

КОВБАСЕНКО Р. В.^{1✉}, КРАВЕЦЬ О. П.¹, СИМОНЕНКО Ю. В.¹, ЄМЕЛЬЯНОВ В. І.^{1,2}

Інститут клітинної біології і генетичної інженерії,

¹ Україна, 03143, м. Київ, вул. Заболотного, 148, ORCID: 0000-0002-0774-362X, 0000-0002-4979-5022, 0000-0002-5597-3315, 0009-0003-5216-3207

² Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17.

✉ rayasenko@ukr.net

ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННОЇ СЕЛЕКЦІЇ РОСЛИН ТОМАТУ, СТІЙКИХ ДО ЗАСОЛЕННЯ

Запропоновано схему клітинної селекції рослин томату на стійкість до засолення, яка включає використання методу ступінчастої селекції, яка передбачає поступове зростання вмісту селективного агента у кількох пасажах. Показано, можливість одержання солестійких ліній рослин томату згідно запропонованої технології. Визначено рівень тиску сольового стресу, необхідного для добору сіль-толерантних регенерантів. Виявлено перспективний генотип для використання за цією технологією – лінію КР-07, яка була одержана з культури *in vitro* сорту Бобринський, отримано повноцінні рослини-регенеранти. Для селекції на клітинному рівні запропоновані живильні середовища, які хоча і не повністю, але частково відповідали б природнім стресовим умовам і забезпечували експресію ознаки резистентності, які давали можливість добору необхідних варіантів. Таким чином, вивчення механізмів витривалості до засолення є важливим для культивованих *in vitro* клітин і цілих рослин. Селекція на клітинному рівні також передбачає реальну перспективу одержання стійких до засолення форм культурних рослин. Виявлено зростання вмісту пероксиду водню у калюсних структурах і підвищення активності антиоксидантних ферментів супероксиддисмутази і пероксидази.

Ключові слова: *Lycopersicon esculentum* Mill., клітинна селекція, антиоксидантні ферменти, регулятори росту, засолення.

У роботах по клітинній селекції рослин на стійкість до іонних стресів частіше всього застосовується метод прямої селекції, при якому як селективний агент застосовували токсичні концентрації солей. Однак, створювати стресові селективні умови *in vitro*, ідентичні природнім надзвичайно складно. У природніх умовах, крім токсичної дії іонів, додаються інші факто-

ри впливу, а саме, наявність різних речовин, у тому числі кислого рН середовища та інших супутніх факторів. Для селекції на клітинному рівні запропоновано живильні середовища, які частково відповідали б природнім стресовим умовам, забезпечували б наявність ознак резистентності та давали можливість добору необхідних варіантів. Таким чином, вивчення клітинних механізмів стійкості до засолення є важливим для культивованих *in vitro* клітин і цілих рослин. Таким чином, селекція на клітинному рівні є реальною перспективою одержання стійких до засолення форм культурних рослин [9].

Для вивчення солестійкості культурних рослин найбільш зручною моделлю для проведення дослідів є така, що дозволяє вивчати стійкість на рівні клітин, тканин і простих фізіологічних реакцій організмів. Тому для вивчення генетичних механізмів солестійкості досить часто використовуються проростки та молоді рослини [14]. Крім того, навіть успадкування солестійкості на молодих проростках зустрічає цілий ряд труднощів. Найбільшого успіху вдається досягнути при аналізі успадкування клітинних механізмів солестійкості. При цьому відмічено, що клітинні механізми солестійкості відрізняються не тільки між видами і родами, але і між сортами та гібридами однієї культури [10]. Припускають, що механізм виникнення соматональної мінливості *in vitro* має подібність із спонтанними мутаціями, які викликають АФК [14].

Клітинна селекція *in vitro* – метод виділення мутантних клітин і соматональних варіантів за допомогою селективних умов. Однією із переваг культури *in vitro* є можливість на основі соматональної варіабельності або індукованих мутацій відбирати у жорстких селективних умовах клітини, які характеризуються необхідними для дослідника ознаками. В умовах

© КОВБАСЕНКО Р. В., КРАВЕЦЬ О. П., СИМОНЕНКО Ю. В., ЄМЕЛЬЯНОВ В. І.

культури *in vitro* відбувається дестабілізація генетичних та епігенетичних програм рослинних клітин, що може призводити до хромосомних змін, таких як одиничні точкові зміни у процесі реплікації, а також метилювання ДНК-послідовностей і активація транспозонів. Подібні прояви генетичної нестабільності мають різний характер: неуспадковані модифікації, успадковані та неуспадковані зміни експресії генів, істинні мутації. Усі ці процеси можуть бути досить тісно пов'язані із фенотиповими змінами. Відомо декілька цитогенетичних механізмів соматональної мінливості, таких як: ядерна фрагментація або дисфункція мітотичного веретена, хромосомні перебудови, зміни у екстрахромосомному геномі, активація мобільних генетичних елементів, пізня реплікація гетерохроматину, ампліфікація і редукція генів, соматичний кросингвер і обмін сестринських хроматид, нуклеотидна незбалансованість, елімінація вірусів, ослаблення або пошкодження механізмів репарації. На сьогодні виявлено декілька причин, які впливають на хромосомну нестабільність рослинних клітин *in vitro*. До них відносяться: а) генетична гетерогенність соматичних клітин вихідного експланта, яка зумовлена генотипом вихідної рослини, типом експланта та початковим рівнем плідності його тканин; б) генетичний стрес при дедиференціації у процесі введення тканин у культуру *in vitro* і редиференціація у процесі регенерації рослин; в) культивування клітин на штучних живильних середовищах (вплив складу середовища, регуляторів росту та тривалості і умов культивування) [13, 15].

Матеріали і методи

Як експланти використовували незрілі зародки, сім'ядольні вузли із меристематичною активністю, гіпокотилі рослин томату сортів Лагідний, Хорів, Борівський і Бобриський довжиною 1,2–1,5 мм у стадії їхнього розвитку, оптимального для індукції калюсогенезу. Для культивування ізольованих тканин використовували агаризоване середовище МС загального мінерального складу із різними концентраціями регуляторів росту [1, 12]. Активність супероксиддисмутази визначали спектрофотометрично за швидкістю окислення NADH у присутності нітросинього тетразоліа і феназинметасульфату за методикою [7].

Результати та обговорення

Для індукції морфогенезу дедиференційовані клітини калюсу, які культивувалися 5–7 тижнів, переносили на середовище того ж соляного складу із додаванням 1 мг/л кінетину, 0,5 мг/л ІОК та 0,1 мг/л ГК. У цих умовах із щільних ділянок калюсу розвивалися зелені листкоподібні структури, тобто ініціалії, а через 2–3 тижні були сформовані рослини-регенеранти. Культури із проявом ризогенезу та некротизації вибраковувалися. Калюси без ознак регенерації переносили на свіже середовище. Після досягнення регенерантами висоти 1,5–2 см їх переносили на середовище із наполовину збідненим мінеральним складом без фіторегуляторів і зниженим вмістом 10–15 г/л цукрози.

Для створення селективних умов NaCl (10–15 мг/л) вносився до живильного середовища у різних варіантах, а для моделювання водного дефіциту до рідкого живильного середовища як осмотик вносився ПЕГ. Використання ПЕГ для моделювання водного дефіциту *in vitro* найбільш перспективне, тому що дозволяє нормувати величину водного потенціалу із достатньою точністю, а його біологічна дія достатньо мінімальна. Введення до живильного середовища 10 % ПЕГ відповідає осмотичному потенціалу 0,7–0,75 МПа, а 15 % – 1,05–1,10 МПа. Для відбирання резистентних клітинних ліній використовували метод ступінчастої селекції за такими схемами: 10 мг/л NaCl (3 пасажі) – 12 мг/л NaCl (3 пасажі) – 15 мг/л NaCl (3 пасажі) – основне середовище МС (3 пасажі). Схеми клітинної селекції включали кілька послідовних дій селективним агентом у різній концентрації на етапах індукції проліферації або проліферації морфогенезу калюсних культур. Контролем були калюсні лінії, культивовані на середовищах без додавання селективних агентів. Як правило, час експозиції на селективному середовищі складав не менше трьох тижнів. Ефективність тієї чи іншої системи визначали за середніми значеннями виживання калюсних тканин і частоти регенерації рослин. Неоднозначність реакції на стрес регенерантів, одержаних на селективних середовищах, зумовила необхідність підвищення ефективності добору солестійких ліній томату *in vitro*, наприклад, шляхом корекції рівня стресора у селективному середовищі. Дворазове збільшення концентрації NaCl у селективному середовищі (до 16 мг/л) призвело до вірогідного пригнічення морфогенезу

калюсної культури, порівнюючи із контролем при помірному рівні формування повноцінних регенерантів (15–20 %). А концентрація NaCl у середовищі, що дорівнює 30 мг/л, викликала некроз калюсів у більшості досліджуваних генотипів. І тільки від селекційної лінії КР-07, яка була одержана із культури *in vitro* сорту Бобрицький, у цих умовах одержано повноцінні рослини-регенеранти. Останнє спостереження лише підкреслює цінність цієї лінії для добору стресостійких форм томату *in vitro*. Таким чином, показана можливість одержання солестійких ліній рослин томату згідно запропонованої технології; визначено рівень тиску сольового стресу, необхідного для добору сільтолерантних регенерантів; виявлено також перспективний генотип, для використання за цією технологією.

При дії на рослинний організм стресових агентів у їх клітинах синтезуються деякі захисні амінокислоти, зокрема пролін. Також було показано, що при додаванні до живильного середовища екзогенного проліну (0,2 мг/л) негативна дія сольового стресу значно уповільнюється: у цих умовах темп проліферації частково відновлюється в усіх вивчених варіантах дослідження. Така ж тенденція була відмічена і при додаванні до живильного середовища стероїдних глікоалкалоїдів 24-епібрасиноліду, епін-екстра та гомобрасиноліду (0,01 мг/л).

Проведені нами дослідження показали стимулюючу роль рослинного стеролу β -ситостерину (20–80 мг/л) в індукції калюсогенезу томату на 18–25 %.

Після проведення першого пасажу було проведено вивчення вмісту пероксиду водню у калюсах контрольного варіанту та в калюсах експериментальних сортів томату. Було встановлено зростання вмісту цієї АФК, порівнюючи із контролем у такому порядку: Контроль \rightarrow Лагідний \rightarrow Бобрицький \rightarrow Борівський \rightarrow Хорів. Дослідження особливостей функціонування антиоксидантної системи не тільки рослин, але і їхніх форм у культурі *in vitro* досить важливе для розуміння того, як рослина адаптується до змінених умов оточуючого середовища, викликаного стресовими факторами. Іншими дослідженнями на різних культурах було встановлено, що при дії хлориду натрію на калюсні культури зростає продукція пероксиду водню – однієї із форм АФК, яка, як правило, інтенсифікує перекисне окислення ліпідів мембран і призводить до значних порушень внутрішньоклітинно-

го гомеостазу. Обмеження процесів пероксидації і підтримування структурно-функціонального стану мембранних ліпідів здійснюється за рахунок інтенсивної роботи антиоксидантної системи захисту, ключову роль у якій відіграють спеціалізовані ферменти [4].

Супероксиддисмутаза є ключовим ферментом антиоксидантного захисту, яка виконує роль первинного бар'єру протидію АФК, елімінуючи супероксид із коефіцієнтом 104. Цей фермент представлений у значній кількості молекулярних форм. У їхніх активних центрах можуть бути присутні такі метали, як мідь, цинк, марганець, залізо, нікель. Cu / Zn-СОД локалізована у різних компартментах клітини. Механізм дії супероксиддисмутази включає послідовне відновлення і окислення металу активного центру цього фермента супероксидними аніон-радикалами. Супероксид-радикал і пероксид водню у присутності іонів заліза (Fe^{2+} , Fe^{3+}) або міді (Cu^{2+}) можуть вступати у реакції Фентона і Габера-Вайса та утворювати гідроксильний радикал, який є самим сильним відомим на цей час окислювачем [3, 6]. Після проведення першого пасажу калюсів томатів, було проведено вивчення вмісту цього антиоксидантного фермента у контрольних варіантах та у експериментальних зразках сортів томату. Було встановлено зростання вмісту супероксиддисмутази, порівнюючи із контролем у такому порядку: Контроль \rightarrow Лагідний \rightarrow Бобрицький \rightarrow Борівський \rightarrow Хорів. Супероксиддисмутаза, пероксидаза і каталаза є основними компонентами ферментативного антиоксидантного захисту, які безпосередньо деактивують АФК, або приймають активну участь у регенерації низькомолекулярних антиоксидантів, зокрема глутатіону. Поєднання антиоксидантних властивостей і здатності активувати транскрипцію генів, у тому числі і деяких антиоксидантних ферментів, а також інгібувати редокс-шляхи активації апоптозу свідчить про досить важливий вклад відновленого глутатіону та глутаредоксину у антиоксидантну захисну систему, що підвищує стійкість клітин проти окислювального стресу [2].

Пероксидаза – функціонально досить лабільний фермент, що реагує на будь-які зміни оточуючого середовища та стресові ситуації і відноситься до 9 класу PR-білків. До складу пероксидази входить гемін, представлений протопорфірином 9 у комплексі із тривалентним залізом і поліпептидним ланцюгом. Поліпептидний ланцюг включає від 203 до 308 амінокислот і

формує компакту третинну структуру, яка представлена великим і малим доменом. Гемінова частина молекули, у свою чергу, виконує роль активного центра, який приймає активну участь у розкладанні або активації пероксида водню. У результаті виникають радикали відповідних субстратів. Пероксидаза є ферментом, який реагує на самі різноманітні дії посередництвом зміни складу своїх ізоформ, або зростання активності вже присутніх молекулярних форм. Після синтезу ізоферменти пероксидази можуть переміщуватися із цитоплазми у переплазматичний простір, тобто цей фермент є секретований. Досить високий поліморфізм пероксидаз зумовлений із одного боку тим, що вони кодуються великою кількістю локусів та алелей, а із іншого – посттранскрипційними модифікаціями молекул, пов'язаними із роботою специфічних протеаз і глікозилюванням окремих ізоферментів. У клітині пероксидази існують як у цитоплазматично розчиненій, так і у мембранозв'язаних формах. Основна функція пероксидази – каталізувати окислення хімічних речовин за рахунок кисню пероксида водню. Встановлено, що цей фермент володіє не тільки пероксидазними, але і оксидазними властивостями, ка-

талізуючи окислення цілого ряду сполук за рахунок не активованого молекулярного кисню [3]. У нашому випадку після проведення першого пасажу калюсів томату було проведено вивчення вмісту цього антиоксидантного фермента у контрольних варіантах та у експериментальних зразках різних сортів томату. Було встановлено зростання вмісту пероксидази, порівнюючи із контролем у такому порядку: Контроль → Лагідний → Бобрицький → Борівський → Хорів.

Висновки

При отриманні у культурі *in vitro* нових форм рослин томату із підвищеною стійкістю до хлоридного засолення ґрунту для відбирання резистентних клітинних ліній необхідно використовувати метод ступінчастої селекції, що включає кілька послідовних пасажів при різній концентрації селективного агента на етапах індукції проліферації або проліферації морфогенезу калюсних культур. Також, було виявлено зростання вмісту пероксида водню у калюсах томатів і відповідно стимуляцію активності антиоксидантних ферментів супероксиддисмутази та пероксидази.

References

1. Kovbasenko R. V. Cellular selection of plants for stress resistance. Kyiv : CPU "COMPRINT". 2021. 452 p. [in Ukrainian]
2. Kovbasenko R. V., Kovbasenko V. M. The role of glutathione in plant life. Kyiv : 2020. 375 p. [in Ukrainian]
3. Kovbasenko R. V., Kovbasenko V. M., Shoty M. V. The role of antioxidant enzymes in pathogenesis. Kyiv, 2022. 446 p. [in Ukrainian]
4. Ahmad P., Jaleel C. A., Salem M. A., Nabi G., Sharma S. Roles of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2010. Vol. 30. P. 161–175.
5. Adamovskaya V. G., Molodchenkova O. O. The formation of biochemical resistance to biotic and abiotic stress in cereals. *Crop Plant Resistance to Biotic and Abiotic Factors: Current Potential and Future Demands: Proc. 3rd Int. Symp. on Plant Protection and Plant Health in Europe.* 2009. P. 452–454.
6. Boguszewska D., Grudkowska M., Zagdańska B. Drought-responsive antioxidant enzymes in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Research.* 2010. Vol. 53. P. 373–382.
7. Bowler C., van Montagu M., Inzé D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1992. Vol. 43. P. 83–116.
8. Dasgupta M., Sahoo M. R., Kole P. C. et al. 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. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 2008. Vol. 94, № 2. P. 161–170.
9. Hasegawa P. M., Bressan R. A., Zhu J. K., Bohnert H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 2000. Vol. 51. P. 463–499.
10. Kishor P. B., Kavi S. G., Reddi C. M. Resistance of rice collus tissues to sodium chloride and polyethyleneglicol. *Cur. Sci.* 1985. Vol. 54, № 21. P. 1129–1131.
11. Mücke A., Donini B. Induced mutation. In: Hayward M. D. (ed.) *Plant Breeding Principles and Prospects.* 1993. P. 52–62.
12. Murashige Y., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 1962. Vol. 3. P. 473–497.
13. Neelakandan A. K., Wang K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Review. Plant Cell Rep.* 2012. Vol. 31. P. 597–620.
14. Shan S. H., Gorham J., Forster B. P., Wynjones R. G. Salt tolerance in the Triticeae. The contribution of the D-Genome to cation selectivity in hexaploid wheat. *J. Exp. Bot.* 1987. Vol. 38, № 187. P. 27–34.
15. Vyroubalová S., Šmehilová M., Galuszka P., Ohnoutková L. Genetic transformation of barley: limiting factors. *Review. Biologia plantarum.* 2011. Vol. 55, № 2. P. 213–224.

KOVBASENKO R. V.¹, KRAVETS A. P.¹, SYMONENKO Yu. V.¹, EMELYANOV V. I.^{1,2}

¹ *Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Acad. Zabolotnoho str., 148*

² *Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17*

FEATURES OF CELLULAR SELECTION OF TOMATO PLANTS, RESISTANCE AGAINST SALINING

Aim. For selection at the cellular level, nutrient media are offered, which, although not completely, would partially correspond to natural stress conditions. **Methods.** As explants, immature embryos, cotyledon nodes with meristematic activity, and hypocotyls of tomato plants of the Lagidnyi, Khoryv, Borivskyi. **Results.** An agar medium of general mineral composition with different concentrations of growth regulators was used for the cultivation of isolated tissues the generally accepted method. **Conclusions.** When creating *in vitro* new forms of tomato plants with increased resistance to chloride salinization of the soil, it is necessary to select resistant cell lines using the stepwise selection method according to the scheme, which includes several consecutive actions of a selective agent in different concentrations at the stages of induction – proliferation, morphogenesis of callus cultures. An increase in the content of hydrogen peroxide in callus structures and stimulation of the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase and peroxidase were also found.

Keywords: *Lycopersicon esculentum* Mill., cell selection, antioxidant enzymes, growth regulators, salting.