

УДК 581.143.6

КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАТИОНОВ Ba^{2+} ДЛЯ ОТБОРА СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ

Л.Е. СЕРГЕЕВА, Л.И. БРОННИКОВА

*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17*

На селективных средах, содержащих летальные для клеточных культур дозы катионов Ba^{2+} , отобраны устойчивые линии пшеницы. Барийустойчивые клеточные линии тестировали в условиях прямого воздействия сульфатно-хлоридного и сульфатного засоления. Отобранные линии характеризовались комплексной устойчивостью к обоим типам солевого стресса.

Ключевые слова: пшеница, клеточная селекция, катионы Ba^{2+} , солеустойчивость.

Потребность в растениях с повышенным уровнем устойчивости к засолению определяет необходимость выдвижения новых идеологий и совершенствования способов их получения. Только такой комплексный подход может обеспечить серьезный прорыв в решении этой научной задачи.

Среди биотехнологических методов клеточная селекция является наиболее экологически приоритетной по ряду причин. Во-первых, только таким способом на сегодня можно получить некоторые генетически измененные формы. Во-вторых, замкнутая система *in vitro* предполагает контроль над всеми своими составляющими, что исключает непреднамеренное выделение вовне отдельных компонентов либо образующихся продуктов. В-третьих, клеточные культуры, отобранные таким способом, могут иметь широкий спектр (комплекс) характеристик, улучшающих показатели. Растения, регенерированные из них, не будут вызывать недоверия.

В то же время как любой научный метод клеточная селекция имеет ряд ограничений. Особенно это касается ее использования при отборе форм с повышенным уровнем устойчивости к осмотическим стрессам [8]. Ранее нами была выдвинута и реализована на практике идея возможности использования ионов тяжелого металла Ba^{2+} в клеточной селекции для получения солеустойчивых форм растений [4]. Солеустойчивость растений табака, полученных таким способом, была сопоставима с уровнем устойчивости природных галофитов [2]. Универсальность подхода доказана с помощью клеточных культур других гликофитов.

Повышение уровня солеустойчивости любой сельскохозяйственной культуры увеличит не только биологическую ценность генотипа, но и поднимет ее экономическую конкурентоспособность. Особенно это касается пшеницы.

Целью настоящей работы было исследование возможности использования метода клеточной селекции пшеницы с катионами бария для отбора солеустойчивых клеточных линий пшеницы.

Методика

Объектом исследования были клеточные культуры пшеницы сортов Золотоколосая и Володарка (селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины). Культуры были иницированы и до момента исследования выращивались на агаризованной среде В5 Гамборга [10]. Селективные условия создавали, прибавляя катионы Ba²⁺ в концентрации, летальной для клеточных культур дикого типа [4]. Устойчивые клеточные линии получали в результате клеточной селекции с использованием «плейтинга» оптимизированной суспензионной культуры клеток в селективные условия. Такой подход является классическим способом отбора генетически измененных единичных клеток [1, 5, 6]. Устойчивые клетки формировали микроколонии, прораставшие через поверхностный слой среды. Этот процесс длился в течение 45–55 сут. Частота выделения колоний не превышала 10⁻⁶, что соответствовало частоте генетически измененных форм [1, 3, 5]. Образовавшиеся колонии переносили на свежую селективную среду, на которой продолжали пассирование в течение 2–3 пассажей для наращивания биомассы каллюса; продолжительность отдельного пассажа составляла 30–35 сут. (В качестве альтернативы для ускорения клеточного роста барийустойчивые варианты культивировали на контрольной среде В5.). Для определения солеустойчивости каллюсную массу пассировали на среды с добавлением 20 г/л солей морской воды либо сульфата натрия. Активность жизнедеятельности оценивали, определяя относительный прирост свежей биомассы (Δm):

$$\Delta m = (m_k - m_n)/m_n,$$

где m_n — исходная масса культуры в начале пассажа; m_k — масса культуры в конце пассажа.

Этот показатель традиционно используется в клеточной селекции [1, 3, 11].

Результаты и обсуждение

Методом клеточной селекции с использованием катионов бария были получены устойчивые клеточные линии пшеницы. Клеточной линией принято считать потомство единичной генетически измененной клетки [3, 11]. На рис. 1 изображены микроколонии, каждая из которых представляет собой отдельную клеточную линию. Всего было получено шесть клеточных линий генотипа Золотоколосая и три относящихся к генотипу Володарка. Все они оказались устойчивыми к летальной дозе катионов бария. Более того, несколько линий генотипа Золотоколосая отличалось устойчивостью к 1,5-кратной летальной дозе стрессора. Этот факт дополнительно подтвердил генетический базис их характеристик.

Известно, что токсичность катионов Ba²⁺ сопряжена с их действием на перемещение катионов K⁺ [9, 12]. В отдельных случаях при наличии катионов Ba²⁺ уменьшалось поглощение Na⁺ и выброс K⁺ [13]. В то же время отрицательное действие засоления проявляется в критической

утере катионов K^+ , вызывающей ингибирование роста клеточных культур [6]. Поэтому барийустойчивые клеточные линии тестировали в условиях прямого действия сульфатно-хлоридного (соли морской воды) и сульфатного засоления.

Отобранные на среде с катионами тяжелого металла бария линии демонстрировали устойчивый рост при засолении любого типа. На рис. 2 зафиксированы результаты культивирования барийустойчивой линии на селективных средах, содержащих катионы Ba^{2+} (см. рис. 2, а) и соли морской воды (см. рис. 2, б). Аналогичные показатели получены в случае выращивания

культур при наличии сульфата натрия. При этом внешний вид нарастающей каллюсной массы устойчивых линий соответствовал стандартным показателям нормы, т.е. не образовывал потемневших участков, обычно указывающих на аккумуляцию полифенолов вследствие солевого стресса [1, 7].

В то же время темп роста барийустойчивых клеточных линий на солевом фоне был различным. В одном случае варианты росли активнее в условиях действия комплекса солей (соли морской воды), в другом — наблюдали большее нарастание при наличии Na_2SO_4 . Мы не склонны относить эти события на счет токсического воздействия. По нашему мнению, таким образом могли проявляться индивидуальные особенности метаболизма, возможно одновременная реализация нескольких за-

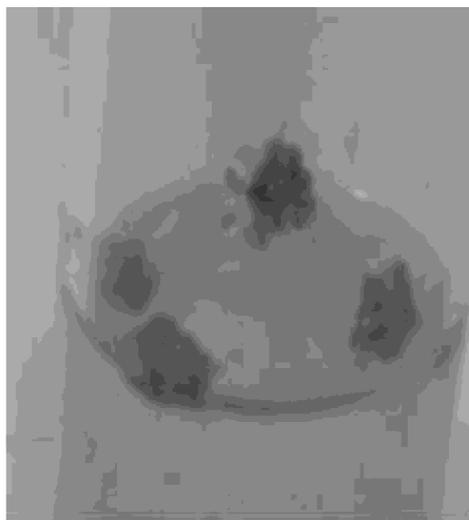
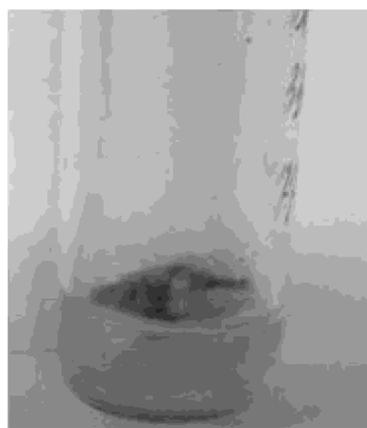


Рис. 1. Микроколони (клеточные линии) пшеницы после выделения



а



б

Рис. 2. Барийустойчивая клеточная линия пшеницы, растущая на селективных средах с добавлением катионов Ba^{2+} (а) и солей морской воды (б)

КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАТИОНОВ Ba²⁺

Относительный прирост массы сырого вещества каллюса барийустойчивых клеточных линий пшеницы, культивируемых в различных условиях

Устойчивая клеточная линия (УКЛ)	Относительный прирост массы сырого вещества каллюса Δm			
	Нормальные условия, среда В5	B5 + Ba ²⁺	B5 + соли морской воды	B5 + сульфат натрия
	Золотоколосая			
УКЛ № 2	1,53±0,09	1,39±0,18	0,34±0,07	0,09±0,01
УКЛ № 3	0,73±0,15	0,54±0,10	0,22±0,02	0,33±0,02
	Володарка			
УКЛ № 2	0,44±0,09	0,36±0,03	0,12±0,04	0,15±0,02

щитных механизмов [2]. Реальность такого события при клеточной селекции отмечал Малига еще в 1984 г. [11]. О стабильном развитии культуры свидетельствовал относительный прирост массы сырого вещества (Δm), представленный в таблице. Однако следует отметить, что параметр Δm при его объективности отражает физиологическое состояние клеточной культуры на момент анализа и может варьировать со временем. Именно поэтому после ротации сред культивирования мы регулярно проводили данные измерения.

Таким образом, барийустойчивые клеточные линии пшеницы проявляли комплексную стрессоустойчивость к обоим типам солевого стресса. Клеточная селекция с использованием катионов тяжелого металла бария может служить надежным базисом при отборе клеточных линий пшеницы, устойчивых к летальному засолению.

1. *Сергеева Л.Е.* Изучение клеточных линий табака, устойчивых к солевому и водному стрессам, и регенерантов из них: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1991. — 21 с.
2. *Сергеева Л.Е.* Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов для получения генотипов растений с комплексной устойчивостью к абиотическим стрессам. — Киев: Логос, 2016. — 211 с.
3. *Сидоров В.А.* Биотехнология растений. Клеточная селекция. — Киев: Наук. думка, 1990. — 280 с.
4. *Деклараційний патент на винахід № 44487 A01H1/04, A01H4/00* Спосіб відбору стійких до засолення клітинних ліній рослин / Л.Є. Сергеева. — Опубл. 15.02.2002, Бюл. № 2.
5. *Conner A.J., Meredith C.P.* Large scale selection of aluminum-resistant mutants from plant cell culture: expression and inheritance in seedlings // *Theor. Appl. Genet.* — 1985. — **71**. — P. 159—165.
6. *Croughan T.P., Stavarek S.J., Rains D.W.* Selection of a NaCl-tolerant line of cultured alfalfa cells // *Crop. Sci.* — 1978. — **18**, N 6. — P. 959—963.
7. *Dix P.J., Street H.E.* Sodium chloride-resistant cultured cell lines from *Nicotiana sylvestris* and *Capsicum annum* // *Plant Sci. Lett.* — 1975. — **5**, N 4. — P. 231—237.
8. *Dracup M.* Why does in vitro cell selection not improve the salt tolerance of plants? // *Genetic aspects of plant mineral nutrition*. P.J. Randall et al. (eds). — Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1993. — P. 137—142.
9. *Fan L.M., Wu W.-H., Yang Y.-Y.* Identification and characterization the inward K⁺ channel in the plasma membrane *Brassica* pollen protoplasts // *Plant Cell Physiol.* — 1999. — **40**, N 8. — P. 859—865.
10. *Gamborg J.L., Miller R.A., Ojima K.* Nutrient requirement of suspension cultures of soybean roots // *Exp. Cell Res.* — 1968. — **509**. — P. 151—158.
11. *Maliga P.* Isolation and characterization of mutants in plant cell culture // *Ann. Rev. Plant Physiol.* — 1984. — **35**. — P. 519—542.

12. *Rubio F., Nieves-Cordones M., Aleman F., Martinez V.* Relative contribution of AtHAK5 and AtHAK1 to K⁺ uptake in the high affinity range of concentrations // *Physiol. Plant.* — 2008. — **134**. — P. 598–608.
13. *Wang D.-M., Zhang J.-L., Flowers T.J.* Low affinity Na⁺ uptake in the halophyte *Suaeda maritima* // *Plant Physiol.* — 2007. — **145**. — P. 559–571.

Получено 20.01.2017

КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯМ КАТІОНІВ Ba²⁺ ДЛЯ ДОБОРУ СОЛЕСТІЙКИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ

Л.Е. Сергеева, Л.І. Броннікова

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

На селективних середовищах, які містили летальні для клітинних культур дози катіонів Ba²⁺, відібрані стійкі лінії пшениці. Барійстійкі клітинні лінії тестували за умов прямої дії сульфатно-хлоридного та сульфатного засолень. Відібрані лінії характеризувались комплексною стійкістю до обох типів сольового стресу.

CELL SELECTION WITH Ba²⁺ CATIONS FOR OBTAINING SALT RESISTANT WHEAT LINES

L.E. Sergeeva, L.I. Bronnikova

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Ba-resistant wheat cell lines were obtained on selective media with the addition Ba²⁺ cations at lethal for cell cultures doses. Those variants were tested under stress pressure of sulfate-chloride and sulfate salinities. Cell lines challenged both types of salt stresses.

Key words: wheat, cell selection, Ba²⁺ cations, salt resistance.