

УДК 633.63:573.6:581.143.6

Н.С. БЕХ, зав. сектором культури клітин і тканин *in vitro*

В.І. ВОЙТОВСЬКА, науковий співробітник

Т.М. НЕДЯК, науковий співробітник

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України

СУСПЕНЗІЙНА КУЛЬТУРА КЛІТИН ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

Створено умови отримання суспензійної культури клітин цукрових буряків зі стійкою швидкістю росту. Розроблено живильне середовище, на якому індуковано ембріогенез та органогенез з клітин суспензії, визначено особливості їх перебігу.

Ключові слова: культура клітин, цукрові буряки, суспензія

Вступ. Культура *in vitro* дозволяє експериментально впливати на клітини і отримувати з них рослини зі зміненим морфогенезом, які в подальшому є вихідним матеріалом для селекційно-генетичних досліджень. Оскільки в культивованих клітинах відбуваються складні фізіологічні процеси і перебудова генома, клітинна популяція в умовах *in vitro* характеризуються фізіологічною, цитологічною і генетичною гетерогенністю. Біотехнологічні методи передбачають використання генотипової мінливості клітинних культур. Причиною виникнення неоднорідності у рослин – регенерантів є генотипова мінливість соматичних клітин під впливом специфічних факторів культурального середовища. Відомо, що уже отримана клітинна лінія з високим вмістом алкалоїдів внаслідок обробки етиленіном калусних клітин *Rauvolfia serpentina* – продуцента інодольних алкалоїдів [1]. Дослідниками також вдалося виявити клони люцерни, конюшини і цукрових буряків з високим регенераційним потенціалом, який використовують для клітинної селекції на стійкість до хвороб, підвищеної засоленості ґрунту та інших несприятливих факторів [3, 6]. В Інституті фізіології рослин ім. К. А. Тімірязєва отримана серія мутантів із різним спектром стероїдних сполучень і кількістю сентизуючого продукту діосгенина. Вченими проведено цитологічне вивчення культури тканин на кукурудзі, часнику і іншими культурами [2, 4, 5].

Матеріали та методика досліджень. Вихідним матеріалом для отримання суспензії клітин слугував рихлий світло-бурого кольору калус. Він був індукований за довгострокового культивування бруньок цукрових буряків (упродовж трьох місяців) на модифікованому середовищі Гамборга і Евелєга, що містив низькі концентрації вітамінів і гормонів. Із 20 дослідних колб тільки в двох утворився рихлий крупинчастий калус в місцях дотику бруньок відмираючих нижніх листків з середовищем. Половину калусної глобули (маса 0,56 г) розміщали в рідке живильне середовище Гамборга і Евелєга з підвищеним вмістом вітамінів, гормонів і цукрози. Потім колби з енокулятом калусних клітин культивували з аерацією в режимі 120 об/хв. за температури 24-26 °С, відносної вологості 70 %, освітленні 6-8 клк і 16-годинному фотоперіоді. Через два тижні вміст колби ділили на дві частини, кожна із яких розміщували на свіже живильне середовище. У подальшому використовували тільки культуральну речовину, яка містить клітинні агрегати, а потемнівші калусні частини видаляли.

Життєздатність суспензійних клітин визначали під мікроскопом. Після обробки фарбуючим 0,1 % -им розчином феносафраніна живі клітини залишалися не зафарбованими. У них спостерігали такі особливості: як цитоплазматичні тяжі, ядра та циркуляцію цитоплазми. Неживі клітини були зафарбовані в червоний колір. Під мікроскопом визначали ступінь агрегації клітин, що діляться. Виділяли поодинокі клітини і агрегати розміром 2-5, 6-21, 22-50 і більше 50 клітин.

Динаміку росту клітин суспензії і їх цитологічні характеристики (форма, розміри, способи ділення) вивчали при фазово-контрасному мікроскопіюванні (мікроскоп NF “Zeis”, фотонасадка МФН-10).

Щільність суспензії визначали числом клітин у камері Фукс-Розенталя (після мацерації тканин і агрегатів в 15 %- ній хромовій кислоті при 70 °С упродовж 10 хвилин) за формулою:

$$X = \frac{M \cdot 100}{3,2}, \text{ де}$$

\check{O} – число клітин у 1 мл;

M – середнє із 6 підрахунків.

Результати досліджень. У результаті 10 пасажів отримали суспензію клітин цукрових буряків світло-жовтого кольору зі стійкою швидкістю росту. Проби для вивчення динаміки росту, життєздатності і щільності клітин суспензії відбирали з інтервалом дві доби (рис. 1).

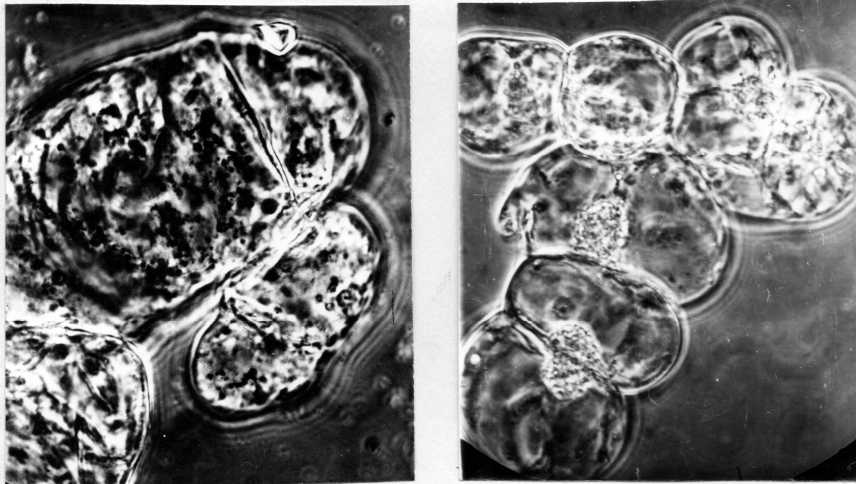
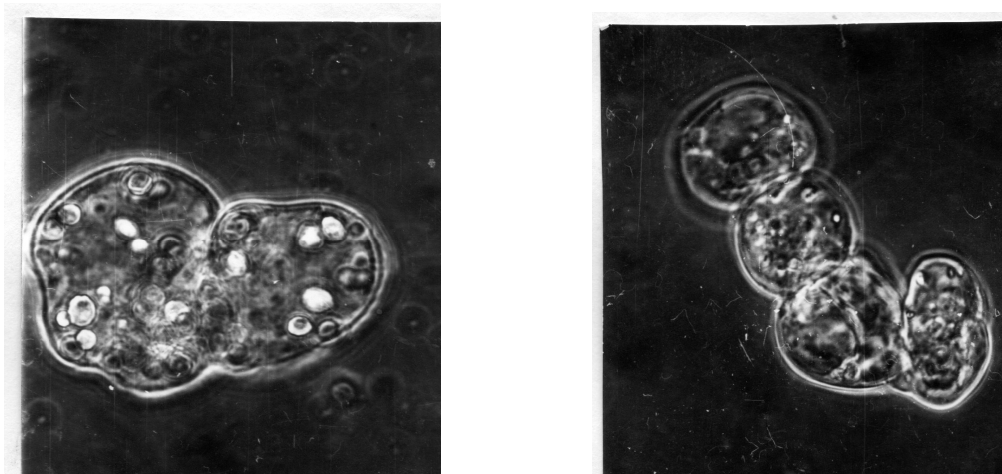


Рис. 1. Клітинні агрегати суспензії цукрових буряків

Вільноживучі суспензійні клітини цукрових буряків мали в основному округлу або подовжену форму, а не багатокутову, як клітини тканин. Також було помічено разом з клітинами середнього розміру, клітини дуже маленькі або гігантські поодинокі, чи у вигляді ланцюжків, а також невеликих або великих агрегатів (рис. 2).



а) поодинокі клітина, що ділиться;

б) ланцюжок клітин.

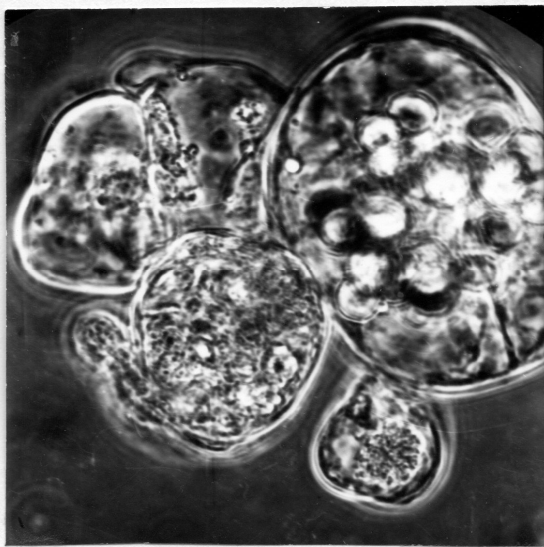
Рис. 2. Типи клітин суспензійної культури цукрових буряків

Поодинокі клітини було мало, частіше утворювалися невеликі агрегати (6-20 клітин), число яких збільшувалося на п'яту добу культивування. У подальшому число їх зменшувалося, але переважали агрегати від 21 до 50 клітин. На 9 добу культивування

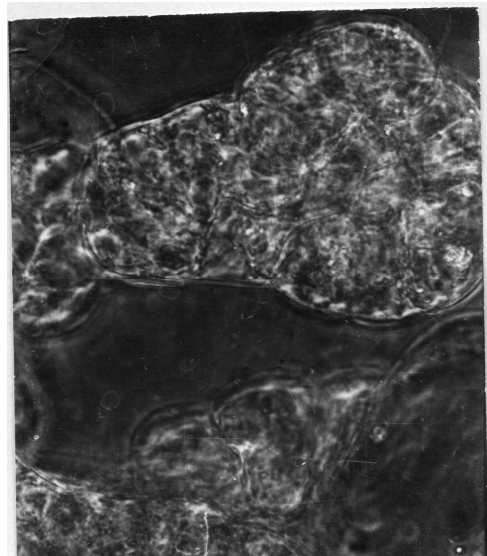
продовжувалося зменшення кількості мало-клітинних агрегатів, а великоклітинних – збільшувалося. Поодинокі клітини або були відсутні, або склали не більше 1-2 % від їх загальної кількості. Так, на 5 добу було відмічено незначну кількість зниження щільності, потім різке збільшення на 7 - 9 добу. Щільність суспензії в середньому складала $9 \cdot 10^5$ клітин на 1 мл при співвідношенні суспензії до середовища як 1:40.

У перші дні культивування суспензійні клітини були найбільш життєздатними (85,5 - 90,2 %).

У суспензійній культурі у клітинах цукрових буряків було відмічено різні способи клітинного поділу. Поряд з нормальним мітозом було відмічено і аномальні способи поділу: брунькування, сегментація, ендомітоз. Серед суспензійних клітин і клітинних агрегатів спостерігали утворення зародкових структур, які нагадували утворення, які виникають при формуванні проембрію із зигот (рис. 3).



а) брунькоутворення



б) створення ембріодних структур

Рис. 3. Поділ клітин цукрових буряків в суспензійній культурі

За вирощування суспензійних культур у рідкому живильному середовищі з додаванням фітогормонів індукували ембріогенез і органогенез. Утворені ембріоїди пересаджували на агаризоване живильне середовище без фітогормонів для регенерації із них рослин (рис. 4).

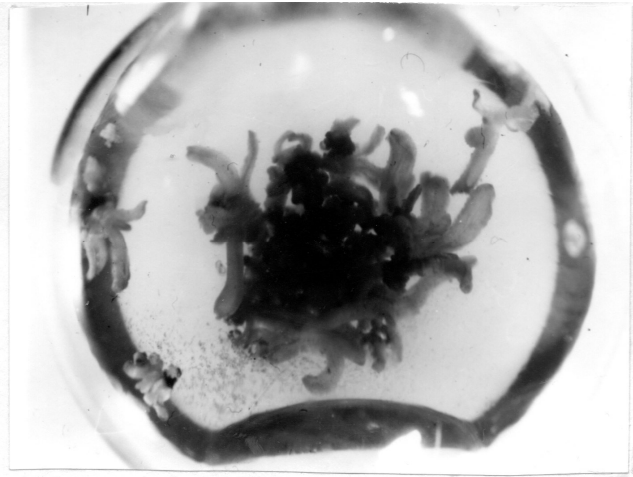


Рис. 4. Регенерація бруньок в суспензійній культурі цукрових буряків

Висновки. Результати проведених нами цитологічних досліджень визначено форми поділу при удосконаленні режимів культивування суспензійних клітин і регенерації із них рослин, а також у клітинній селекції.

Список використаних літературних джерел

1. Бутенко Р. Г. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения // Культура клеток растений и биотехнология. – М., 1986. – С. 3-20.
2. Долежел Й., Новак Ф. И. Кариологические изменения в ходе дифференцировке клеток чеснока (*Allium sativum* D.) // Культура клеток растений и биотехнология. – М., 1986. – С. 3-25.
3. Мезинцев А. В., Любавина Л. А., Карелина Н. А. Культура клеток в селекции клевера и люцерны // Доклады ВАСХНИЛ. – 1982. – №7. – С. 7-10.
4. Савченко Е. В., Кунах В.А. Сравнительная характеристика культуры тканей двух родственных линий кукурузы, различающихся по количеству гетерохроматина // Культура клеток растений и биотехнология. – М., 1986. – С. 214-218.
5. Ярмолюк Г. И., Ильенко И. И., Бех Н. С., Белоус В. Е. Динамика роста суспензионной культуры клеток сахарной свеклы // Биотехнологические методы в селекции сахарной свеклы. – М.: Агропромиздат, 1989. – С. 58-63.
6. De Greef W., Jacobs M. In vitro culture of the Sugar beet: description of a zell line with hick regeneration capacity // Plant Science Lett. – 1979. –17. – P. 55-61.

Аннотация

Бех Н. С., Войтовская В. И., Недяк Т. Н.

Суспензионная культура клеток сахарной свеклы

Созданы условия получения суспензивной культуры клеток сахарной свеклы со стабильной скоростью роста. Разработана питательная среда, на которой индуцирован эмбриогенез и органогенез с клеток суспензии, определены особенности их прохождения.

Ключевые слова: культура клеток, сахарная свекла, суспензия

Annotation

Bech N., Voytovska V., Nedyak T.

Suspension culture cells of Sugar beets

The conditions obtaining suspension cell culture of sugar beet with a stable growth rate. Designed nutritious medium, which is induced embryogenesis and organogenesis from suspension cells, identified features of their passing.

Keywords: culture cells, sugar beet, suspension

УДК: 633.63:631.527

С.М. БРОВКО, завідувач сектору генетичних ресурсів рослин
Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України

УСПАДКУВАННЯ ОЗНАКИ СТІЙКОСТІ ДО ГЛЮФОСИНАТУ АМОНІЮ ПРИ СТВОРЕННІ ПІЛКОСТЕРИЛЬНИХ МАТЕРИНСЬКИХ КОМПОНЕНТІВ ЦЧС ГІБРИДІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

Наведено результати досліджень з характеру успадкування ознаки стійкості до глюфосинату амонію при створенні ліній цукрових буряків на ЦЧС основі та проаналізовано розщеплення після самозапилення у вихідних трансгенних лініях O-типу та в їх гібридних ЦЧС потомствах. Встановлено, що трансгенна ознака успадковувалась як домінантна моногенна за менделівським типом.

Ключові слова: трансгенні цукрові буряки, лінії O-типу, цитоплазматична чоловіча стерильність(ЦЧС), глюфосинат амонію.