали из каллуса на модифицированной нами среде RV, обогащенной аминокислотами и фитогормонами [19]. Экспериментальный материал выращивали на свету с 16-ч фотопериодом при температуре 26±2 °С. Учет сформировавшихся розеток проводили через 8—10 недель после начала опыта. Частоту пролиферации побегов вычисляли как соотношение количества прорегенерировавших каллусов к общему числу высаженных клонов.

Цитологический анализ растений-регенерантов проводили на метафазных пластинках клеток меристемы молодых листочков по стандартной методике [20]. В каждом растении анализировали не менее 20—30 метафаз.

Результаты и обсуждение. Методом клеточной селекции нами получено несколько каллусных линий кормовой свеклы, имеющих перекрестную устойчивость к токсину возбудителя бактериальной пятнистости листьев и низким температурам и характеризующихся медленным ростом (длительность пассажа 80 дней) по сравнению с обычными каллусными культурами кормовой свеклы (длительность пассажа 20 дней), мелкозернистой, плот-

ной структурой и светло-желтой пигментацией [16].

С использованием ступенчатой селекции получены клеточные линии кормовой свеклы, устойчивые к 2 %-му хлоридному и 2,5 %-му сульфатному засолению [10]. Показано, что хлоридное засоление более токсично для каллусных культур, чем сульфатное. В этих экспериментах установлено, что летальной дозой для клеточных культур кормовой свеклы является содержание 2,5 % хлорида натрия и 3,0 % сульфата натрия [10]. Поэтому клеточные культуры отбирали на устойчивость к засолению, используя как прямой перенос на среду с сублетальными концентрациями солей, так и метод ступенчатой селекции.

В табл. 1 приведены данные о динамике выживаемости клеточных линий с перекрестной устойчивостью при прямом их переносе на селективные среды, содержащие сублетальные дозы солей. В соответствии со стандартной схемой клеточной селекции [21], растущие колонии проверяли в селективных и неселективных условиях. Выявлено, что к концу первого пассажа выживало до 32 % каллусов на среде с NaCl и до 37 % — на селективной среде с Na₂SO₄ (табл. 1). После трех пассажей в селективных условиях число живых колоний составляло от 13 до 25 % на среде с NaCl и от 15 до 26 % на среде с Na₂SO₄. После двух пассажей на среде без селективного фактора и проверки роста в селективных условиях удалось выделить от 2,6 до 4,8 % резистентных клонов. При этом элиминация микрокаллусов по пассажам в количественном выражении была примерно одинаковой

Таблица 1

Динамика выживаемости резистентных каллусных линий кормовой свеклы на селективных средах с сублетальными дозами солей

Клеточная линия	Количество высаженных микрокаллусов	Количество живых микрокаллусов по пассажам от числа высаженных, %						
		1	2	3	4	5	6	7
<i>NaCl, 2,0 %</i>								
3п	260	30,4±2,6	25,4±2,7	21,9±2,6	19,2±2,4	18,0±2,4	10,8±1,9	4,2±1,2
8п	250	27,6±2,8	14,8±2,2	13,6±2,2	13,0±2,1	12,0±2,1	9,6±1,9	2,6±1,0
11п	290	32,4±2,7	26,6±2,6	24,8±2,5	24,1±2,5	23,1±2,5	12,8±2,0	4,8±1,3
<i>Na₂SO₄, 2,5 %</i>								
3п	250	33,6±3,0	26,8±2,8	22,8±2,7	21,2±2,6	21,2±2,6	12,0±2,6	4,4±1,3
8п	230	30,0±3,0	17,8±2,5	15,7±2,4	13,0±2,2	13,0±2,2	10,9±2,6	3,0±1,1
11п	270	37,0±2,9	29,6±2,8	25,9±2,7	24,1±2,6	22,6±2,5	14,8±2,6	4,8±2,6

Примечание. 1—3-й и 6—7-й пассажи — среда с селективным фактором; 4—5-й пассажи — основная среда

для обеих селективных систем. Вероятно, при отборе на устойчивость к стрессовым факторам существуют закономерности, не зависящие от типа засоления.

Наряду с экспериментами по прямому переносу на селективные среды проводили ступенчатую селекцию по схеме: 1,5 % NaCl (3 пассажа) → DS-2 (2 пассажа); 2,0 % NaCl (3 пассажа) → DS-2 (2 пассажа); 2,5 % NaCl (3 пассажа) → DS-2 (2 пассажа) → 3,0 % NaCl (1 пассаж), а также 2,0 % Na₂SO₄ (3 пассажа) → DS-2 (2 пассажа); 2,5 % Na₂SO₄ (3 пассажа) → DS-2 (2 пассажа); 3,0 % Na₂SO₄ (3 пассажа) → DS-2 (2 пассажа) → 3,5% Na₂SO₄ (1 пассаж). По такой схеме проведены три цикла отбора. В результате последовательных отборов выделены варианты, способные расти на селективных средах с 2,5 % NaCl и 3,0 % Na₂SO₄ и стабильно сохраняющие признак резистентности в течение пяти пассажей. Устойчивые к хлоридному засолению клеточные линии обозначены нами как 3п/1, 8п/1 и 11п/1, а к сульфатному типу засоления — 3п/2, 8п/2 и 11п/2.

Метод ступенчатой селекции оказался в нашем случае более результативным в сравнении с прямым переносом на селективные среды, поскольку несколько повысилось число жизнеспособных каллусов (табл. 2). Выявлено, что в отличие от линий кормовой свеклы, резистентных только к хлоридному или сульфатному типу засоления, концентрация в среде 2,5 % NaCl и 3,0 % Na₂SO₄ не оказывает летального воздействия на линии с комплексной устойчивостью. На среде с 2,5 % NaCl выживало от 1,3 до 2,7 % каллусов, а на среде с 3,0 % Na₂SO₄ — от 2 до 3% клеточных культур. Наши исследования подтвердили, что для каллусных культур с комплексной устойчивостью, так же как и для обычных клеточных культур кормовой свеклы, хлоридное засоление оказывает более токсичное воздействие, чем сульфатное.

Полученные клеточные линии с тройной устойчивостью имели следующие морфологические характеристики: плотный каллус с глобулярной структурой, соломенно-желтый или бурого цвета на среде с NaCl и темно-желтый на среде с Na₂SO₄. Бурый и темно-желтый каллус классифицируется нами как регенеративный. Помимо этого, выделенные каллусные линии также характеризуются медленным ростом. У всех вариантов при росте на средах с солями не отмечалось значительного снижения прироста биомассы по сравнению с исходными линиями (табл. 3).

Наши многолетние исследования показали, что регенерация из резистентных клеточных линий кормовой свеклы затруднена и зависит от природы стрессового фактора. Лучше всего проходит регенерация из устойчивых к засолению, высоким и низким температурам каллусных линий. Наимень-

Таблица 2
Выживаемость резистентных каллусных линий кормовой свеклы на селективных средах при ступенчатом отборе*

Каллусная линия	Количество высаженных каллусов	Концентрация соли в питательной среде, %	Количество выживших каллусов, %
<i>NaCl</i>			
25	150	1,5	7,3±2,1
	150	2,0	4,0±1,6
	150	2,5	0
3п/1	150	1,5	9,3±2,4
	150	2,0	5,3±1,8
	150	2,5	1,3±0,9
	150	3,0	0
11п/1	150	1,5	10,7±2,5
	150	2,0	6,0±1,9
	150	2,5	2,7±1,3
	150	3,0	0
<i>Na₂SO₄</i>			
25	150	2,0	9,3±2,4
	150	2,5	5,3±1,8
	150	3,0	0
3п/2	150	2,0	12,0±2,7
	150	2,5	6,0±1,9
	150	3,0	2,0±1,1
	150	3,5	0
11п/2	150	2,0	13,3±2,8
	150	2,5	7,3±2,1
	150	3,0	3,3±1,5
	150	3,5	0

*Суммарные данные в трех повторностях.

шая частота регенерации отмечена нами у токсин-резистентных клеточных линий [8]. Частота регенерации у полученных нами каллусных линий кормовой свеклы, устойчивых к нескольким стрессовым факторам, также оказалась очень низкой — ее уровень не превышал 3 %. Только у небольшой части клеточных культур, растущих на среде с 2,0 % NaCl и 2,5 % Na₂SO₄, образовывались микророзетки. На средах с более высокими концентрациями солей каллусы не регенерировали. При пересадке микророзеток на среду для регенерации (RV [19]) развивались проростки с морфологическими изменениями листьев — длинные игольчатые светло-зеленого цвета, а также ланцетовидные

с темно-зеленой окраской. Часть регенерантов оказалась альбиносами.

Из каллусных линий 3п/1 и 11п/1, растущих на среде с 2 % хлоридным засолением, удалось регенерировать несколько растений. При цитологическом изучении полученных растений выявлено, что большая часть регенерантов оказались миксоплоидами (2х и 4х) и анеуплоидами с околотетраплоидным ($2n = 37$) числом хромосом (табл. 4). У

данных растений отмечалось значительное (до 12 %) количество клеток с нарушениями митоза. Выявлены отстающие хромосомы и фрагменты, слипание хромосом, одиночные мосты в анафазах. Растения отличались слабым развитием, очень медленным ростом и в процессе дальнейшего культивирования погибали.

Значительная часть растений, инициированных из каллусных линий кормовой свеклы, растущих на среде с 2,0 % сульфатным засолением, также оказалась миксоплоидами и имела большое количество клеток с аномалиями митоза. Выделено также одно анеуплоидное растение ($2n = 37$). Среди 12 регенерантов, полученных из резистентного каллуса, четыре растения вообще не формировали побегов, оставаясь розеточной формой.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены клеточные линии кормовой свеклы, обладающие устойчивостью одновременно к нескольким факторам: токсину возбудителя бактериоза, низким температурам и хлоридному или сульфатному типу засоления. Результаты нашей работы подтверждают данные литературы [22, 23] о том, что у растений помимо специализированных существуют и общие системы устойчивости к различным стресс-факторам. Однако вопрос о том, какова их природа, остается пока открытым. Устойчивость клеток различных организмов к стрессам обеспечивается биохимическими механизмами, затрагивающими разные стороны метаболизма. Клетки всех организмов в ответ на стрессовое воздействие реагируют синтезом набора специфических стрессовых белков, появление которых свидетельствует об изменении экспрессии соответствующих генов [24]. Высказывается предположение о том, что белки с молекулярной массой 24 и 82 кДа могут являться компонентами стрессорной реакции и иметь отношение к общей устойчивости растений [12]. Поэтому дальнейшие наши исследования будут направлены на изучение некоторых биохими-

Таблица 3
Относительный прирост сырой биомассы у каллусных культур кормовой свеклы на селективных средах с солями

Каллусная линия	Масса каллуса ($M \pm m$), г, после недель пассажа		
	3	5	10
<i>DS-2</i>			
25 (контроль)	2,250±0,15	—	—
3п	0,245±0,02	0,390±0,02	0,990±0,05
8п	0,130±0,02	0,240±0,03	0,850±0,07
11п	0,335±0,03	0,485±0,05	0,070±0,04
<i>DS-2 + NaCl (2 %)*</i>			
3п/1	0,202±0,06	0,378±0,07	0,875±0,14
8п/1	0,100±0,05	0,230±0,05	0,720±0,09
11п/1	0,280±0,07	0,472±0,09	0,955±0,11
<i>DS-2 + Na₂SO₄ (2 %)*</i>			
3п/2	0,215±0,06	0,410±0,08	0,995±0,15
8п/2	0,120±0,04	0,250±0,10	0,845±0,11
11п/2	0,315±0,07	0,505±0,09	0,018±0,14

*Суммарные данные в трех повторностях.

Таблица 4
Плоидность растений-регенерантов, полученных из каллусных культур кормовой свеклы, обладающих устойчивостью к нескольким стрессовым факторам

Каллусная линия	Всего изучено регенерантов	Количество растений с числом хромосом			
		2х	4х	Анеуплоиды	Миксоплоиды
3п/1	3	—	—	1	2
8п/1	2	—	—	1	1
11п/1	5	—	1	1	3
3п/2	4	1	—	—	3
8п/2	2	—	—	—	2
11п/2	6	—	1	1	4

ческих показателей у данных клеточных линий для установления их роли в устойчивости к стрессам.

N. Ya. Gubanova, O. V. Dubrovna, T. V. Chugunkova

The cell breeding of mangel beet resistant to several stress factors

Summary

The reaction of the mangel beet cell lines, having crossed resistance to the bacterial toxin and low temperatures, on chloride and sulfate medium salinization was investigated. The cell lines resistant to several stress factors, namely the bacterial toxin, low temperature and sulfate or chloride medium salinization, were selected. The regenerated plants were obtained and cytological analysis was carried out.

Н. Я. Губанова, О. В. Дубровна, Т. В. Чугункова

Клітинна селекція кормового буряку на стійкість до декількох стресових факторів

Резюме

Досліджено реакцію на хлоридне та сульфатне засолення калусних ліній кормового буряку, які мають перехресну стійкість до токсину збудника бактеріозу та низьких температур. Відібрано клітинні лінії, стійкі до трьох стресових факторів — токсину збудника бактеріозу, низьких температур, а також одного із типів засолення — сульфатного або хлоридного. З них отримано рослини-регенеранти та проведено їхній цитогенетичний аналіз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lepoirve P., Carels N. Selection of sugar beet calli to obtain plants resistant to *Cercospora beticola* // Nucl. Techn. and in vitro Cult. Plant improv.: Proc. Int. Symp. (Vienna, 19—23 Aug. 1985).—Vienna, 1986.—P. 305—308.
2. Жук И. П., Бобырь А. Д., Сахно Т. Н. Вирусоустойчивость растений-регенерантов, полученных из темно-зеленых участков листьев сахарной свеклы, пораженных вирусом мозаики свеклы // С.-х. биология.—1989.—№ 3.—С. 68—70.
3. Жук И. П., Бобырь А. Д., Сахно Т. Н. Ослабление вирулентности вируса мозаики свеклы в культуре ткани сахарной свеклы // Докл. ВАСХНИЛ.—1991.—№ 1.—С. 15—17.
4. Mangold B., Kraus J., Mechelke W., Buttner G. Resistenz gegenüber dem beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) bei konventionell gezuchteten und gentechnisch entwickelten linien und Sorten von Zuckerruben // Milt. Biol. Bundesanst Land — und Forstwiss (Berlin).—1998.—N 357.— S. 289—290.
5. Горина И. Н. Создание *in vitro* формы сахарной свеклы, устойчивой к экологически безопасным гербицидам // Методы комплекс. оценки продуктивности и устойчивости с.-х. растений: Тез. науч.-методол. совещ. (пос. Немчиновка, 15—17 февраля, 1994).—М., 1994.—С. 10—11.
6. Chandler S., Reak K., Rua E. The effectiveness of selection for salinity tolerance using *in vitro* shoot cultures // Bot. Gaz.—1988.—149, N 2.—P. 166—172.
7. Редько В. В., Редько В. И. Особенности реакции сахарной свеклы на солевой стресс // Генетические исследования сахарной свеклы.—Киев: ВНИИСС, 1991.—С. 68—75.
8. Губанова Н. Я., Дубровна О. В., Чугункова Т. В. Отбор и цитологический анализ устойчивых к токсину *Pseudomonas syringae* pv. *artata* клеточных линий кормовой свеклы и регенерантов из них // Цитология и генетика.—1999.—33, № 4.—С. 9—16.

9. Чугункова Т. В., Шевцов И. А. Клеточная селекция свеклы на устойчивость к экстремальным факторам среды // Молекуляр. генетика и биотехнология: Материалы междунар. конф. (Минск, 6—8 апреля 1998).—Минск, 1998.—С. 286—287.
10. Губанова Н. Я., Дубровна О. В., Чугункова Т. В. Отбор и сравнительный анализ устойчивых к солевому стрессу калусных культур кормовой свеклы, полученных из эксплантов различной ploidy // Физиология и биохимия культур. растений.—2000.—32, № 5.—С. 416—424.
11. 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.
12. 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 // 3 съезд Всерос. об-ва физиологов растений (24—29 июня 1993, Санкт-Петербург): Тез докл.—Санкт-Петербург, 1993.—С. 653.
13. 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.
14. 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.
15. Кузнецов В. В., Хыдыров Б. Т., Шевякова Н. И., Ракитин В. Ю. Индукция тепловым шоком солеустойчивости хлопчатника: участие полиаминов, этилена, пролина // Физиология растений.—1991.—38, № 6.—С. 1203—1207.
16. Губанова Н. Я., Дубровна О. В., Чугункова Т. В. Комплексная селекция *in vitro* на устойчивость клеточных линий кормовой свеклы к токсину возбудителя бактериоза и низким температурам // Биополимеры и клетка.—2000.—16, № 2.—С. 111—120.
17. Doley W. P., Sawnders G. W. Hormone-free medium will support callus production and subsequent shoot regeneration from whole leaf explants in some sugar beet (*Beta vulgaris* L.) population // Plant Cell Rep.—1989.—8, N 4.—P. 222—225.
18. Кучеренко Л. А., Маддуме Р. П., Гужов Ю. Л. К методике определения массы калусных тканей в процессе культивирования // С.-х. биология.—1991.—№ 3.—С. 84—85.
19. Freytag A., Anand S., Rao-Arelli A., Owens L. An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. *in vitro* // Plant Cell Rep.—1988.—7, N 1.—P. 30—34.
20. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений.—М., 1988.—280 с.
21. Шамина Э. Б. Методические указания по клеточной селекции.—М.: ВАСХНИЛ, 1984.—35 с.
22. Ghosh B. Plant responses to abiotic stress — an overview // Proc. Nat. Acad. Sci. (India).—1996.—66, N 1.—P. 21—34.
23. Keller H., Blein J., Bonnet P., Ricci P. Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired persistence in tobacco // Plant Physiol.—1996.—110, N 2.—P. 365—376.
24. Harrington H., Alm P. Interaction of heat and salt shock in cultured tobacco cells // Plant Physiol.—1988.—66, N 3.—P. 618—621.

УДК 57.085.23:633.63.
Надійшла до редакції 04.07.2000