

Т.В. ЧУГУНКОВА, Н.Я. ГУБАНОВА, Л.Ф. РОЗУМНА  
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

ВИВЧЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ОЗНАКИ СТІЙКОСТІ ДО КОМПЛЕКСУ  
СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ У КЛІТИННИХ ЛІНІЙ І РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ  
БУРЯКІВ

Проведено дослідження стабільності ознаки стійкості до комплексу стресових чинників біотичної та абіотичної природи у клітинних ліній та рослин-регенерантів кормових буряків. Встановлено, що ознака стійкості до комплексу стресових факторів у одержаних клітинних ліній була на рівні 66-74%, а у індукованих із них рослин-регенерантів складала 44-54%.

Вступ. Створення вихідного селекційного матеріалу, стійкого до несприятливих факторів довкілля, токсинів патогенів, солей, низьких температур можливо при застосуванні методу клітинної селекції [1]. В умовах *in vitro* на селективних середовищах відбирають клітини з мутантними генотипами, а потім індукують з них рослини-регенеранти, стійкі до селективного фактору. Методами клітинної селекції у буряків одержані калюсні лінії, стійкі до церкоспорозу [2], вірусу мозаїки [3], деяким гербіцидам [4] та солям [5-7] .

Нами вперше були отримані калюсні лінії та рослини-регенеранти кормових буряків, стійкі до токсину збудника бактеріозу [8], та клітинні лінії з перехресною комплексною стійкістю до токсину збудника бактеріозу [9], низьких позитивних температур та одного із типів засолення -хпоридного або сульфатного [10].

Для використання резистентних клітинних ліній в генетичних і біотехнологічних дослідженнях необхідна впевненість у стабільності ознак стійкості у одержаного рослинного матеріалу. Адже відомо, що при тривалому культивуванні ліній відбувається зниження або втрата стабільності прояву ознаки стійкості, а також експресії цієї ознаки в поколіннях [11].

Отримання рослин-регенерантів із резистентних клітинних ліній є однією з важливих і складних задач. У багатьох сільськогосподарських рослин регенерація пагонів з клітин калюсу дуже ускладнена, а частота появи рослин низька. У буряків одним із лімітуючих факторів для широкого впровадження біотехнології в генетико-селекційний процес є відсутність ефективних методів масової регенерації рослин із клітинних ліній, стійких як до окремих, так і до комплексу стресових чинників.

В результаті послідовних відборів нами були отримані калюсні лінії з комплексною стійкістю, стійкі до сублетальних доз токсину збудника бактеріозу буряків, солей - NaCl і Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> та низьких позитивних температур.

Перевірка стабільності ознак стійкості до комплексу стресових факторів у отриманих клітинних ліній та рослин-регенерантів була метою даної роботи.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом дослідження були калюсні лінії з комплексною стійкістю до токсину збудника бактеріозу буряків, низьких позитивних температур і одного із типів засолення - хлоридного ( 3п/1,8п/1,11п/1) або сульфатного ( 3п/2,8п/2,11п/2 ). Вихідним матеріалом для одержання стійких ліній слугувала високоорганогенна клітинна лінія кормових буряків № 25 сорту Панфільська. Перевірку стабільності ознаки стійкості до комплексу стресових факторів проводили шляхом пересадок даних ліній на селективні і контрольне середовище ДС. Селективні середовища містили 40 мг/л токсину, 2,5 % хлориду натрію або 3,0% сульфату натрію.

Частинки калюсної тканини кожного варіанту масою 20 мг розміщували на чашках Петрі по 30 шт. в кожній і вирощували при низьких позитивних температурах. Після пасажування на основному середовищі калюси знову вертали на селективні середовища з вихідними концентраціями стресових чинників. Паралельно з вивченням ознаки стійкості у клітинних ліній, відбирали мікророзетки і пасажували їх так само, які калюси.

Результати досліджень та їх обговорення. Отримані клітинні лінії кормових буряків, резистентні до комплексу стресових чинників, були здатні до регенерації і мали такі морфологічні характеристики: щільний калус з глобулярною структурою світло-жовтого або брунатного кольору на середовищі з 2,5% NaCl і темно-жовтий на середовищі з 3,0% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Порівняно з вихідними лініями (3п,8п,11п), резистентними до токсину і низьких позитивних температур, у одержаних нами ліній з комплексною стійкістю не відмічено значного зниження приросту біомаси при пасажуванні. Визначення стабільності ознак стійкості до комплексу стресових чинників у одержаних ліній проводили, використовуючи розроблену нами систему пересадок на поживні середовища із стресовими чинниками і без них. Загальна схема перевірки стабільності стійкості була така: стійка лінія->середовище ДС ( 3 пасажі ) ^селективне середовище (2 пасажі) ->середовище ДС (2 пасажі) ->селективне середовище (2 пасажі) ->середовище ДС .

Стабільність прояву ознаки резистентності до комплексу стресових чинників у одержаних клітинних ліній була високою і складала 66-74 % (табл.1). Ушкодженими вважали такі калюсні маси (20 мг), які були почорнілими на дві третини і більше. Слід зазначити, що калюсні культури, стійкі до комплексу стресових факторів і сульфатного засолення, краще перенесли перевірку стабільності ознак стійкості протягом 10-ти пасажів.

Таблиця 1

Вживання клітинних ліній кормових буряків з комплексною стійкістю в процесі перевірки стабільності ознаки

Клітинні лінії	Кількість висаджених калюсів, шт	Зберігали нормальний ріст після:			
		3-кратного пасажування на ДС,%	2-кратного пасажування на селективному середовищі, %	2-кратного пасажування на ДС,%	10-ти пасажів, %
3п/1	90	86	83	72	66
8п/1	90	88	85	77	70
11п/1	90	83	78	74	67
3п/2	90	91	88	82	73
8п/2	90	92	88	83	74
11 п/2	90	86	80	75	66

Примітка. Розрахунки проведені, виходячи із кількості первинно висаджених калюсів (90 шт).

В середньому із трьох ліній (3п/2, 8п/2, 11п/2) пересадки витримали 71% висаджених калюсів. У ліній, стійких до хпоридного типу засолення (3п/1, 8п/1, 11п/1), на кінець пересадок життєздатними залишились 66-70% калюсів. Одержані дані свідчать про достатньо високу толерантність одержаних нами клітинних ліній до стресових факторів. Серед 3-ох стійких ліній (3п, 8п, 11п) можна виділити лінію 8п, що характеризувалась найбільшим відсотком виживання після дії всього спектру використаних нами чинників. У лінії 8п/1, стійкої до комплексу стресів і хпоридного засолення виживання калюсів після 10-кратного пасажування за розробленою схемою складало 70%. У ліній 3п/1 і 11п/1 цей показник відповідно був 66% і 67%. У лінії 8п/2 життєздатними після багаторазових пересадок на селективні і контрольні середовища залишилось 74% калюсів. У лінії 3п/2 відповідно 73% і у 11 п/2 - 66% калюсів.

Паралельно з вивченням стабільності ознаки стійкості у клітинних ліній кормових буряків перевіряли стабільність ознаки стійкості до стресових чинників у мікророзеток за приведеною вище схемою.

Виявлено, що виживання індукованих мікророзеток із клітинних ліній з хлоридним типом засолення (3п/1, 8п/1, 11 п/1) після десяти пасажів було на рівні 44-46%, в той час, як із клітинних ліній з сульфатним типом засолення (3п/2, 8п/2, 11п/2) - в межах 50-54% (табл. 2). Краще зберігали нормальний ріст мікророзетки отримані з клітинних ліній 11п/1 та 11п/2. Таким чином, рослини-регенеранти з комплексною стійкістю, у тому числі і до токсину збудника бактеріозу, виявили в умовах *in vitro* стійкість і до самого збудника хвороби.

Таблиця 2

Кількість мікророзеток, стійких до комплексу стресових чинників після перевірки на стабільність ознаки

Лінія	Кількість висаджених мікророзеток, шт.	Зберігали нормальний ріст після 10-ти 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
8 п/2	30	15	50,0
11 п/2	24	13	54,2

Висновки. В результаті проведеної роботи була перевірена стабільність ознаки резистентності до комплексу стресових факторів у одержаних клітинних ліній і рослин-регенерантів кормових буряків. Одержані результати свідчать, що в наших дослідах стійкість до комплексу стресових чинників виявилась стабільною ознакою, що може свідчити про її генетичну обумовленість. Передачу ознаки стійкості потомствам буде перевірено в наступних дослідженнях.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Удовенко Г. В. Устойчивость растений к абиотическим стрессам // Генетические ресурсы и селекция растений на устойчивость к болезням, вредителям и абиотическим факторам среды. - Материалы IX Конгресса ЕУКАРПИА . -Лі. : ВИР, 1991.-С.98-104.
2. Leporine P., Careles N. Selection of sugar beet calli to 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.
3. Жук И.П., Бобырь А. Д., Сахно Т. Н. Вирусоустойчивость растений-регенерантов, полученных из темно-зеленых участков листьев сахарной свеклы// С.-х. биология.-1989.-№ 3.-С.68-70.
4. Горина И. Н. Создание in vitro форм сахарной свеклы, устойчивой к экологически безопасным гербицидам // Методы комплекс, оценки продук. и устойчив, с.-х. растений. -Тез. Научно-методол. совещ., пос. Немчиновка ,15-17 февраля 1994.-М.,1994.-С.10-11.
5. Редько В. В., Редько В. И. Особенности реакции сахарной свеклы на солевой стресс // Генетические исследования сахарной свеклы.- К.: ВНИС.-1991.-С.68-75.
6. Зубенко В. Ф., Ильенко И.И., Редько В.И. Отбор устойчивых к хлоридному засолению форм сахарной свеклы в условиях культуры тканей //Доклады ВАСХНИЛ.-1987.-С. 18-20.

7. 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 ploидности // Физиология и биохимия культ, растений - 2000.-Т.32,№5.-С.416-424.
8. Губанова Н. Я., Дубровная О.В., Чугункова Т. В. Отбор и цитологический анализ устойчивости к токсину *Pseudomonas syringae* pv. aptata клеточных линий кормовой свеклы и регенерантов из них // Цитология и генетика -1999.-Т.33,№4.-С.9-16.
9. 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, №2.-С. 111-120.
- Ю.Губанова Н. Я., Дубровная О. В., Чугункова Т. В. Клеточная селекция кормовой свеклы на устойчивость к нескольким стрессовым факторам // Биополимеры и клетка.-2001.-Т. 17,№5.-С.227-232.
11. Сергеева Л. Е., Левенко Б. А. Солеустойчивость потомства растений-регенерантов, полученных из солеустойчивых клеточных линий табака. // Труды VI съезда Украинского об-ва генетиков и селекционеров им. Н. И. Вавилова-Том III -Полтава: АН Украины.-1992.-С.-134-135.

#### Аннотация

УДК 633.63.581

Изучение стабильности признака устойчивости к комплексу стрессовых факторов у клеточных линий и растений-регенерантов свеклы

Т.В. Чугункова, Н.Я. Губанова, Л.Ф. Розумна

Проверка стабильности стойкости к комплексу стрессовых факторов у клеточных линий и растений - регенерантов свеклы позволила установить, что у клеточных линий она была на уровне 66-74 %, у индуцированных из них растений-регенерантов-44-54%.

#### Annotation

UDC 633.63.581

The investigation of stability of trait of resistance to the complex of stress factors in cell lines and plant-regenerants of beet

T. Chugunkova, N. Gubanovа ,L. Rozumna

The control of stability in the resistance to the complex of stress factors for cell lines and plant-regenerants of beet makes it possible to establish that it made up 66 to 74 % and 44 to 54 % in cell lines and induced regenerants, respectively.