

УДК 606:58.04:633.854.79

ДОСЛІДЖЕННЯ СТІЙКОСТІ МОРФОГЕННОГО І НЕМОРФОГЕННОГО
КАЛЮСУ ОЗИМОГО РІПАКУ (*BRASSICA NAPUS L.*) ПРОТИ
СОЛЬОВОГО СТРЕСУ

О. Л. КЛЯЧЕНКО, кандидат біологічних наук

Н. В. ШОФОЛОВА, аспірантка*

*Представлені результати досліджень дії сольового стресу на процеси калюсо- і морфогенезу в культурі ізольованих тканин озимого ріпаку (*Brassica napus L.*). Доведена перевага використання морфогенних калюсів для селекційних процесів *in vitro*. Отримані експериментальні дані і висновки, є основою для розробки методу ступінчастої клітинної селекції на солестійкість для отримання цінного селекційного матеріалу озимого ріпаку.*

Ключові слова: солестійкість, ріпак, морфогенез, калюсогенез, клітинна селекція.

Абіотичні стреси вважають однією з причин втрати понад 50% врожаю більшості сільськогосподарських культур [7]. Одним із стресових чинників навколишнього середовища, який завдає вагомих збитків сільському господарству, є засолення ґрунтів, що пов'язане зі зрошенням та інтенсивним використанням добрив. Високий рівень засолення є причиною дисбалансу іонів, створення токсичного рівня цитоплазматичного натрію, водного стресу. Сольовий і водний стреси спричиняють порушення основних біосинтетичних функцій, в тому числі і процесу фотосинтезу й вуглеводневого метаболізму [5]. Різномічне вивчення регенерації рослин озимого ріпаку (*Brassica napus L.*) на підвищений

*Науковий керівник – кандидат біологічних наук О.Л. Кляченко

вміст солей в природному середовищі і в експериментальних умовах дозволяє виявити багато морфологічних, фізіологічних і біохімічних механізмів солестійкості [2,3].

Метою досліджень було вивчення особливостей дії NaCl на процеси калюсогенезу і морфогенезу у сортів озимого ріпаку (*Brassica napus L.*) *in vitro* для розробки методів клітинної селекції на стійкість проти засолення.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом для досліджень слугували рослини озимого ріпаку сортів Антарія, Чорний велетень і гібриду НК Технік. Для отримання калюсних тканин як експлантати використовували листові пластинки й їх сегменти. Калюсні культури культивували на модифікованому агаризованому живильному середовищі за прописом Мурасіге і Скуга (МС) [6]. Для ініціації калюсогенезу використовували живильне середовище МС з додаванням аденіну – 10мг/л, гіберелової кислоти (ГК) – 0,05мг/л, 6-бензиламінопурину (6-БАП) – 0,5мг/л і нафтилоцтової кислоти (НОК) – 0,5мг/л. Отримані калюси пасирували на живильне середовище такого самого складу кожні 24 доби культивування.

Для вивчення впливу засолення калюсні тканини переносили на калюсогенне живильне середовище з додаванням NaCl у концентраціях 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2%. Контролем слугувало середовище без додавання NaCl. У кінці циклу вирощування визначали масу калюсних тканин, ростовий індекс (PI), який розраховували як відношення приросту маси калюсної тканини до початкової маси експлантату і PI у відсотках до контролю. При ступінчатому відборі калюси культивували на середовищі з додаванням 0,4% NaCl (перший пасаж) і з 0,6% NaCl (другий пасаж).

Для індукції морфогенезу калюсні тканини переносили на середовище МС з додаванням кінетину – 0,25мг/л. Через 24 доби культивування на регенераційному середовищі визначали частоту морфогенезу, як кількість калюсів з бруньками і пагонами у відсотках від загальної кількості проаналізованих калюсів. Калюсні

культури вирощували в темновій культуральній кімнаті за регульованої температури $+25 - 26^{\circ} \text{C}$ і відносної вологості 80%. Морфогенні калюсні тканини і проростки вирощували в світловій культуральній кімнаті з 16-годинним фотоперіодом (інтенсивність освітлення 3000 – 4000 лк). Отримані рослини-регенеранти згодом переносили на ризогенне живильне середовище - $\frac{1}{2}$ МС + 0,5мг/л НОК + 3мг/л БАП.

Рослини з достатньо розвинутою кореневою системою висаджували в стерильний ґрунт і періодично поливали розчином макро- та мікросолей за прописом МС з додаванням 30 г/л сахарози. Під час аналізу впливу засолення на розвиток меристемних культур здійснювали експлантацію меристем вихідних сортів і отриманих стійких ліній рослин-регенерантів на контрольне середовище та середовище з додаванням 1%-ного NaCl.

Результати досліджень та їх обговорення. Для багатьох видів рослин при моделюванні сольового стресу в живильне середовище вводять NaCl, Na_2SO_4 або солі морської води. [1,3,4]. В наших дослідженнях за створення селективних середовищ використали хлоридне засолення. Основною задачею на перших етапах була оцінка дії різноманітних концентрацій NaCl на приріст калюсної маси. Для цього в кінці циклу вирощування протягом декількох пасажів визначали PI і приріст відносно контролю. Встановлено, що концентрація 0,2 NaCl здійснювала селективну дію, знижуючи приріст калюса (рис.1). При культивуванні протягом чотирьох пасажів приріст калюса на цьому середовищі знижувався відносно контролю в середньому на 45 %. Концентрації NaCl вище 1% мали летальну дію, призводячи до повного пригнічення проліферації калюсу, його почорніння і некрозу. Для добору стійких проти засолення ліній озимого ріпаку (*Brassica napus* L.) на цьому етапі досліджень було доцільним використовувати, як сублетальну 0,6%-ну концентрацію NaCl, за якої протягом двох пасажів спостерігали незначний приріст – у середньому до 5% відносно контролю. Проте при цьому

виділялось до 15 – 25% калюсних ліній, які на селективному середовищі мали 8 – 25% приросту відносно контролю, а після позбавлення селективного навантаження поступово нарощували масу.

Для отримання стійких ліній досліджуваних генотипів озимого ріпаку доволі успішним є спосіб ступінчатого добору, при якому поступово підвищується рівень стресового фактора на середовищі з додаванням 0,2 % NaCl (перший пасаж) – 0,4% NaCl (перший пасаж) та 0,6% (другий пасаж). Такий варіант добору дозволив підвищити приріст калюсних тканин в 3 – 4-му пасажах порівняно з прямим добором і отримати три стійких лінії з PI 1,5 – 2.

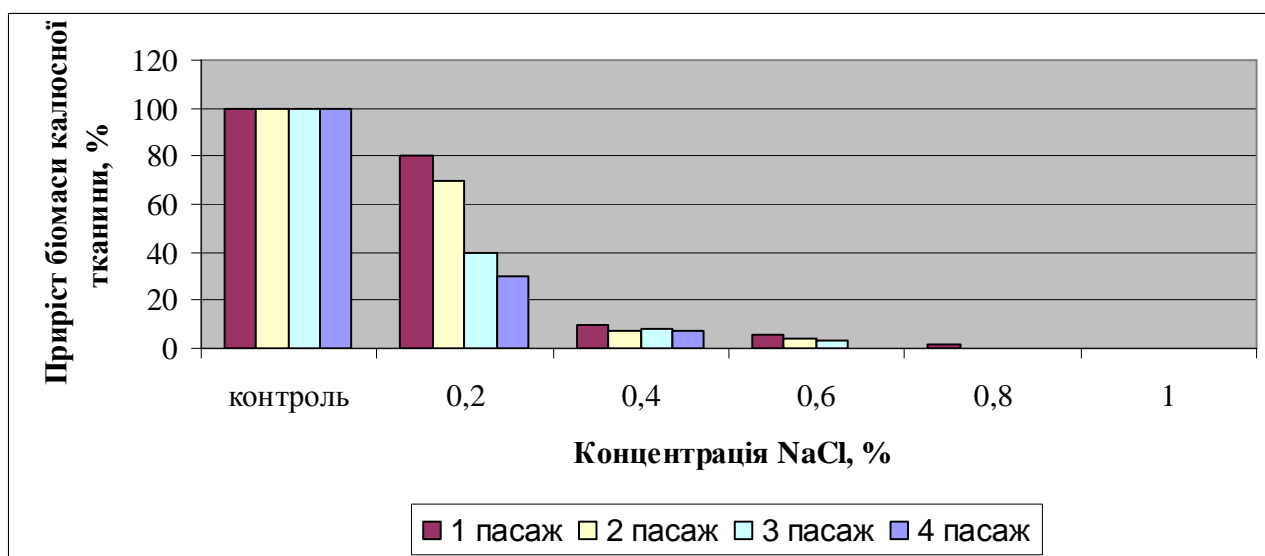


Рис. 1. Загальна динаміка зміни ростового індексу неморфогенного калюсу досліджуваних генотипів залежно від концентрацій NaCl у живильному середовищі

Під час перенесення отриманих стійких ліній на регенераційне середовище здатність до морфогенезу зберігалася. Частота його знижувалась з підвищенням концентрації стресового фактора і тривалості культивування (рис.2). Проте навіть за перенесення ліній, відібраних на середовищі з 0,6%-ною NaCl, на середовище для індукції морфогенезу, спостерігали приріст маси і частоти морфогенезу протягом 1 – 4 пасажів. Слід відзначити, що у відібраних ліній морфогенез

проходив повільніше, ніж у контролі, відзначали затримку розвитку пагонів, утворення великої кількості анатомічно неправильних проростків.

Відібрані на середовищах з NaCl стійкі лінії переносили на регенераційне середовище без селективного навантаження. При цьому сублетальна концентрація солі була не дуже високою – 0,6% NaCl.

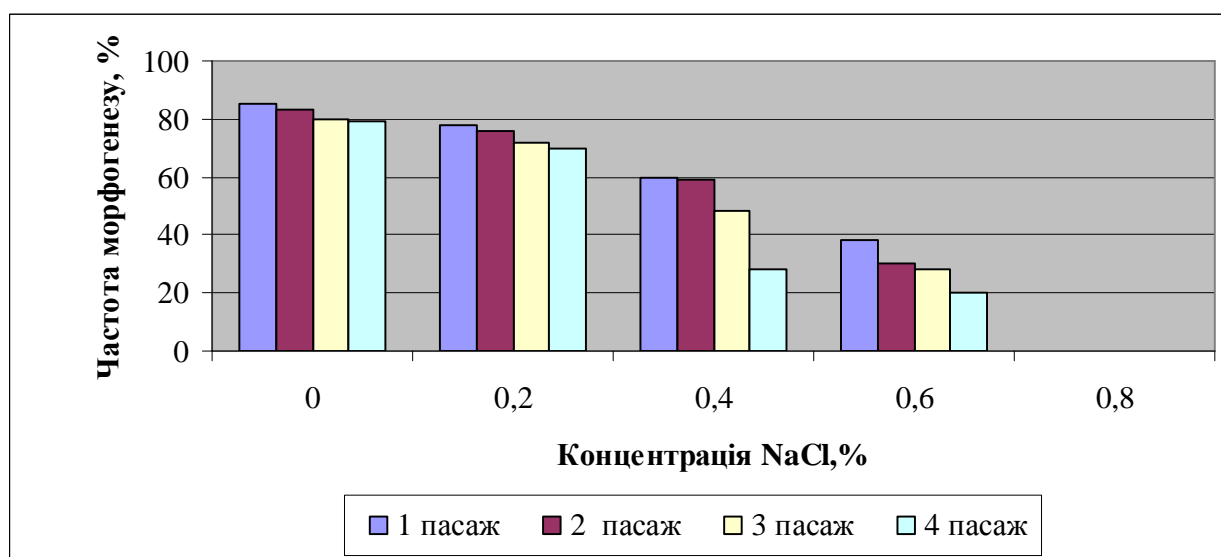


Рис. 2. Загальна динаміка індукції морфогенезу досліджуваних генотипів за перенесення неморфогенного калюсу озимого ріпаку на регенераційне середовище під впливом різних концентрацій NaCl у живильному середовищі для калюсогенезу

Далі досліджували дію хлоридного засолення за додавання NaCl у живильне середовище для індукції морфогенезу. Неморфогенні калюси культивували на середовищі для калюсогенезу без селективного фактора, а потім переносили на регенераційне середовище з додаванням різних концентрацій NaCl. Найбільша сублетальна концентрація солі становила 1% і відзначалась найвища проліферація калюсних тканин порівнянно з морфогенним калюсом – протягом трьох пасажів спостерігали 15 – 30% приросту біомаси калюсу відносно контролю (рис.3.).

Протягом першого пасажу калюсів на регенераційному середовищі з 0,8%-ним NaCl, спостерігали активне утворення зелених меристематичних центрів. Бруньки і невеликі пагони з'являлися тільки в наступному, другому пасажі. Стійкі рослини з достатньо розвинутою кореневою системою висаджували в стерильний ґрунт і періодично поливали розчином макро- та мікросолей за прописом МС з додаванням 30 г/л сахарози.

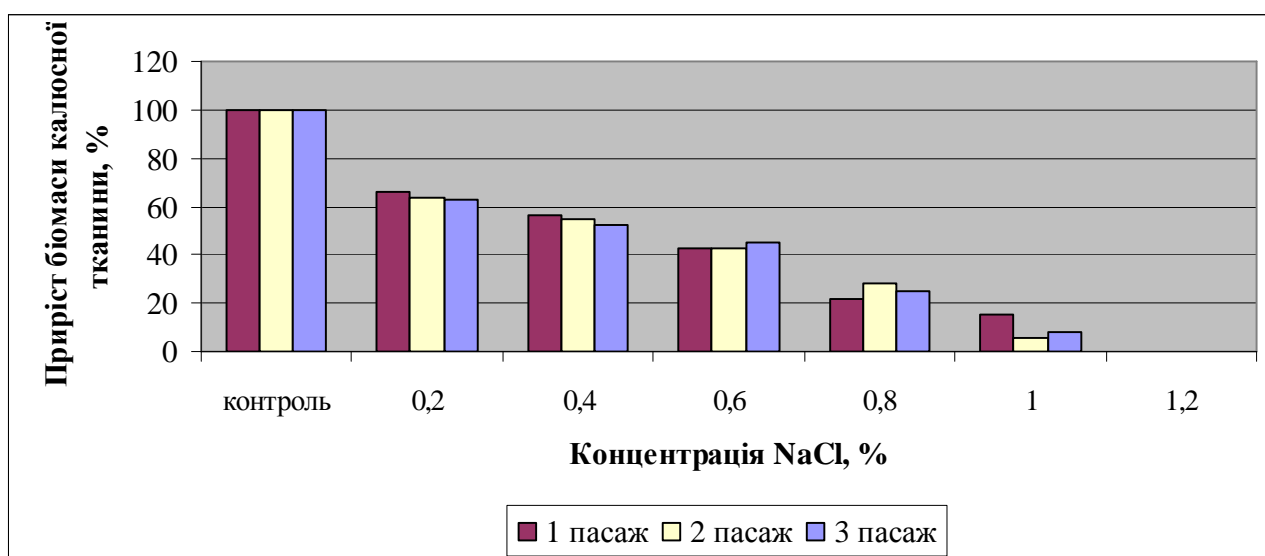


Рис. 3. Загальна динаміка зміни ростового індексу калюсних тканин досліджуваних генотипів озимого ріпаку (*Brassica napus* L.), залежно від концентрацій NaCl у регенераційному живильному середовищі

Висновки

1. Проведені дослідження впливу засолення на процеси калюсо- і морфогенезу в озимого ріпаку (*Brassica napus* L.) дозволили виявити сублетальну концентрацію NaCl для неморфогенного калюсу – 0,6 %.
2. При дослідженні дії хлоридного засолення на процес індукції морфогенезу сублетальна концентрація солі становила 1 % і відзначалась найвища проліферація калюсних тканин порівнянно з морфогенним калюсом.

3. Експериментально відзначена перевага прийому селекції на солестійкість при введенні NaCl у живильне середовище для індукції морфогенезу і проведення доборів морфогенних калюсних ліній на фоні стресового фактора.

4. Отримані експериментальні дані є основою для розробки методу ступінчатої клітинної селекції на солестійкість для отримання цінного селекційного матеріалу озимого ріпаку.

Список літератури

1. Губанова Н. Я. Отбор и сравнительный анализ устойчивости к солевому стрессу каллюсных культур кормовой свеклы, полученных из эксплантов различной ploидности / Губанова Н. Я., Дубровная О. В., Чугункова Т. В. // Физиология и биохимия культурных растений. – 2000. – Т. 32, № 5. – С. 362–368.
2. Косулина Л. Г. Физиология устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды / Косулина Л. Г., Луценко Э. К., Аксенова В. А. – Ростов н/Д.: Изд-во Ростов. ун-та, 2007. – 236 с.
3. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. / В. А. Сидоров – К.: Наук. Думка, 1990. – 280 с.
4. Тугай Ю. А. Реакція калюсних культур буряків (*Beta vulgaris* L.) на сольовий стрес / Тугай Ю. А., Чугункова Т. В., Розумна Л. Ф. // Фактори експериментальної еволюції організмів / Зб. наук. праць. – К.: Логос., 2006. – С. 515–518.
5. Meyer S. Heterogeneous inhibition of photosynthesis over the leaf surface of *Rosa rubiginosa* L. during water stress and abscisic acid treatment induction of a metabolic component by limitation of CO₂ diffusion / S. Meyer, B. Genty // *Planta*. – 1999. – Vol. 210. – № 1. – P. 126 – 131.

6. Murasige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / Murasige T., Scoog F. // *Physiol. plant.* – 1962. – Vol. 15. – P.473–497.
7. Swindell W.R. Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways / W.R. Swindell, M. Huebner, A.P. Weber // *BMC Genomics.* – 2007. – № 8. – P. 125 – 131.

Исследование устойчивости морфогенного и неморфогенного каллюса озимого рапса (*Brassica napus* L.) к солевому стрессу

О.Л. Кляченко, Н.В. Шофолова

Представлены результаты исследований действия солевого стресса на процессы каллюсо- и морфогенеза в культуре изолированных тканей озимого рапса (*Brassica napus* L.). Доказано преимущество использования морфогенных каллюсов для селекционных процессов *in vitro*. Полученные экспериментальные данные и выводы, являются основой для разработки метода ступенчатой клеточной селекции на солеустойчивость с целью получения ценного селекционного материала озимого рапса.

Ключевые слова: *солеустойчивость, рапс, морфогенез, каллюсогенез, клеточная селекция.*

The investigation of salt stress resistance of morphogenic and nonmorphogenic callus of winter rapeseed (*Brassica napus* L.)

O.L. Klyachenko, N.V. Shofolova

Presented the results of research actions on salt stress processes callusogenesis and morphogenesis in tissue culture isolated winter oilseed rape (*Brassica napus* L.).

Proved advantage of using morphogenic callus for selection processes in vitro. The experimental data and conclusions are the basis for the development of cell selection method for stepwise salt resistance to obtain valuable breeding material winter rapeseed.

Key words: *salt resistance, rapeseed, morphogenesis, callusogenesis, cell selection.*