

УДК 578.083:633.81

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ОСНОВ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ ЛАВАНДЫ *IN VITRO* НА УСТОЙЧИВОСТЬ К NaCl

Егорова Н. А.

Институт эфиромасличных и лекарственных растений НААНУ, Симферополь, yegorova.na@mail.ru

Исследованы особенности действия солевого стресса на развитие каллусных тканей лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.) в течение нескольких пассажей. Выявлены сублетальные концентрации NaCl, при которых были отобраны устойчивые линии. Показано влияние на солеустойчивость каллусных культур исходного пассажа, сорта, мутагенной обработки колхицином и длительности действия стрессового фактора.

Ключевые слова: *Lavandula angustifolia*, клеточная селекция, каллусогенез.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных возделываемых на Украине эфиромасличных растений является лаванда узколистая (*Lavandula angustifolia* Mill.). Широкое применение этого вида связано, прежде всего, с наличием у него эфирного масла, а также фенольных соединений, кумаринов, дубильных и других биологически активных веществ [7]. Эфирное масло лаванды активно используется в медицине, как ранозаживляющее, успокаивающее и спазмолитическое средство, а также в парфюмерно-косметической и пищевой промышленности, в керамическом, лакокрасочном, фарфоровом производствах.

Получение новых высокопродуктивных и пластичных сортов лаванды может быть успешным только при наличии разнообразного исходного селекционного материала, при этом важную роль играет создание генотипов, устойчивых к абиотическим стрессам, и, в частности, к засухе, засолению почв. Среди современных методов биотехнологии одним из эффективных подходов в решении этой проблемы является клеточная селекция, позволяющая отбирать резистентные клетки и ткани в селективных условиях *in vitro* [3, 6, 8]. Несмотря на то, что работы по клеточной селекции интенсивно ведутся у многих сельскохозяйственных растений, общих методических подходов на сегодняшний день не имеется, поэтому для каждого вида необходимо оптимизировать многие параметры этой клеточной технологии – объекты и схемы селекции *in vitro*, селективный фактор, его сублетальные дозы и длительность действия, условия для регенерации растений из устойчивых линий и другие. При создании селективного фона в клеточной селекции на засухоустойчивость, наряду с традиционными осмотиками, часто используется неионный осмотик NaCl, так как он позволяет моделировать не только солевой, но и осмотический стресс и получать соле- и засухоустойчивые формы [1, 3, 6, 9, 12].

Литературные данные по исследованию культуры изолированных тканей и органов различных видов рода *Lavandula* в основном касаются вопросов клонального микроразмножения, а также индукции каллусо- и морфогенеза [2, 11, 13, 14]. Изолированные культуры отдельных видов лаванды активно

использовались и для изучения особенностей биосинтеза некоторых вторичных метаболитов – фенольных кислот, пигментов, биотина, терпеноидов [10, 15, 17]. Проблемы клеточной селекции были затронуты только в работе А. М. Sodi с соавторами при изучении солеустойчивости каллуса лавандина [16], а также при отборе высокопродуктивных штаммов-продуцентов биотина у *L. vera* [17]. В задачи нашего исследования входило изучение закономерностей действия NaCl на развитие каллусных культур у сортов лаванды узколистной с целью разработки методических основ клеточной селекции на устойчивость к осмотическому стрессу.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили ткани и органы лаванды (*L. angustifolia*) сортов Степная и Синева. Для получения каллуса в качестве эксплантов использовали сегменты листьев растений. Приготовление питательных сред, введение в культуру и культивирование проводили с применением традиционных методик, принятых в работах по культуре тканей [4]. Индукция и культивирование каллуса осуществлялись с использованием разработанных ранее модификаций среды Мурасиге и Скуга [2]. Каллусные ткани пассировали каждые 30–40 суток, масса трансплантов составляла 90 мг. В опытах по изучению влияния солевого стресса каллус переносили на среды с добавлением NaCl в концентрациях от 0,1 до 1,0%. Контролем служило культивирование на среде без этой соли. В конце цикла выращивания определяли ростовой индекс (РИ), который рассчитывали как отношение прироста массы сырого каллуса к массе транспланта.

При мутагенной обработке каллусные транспланты переносили на среду с введением 100,0 мг/л колхицина, а через 14 суток пассировали на среды с селективным фактором. Цитофизиологические исследования в цикле выращивания каллуса лаванды проводили согласно разработанным методическим рекомендациям [2]. Каллусные культуры культивировали в пробирках при температуре 26°C, 70%-ой влажности и интенсивности освещения 600 люкс, с 16-часовым фотопериодом.

Все эксперименты были повторены не менее 2–3 раз, а полученные данные обработаны статистически с использованием программы Microsoft Office Excel 2003. На диаграммах представлены средние арифметические и доверительные интервалы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании действия NaCl на процессы каллусо- и морфогенеза у лаванды на начальных этапах использовали неморфогенные каллусные культуры, полученные из листовых эксплантов, и анализировали влияние разных концентраций этой соли, исходного пассажа каллуса, сорта, продолжительности стрессового воздействия и питательной среды, используемой после снятия стресса.

Установлено, что при добавлении в питательную среду 0,2% NaCl у обоих сортов при использовании каллусов 1-го и 4-го пассажей происходило достоверное снижение ростового индекса каллуса по сравнению с контролем (рис. 1).

Дальнейшее увеличение концентрации соли привело к более сильному угнетению роста каллусных тканей, что особенно ярко проявилось при использовании для селекции исходного каллуса 1-го пассажа. Сублетальная доза у обоих сортов в этом варианте опыта составила 0,6–0,7% NaCl (прирост массы каллуса к контролю до 7,5%). При больших концентрациях соли наблюдалось полное угнетение пролиферации и некроз каллусной ткани. Следует отметить, что применение различных вариантов ступенчатого отбора (при повышении содержания соли с 0,5 до 0,9%) не показало преимущества по сравнению с отбором при одной дозе NaCl.

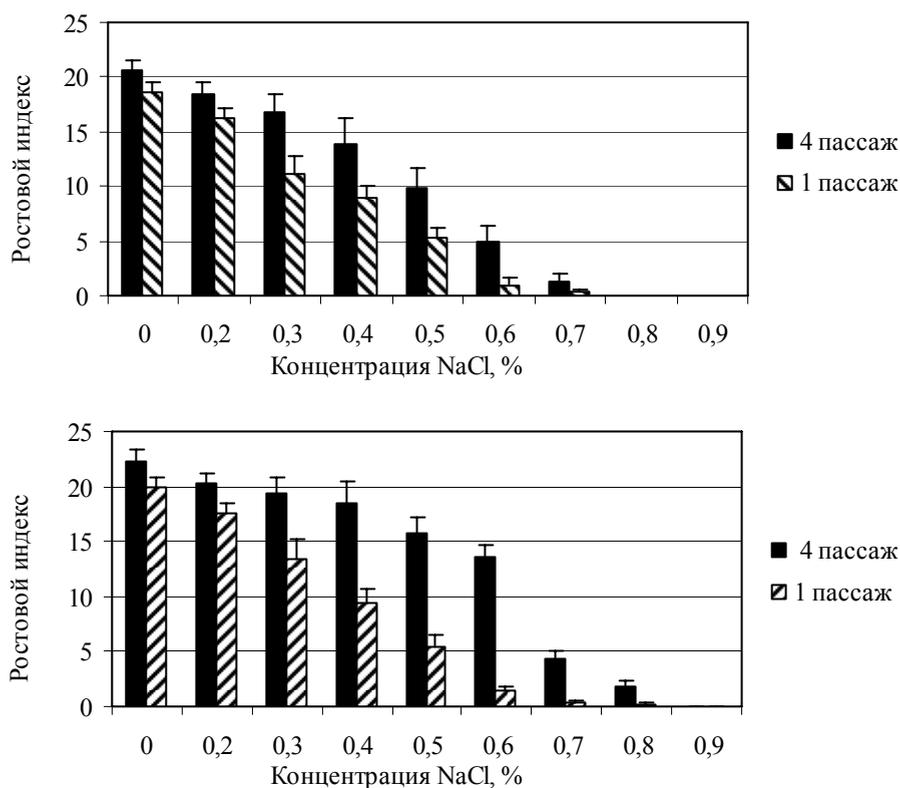


Рис. 1. Влияние концентрации NaCl и исходного пассажа на прирост массы каллуса (ростовой индекс) лаванды сортов Степная (вверху) и Синева (внизу)

При использовании в схеме клеточной селекции исходного каллуса 4-го пассажа у обоих сортов был отмечен лучший прирост по сравнению с первым пассажем (рис. 1). В частности, у сорта Синева при 0,6% NaCl РИ составил 13,6 (60,9% от контроля), а при использовании каллуса 1-го пассажа – всего 1,5 (7,2 % от контроля). Учитывая более высокий прирост биомассы у культур 4-го пассажа, можно было отбирать больше солеустойчивых линий с более высоким РИ и при более высоких концентрациях NaCl. При проведении клеточной селекции с

культурами 4-го пассажа сублетальная концентрация NaCl у сорта Синева (0,8%) была выше по сравнению с первым пассажем (0,7%). И хотя прирост клеточных линий к контролю при сублетальных дозах был в среднем не очень велик (6,2–8,5%), однако можно было отобрать гораздо больше устойчивых клеточных линий. При сублетальных дозах NaCl пролиферация каллуса наблюдалась не более 2–3 пассажей, однако после снятия селективной нагрузки и перевода отобранных линий на среду для каллусогенеза происходило почти полное восстановление ростовой активности каллусных культур.

Следовательно, для клеточной селекции на устойчивость к NaCl у лаванды предпочтительно использовать исходные каллусы 4-го пассажа. Лучший прирост таких культур на стрессовом фоне и более эффективный отбор солеустойчивых линий, по-видимому, обусловлен большей генетической гетерогенностью клеточной популяции более позднего пассажа по сравнению с первым пассажем и появлением устойчивых генотипов. Это может быть связано с усилением генетической изменчивости соматических клеток при длительном культивировании каллусов, продемонстрированным для ряда видов в исследованиях В. А. Кунаха [5].

Полученные данные также могут косвенно свидетельствовать о большей солеустойчивости сорта Синева по сравнению со «Степной» на уровне изолированных тканей (рис. 1). Каллусные культуры сорта Синева имели более высокие ростовые индексы (особенно при высоких концентрациях соли) и сублетальную дозу NaCl, по сравнению с сортом Степная (соответственно 0,8 и 0,7%).

При дальнейшем усовершенствовании схемы клеточной селекции на солеустойчивость для усиления изменчивости каллусных клеток была испытана предварительная мутагенная обработка. Для этого каллусы после культивирования две недели на среде с колхицином переводили на среды с NaCl. Установлено, что у сорта Синева такая обработка позволила повысить эффективность отбора и отобрать больше клеточных линий (с приростом до 20% от контроля), по сравнению с вариантом без мутагенной предобработки. В частности, без колхициновой предобработки при 0,7% NaCl РИ в среднем был $1,1 \pm 0,2$, а в варианте после колхициновой обработки – $2,7 \pm 0,4$. При этом выделялись клеточные линии с ростовым индексом до 5–6. По-видимому, этап мутагенной обработки целесообразно включать в схему клеточной селекции при использовании каллусов ранних 1–2 пассажей, что может усилить изменчивость клеточной популяции.

В следующей серии опытов было изучено влияние длительности действия стрессового фактора на пролиферацию каллусных культур. Для этого отобранные при трех концентрациях (0,25; 0,5; 0,75% NaCl) клеточные линии сорта Степная субкультивировали при исходной концентрации соли в течение шести пассажей (рис. 2). Как видно из представленных данных, при селективных концентрациях 0,25 и 0,5% NaCl культивирование каллусных линий было возможно в течение, как минимум, 6-ти пассажей, при этом ростовой индекс снижался соответственно с 89,3 до 43,5% и с 50,0 до 8,4% к контролю. При культивировании отобранных линий на среде с сублетальной концентрацией NaCl (0,75%) прирост биомассы отмечался в течение трех пассажей (РИ составил до 17% от контроля), а в 4-м почти не было

отрастающих каллусов. При проведении последовательного многоэтапного отбора на фоне 0,5–0,75% NaCl в течение 3–6 пассажей были выделены устойчивые к засолению клеточные линии лаванды и дана их характеристика по некоторым показателям. В частности, при изучении динамики изменения цитофизиологических параметров клеточной популяции в цикле выращивания у устойчивой линии было показано снижение скорости прироста биомассы, по сравнению с контрольной линией, а также увеличение в 1,5–2 раза плотности каллусной ткани и изменение соотношения клеток меристематического и паренхимного типов, что может быть обусловлено действием солевого и осмотического стрессов.

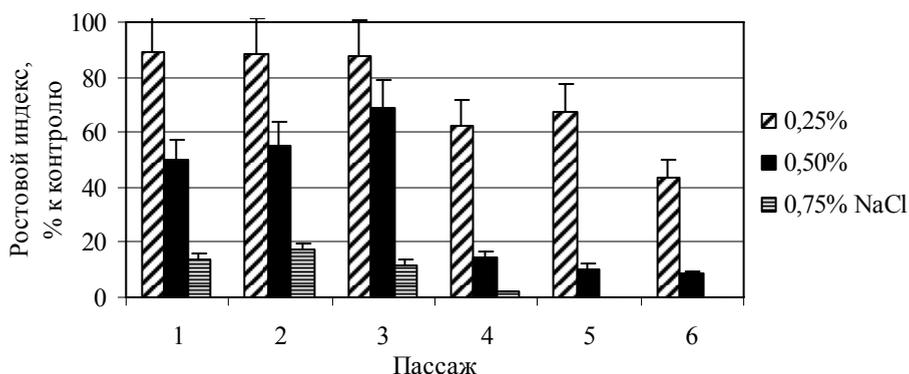


Рис. 2. Влияние длительности пассирования и концентрации NaCl на ростовой индекс каллуса лаванды сорта Степная (% к контролю)

В различных исследованиях по клеточной селекции в качестве объектов для отбора применяются каллусные ткани, суспензионные культуры, а иногда, изолированные органы [1, 3, 6, 8, 12]. В представленной работе у лаванды были использованы неморфогенные каллусы, причем было показано преимущество каллусов более позднего, 4-го пассажа. Выделенные устойчивые к соли клеточные линии были способны к достаточно длительному культивированию на селективном фоне – от 3-х до 6-ти пассажей, в зависимости от концентрации NaCl. Что касается длительности действия стрессового фактора, то в разных работах исследователи применяют как однократный отбор при непродолжительном культивировании на фоне засоления в течение 1–2-х пассажей [9], так и достаточно сложные схемы ступенчатого отбора в течение 7–10 пассажей. Например, такие походы с повышением концентрации NaCl были использованы при клеточной селекции у сахарной свеклы и табака, что позволило существенно увеличить сублетальную дозу стресса [1, 6]. Для лаванды, как указывалось, используемые варианты ступенчатой селекции, к сожалению, были мало эффективны.

Следует отметить, что выявленные нами у лаванды сублетальные дозы NaCl (0,7–0,8%) были несколько ниже, чем у некоторых изученных видов растений, у которых отбор проводился при концентрациях солей до 1,5–2,5% [1, 3, 6]. Хотя в

исследованиях, проведенных у лавандина, также было показано, что концентрации NaCl 0,75–1,0% вызывали ингибирование роста каллуса, при этом выживаемость каллусов зависела от используемого экспланта [16].

Несмотря на специфику условий проведения селекции на осмотический стресс у лаванды, имеется ряд фактов, согласующихся с результатами, полученными для других видов растений. Это касается влияния на реакции культур *in vitro* сортовых особенностей и эффективности использования мутагенной предобработки [6, 8, 9, 12]. Важным вопросом при создании селективных систем отбора *in vitro* является возможность индукции морфогенеза у отобранных устойчивых линий, так как часто отмечается снижение их регенерационного потенциала или жизнеспособности полученных растений [1, 6]. В наших дальнейших исследованиях были разработаны приемы регенерации растений лаванды из солеустойчивых линий, что будет предметом отдельной публикации. Представленные в данной работе результаты являются методической основой разработки селективной системы отбора клеточных линий и регенерантов, устойчивых к абиотическому солевому стрессу, и свидетельствуют о перспективности использования такого биотехнологического метода для создания исходного селекционного материала у одного из основных эфиромасличных растений.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в результате проведенных исследований были выявлены некоторые особенности действия солевого стресса на развитие каллусных культур двух сортов лаванды узколистной в течение нескольких пассажей. Выявлены сублетальные концентрации NaCl (0,7–0,8%) и отобраны устойчивые клеточные линии. Показано преимущество использования для отбора *in vitro* каллусов 4-го пассажа, по сравнению с первым, а также влияние на степень солеустойчивости каллусов сорта, мутагенной обработки колхицином и длительности действия стрессового фактора. Установлено, что при сублетальной концентрации NaCl возможно культивирование каллусных тканей не более трех пассажей, а при селективных – в течение 6-ти пассажей.

Список литературы

1. Використання біотехнологічних прийомів для підвищення цукронакопичення та стійкості цукрових буряків до несприятливих чинників довкілля / [О. В. Дубровна, О. М. Тищенко, Т. В. Чугункова та ін.] // Труды НБС. – 2009. – Т. 131. – С. 202–206.
2. Егорова Н. А. Получение растений-регенерантов в каллусной культуре лаванды и их микроразмножение *in vitro* (методические рекомендации) / Н. А. Егорова. – Симферополь: ИЭЛР УААН, 2008. – 28 с.
3. Игнатова С. А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro* / С. А. Игнатова. – Одесса: Астропринт, 2011. – 224 с.
4. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полишук. – К.: Наукова думка. – 1980. – 488 с.
5. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В. А. Кунах. – К.: Логос, 2005. – 730 с.

6. Левенко Б. А. Клеточная селекция растений на устойчивость к стрессовым факторам: автореферат дис. на соискание науч. степени докт. биол. наук / Б. А. Левенко; ИФРГ. – К., 1991. – 41 с.
7. Растениеводство Крыма / [Е. В. Николаев, А. М. Изотов, В. Н. Чуниховская, Б. А. Тарасенко]. – Симферополь: Таврия, 2008. – 290 с.
8. Сидоров В. А. Биология растений. Клеточная селекция / В. А. Сидоров. – Киев.: Наук. думка. – 1990. – 280 с.
9. Arzani A. Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and *in vitro* salt stress / A. Arzani, S.-S. Mirodjagh // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1999. – Vol. 58, N 1. – P. 67–72.
10. Banthorpe D. V. Stimulation of accumulation of terpenoids by cell suspensions of *Lavandula angustifolia* following pre-treatment of parent callus / D. V. Banthorpe, M. J. Bates, M. J. Ireland // Phytochemistry. – 1995. – Vol. 40, N 1. – P. 83–87.
11. Calvo M. C. Plant regeneration from cultured leaves of *Lavandula latifolia* Medicus: Influence of growth regulators and illumination conditions / M. C. Calvo, J. Segura // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1989. – Vol. 19, N 1. – P. 33–42.
12. Dasgupta M. Evaluation of orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes for salt tolerance through shoot apex culture under *in vitro* NaCl mediated salinity stress conditions / M. Dasgupta, M. R. Sahoo, P. C. Kole et al. // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 2008. – Vol. 94, N 2. – P. 161–170.
13. Echeverrigaray S. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants / S. Echeverrigaray, R. Basso, L. B. Andrade // Biol. Plantarum. – 2005. – Vol. 49, N 3. – P. 439–442.
14. Ghiorghita G. Some aspects concerning the *in vitro* reaction of *Lavandula angustifolia* L. / G. Ghiorghita, D. E. Maftai, D. Nicuta // Propag. Ornament. Plants. – 2009. – Vol. 9, N 1. – P. 47–49.
15. Pavlov A. I. Nutrient medium optimization for rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension / A. I. Pavlov, M. P. Ilieva, I. N. Panchev // Biotechnology Progress. – 2000. – Vol. 16, N 4. – P. 668–670.
16. *In vitro* growth pattern of salt-stressed cells of lavender / [A. M. Sodi, G. Serra, C. Vitagliano et al.] // Acta Hort. – 1990. – N 280. – P. 459–462.
17. Watanabe K. The selection of cultured plant cell lines producing high levels of biotin / K. Watanabe, S. Yano, Y. Yamada // Phytochemistry. – 1982. – Vol. 21, N 3. – P. 513–516.

Єгорова Н. О. Розробка методичних основ клітинної селекції лаванди *in vitro* на стійкість до NaCl // Екосистеми, їх оптимізація та охорона. Симферополь: ТНУ, 2011. Вип. 5. С. 173–179.

Досліджено особливості дії сольового стресу на розвиток калюсних тканин лаванди (*Lavandula angustifolia* Mill.) впродовж декількох пасажів. Виявлено сублетальні концентрації NaCl, при яких було відібрано стійкі лінії. Показано вплив на солестійкість калюсних культур вихідного пасажу, сорту, мутагенної обробки колхіцином та тривалості дії стресового чинника.

Ключові слова: *Lavandula angustifolia*, клітинна селекція, калюсогенез.

Yegorova N. A. The development of methodological basic of lavender cell selection *in vitro* for NaCl tolerance // Optimization and Protection of Ecosystems. Simferopol: TNU, 2011. Iss. 5. P. 173–179.

The peculiarities of salt stress effect on the development callus tissues of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) during several passages were investigated. The sublethal NaCl concentrations have been determined, and selection of resistant lines were carrying out. It was shown the influence on the callus culture salinity tolerance the initial passage, variety, colchicine treatment and duration of stress factor action.

Key words: *Lavandula angustifolia*, cell selection, callusogenesis.

Поступила в редакцію 18.10.2011 г.