

УДК 576.535:633:78

**МОРФОГЕНЕЗ Ba^{2+} -РЕЗЗИСТЕНТНИХ КАЛЮСНИХ ЛІНІЙ
ЦИКОРІЮ КОРЕНЕПЛІДНОГО ТА ЗБЕРЕЖЕННЯ ОЗНАКИ
СТІЙКОСТІ РЕГЕНЕРАНТАМИ ПРИ ПЕРЕХОДІ З КЛІТИННОГО
РІВНЯ НА РІВЕНЬ ЦІЛІСНОЇ РОСЛИНИ**

Л.О. РЯБОВОЛ, доктор сільськогосподарських наук

А.І. ЛЮБЧЕНКО, кандидат сільськогосподарських наук

Уманський національний університет садівництва

Наведено результати досліджень щодо отримання регенерантів з клітинних ліній цикорію коренеплідного стійких проти дії іонів барію та ретестування рослинного матеріалу. Відібрано клони, які зберігають ознаки стійкості проти стресового чинника на рівні інтактної рослини.

Ключові слова: цикорій коренеплідний, хлорид барію, стрес, стійкість, рослини-регенеранти, калюсна лінія.

Одними із найшкідливіших факторів навколишнього середовища є іони важких металів. Навіть у незначних дозах вони негативно впливають на живі організми. Надходження важких металів до навколишнього середовища та їх вплив на біооб'єкти зумовлене взаємодією природних (фоновий вміст елементів у ґрунті) та антропогенних факторів [1]. Важкі метали порушують мінеральне живлення, пригнічують інтенсивність фотосинтезу і дихання та активність ділення клітин, зменшують вміст пігментів у листках, що призводить до зниження життєздатності та продуктивності організму або його загибелі [2, 3].

Ведення рослинництва на землях, забруднених іонами важких металів, вимагає застосування спеціальних організаційно-господарських та агротехнічних прийомів. Використання нових високоврожайних, адаптованих до умов вирощування сортів і гібридів є одним із найефективніших, найдешевших та екологічно чистих способів підвищення врожайності сільськогосподарських культур в умовах стресу [4]. Для цикорію коренеплідного, цінної сільськогосподарської культури різнобічного призначення, це питання особливо актуальне [5]. Відсутність високоврожайних, пластичних сортів, стійких проти несприятливих чинників навколишнього природного середовища — основна причина, яка стримує розширення площ під цикорієм коренеплідним.

При використанні біотехнологічних методів відбувається економія експериментальних площ, створюються умови для роботи з біооб'єктами незалежно від погодних умов, скорочуються затрати часу на добір рослинних форм з бажаними ознаками, а це сприяє підвищенню ефективності селекційного процесу. Система клітинної культури забезпечує можливість повного контролю фізичних та трофічних параметрів вирощування рослинного матеріалу та моделювання впливу стресового агента на організм, що важко досягти при роботі з інтактними рослинами [6]. Проте при проведенні селекції на клітинному рівні виникають певні негативні моменти. По-перше, це складність отримання рослин-регенерантів внаслідок втрати тканиною здатності до морфогенезу. Окрім того, стійкість проти стресу на клітинному рівні не завжди зберігається на рівні цілої рослини. Це явище виникає внаслідок, так званого, «фізіологічного звикання» клітин або їх «перехресного живлення» [7].

Метою досліджень було отримання клітинних ліній та рослин-регенерантів цикорію коренеплідного, стійких проти іонів важких металів. Як селективний агент обрали солі хлориду барію (Ba^{2+}), який є одним із найменш токсичних металів і тому використовується як модельний стресовий чинник у дослідженнях на стійкість проти стронцію, кобальту та інших важких металів. Навіть у незначних кількостях іони барію призводять до сильного стресу в рослинних організмах.

Методика досліджень. У дослідженнях з клітинної селекції цикорію коренеплідного використовували модифіковані середовища Шенка-Хильдебрандта, до яких додавали як селективний агент різні концентрації (0,25; 0,5; 1,0; 1,5 мМ) хлориду барію. Отримані мікрокалюси цикорію коренеплідного висаджували на середовища з стресовим чинником та проводили добір стійких форм. Під час ступінчастої клітинної селекції вдалось відібрати клітинні лінії з максимальною стійкістю проти стресового чинника (гранична концентрація $BaCl_2$ в живильному середовищі становила 1,0 мМ). З метою отримання рослин-регенерантів відібрані клітинні лінії переносили на регенераційні живильні середовища за прописом Мурасіге-Скуга, які модифікували підвищеними концентраціями цитокінінів (1,0–1,2 мг/л 6-БАП).

Регенерацію проводили як у присутності стресового агента, так і без нього (контрольний варіант). Концентрацію його обирали з таким розрахунком, щоб створювався високий стресовий тиск, але калюси повністю не втрачали здатності до морфогенезу. Біоматеріал культивували при інтенсивності освітлення 4 кЛк, 16-годинному фотоперіоді, температурному режимі 20–24°C та відносній вологості повітря 75%.

Одержаний рослинний матеріал цикорію коренеплідного після мікроклонального розмноження на розроблених нами модифікованих ростових живильних середовищах [8], для проведення ретестування переносили в селективні умови вирощування з максимально допустимою концентрацією стресового чинника.

Результати досліджень. Калюсна тканина цикорію коренеплідного відзначається високими показниками регенерації. При створенні оптимальних умов вирощування морфогенез відмічено у 88,8 % калюсних тканин (інтенсивність морфогенезу становила 35–42 регенерантів з одного мікрокалюса масою 50–60 мг). Процес морфогенезу проходив як шляхом органогенезу, так і соматичного ембріоїдогенезу.

Хлорид барію здійснює сильний токсичний стрес на калюсну тканину цикорію коренеплідного. При тривалому культивуванні біоматеріалу в селективних умовах поряд зі зниженням ростових показників спостерігали істотне пригнічення морфогенних характеристик калюсних тканин. Регенераційна здатність відібраних мікрокалюсів зберігалась впродовж трьох пасажів. Відібранні стійкі проти стресових факторів клітинні лінії цикорію коренеплідного характеризувалися індивідуальними показниками морфогенезу як на середовищах зі стресовими чинниками, так і в контрольному варіанті (табл. 1).

Найінтенсивніше морфогенез проходив у першому пасажі на живильних середовищах без селективного фактора. Залежно від генотипу інтенсивність його становила від 3,67 до 7,35 рослин з одного мікрокалюса. З кожним наступним субкультивуванням показники регенерації знижувались на 45,7–73,7 %.

1. Морфогенез калюсних ліній цикорію коренеплідного стійких проти дії іонів барію

Калюсна лінія	Пасаж	Умови проведення регенерації	Інтенсивність морфогенезу, шт. рослин з одного мікрокалюсу (маса 50–60 мг)	Отримано рослин-регенерантів	
				на середовищах без селективного фактора, %	на середовищах у присутності селективного фактора. %
99ССК153	I	Контроль	6,64±2,3	68,1±3,1	31,9±2,7
		BaCl ₂	3,32±1,8		
	II	Контроль	2,67±0,9		
		BaCl ₂	1,41±1,4		
	III	Контроль	1,43±1,3		
		BaCl ₂	0,33±0,6		
99ССК162	I	Контроль	3,67±1,7	62,1±2,7	37,9±2,5
		BaCl ₂	2,34±1,1		
	II	Контроль	1,62±1,0		
		BaCl ₂	0,95±0,6		
	III	Контроль	0,68±1,0		
		BaCl ₂	0,33±0,3		
97ССК150	I	Контроль	5,28±2,3	69,6±3,4	30,4±3,0
		BaCl ₂	2,31±1,7		
	II	Контроль	3,52±1,9		
		BaCl ₂	1,68±1,1		
	III	Контроль	1,62±1,1		
		BaCl ₂	0,65±1,0		
97ССК168	I	Контроль	7,35±1,7	64,4±3,7	35,6±2,4
		BaCl ₂	4,37±2,0		
	II	Контроль	4,13±1,8		
		BaCl ₂	2,43±0,8		
	III	Контроль	1,36±0,7		
		BaCl ₂	0,28±0,7		

Інтенсивність морфогенезу барійстійких клітинних ліній впродовж трьох пасажів у середньому за генотипом становила 2,51 регенеранти з одного мікрокалюсу. Присутність хлориду барію в регенераційних середовищах знижувала отримання рослин-регенерантів на 49,2 % порівняно з контрольним варіантом.

Найвищими показниками інтенсивності морфогенезу характеризувалась клітинна лінія 97ССК168, з якої одержали 59 рослин-регенерантів. Порівняно з іншими матеріалами генотипи 97ССК168 та 99ССК162 меншою мірою реагували на присутність селективного фактора в регенераційному

середовищі.

В результаті проведеної клітинної селекції із барійстійких калюсних ліній всього було регенеровано 181 рослину, з них 33,7 % рослин отримано на селективних середовищах у присутності іонів барію. Для визначення стійкості отриманих матеріалів на рівні цілісної рослини, рослини-регенеранти культивували на середовищах з селективним чинником у максимально допустимій концентрації (табл. 2).

2. Вживання рослин-регенерантів, при ретестуванні в присутності селективного чинника

Калюсна лінія	Пасаж	Умови проведення регенерації	Вживання рослин регенерантів			
			залежно від умов проведення регенерації, %	загалом за генотипом, %	отриманих у контрольному варіанті, %	отриманих у присутності селективного чинника, %
99ССК153	I	Контроль	62,4±4,2	72,3±3,8	68,8±3,5	80,2±4,2
		ВаCl ₂	80,2±3,7			
	II	Контроль	75,6±3,4			
		ВаCl ₂	78,2±3,5			
	III	Контроль	93,5±4,0			
		ВаCl ₂	100±3,3			
99ССК162	I	Контроль	63,6±3,7	75,9±4,2	72,2±3,4	81,2±3,7
		ВаCl ₂	71,4±3,2			
	II	Контроль	80,0±2,8			
		ВаCl ₂	100±2,2			
	III	Контроль	100±2,8			
		ВаCl ₂	100±3,0			
97ССК150	I	Контроль	43,7±3,2	65,2±3,2	59,4±2,8	78,6±2,6
		ВаCl ₂	80,0±3,6			
	II	Контроль	61,6±3,0			
		ВаCl ₂	85,5±2,4			
	III	Контроль	100±2,7			
		ВаCl ₂	100±2,3			
97ССК168	I	Контроль	60,4±4,2	74,6±3,5	71,1±3,0	80,9±3,2
		ВаCl ₂	76,9±3,8			
	II	Контроль	75,0±3,3			
		ВаCl ₂	85,7±2,4			
	III	Контроль	100±2,6			
		ВаCl ₂	100±2,5			

Не всі рослинні матеріали, отримані з резистентних до стресового чинника калюсних ліній, зберігали ознаки стійкості, виживання їх в середньому становило 71,8 %. У рослинних ліній, які отримали на контрольних регенераційних середовищах, цей показник залежно від генотипу становив 59,4–72,2 %. При ретестуванні рослинного матеріалу, регенованого в присутності селективного фактора, цей показник був вищим на 11,6 %, і в середньому за генотипом складав 80,2 %.

Значно впливає на збереження ознаки стійкості на рівні цілісної рослини тривалість вирощування біоматеріалу за присутності в живильному середовищі хлориду барію. Регенеранти, отримані після третього культивування, забезпечували майже стовідсоткове виживання при їх повторному вирощуванні на середовищах зі стресовим чинником.

Висновки. Хлорид барію створює високий стресовий тиск на калюсну тканину цикорію коренеплідного. При проведенні регенерації відселектованих клітинних ліній в присутності селективного чинника спостерігалось зниження морфогенних показників порівняно з контрольним варіантом на 38,9–56,2 %. При ретестуванні рослинні лінії, отримані в присутності селективного фактора, забезпечують виживання 78,6–81,2 % матеріалу, що на 15,5 % вище, ніж лінії, отримані на контрольних регенераційних середовищах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ягодин Б.А. Влияние металлургических шлаков на прорастание семян и содержание тяжелых металлов в почве и растениях при длительном взаимодействии с почвой / Б.А. Ягодин, Н.В. Решетникова, Али Мохамед Аль-Мосава. // Агрехимия. — 1994. — № 9. — С. 22–24.
2. Гамзикова О.И., Барсукова В.С. К изучению генетического контроля устойчивости мягкой пшеницы к кадмию и никелю // Изоген. линии и генет. коллекции. Матер. 2 Совещ., Новосибирск, 23–25 марта, 1993 / РАН СО. Ин-т цитол. и генет. — Новосибирск: Институт цитологи и генетики, 1993. — С. 101–103.
3. Кириллова Г.В. Влияние избыточных концентраций Cu и Ba в среде выращивания на основные физиологические процессы // Человек. Природа. Общество. Актуал. пробл. — Межвуз. конф. мол. ученых, Санкт-Петербург, 25 февраля. — 1 марта, 1992г. Тез. докл., СПб., 1992, Ч. 2. — С. 63.

4. Молоцький М.Я., Васильківський С.П., Князюк В.І., Власенко В.А. Селекція і насінництво сільськогосподарських рослин: Підручник. — К.: Вища школа, 2006. — 463с.
5. Яценко А. О. Цикорій коренеплідний: Біологія, селекція, виробництво і переробка коренеплідів: Навчальний посібник. / А. О. Яценко— Умань: ФІЦБ УААН, 2003. — 161 с.
6. Сергеева Л.Е. Изменение культуры клеток под воздействием стресса. / Л.Е. Сергеева — К.: Логос, 2001. — 98 с.
7. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция / В.А. Сидоров Под. ред. Глеба Ю.Ю.; АН УССР. Отделение клеточной биологии и инженерии Ин-та ботаники им. Н.Г. Холодного. — К.: Наук. думка, 1990. — 280 с.
8. Рябовол Л.О., Парій Ф.М., Яценко А.О., Труш С.Г., Любченко А.І. Патент на корисну модель № 24325 від 25.06. 2007 р. (Україна). Спосіб активації розвитку меристем та розмноження рослин цикорію коренеплідного; Заявл. 21.02.2007; Опубл. 25.06. 2007, Бюл. № 9. — 3 с.

МОРФОГЕНЕЗ Ba^{2+} -РЕЗИСТЕНТНЫХ КАЛЛУСНЫХ ЛИНИЙ ЦИКОРИЯ КОРНЕПЛОДНОГО И СОХРАНЕНИЕ ПРИЗНАКА УСТОЙЧИВОСТИ РЕГЕНЕРАНТАМИ ПРИ ПЕРЕХОДЕ С КЛЕТОЧНОГО УРОВНЯ НА УРОВЕНЬ ИНТАКТНОГО РАСТЕНИЯ
Л.О. Рябовол, А.І. Любченко

Установлено, что присутствие ионов бария в питательной среде создает сильное стрессовое давление на каллусную ткань и растения-регенеранты цикория корнеплодного. Отобраны клоны, сохраняющие устойчивость к действию хлорида бария на уровне целостного растения.

Ключевые слова: цикорій корнеплодний, хлорид бария, стресс, устойчивость, растения-регенеранты, каллусная линия.

MORPHOGENESIS OF Ba^{2+} -RESISTANT CALLUS LINES OF COMMON CHICORY AND PRESERVATION OF RESISTANCE FEATURES BY REGENERANTS WHILE CHANGING FROM CELLULAR LEVEL TO THE LEVEL OF THE ENTIRE PLANT
L.O. Riabovol, A.I. Lyubchenko

The results of studying Ba^{2+} -tolerance callus lines of chicory common cultivated in vitro are presented in this paper. The correlation of survive explants, increase callus between level salinity nutritious culture was identified. The using of selective culture was selected Ba^{2+} -tolerance callus lines of chicory common.

Key words: common chicory, barium chloride, stress, resistance, plant regenerant, callus lines.

Л.О. Рябовол, А.І. Любченко
Україна, 20305, Умань, Черкасская обл.,
ул. Институтская 1, п/о «Софиевка-5»,
e-mail: usau@usau.ic.ck.ua, телефони: 0995342730, 0982252741.