



# Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 60:547.458.2:633.63

© 2019

## **АКТИВНІСТЬ САХАРОЗО- ФОСФАТСИНТАЗИ У ЛІНІЯХ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ (BETA VULGARIS L.) З КОМПЛЕКСНОЮ СТІЙКІСТЮ**

*О.Л. Кляченко*

*доктор сільськогосподарських наук*

*Національний університет біоресурсів і природокористування України*

*вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна*

*e-mail: Klyachenko@ukr.net*

*Надійшла 11.06.2018*

**Мета.** Визначення активності ферменту сахарозофосфатсинтази в лініях буряків цукрових із комплексною стійкістю до 2-х стресових факторів. **Методи.** Лабораторні, вегетаційні, математико-статистичні. **Результати.** У процесі адаптації рослин до стресових факторів порушуються процеси метаболізму, що позначається на пригніченні росту та зниженні їхньої фотосинтетичної активності. Наведено експериментальні дані змін функціональної активності ферменту сахарозофосфатсинтази в умовах дії водного та сольового стресів у листках рослин-регенерантів і цукристості коренеплодів клітинних ліній буряків цукрових із комплексною стійкістю до посухи і засолення. Під час проведення експериментальних досліджень сформовані рослини-регенеранти клітинних ліній буряків цукрових заввишки 10–15 см, які мали 6–10 наявних листків, пересаджували у відкритий ґрунт. Приживаність їх у ґрунті була 68–80%. Виявлені істотні зміни функціональної активності ферменту сахарозофосфатсинтази в досліджуваних регенерантів клітинних ліній за дії комплексного стресу знаходять підтвердження у формуванні цукристості коренеплодів. При цьому особливо відчутною була активація ферменту високостійких клітинних ліній, величина якого становила 60–99%, що свідчить про їх здатність до адаптації в цих умовах. Установлено, що цукристість отриманих ліній буряків цукрових із комплексною стійкістю до посух та засолення залежно від їх градації була в межах 15,8–17,2% і знижувалася за цих умов щодо контрольних рослин на 0,2–0,7%. **Висновки.** За комплексного стресу відбуваються істотні зміни ферменту сахарозофосфатсинтази в листках і цукристості коренеплодів. Активність ферменту можна використовувати як біохімічний маркер стійкості в умовах первинної діагностики рослин-регенерантів буряків цукрових із потенційно високим адаптивним потенціалом.

**Ключові слова:** буряки цукрові, сольовий і водний стреси, сахарозофосфатсинтаза, рослини-регенеранти, цукристість.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201903-07>

Нині одним із перспективних напрямів, які дають можливість створювати стійкий до екстремальних умов вихідний матеріал і підвищувати ефективність створення нових форм рослин, є метод клітинної селекції *in vitro*. Селекцію *in vitro* проводять на ознаки, що проявляються на клітинному рівні. Зокрема, це збільшення експресії певних генів, які контролюють метаболічні шляхи, що забезпечують толерантність до стресових чинників [1]. На всі відхилення від норми клітина реагує зміною низки фізіологічних і біохімічних параметрів, що дає змогу проводити селекцію на стійкість, використовуючи відбір у культурі *in vitro* з урахуванням цих ознак [2].

Переваги клітинної селекції над традиційними методами полягають насамперед у пришвидшенні скринінгу селекційного матеріалу, контролі за фізіологічними і фізичними факторами середовища, посиленому створенні нових генетичних комбінацій, їх доборі і передачі рослинам-регенерантам та отриманні клітинних ліній і рослин, які проявляють резистентність до кількох стресових чинників [3, 4]. За допомогою селекції *in vitro* отримано лінії буряків цукрових, стійких до деяких гербіцидів [5], солей [6], комплексу біотичних і абіотичних стресів [7] та лінії з комплексною стійкістю до посухи і засолення. Після скринінгу генотипів їх можна залучати у селекційний процес як джерела стійкості до стресових чинників навколишнього середовища.

**Мета досліджень** — визначення активності ферменту сахарозофосфатсинтази в лініях буряків цукрових із комплексною стійкістю до 2-х стресових чинників.

**Матеріали та методи досліджень.** Матеріалом для дослідження були клітинні лінії буряків цукрових із комплексною стійкістю до посухи та засолення сорту Ялтушківський однонасінний 64 і гібридів Ялтушківський ЧС 72, Український ЧС 72, Іванівський ЧС 33, Уладово-Верхняцький ЧС 37, Український ЧС 70, Іванівсько-Веселоподільський ЧС 84, Білоцерківський ЧС 57, Олександрія, отримані нами клітинною селекцією *in vitro* за використанням селективних агентів — 20% поліетиленгліколю (ПЕГ 6000) і 2%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Під час проведення ранжування ці лінії було об'єднано в 3 групи: високостійкі, середньостійкі і слабостійкі до стресових чинників. Індуковані рослини-регенеранти вирощували

на майданчику в 6-кілограмових вегетаційних посудинах (ґрунт — чорнозем опідзолений) з унесенням поживної суміші ВНЦ. Вегетаційний період — 92 доби, вологість — 60% ПВ, біологічна повторність — 20 рослин. Виділення і визначення активності сахарозофосфатсинтази (СФС) проводили за методами Лафта [8] і Губера [9]. Активність ферменту виражали в мкМ сахарози, що утворювалася на 1 мг білка або 1 г тканини/год [10]. Уміст сахарози в коренеплодах визначали поляриметричним методом холодної дигестії за Починком [11]. Одержані дані оброблено статистично з використанням пакета програм «Аналіз електронних таблиць Microsoft Excel».

**Результати досліджень.** Рівень стійкості до стресових факторів забезпечується зміною характеру перебігу багатьох фізіолого-біохімічних процесів. Під час адаптації рослин до стресових факторів у них порушуються процеси метаболізму, що характеризується пригніченням росту і зниженням їхньої фотосинтетичної активності [12]. Різноманітність функцій вуглеводів, їх участь у регуляції метаболізму та росту, забезпеченні рослин енергетичним і пластичним матеріалом та в експресії генів, які кодують ферменти, пов'язані з фотосинтезом, що є важливим підґрунтям для їх адаптації до стресів різної природи [13].

#### 1. Приживаність рослин-регенерантів генотипів буряків цукрових у відкритому ґрунті

Генотип	Висаджено рослин, шт.	Приживаність рослин	
		шт.	%
<i>Високостійкі</i>			
Ялтушківський однонасінний 64	46	37	80
Ялтушківський ЧС 72	47	33	68,8
Уладово-Верхняцький ЧС 37	45	34	75,5
Український ЧС 70	45	35	77,7
<i>Середньостійкі</i>			
Український ЧС 72	46	33	71,7
Іванівсько-Веселоподільський ЧС 84	45	30	66,6
Іванівський ЧС 33	47	37	79,7
<i>Слабостійкі</i>			
Олександрія	45	35	77,7
Білоцерківський ЧС 57	48	35	72,2
НІР <sub>05</sub>		1,7	5,2

**2. Активність сахарозофосфатсинтази в листках стійких рослин-регенерантів буряків цукрових за умов комплексного стресу**

Генотип	СФС, мкМ сахарози/ (мг білка·год)		СФС, мкМ сахарози/(г тканини·год)		% від контролю
	контроль	стрес	контроль	стрес	
<i>Тривалість стресу 3 доби</i>					
<i>Високостійкі</i>					
Ялтушківський однонасічний 64	1,28±0,06	5,19±0,45	38,3±1,6	67,5±0,9	+76
Ялтушківський ЧС 72	1,94±0,08	3,85±0,12	58,2±1,6	115,6±2,3	+99
Уладово-Верхняцький ЧС 37	4,67±0,22	8,45±0,39	140,1±9,4	253,6±12,3	+81
Український ЧС 70	3,55±0,17	5,68±0,27	106,4±1,0	170,5±2,5	+60
<i>Середньостійкі</i>					
Український ЧС 72	3,29±0,16	4,11±0,19	131,5±2,5	164,4±8,3	+25
Іванівсько-Веселоподільський ЧС-84	3,44±0,16	4,05±0,18	137,4±2,4	162,1±7,2	+18
Іванівський ЧС 33	3,27±0,15	3,96±0,18	130,8±2,5	158,3±6,8	+21
<i>Слабостійкі</i>					
Олександрія	2,41±0,12	2,56±0,11	120,6±2,3	127,8±5,4	+6
Білоцерківський ЧС 57	2,53±0,10	2,61±0,12	126,7±4,6	130,5±6,4	+3
<i>Тривалість стресу 6 діб</i>					
<i>Високостійкі</i>					
Ялтушківський однонасічний 64	4,81±0,30	4,38±0,19	144,4±1,6	131,4±6,1	-9
Ялтушківський ЧС 72	3,63±0,16	3,36±0,14	109,0±1,6	100,8±2,3	-7,5
Уладово-Верхняцький ЧС 37	2,61±1,20	2,4±0,11	78,3±1,3	72,0±0,9	-8
Український ЧС 70	1,56±0,06	1,05±0,04	46,7±2,8	31,4±2,2	-18
<i>Середньостійкі</i>					
Український ЧС 72	2,86±0,13	0,91±0,04	114,5±10,5	36,5±1,0	-20
Іванівсько-Веселоподільський ЧС 84	3,5±0,16	1,7±0,06	140,1±9,4	68,0±2,6	-28
Іванівський ЧС 33	3,33±0,15	2,57±0,13	133,3±2,9	102,6±3,3	-23
<i>Слабостійкі</i>					
Олександрія	2,08±0,10	1,20±0,05	103,8±2,3	60,2±1,7	-42
Білоцерківський ЧС 57	2,29±0,10	1,31±0,05	114,8±12,8	65,4±1,9	-43

Примітка. Різниця достовірна при P<0,05 щодо контролю.

Синтез сахарози — основної транспортної форми вуглецю в буряків цукрових [14] відбувається в процесі фотосинтезу в цитоплазмі клітин, де функціонує система сахарозосинтезувальних ферментів [15]. Ключовим регуляторним ферментом біосинтезу сахарози в листках є СФС, яка значною мірою визначає формування її транспортного фонду і відтік [16] у запасуючий вакуолярний компартмент клітин основної паренхіми коренеплоду [17].

Під час проведення експериментальних досліджень сформовано рослини-регенеранти клітинних ліній буряків цукрових висотою 10–15 см, які мали 6–10 справжніх листків. Їх пересаджували у відкритий ґрунт. За даними табл. 1, приживаність їх у ґрунті становила 68–80%. Активність СФС у листках рослин визначали за умов короткочасного 3-добового

**3. Цукристість коренеплодів ліній різних генотипів буряків цукрових, адаптованих до умов стресу**

Генотип	Цукристість, %	
	контроль	за дії стресу
Ялтушківський однонасічний 64	17,4±0,78	17,1±0,65
Ялтушківський ЧС 72	17,1±0,75	16,9±0,73
Уладово-Верхняцький ЧС 37	16,9±0,73	16,7±0,80
Український ЧС 70	17,5±0,77	17,2±0,80
Український ЧС 72	17,1±0,78	16,8±0,84
Іванівсько- Веселоподільський ЧС 84	17,1±0,74	16,7±0,81
Іванівський ЧС 33	16,0±0,79	15,7±0,76
Олександрія	17,7±0,80	17,1±0,78
Білоцерківський ЧС 57	17,9±0,84	17,2±0,84

стресу, який створювали обмеженням поливу до 40% ПВ від контролю та внесенням 2% розчину  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Установлено, що при цьому значно активувалася діяльність ферменту порівняно з контролем. Це проявлялося в помітному підвищенні активності СФС у слабостійких ліній відповідних генотипів (на 3–6% у розрахунку на 1 г тканини листка і на 1 мг білка) і середньостійких (на 18–25%). Особливо помітним було активування СФС у високостійких клітинних ліній, величина якого варіювала в межах 60–99%, що свідчить про їх здатність до адаптації за цих умов (табл. 2). У період подальшого жорсткого стресового впливу (6 діб без поливу та внесення 2% розчину  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) спостерігалось зниження активності СФС в усіх отриманих клітинних ліній із комплексною стійкістю до посухи та засолення (див. табл. 2). Зокрема, у слабостійких ліній її рівень досягав лише 57–58% від контрольного варіанта. Водночас інгібування активності СФС відбувалося також у ліній високостійких

генотипів, де вона знизилася на 8–18% залежно від генотипу.

Виявлені істотні зміни функціональної активності ферменту СФС у досліджених регенерантів клітинних ліній за дії комплексного водного і сольового стресів позначаються на формуванні цукристості коренеплодів (табл. 3). Так, цукристість отриманих ліній буряків цукрових із комплексною стійкістю до посухи та засолення залежно від їх градації становила 15,8–17,2% і знижувалася за цих умов стосовно контрольних рослин на 0,2–0,7%. Активність СФС, що визначається кількома рівнями ендogenous регулювання, пов'язана з інтенсивністю фотосинтезу і досягає максимуму в період інтенсивного цукронакопичення в коренеплоді (75–100 діб) [16]. Оскільки вміст сахарози визначається динамічною рівновагою її синтезу, гідролізу і відтоку, індуковані за дії стресу зміни кількості цього дисахариду можуть бути пов'язані з регуляцією активності ферменту СФС.

## Висновки

*За умов водного і сольового стресів відбуваються значні зміни у функціонуванні ферменту СФС у листках і цукристості коренеплодів, які зумовлюються генотипною стійкістю рослин-регенерантів клітинних ліній із комплексною стійкістю до посухи*

*і засолення. Отже, активність ферменту СФС можна використовувати як біохімічний маркер стійкості за умов первинної діагностики і селекційного відбору рослин-регенерантів буряків цукрових з потенційно високим адаптивним потенціалом.*

**Кляченко О.Л.**

*Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, ул. Героев Оборонь, 15, г. Киев, 03041, Украина; e-mail: Klyachenko@ukr.net*

**Активність сахарозофосфатсинтази в лінійх свеклы сахарной (*Beta vulgaris* L.) с комплексной устойчивостью**

**Цель.** Определение активности фермента сахарозофосфатсинтазы в линиях сахарной свеклы с комплексной устойчивостью к 2-м стрессовым факторам. **Методы.** Лабораторные, вегетационные, математико-статистические. **Результаты.** В процессе адаптации растений к стрессовым факторам у них нарушаются процессы метаболизма, что отражается на угнетении роста и снижении их фотосинтетической активности. Приведены экспериментальные данные по изменению функциональной активности фермента сахарозофосфатсинтазы в условиях действия водного и солевого стрессов в листьях растений-регенерантов и сахаристости корнеплодов клеточных линий свеклы сахарной с комплексной устойчивостью к засухе и засолению.

При проведении экспериментальных исследований сформированные растения-регенеранты клеточных линий свеклы сахарной высотой 10–15 см, которые имели 6–10 настоящих листьев, пересаживали в открытую почву. Приживаемость их в почве составляла 68–80%. Выявленные существенные изменения функциональной активности фермента сахарозофосфатсинтазы в исследованных регенерантов клеточных линий при воздействии комплексного стресса находят подтверждение в формировании сахаристости корнеплодов. При этом особенно ощутимой была активация фермента в высокоустойчивых клеточных линий, величина которого варьировала в пределах 60–99%, что свидетельствует об их способности к адаптации в этих условиях. Установлено, что сахаристость полученных линий свеклы сахарной с комплексной устойчивостью против засухи и засоления в зависимости от их градации была в пределах 15,8–17,2% и снижалась при этих условиях относительно контрольных растений на 0,2–0,7%. **Выводы.** При комплексном стрессе происходят существенные изменения в функционировании

фермента сахарозофосфатсинтази в листях і сахаристості корнеплодів. Активність фермента можна використовувати як біохімічний маркер устойчивості в умовах первинної діагностики рослин-регенерантів свекли сахарної з потенційно високим адаптивним потенціалом.

**Ключевые слова:** свекла сахарная, солевой и водный стрессы, сахарозофосфатсинтаза, растения-регенеранты, сахаристость.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201903-07>

**Kliachenko O.**

National university of bioresources and nature management of Ukraine, Heroiv Oborony Str., 15, Kyiv, 03041, Ukraine; e-mail: [Klyachenko@ukr.net](mailto:Klyachenko@ukr.net)

**Activity of sucrose phosphate synthase in lines of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) with complex stability**

**The purpose.** To determine activity of enzyme sucrose phosphate synthase in lines of sugar beet with complex stability to two stressful factors. **Methods.** Laboratory, vegetative, mathematical-statistical. **Results.** Processes of metabolism break during adaptation of plants to stressful factors. That is reflected in oppression of growth and decrease in photosynthetic activity. Experimental data on change of functional activity of enzyme sucrose phosphate synthase in conditions of action of water and salt stresses in leaves of plants-regenerants

and sugariness of root crops of cellular lines of sugar beet with complex stability to drought and salinization are brought. At experiment the generated plants-regenerants of cellular lines of sugar beet of height 10–15 cm which had 6–10 true leaves were replanted in the open ground. Their survival made 68-80%. The revealed essential changes of functional activity of enzyme sucrose phosphate synthase in researched regenerants of cellular lines at influence of complex stress found confirmation in formation of sugariness of root crops. Thus especially perceptual was activation of enzyme in highly-stable cellular lines which size varied within the limits of 60-99%. That testified to their ability to adaptation in such conditions. It was established that sugariness of the received lines of sugar beet with complex stability against drought and salinization depending on their gradation was within the limits of 15,8–17,2% and decreased under these conditions concerning control plants on 0,2–0,7%.

**Conclusions.** At complex stress there are essential changes in action of enzyme sucrose phosphate synthase in leaves and sugariness of root crops. Activity of enzyme can be used as biochemical marker of stability in conditions of primary diagnostics of plants-regenerants of sugar beet with potentially high adaptive potential.

**Key words:** sugar beet, salt and water stresses, sucrose phosphate synthase, plants-regenerants, sugariness.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201903-07>

**Бібліографія**

1. Дубровна О.В., Моргул Б.В. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля. *Фізіологія і біохімія культурних рослин*. 2009. Т. 41, № 6. С. 463–475.

2. Lestari E.G. Review: In vitro selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance. *Biodiversitas*. 2006. V. 7, № 3. P. 297–301.

3. Mohd M., Khan Taqi A., Firoz M. Effect of abiotic stress on synthesis of secondary plant products: a critical review. *Agricultural Reviews*. 2011. V. 32 (3). P. 172–182.

4. Дубровна О.В., Чузункова Т.В., Бавол А.В., Лялько І.І. Біотехнологічні основи створення рослин, стійких до стресів. Київ: Логос, 2012. 428 с.

5. Yildiz M., Telci C., Onol B., Ozcan S. Oxidative stress in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) in vitro culture. *Bioloji Bilimleri Arastirma Dergisi*. 2011. V. 4 (2). P. 113–117.

6. Saad E., Raja A. In vitro micropropagation of spinach beet (*Beta vulgaris* L.) under effect of salt-stress. *Amer. Soc. Plant. Biol. (ASPB)*. 2003. V. 34, № 4. P. 503.

7. Чузункова Т.В. Використання клітинної селекції для створення стійких форм буряків. *Фізіологія і біохімія культурних рослин*. 2009. Т. 41, № 6. С. 509–515.

8. Lafta A.M., Lorensen I.H. Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. *Plant Physiol*. 1995. V. 109. P. 637–643.

9. Huber S.C. Role of sucrose phosphate synthetase in partitioning of carbon in leaves. *Plant Physiol*. 1983. V. 71, № 4. P. 818–821.

10. Roe J.H. A Colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. *J. Biol. Chem*. 1954. V. 107. P. 15–22.

11. Починок Х.Н. Методи біохімічного аналізу рослин. Київ: Наукова думка, 1976. 333 с.

12. Yordanov I., Vellikova V., Tsonev T. Plant responses to drought, acclimation and stress tolerance. *Photosynthetica*. 2000. V. 38, № 1. P. 171–186.

13. Ho S.-L., Chao Y.-C., Tong W.-F., Yu S.-M. Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanism. *Plant Physiol*. 2001. V. 125, № 2. P. 877–890.

14. Курсанов А.П. Хлоропласт как датчик ассимилятов в растении. Москва: Наука, 1988. 277 с.

15. Павлинова О.А., Холодова В.П. Біохімічні та мембранні аспекти сахаронакоплення. *Нові напрями в фізіології рослин*. Москва: Наука, 1985. С. 252–260.

16. Сакало В.Д. Роль і регуляція ключового фермента біосинтезу сахарози — сахарозофосфатсинтази. *Фізіологія і біохімія культурних рослин*. 2002. № 6. Вып. 34. С. 463–474.

17. Avigad G. Sucrose and other disaccharides. *Plant carbohydrates I. Encyclopedia of Plant Physiol. New series*. 1982. V. 13A. P. 217–348.