

УДК 57.085.23

КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР *GLYCINE MAX* НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ

Бугара И. А., Юнусова Э. А.

Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского, Симферополь, bia.05@mail.ru

Показана возможность использования метода прямой клеточной селекции для отбора каллусных культур *Glycine max* L., устойчивых к осмотическому стрессу. На основе цитологических исследований отобраны морфогенные каллусные культуры *G. max*, которые культивировали на питательных средах с различным содержанием NaCl. Ступенчатое повышение концентрации NaCl в составе питательной среды способствовало увеличению значения ростового индекса каллусных культур в процессе пассирования.

Ключевые слова: *Glycine max*, каллусная культура, прямая клеточная селекция, осмотический стресс.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в мировом земледелии среди зернобобовых культур *Glycine max* L. занимает первое место. Ценность культуры определяется удачным химическим составом зерна, которое содержит 33–40 % белка, 17–25 % жиров и 20 % углеводов. Соевый белок обладает уникальным аминокислотным составом, приближающимся по соотношению и содержанию аминокислот к полноценным белкам животного происхождения. В 100 г белка сои содержится: лизина – 6,6 г, метионина – 1,4 г, триптофана – 1,3 г, валина – 5,4 г, изолейцина – 5,3 г, лейцина – 7,9 г, тирозина – 3,8 г, треонина – 3,8 г, фенилаланина – 5,1 г. Начиная с 20-х годов XX столетия Крым несколько раз планировалось сделать одним из основных районов по производству сои. Однако недостаток орошения приводил к низкой урожайности, что стало причиной незаслуженной потери интереса к возделыванию данной культуры (Николаев и др., 1998).

В современных условиях ведения сельского хозяйства в Республике Крым необходимо уделять внимание использованию в производстве культур, способных давать качественный урожай при сравнительно невысокой потребности во влаге. Вместе с тем немаловажно принимать во внимание приспособленность культур к возделыванию в условиях засоления почвы.

Наиболее распространенным и перспективным подходом к созданию устойчивых к неблагоприятным условиям сортов является использование метода прямой клеточной селекции на основе культуры изолированных клеток, тканей и органов растений *in vitro*. Метод прямой селекции используется для выделения мутантных форм каллусных культур, устойчивых к гербицидам, антибиотикам, токсинам патогенов, тяжелым металлам, засухе и засолению. В ходе исследований подбирают селективную концентрацию токсичных веществ в составе питательной среды. В ряде случаев используют ступенчатую селекцию, при которой концентрацию токсичных веществ в питательной среде повышают постепенно (Кунах, 2000; Мельничук и др., 2003). Эффективность использования метода прямой клеточной селекции на устойчивость к осмотическому стрессу была продемонстрирована для ряда сортов эфиромасличных культур, выращиваемых в Республике Крым (Егорова, 2009; Егорова, Ставцева, 2013). При этом для создания селективных условий авторы вводили в состав питательной среды маннит и неионный осмотик NaCl в различных концентрациях.

Цель работы – отобрать методом прямой клеточной селекции каллусные культуры *G. max*, характеризующиеся высокими значениями ростового индекса на питательных средах в условиях осмотического стресса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили растения *Glycine max* L., которые культивировали в вегетационных сосудах в условиях лабораторного помещения. Для получения каллуса использовали сегменты молодых листьев. Стерилизацию эксплантов проводили 3 % раствором перекиси водорода в ламинарном боксе непосредственно перед помещением на питательную среду. Приготовление питательных сред, введение в культуру и субкультивирование проводили с применением традиционных методик, принятых в работах по культуре изолированных клеток, тканей и органов растений (Калинин и др., 1980). Для индукции каллусообразования и пассирования каллуса использовали питательную среду Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962), дополненную кинетином – 0,5 мг/л, 6-бензиламинопурином (6-БАП) – 0,5 мг/л и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) – 2,0 мг/л. Для моделирования осмотического стресса в состав питательной среды добавляли неионный осмотик NaCl в концентрациях 0,1 %, 0,2 %, 0,5 %, 1,0 %, 1,5 %. В качестве контроля использовали питательную среду без NaCl.

Выращивание каллусных культур проводили при температуре 20–22 °С, освещенности 2–3 тысячи люкс и 16-ти часовом фотопериоде. Каждые 40–50 суток осуществляли пассирование каллусных тканей. В конце цикла выращивания определяли массу сырого каллуса и ростовой индекс (Калинин, 1980). Для цитологических исследований первичных и пассируемых каллусных культур готовили временные давленные препараты участков каллуса размером не более 2,0 мм, которые помещали на предметные стекла и окрашивали в 0,1 % растворе метиленового синего в течение 5 минут. Препараты анализировали под микроскопом МРІ-5. Объем выборки составлял не менее 30 клеток каждого типа.

Математическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Excel 2016 для Microsoft Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведения исследований предполагалось выполнить подбор гормонального состава питательных сред для индукции каллусообразования в культуре листовых эксплантов, установить зависимость процесса каллусогенеза от состава питательной среды, исследовать цитологические особенности каллусных культур, отобрать морфогенные клеточные линии, пассировать морфогенные каллусные культуры на питательные среды с NaCl, увеличивая концентрацию соли в процессе пассирования, для отбора устойчивых к осмотическому стрессу каллусных культур.

Данные по влиянию состава модифицированных нами питательных сред Мурасиге и Скуга, дополненных кинетином, 6-БАП и 2,4-Д в различных концентрациях, на частоту каллусообразования представлены в таблице 1.

Таблица 1

Частота каллусообразования в культуре листовых эксплантов *Glycine max* на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга

Вариант питательной среды	Типы и концентрации фитогормонов, мг/л			Частота каллусообразования, % $\bar{X} \pm S_x$
	Кинетин	6-БАП	2,4-Д	
МС-1	-	-	-	0,0
МС-2	-	0,1	1,0	32,5±4,4
МС-3	-	0,5	2,0	43,6±7,6
МС-4	0,1	-	1,0	58,4±2,7
МС-5	0,5	-	2,0	62,7±4,3*
МС-6	0,5	0,5	2,0	95,3±3,3*

*различия достоверны при $p=0,001$

Первые признаки индукции каллусообразования при культивировании листовых эксплантов в культуре *in vitro* визуально обнаруживались на 10–15 сутки в зависимости от состава питательной среды. Образующийся каллус имел светло-зеленую окраску, рыхлую консистенцию и отличался невысокой интенсивностью роста (рис. 1).

Анализируя влияние гормонального состава питательных сред на частоту каллусообразования, необходимо отметить, что при использовании безгормональной питательной среды МС-1 индукции каллусообразования в культуре листовых сегментов отмечено не было. Вместе с тем лучшие результаты по частоте каллусообразования были получены при использовании питательной среды МС-6, дополненной кинетином – 0,5 мг/л, 6-бензиламинопурином – 0,5 мг/л и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой – 2,0 мг/л. В данном случае частота каллусообразования достигала 95,3 % и была достоверно выше по сравнению с другими вариантами опыта.

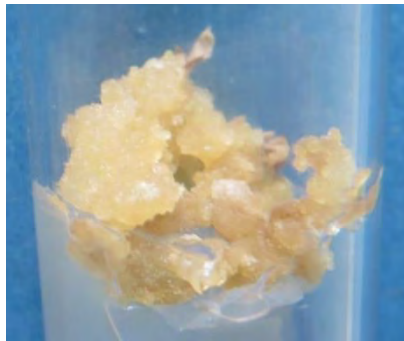


Рис. 1. Каллусная культура *Glycine max* 0-пассажа, индуцированная в культуре листовых эксплантов на питательной среде МС-6

В ходе дальнейших исследований для отбора клеточных линий, устойчивых к действию осмотического стресса, мы использовали в качестве базовой питательной среды модифицированную нами питательную среду Мурасиге и Скуга – МС-6.

При проведении цитологических исследований каллусных культур сои 0-пассажа в них были обнаружены клетки меристематического типа, клетки паренхимного типа различных размеров и формы, трахеидоподобные клетки, а также морфогенные участки, связанные с закладкой адвентивных почек (рис. 2).

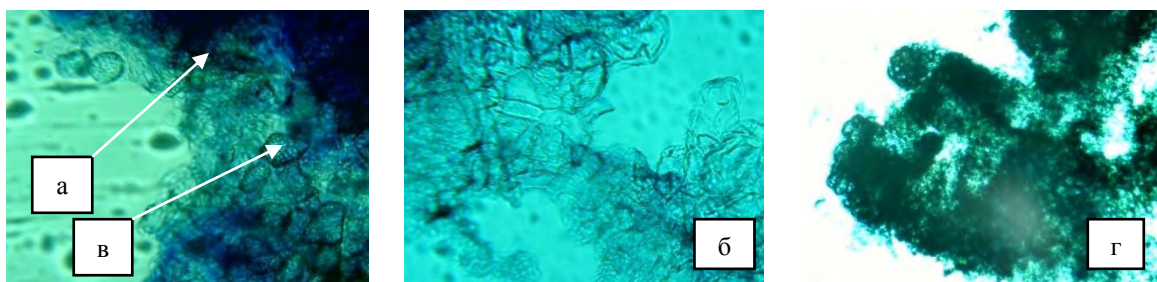


Рис. 2. Морфология клеток каллусных тканей *Glycine max* 0-пассажа

а – клетки меристематического типа, б – клетки паренхимного типа, в – трахеидоподобные клетки, г – закладка адвентивной почки.

Клетки меристематического типа имели относительно небольшие размеры, крупные ядра и располагались крупными скоплениями в местах локализации трахеидоподобных клеток.

Клетки паренхимного типа отличались более крупными размерами, небольшим количеством цитоплазмы и сильной вакуолизацией. Такие клетки имели округлую и удлинённую форму.

В каллусных культурах сои культурной 0-пассажа нами была выявлена дифференциация вегетативных почек, связанная с пролиферацией клеток меристематического типа. Это может свидетельствовать о потенциальной способности каллусных культур к морфогенезу и дальнейшему развитию растений-регенерантов по пути органогенеза.

Морфогенные каллусные культуры, отобранные в ходе цитологических исследований, субкультивировали на питательные среды, ступенчато увеличивая концентрацию NaCl, для последующего отбора клеточных линий, устойчивых к осмотическому стрессу (рис. 3).

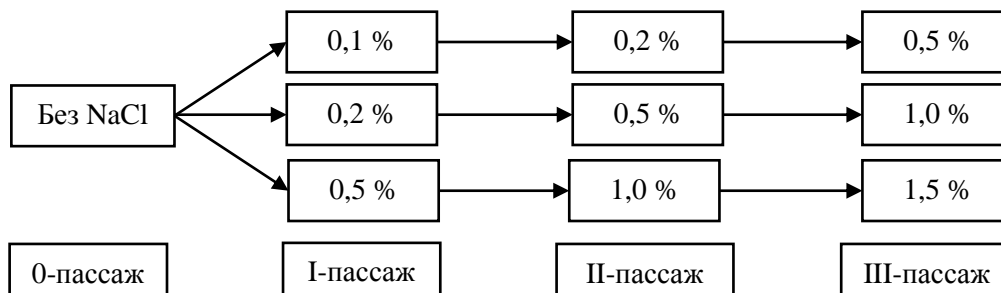


Рис. 3. Схема пассирования каллусных культур *Glycine max* с увеличением концентрации NaCl в составе питательной среды

Субкультивирование каллусных культур сои культурной на питательные среды, содержащие NaCl, показало существенную зависимость ростового индекса от концентрации соли (рис. 4).

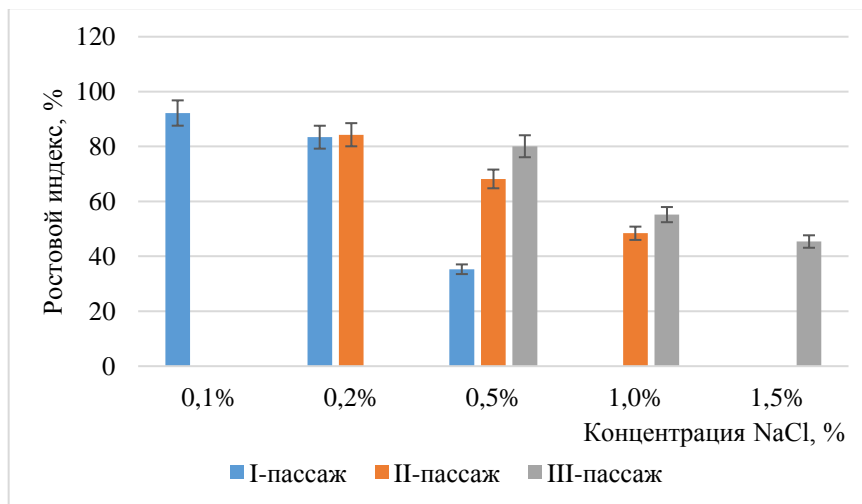


Рис. 4. Изменение ростового индекса каллусных культур *Glycine max* в процессе пассирования на питательных средах с различным содержанием NaCl (значение ростового индекса 100 % соответствует контрольному варианту опыта)

Так, в первом пассаже на питательных средах, содержащих NaCl в концентрациях 0,1 % и 0,2 %, мы не наблюдали достоверных отличий в значениях ростовых индексов каллусных культур, которые достигали 92,2 % и 83,4 % соответственно. Вместе с тем увеличение концентрации соли до 0,5 % снижало значение ростового индекса до 35,3 %.

С целью дальнейшей адаптации каллусные культуры, пассируемые на питательных средах, содержащих NaCl в концентрациях 0,1 %, 0,2 % и 0,5 %, субкультивировали с

увеличением содержания NaCl, соответственно, до 0,2 %, 0,5 % и 1,0 %. Используемая нами схема пассирования каллусных культур сои на питательные среды с увеличением содержания NaCl позволила во втором пассаже повысить значение ростового индекса в варианте опыта с содержанием соли 0,5 % с 35,3 % до 68,2 %. Повышение концентрации соли в составе питательной среды с 0,5 % до 1,0 % не оказывало ингибирующего действия на ростовые характеристики каллусных культур, напротив, значение ростового индекса увеличилось до 48,4 %.

В третьем пассаже на питательных средах с содержанием NaCl 0,5 % и 1,0 % нами было отмечено увеличение значения ростового индекса до 80,1 % и 55,2 % соответственно.

Таким образом, в результате проведенных исследований показана принципиальная возможность адаптации каллусных культур сои культурной к осмотическому стрессу при пассировании на питательные среды с увеличением концентрации NaCl. Используемая нами схема адаптации позволила повысить значение ростового индекса в процессе пассирования. На питательной среде, содержащей NaCl в концентрации 0,2 %, в первом и втором пассажах значение ростового индекса увеличилось незначительно относительно контроля – с 83,4 % до 84,3 % соответственно.

Вместе с тем на питательной среде, содержащей NaCl в концентрации 0,5 %, в течение первого, второго и третьего пассажей значение ростового индекса увеличилось с 35,3 % до 80,1 %. Установленная зависимость может свидетельствовать об успешности использования метода ступенчатой селекции при получении каллусных культур *G. max*, устойчивых к осмотическому стрессу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение устойчивых к осмотическому стрессу каллусных культур растений методом прямой клеточной селекции, несомненно, открывает широкие перспективы для совершенствования селекционной работы по созданию сортов, устойчивых к неблагоприятным факторам среды. Повышение адаптационного потенциала возделываемых культур на основе использования биотехнологических подходов является актуальной задачей, решение которой позволит поднять на качественно новый уровень сельскохозяйственное производство Республики Крым.

Список литературы

- Егорова Н. А. Исследование устойчивости к солевому стрессу каллусных культур эфиромасличной герани / Н. А. Егорова // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41., № 6. – С. 523–530.
- Егорова Н. А. Биотехнологические приемы получения форм шалфея, устойчивых к осмотическому стрессу *in vitro* / Н. А. Егорова, И. В. Ставцева // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2013. – Вып. 8. – С. 93–100.
- Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
- Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. Изменчивость и отбор в процессе адаптации к условиям выращивания *in vitro* / В. А. Кунах // Биополимеры и клетка (Biopolymers and Cell). – 2000. – Т. 16, № 3. – С. 159–185.
- Мельничук М. Д. Биотехнологія рослин: Підручник / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах. – К.: ПоліграфКонсалтінг, 2003. – 520 с.
- Николаев Е. В. Крымское полеводство. Справочное пособие / Е. В. Николаев, Л. Г. Назаренко, М. М. Мельников. – Симферополь: Таврида, 1998. – 384 с.
- Murashige T. The revised medium for rapid growth, and bioassays with tobacco tissue culture / Murashige T., Skoog F. A // *Physiol. Plant.* – 1962. – V.15, №13. – P. 473–497.

Bugara I. A., Yunusova E. A. Cell selection of callus cultures *Glycine max* for resistance to osmotic stress // *Ekosystemy*. 2016. Iss. 8 (38). P. 83–87.

The possibility of using direct cell selection for the selection of callus cultures *Glycine max* L., resistant to osmotic stress, was shown. Based on cytological studies, morphogenic callus cultures of *G. max* were selected. They were cultured on nutrient media with different NaCl content. The stepwise increase of the NaCl concentration in the nutrient medium promoted an increase in the value of the growth index of callus cultures during the passage.

Key words: *Glycine max*, callus culture, direct cell selection, osmotic stress.

Поступила в редакцию 27.11.2016 г.