

УДК 581.1.633.63

О.В. ДУБРОВНА, І.І. ЛЯЛКО, О.М. ТИЩЕНКО
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

ОСОБЛИВОСТІ ПРОЦЕСІВ КАЛЮСОГЕНЕЗУ У РОСЛИН БУРЯКІВ РІЗНОГО РІВНЯ ПЛОЇДНОСТІ

Досліджено процеси калюсоутворення у різних селекційно-цінних форм буряків. Показано, що калюсогенез більш інтенсивно відбувається у поліплоїдних форм. Підібрано гормональний склад живильного середовища МС, який дозволяє цілеспрямовано індукувати цей процес у різних генотипів буряків. Встановлено, що найбільш придатними експлантами для індукції пухкого калюсу є сегменти листків рослин-регенерантів 2-3 пасажів.

Вступ. Метод культури клітин, тканин і органів нині є загальноприйнятим і широко впроваджується в багатьох країнах при розв'язанні не тільки теоретичних проблем сучасної біології, але й селекційної практики. Калюсні культури цукрових та кормових буряків успішно використовуються для добору соматоклональних варіантів і урізноманітнення генотипів з цінними ознаками; одержання індукованих мутантів на клітинному рівні та створення форм, стійких до стресових чинників довкілля; отримання трансгенних рослин і одержання дигаметоїдних ліній та поліплоїдних форм [1-7].

Відомо, що калюс у буряків може утворюватися із сім'ядолей, черешків, листків, а також гіпокотилів на живильних середовищах, доповнених фітогормонами у певних концентраціях [8-10]. Для індукції процесів калюсоутворення використовували різні способи оптимізації умов культивування. Зокрема, середовища, що розрізнялись за мінеральним складом і органічними добавками [11]. Показано, що основними індукторами калюсогенезу із експлантів даної культури є гормональні речовини ауксинової та цитокінінової природи [12,13]. Встановлено, що суттєвий вплив на проліферативні процеси мають і фізичні фактори, у тому числі температура та освітлення [14]. Проте, повторити в незалежних умовах методичні аспекти процесів калюсогенезу у різних генотипів буряків вдається рідко. Рослини різних форм проявляють специфічність в умовах *in vitro*, потребують особливого добору компонентів живильного середовища, використання різних тканин в якості експланта. Тому досить часто виникає необхідність індивідуальної розробки специфічних умов, які сприяють процесам калюсогенезу в культурі ізольованих клітин певних генотипів. Слід зазначити, що на сьогодні не існує рутинного протоколу живильного середовища, на якому можливо індукувати з високою частотою

утворення калюсу у різних форм буряків. У зв'язку з цим метою нашої роботи була оптимізація живильних середовищ та дослідження особливостей процесів калюсогенезу у селекційно-цінних форм буряків різного рівня плоідності.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом досліджень були інбредні лінії цукрових буряків з різною загальною комбінаційною здатністю (ЗКЗ), диплоїдні однопасінні чоловічостерильні форми (ЧС-1, ЧС-2), багатопасінні тетраплоїдні запилювачі (ЗБ-1, ЗБ-2) та триплоїдні гібриди (Г-1, Г-2), створені на їх основі, а також диплоїдна чоловічостерильна форма кормових буряків (ЧС-3). Для введення в стерильну культуру використовувалося зріле насіння, яке попередньо витримували 7 діб в холодильній камері при температурі 4°C для стратифікації. Для збільшення кількості неінфікованих проростків насіння механічно звільняли від оплодня. Непошкоджені зародки стерилізували за такою схемою: витримували 2 хвилини в слабкому розчині перманганату калію, 1 хвилину в 70% -вому етанолі; 15 хвилин в 10% -вому розчині гіпохлориду натрію, а потім 5 змін дистильованої стерильної води - 15 хвилин. Для проростання зародки переносили в чашки Петрі на фільтрувальний папір, змочений стерильною водою. Отримані стерильні проростки вихідних материнських рослин пересаджували в стаканчики на безгормональні середовища ДС та МС [15,16]. В якості експлантів використовували сегменти листків та черешків материнських рослин віком в один місяць, які культивували при розсіяному освітленні і температурі $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Ефективність кожного варіанта середовища оцінювали за частотою утворення калюсів з різних експлантів.

Результати досліджень та їх обговорення. Для індукції калюсогенезу із тканин експлантів було проаналізовано декілька відомих регенераційних середовищ, які відрізнялись за складом вітамінів, амінокислот та фітогормонів [2,9,12,17-20]. Використання наведених у літературі живильних середовищ у досліджених нами генотипів призводило до утворення тільки щільного калюсу. Так, при культивуванні різних типів експлантів на середовищі МС, яке містило 2,4-Д у концентрації 0,1- 1,0 мг/л практично у всіх досліджених генотипів утворювався щільний калюс світло-зеленого кольору з частотою 10-80%. Слід зазначити, що у самозапильних ліній процеси калюсогенезу відбувалися при дозі 0,3 мг/л ауксину, в той час, як у гібридів та тетраплоїдних форм калюсоутворення спостерігалось вже при внесенні 0,1 мг/л 2,4 Д.

В табл. 1 представлені дані про частоту калюсоутворення із експлантів черешків декількох ліній цукрових буряків четвертого покоління самозапилення з різною комбінаційною здатністю, що висаджувались на середовище МС, доповнене 2,4-Д у концентрації 0,3 мг/л. Дані таблиці свідчать про певну позитивну тенденцію до підвищення частоти калюсоутворення у генотипів з високою комбінаційною здатністю у співставленні із самозапильними лініями з низькою ЗКЗ.

Нами була перевірена система проліферації калюсу, запропонована Доллі, Сандерсом [15]. За її використання отриманий щільний калюс білого

кольору, який при подальшому вирощуванні не дав пересадної культури в жодного генотипу. Частота утворення калюсу у тетраплоїдних генотипів була значно більшою (табл. 2).

Таблиця 1

Частота калюсоутворення на експлантах черешків диплоїдних самоzapильних ліній цукрових буряків з різною комбінаційною здатністю на середовищі ІМС, доповненому 0,3 мг/л 2,4 Д

Умовний № лінії	Рівень ЗКЗ*	Кількість висаджених експлантів, шт.	Кількість експлантів, що регенерують, шт.	Частота, %
	в	42	27	64,3±7,4
		37	29	78,3±6,8
		49	30	61,2±7,0
		54	18	33,3±7,5
12		51	13	25,5±6,1
17		58	26	44,8±6,5

Примітка. *в - висока ЗКЗ; н - низька ЗКЗ

Таблиця 2

Частота калюсоутворення із експлантів листків у буряків різного рівня плоїдності на безгормональному середовищі МС

Генотип	Плоїдність	Кількість висаджених експлантів, шт.	Кількість експлантів, що регенерують, шт.	Частота, %
ЧС-1	2х	29	7	24,1±7,9*
ЧС-2	2х	37	6	16,2±6,1
ЧС-3	2х	45	10	22,2±6,2
ЗБ-1	4х	43	21	48,8±7,6
ЗБ-2	4х	33	22	66,7±8,2*

Примітка. * Різниця між показниками достовірна при $p \leq 0,05$

Для отримання пухкого калюсу нами була використана система, яка базується на послідовній зміні гормональних та безгормональних середовищ. Для цього материнські рослини культивували на середовищі МС, доповненому БАП у концентрації 0,25 - 0,5 - 1 мг/л протягом одного -

півтора місяця. Треба вказати, що у триплоїдних гібридів на відміну від рослин іншої плоїдності вже в першому пасажі на середовищі з 0,25 мг/л БАП спостерігалось утворення пухкого калюсу на вихідній рослині.

Після витримування материнської рослини інших генотипів на гормональному середовищі з неї вищеплювали експланти і переносили на безгормональне середовище МС. Через декілька тижнів культивування експлантів в умовах розсіяного освітлення на безгормональному середовищі МС спостерігалось утворення пухкого калюсу.

Також для індукції пухкого калюсу були використані експланти, отримані з рослин, які вирощувалися на безгормональних середовищах МС та ДС-2. Сегменти листків та черешків переносили на живильні середовища, доповнені БАП у концентрації 0,5- 2,0 мг/л, і культивували у темряві при температурі 21°C. Через 4 тижні їх субкультивували на відповідне середовище, але вже без регулятора росту, на якому і спостерігалось утворення пухкого калюсу при повному або частковому некрозі вихідного експланта. Найкращі результати отримані нами на середовищі МС при концентрації БАП 0,5 мг/л для генотипів кормових буряків та 1,0 мг/л - для цукрових. При збільшенні дози цитокініну до 2 мг/л процесів калюсогенезу не відбувалося.

Слід зазначити, що час, необхідний для калюсоутворення, варіював у досліджених нами генотипів цукрових буряків різної плоїдності. Так, для тетраплоїдних форм він становив 1-2 тижні, для триплоїдних гібридів - від 2 до 4 тижнів, а у диплоїдних генотипів змінювався від 2 до 10 тижнів. У диплоїдних зразків найшвидше калюс з'являвся у чоловічостерильних форм - протягом 2-3 тижнів, в той час, як для самозапильних ліній він збільшувався до 6-10 тижнів.

Частота калюсоутворення залежала від генотипу рослини, складу живильного середовища, типу експланта. При порівнянні експлантів різного типу встановлено, що для досліджених генотипів цукрових та кормових буряків краще всього калюс утворювався на листках (10-40%) і менше на черешках (5-20%).

Для підвищення частоти калюсогенезу нами було випробовувано декілька прийомів, у тому числі: використання експлантів з материнських рослин, які тричі були пересаджені на середовище МС, доповнене 0,25 мг/л БАП ; використання експлантів з рослин-регенерантів, отриманих шляхом прямого органогенезу на гормональному середовищі РВ [21]. Треба відмітити, що найбільша частота утворення пухкого калюсу спостерігалася із сегментів листків рослин-регенерантів 2-3 пасажів у поліплоїдних генотипів (табл. 3).

З листового експланта диплоїдної рослини кормових буряків чоловічостерильної форми 10-29 селекції фірми KWS (Німеччина) було отримано два типи калюсів. Один з них утворювався на центральній жилці листка і являв собою рихлі глобулярні структури яскраво-жовтого кольору, що легко розділялися на окремі фрагменти.

Таблиця 3

Частота калюсоутворення із експлантів листків у буряків різного рівня плідності на середовищі МС

Генотип	Плідність	Кількість висаджених експлантів, шт.	Кількість експлантів, що регенерують, шт.	Частота, %
ЧС-1	2х	34	12	35,2±8,2*
ЧС-2	2х	57	13	22,8±5,6
ЧС-3	2х	52	15	28,8±6,3
Г-1	3х	59	31	52,5±6,5*
Г-2	3х	39	22	56,4±7,9
ЗБ-1	4х	51	33	64,7±6,7
ЗБ-2	4х	62	36	58,8±6,2

Примітка. * Різниця між показниками достовірна при $p \leq 0,05$

Даний калюс надалі характеризувався нами як морфогенний, тому що вже в перших пасажах спостерігалось утворення вегетативних бруньок. Інший тип калюса з'являвся по краях листкової поверхні і складався з досить рихлих утворень білого кольору, який при подальшому пасажуванні набував коричневого забарвлення. При наступному культивуванні процесів морфогенезу у таких калюсів не спостерігалось, і він віднесений нами до неморфогенного типу.

Нами було проведено порівняльне цитологічне та молекулярно-генетичне дослідження обох типів клітинних культур [22]. Уже на перших пасажах культивування встановлені істотні відмінності як за хромосомним складом клітинних популяцій, так і за частотою аберацій хромосом між калюсами різного типу. У порівнянні з морфогенним калюсом у неморфогенного ступінь поліплоїдизації і частота структурних перебудов хромосом значно вища. На фоні підвищеного рівня геномної мінливості особливістю неморфогенного калюса є утворення надспіралізованих хромосом і конденсованого хроматину у високоплідних клітинах, що супроводжується підвищенням рівня метилування геному [22]. Це може бути однією з епігенетичних детермінант, яка приймає участь в процесах, що в кінцевому підсумку призводять до втрати тотипотентності клітин.

Висновки. Результати досліджень калюсоутворення у різних селекційно-цінних форм буряків свідчать, що цей процес пов'язаний із специфічними особливостями генотипу, у тому числі рівнем плідності геному. Показано, що серед досліджених нами генотипів процеси калюсогенезу більш інтенсивно відбуваються у поліплоїдних форм.

Відмічено певну позитивну тенденцію до підвищення частоти калюсоутворення у генотипів з високою комбінаційною здатністю у співставленні з лініями з низькою ЗКЗ. Підібраний гормональний склад живильного середовища МС₁ який дозволяє цілеспрямовано індукувати цей процес у різних генотипів буряків. Встановлено, що найбільш придатними експлантати для індукції калюсу є листки рослин-регенерантів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Атанасов А.А. Биотехнология в растениеводстве.- Новосибирск: ИЦИГ СО РАН ,1993.- 240с.
2. Свирщевская А.М., Бормотов В.Е. Культура тканей сахарной свеклы.- Минск: Высшейша школа, 1994,- 141 с.
3. Губанова Н.Я., Дубровная 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.-Т. 16, № 3.- С.227-232.
4. Губанова Н.Я., Дубровная О.В.,Чугункова Т.В. Отбор и сравнительный анализ устойчивых к солевому стрессу каллусных культур кормовой свеклы, полученных из эксплантов различной плоидности // Физиология и биохимия культурных растений.-2000.-Т.32, №5.-С. 362-368.
5. Губанова Н.Я., Дубровная О.В.,Чугункова Т.В. Клеточная селекция кормовой свеклы на устойчивость к нескольким стрессовым факторам // Биополимеры и клетка .-2002.- Т. 18, № 3 С. 565-571.
6. Krens F.A., Trifonova A., Keizer L.C.P., Hall R.D. The effect of exogenously-applied phytohormones on gene transfer efficiency in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.)//Plant Sci. — 1996. -N 116.-P. 97-106.
7. Stanys V., Staniene G., Petroniene D. Plant regenerated from unfertilized red beet ovaries // Biologija. - 1996. - № 3 .- P. 72- 73.
8. Krens F.A., Jamar D. The role of explant source and culture conditions on callus induction and shoot regeneration from cotyledons of sugarbeet *Beta vulgaris* L. // J. Plant Physiol. - 1989.- N 134.- P. 651- 655.
9. Банникова М.А., Головки А.Э., Хведыныч О.А., Кучук Н.В. Регенерация растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L) в культуре in vitro. Гистологическое изучение процессов регенерации // Цитология и генетика. — 1995. — Т.29,№ 6. — С. 14—22.
10. Jacq B., Tetu T., Sangwan R. S. Plant regeneration from sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) hypocotyls cultured in vitro and flow cytometric nuclear DNA analysis of regenerants // Plant Cell Rep.—1992 — N 11,—P. 329—333.
11. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. — К.: Наукова думка, 1992. — 154 с.
12. Бормотов В.Е., Долгих А.М. Каллусообразование на листовых эксплантах инбредных линий сахарной свеклы // Тез. докл. межд. конф.:

- «Биология культивируемых клеток и биотехнология». - Новосибирск: ИЦиГ СО РАН.- 1988. - С.17.
13. Kubalakova M. Somatic embryogenesis and cytoplasmic sterility in *Beta vulgaris* L. var. *Saccharifera* // Biol. Plant. - 1990. - Vol.32, N6. - P.414-419.
 14. Owens L.D., Eberts D.R. Sugar beet leaf disc culture: an improved procedure for inducing morphogenesis // Plant Cell Tiss. Org. Cult.- 1992. - N 41.- P. 165-170.
 15. Doley W.P., Sounders G.W. Hormone-free medium will support callus production and subsequent shoot regeneration from whole leaf explants in some sugar beet (*Beta vulgaris* L.) populations // Plant Cell Rep. - 1989. - Vol. 8, N4. - P.222-225.
 16. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol Plant.- 1962.- N15.- P. 473-497.
 17. Farago L, Setnan I. Effect of growth substances on callus induction and morphogenesis of sugar beet // Plant Cell Rep.— 1989.—N 9.—P. 211—213.
 18. Ritchie G. A., Short K. C., Davey M. R. In-vitro shoot regeneration from callus, leaf axils and petioles of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // J. Exp. Bot.-1989.—N 211.—P. 277-284.
 19. Tetu T., Sangwan R., Sangwan-Norreel B. Hormonal control of organogenesis and somatic embryogenesis in *Beta vulgaris* callus // J. Exp. Bot. 1987.- N38.-P. 506-517.
 20. Roussy I., Dubois F., Sangwan R., Sangwan-Norreel B. In planta 2,3,5 triiodobenzoic acid treatment promotes high frequency and routine in vitro regeneration of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants // Plant Cell Rep. -1996.- N16.- P. 142-146.
 21. Freytag A.H., Anand S.C., Rao-Arelli A.P., Owens L.D. An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. *in vitro* // Plant Cell Rep. - 1988. - Vol. 7, N1. - P.30-34.
 22. Дубровная О.В., Тищенко Е.Н. Геномная изменчивость морфогенного и неморфогенного каллуса кормовой свеклы // Цитология и генетика. - 2003. - Т.37, №6. -С. 23-30.

Аннотация

УДК 581.1.633.63

Особенности процессов каллюсогенеза у растений свеклы различного
уровня пloidности

О.В. Дубровная, И.И. Лялько, Е.Н. Тищенко

Изучены процессы каллюсообразования у различных селекционно-ценных форм свеклы. Показано, что каллюсогенез более интенсивно проходит у полиплоидных форм. Подобран гормональный состав питательной среды МС, позволяющий целенаправленно индуцировать этот

процесс у различных генотипов свеклы. Установлено, что наиболее подходящими эксплантами для индукции рыхлого каллюса являются сегменты листьев растений-регенерантов 2-3 пассажей.

Annotathion

UDC 581.1.633.63

Features of processes of callusogenesis of beet plants with different levels of ploidy

O. Dubrovnaya , I. Lyalko, E. Tishchenko

The process of callus induction of different valuable forms of beet has been investigated. It is shown that callusogenesis is more active in polyploid forms. A hormonal complex of nutrient medium MS for callus formation that allows to directly induce this process in different genotypes of beet was found. It was established that the most acceptable explants for induction of friable callus were leaf segments of plant-regenerants of 2-3 passages.