

В.І.Редько, Т.М.Недяк, О.К.Драгунова,
О.В.Дубін

КАЛУСОГЕНЕЗ І СОМАКЛОНАЛЬНА МІНЛИВІСТЬ У ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

Метод культури рослинних клітин *in vitro* використовується для вирішення багатьох фундаментальних питань клітинної біології, фізіології і генетики рослин. Проходження клітинами стадії неорганізованого росту *in vitro* приводить до виникнення нових форм - соматоклональних варіантів, які відрізняються від вихідних рослин, як за фенотиповими, так і за генотиповими ознаками, що відкрило можливість використання цього методу в селекційній практиці.

Вивчення соматоклональних варіантів показало, що від прототипу вони відрізняються не тільки за моногенними якісними ознаками, а й за полігенними кількісними, такими як інтенсивність росту, продуктивність, толерантність до несприятливих факторів навколишнього середовища. Мутаційні зміни відбуваються як на рівні геному, так і цитоплазми. Вдалося отримати соматоклональні варіанти, в яких поєднувались ознаки, які неможливо чи важко об'єднати в одному генотипі традиційними методами.

Так, серед соматоклонів, виділили форми рису, в яких поєднана ранньостиглість і довгозерність (2), ранньостиглість і стійкість до знижених температур. Зараз уже отримані селекційно-цінні соматоклональні варіанти пшениці, кукурудзи, люцерни, картоплі, томатів, льону, тютюну та інших культур.

Явище соматоклональної мінливості у цукрових буряків досліджене недостатньо. На вивчення деяких аспектів цього питання були направлені наші зусилля.

Матеріали і методи.

Вихідними матеріалами для експлантів були стерильні рослини селекційних номерів. Для індукції калусу використовували частини листових пластинок та черешків довжиною 3-5 мм. Культивування проводили на модифікованих поживних середовищах Мурасіге і Скуга та Гамборга і Евелєга В₅ при температурі $+ 35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, спочатку в темноті, а потім на світлі, при відносній вологості 70 %. Субкультивування калусної тканини проводили кожні 3-4 тижні.

Індуковані бруньки відділяли від калусу і розмножували мікроклонуванням (3). Над отриманими рослинами-регенерантами проводили спостереження, відмічаючи активність ростових і формотворчих процесів (кількість бруньок і листків, коренестворююча здатність, калусогенез), їхні морфологічні особливості (колір і форма листків та черешків), вивчали електрофоретичні характеристики пероксидаз.

Проводили фенологічні спостереження соматоклональних варіантів, висаджених в поле.

Результати досліджень і їх обговорення.

Розвиток таких напрямків біотехнології як соматоклональна мішлявість, соматична гібридизація та трансгенез неможливі без створення методики, яка дозволяла б отримувати пряму чи непряму (через калусну культуру) регенерацію рослин.

Індукцію калусогенезу одержати порівняно неважко.

Починаючи з перших досліджень, проведених в 60-ті роки вона уже отримана з різних експлантів цукрових буряків (4, 5).

Проте регенерацію із калуса недивлячись на те, що вона описана рядом дослідників (1), не можна назвати регулярною, тобто не у кожного генотипу і не з будь-якого типу калусної тканини її можна індукувати. Кожній рослинній клітині притаманна така властивість, як тотіпотентність, тобто здатність відтворювати новий організм. Для прояву цієї властивості потрібна сукупність багатьох факторів. Тому вивчення складових, які забезпечували б процес регенерації і отримання повноцінних рослин, є дуже важливим.

Аналіз численних літературних даних про вплив екзогенних регуляторів росту та складу поживних середовищ на індукцію калусу у цукрових буряків і регенераційну здатність, показав, що вони дуже розрізнені, в деяких випадках навіть суперечливі, і не піддаються відтворенню. Це пояснюється складністю культивування цукрових буряків в умовах *in vitro* і генотиповою залежністю процесу індукції морфогенних калусів.

Вивчаючи вплив екзогенного цитокініну на процес калусоутворення, встановили, що внесення в модифіковане середовище MS БАП в концентрації 0,1-0,5 мг/л сприяло утворенню калусу. Збільшення концентрації БАП вище 0,5 мг/л приводило до пригнічення процесу калусогенезу.

Слід відмітити, що селекційний номер 23, який має найбільшу здатність до калусогенезу, при мікроклонуванні був найкращим за брунько- та коренестворюючою здатністю.

Таблиця 1
Залежність калусоутворення від генотипу та концентрації БАП

БАП, мг/л	Селекційні номери			
	16	18	23	24
0,1	+ -	+	+	+
0,3	+	+ -	+	+
0,5	+	+	+	+ -
1	- +	- +	-	-
<1	-	-	-	-

- (+) - висока здатність до калусоутворення,
 (+ -) - середня здатність до калусоутворення,
 (- +) - низька здатність до калусоутворення,
 (-) - утворення калусу не спостерігалось.

При оптимальній концентрації БАП для досліджуваних генотипів додавання 2,4-Д і НОК в концентраціях до 0,2 мг/л приводило до зростання калусогенезу.

Таблиця 2
Оптимальні концентрації та співвідношення фітогормонів для різних селекційних номерів цукрових буряків

Селекційний номер	БАП, мг/л	2,4-Д, мг/л	НОК, мг/л
16	0,3	0,1	-
18	0,1	-	0,2
23	0,3	0,1	0,1
24	0,3	0,2	-

Встановлено, що сольовий склад поживного середовища не має принципового значення для індукції калусу. Так, утворення калусу на середовищах на основі MS та B₅ суттєво не відрізнялось. Але додавання в середовище органічних речовин - гідролізату казеїну (100 мг/л), інозитолу (100 мг/л) і аскорбінової кислоти (2,5 мг/л) підсилювало швидкість росту калусу (табл. 3).

Таблиця 3
Залежність росту калусної тканини від органічних речовин

Термін обліку	Розмір калусних глобул (мм)	
	без органічних речовин	з органічними речовинами
15 діб	1,0	1,5
25 діб	2,0	2,5
35 діб	2,5	3,5

В дослідженнях з калусогенезу спостерігали утворення різних типів калусу: твердий і розсіпчастий, білий, жовтий, бурий, здатний до фотосинтезу і нездатний, органігенний. Причиною цього може бути гетерогенність клітин вихідного експланту за морфологічними, цитогенетичними і фізіологічними особливостями. І невідомо, які саме клітини дедиференціювались і дали початок калусній культурі.

Використовуючи модифіковане поживне середовище MS, яке містило БАП (2,0-5,0 мг/л) і 2,4-Д (0,1-0,5 мг/л), отримана регенерація із калусів різних селекційних номерів. Найбільший вихід органігенних калусів (8,9 %) та пагонів на експлант (1,4 шт.) мав селекційний номер 23 (табл. 4).

Таблиця 4
Оптимальні концентрації та співвідношення фітогормонів для регенерації із калусів різних селекційних номерів

Селекційний номер	Концентрація		Органогенні калуси	Пагонів на експлант, шт.
	БАП, мг/л	2,4-Д, мг/л		
16	3,0	0,2	7,6	1,2
18	4,0	0,3	4,2	1,1
23	2,0	0,3	8,9	1,4
24	5,0	0,1	4,3	1,3

Встановлено, що крім гормонального складу середовища, регенерація залежить від наявності органічних речовин. При ви-

користанні Інозиту (200–400 мг/л) і гідролізату казеїну (200 мг/л) процент регенерації значно підвищується.

Таблиця 5

Залежність органогенезу із калусів різних селекційних номерів від органічних речовин

Селекційний номер	Мезоінозит, мг/л	Гідролізат, казеїну, мг/л	Органогенні калуси, %	Пагонів на експлант, шт.
18	200	200	28,6	1,8
18	400	200	30,0	1,3
23	200	200	18,6	2,1
24	300	200	12,4	1,2

Рослини-регенеранти калусного походження були мікроклонально розмножені і їх особливості вивчені в умовах культури *in vitro* та в полі. Встановлені відмінності як у порівнянні з вихідною формою, так і між соматоклональними варіантами. Мікроклонові лінії соматоклональних варіантів відрізнялись в культурі *in vitro* за кольором і формою листків і черешків, їх кількістю, здатністю до коренеутворення і калусогенезу.

Електрофоретичний аналіз пероксидаз культурних рослин дозволив виявити відмінні між лініями за кількістю компонентів та їх електрофоретичною рухомістю. пластинки, розпластану над поверхнею ґрунту розетку, дрібні коренеплоди:

У польових умовах мікроклонові лінії відрізнялись за габітусом. Виділялось три групи рослин. Перша мала редуковані листові пластинки, розпластану над поверхнею ґрунту розетку, дрібні коренеплоди; у другій були хрїновидні листки, ерекційний тип розетки, крупні плоди, третя - не відрізнялась від вихідної форми.

Соматоклони різнилися за строками дозрівання. Серед рослин другого року життя виявлені форми з чоловічою стерильністю. Цікавим є отримання рослин - регенерантів і соматоклональних варіантів з гаплоїдних калусних тканин. Це дозволяє легше виявити селекційно-цінні рецесивні мутації та рідкі рекомбінації.

Для індукції калусогенезу у експлантованих незапліднених насінневих зачатків нами використано 5 варіантів поживних середовищ. Найбільш ефективним виявився той, до складу якого входило 0,2 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л БАП і 0,1 мг/л НОК. Встановлено також, що утворення калусу залежало від генотипу рослини-донора.

Таким чином, виявлення соматональних варіантів з генетично-цінними ознаками дозволить застосувати їх для покращення сортів і гібридів цукрових буряків.

Література

1. Зубенко В.Ф., Редько В.І., Белоус В.Е., Ильенко И.И. Морфогенез в калусной ткани сахарной свеклы // Доклады ВАСХНИЛ. - 1990. - № 1. - С. 21-24.
2. Кучеренко Л.А. Индуцированный морфогенез в культуре тканей риса и его использование для создания исходного селекционного материала // Культура клеток растений и биотехнология. - М.: Наука. - 1986. - С. 211-213.
3. Редько В.І., Ильенко І.І., Павловська Л.Л., Білоус В.О. Методичні рекомендації по мікроклональному розмноженню цукрових буряків. - Київ. - 1997. - С. 10.
4. Catlin D.W. The effect of antibiotics on the inhibition of callus induction and plant regeneration from cotyledons of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Plant Cell Reports. - 1990. - N 9. - P. 385-388.
5. Ritchie G.A., Short K.C., Davey M.R. In vitro shoot regeneration from callus of leaf axils and petioles of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // J. Exp. Bot. - 1989. - N 211. - P. 277-284.