

УДК 575.827:633.63:632.35

Ю. В. Коломієць¹

Л. М. Яковлева²

к. б. н.

О. Л. Кляченко¹

к. б. н.

Л. М. Ващенко²

к. б. н.

¹Національний аграрний університет

²Інститут мікробіології і вірусології НАН України,

ВИКОРИСТАННЯ ДЕЯКИХ МЕТОДІВ КЛІТИННОЇ СЕЛЕКЦІЇ І МУТАГЕНЕЗУ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ СТІЙКОСТІ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ ДО ЗБУДНИКІВ БАКТЕРІОЗІВ

Досліджено вплив метаболітів бактерій *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* і *Pseudomonas wieringae* на ріст калусної тканини і рослин-регенерантів цукрових буряків. Розроблена схема клітинної селекції цукрових буряків на стійкість до збудників бактеріозів *P. syringae* pv. *aptata* і *P. wieringae*.

Постановка проблеми

Бактеріозі цукрових буряків, збудниками яких є бактерії *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (Brown & Jamieson 1913) Yong, Dye & Wilkie 1978 і *Pseudomonas wieringae* (Wieringae 1927) Elliott 1951, – одна з основних причин зниження врожайності і технологічних показників цукрових буряків. Втрати врожаю цукрових буряків від них у багатьох регіонах вирощування становлять в середньому від 10 до 20 % [10].

Одержання сортів сільськогосподарських рослин, у тому числі цукрових буряків, із підвищеною стійкістю до фітопатогенів – важливе завдання сучасної селекції. В останній час велику зацікавленість у дослідників викликають методи біотехнології, які використовуються для одержання рослин-регенерантів із калусних і суспензійних культур, що пройшли відбір у стресових умовах [5]. Використання методів експериментального мутагенезу і клітинної селекції на рівні популяцій соматичних клітин *in vitro* дозволяють одержувати клітини з генотипом, який обумовлює стійкість до фітопатогенів. Регенерація із таких клітин рослин, які зберігають таку стійкість, дає можливість одержувати генотипи і використовувати їх в селекції як вихідний матеріал [1, 6].

Метою даної роботи було розроблення селективної системи для виявлення мутантних клітин, резистентних до метаболітів *P. syringae* pv. *aptata* та *P. wieringae* і одержання рослин-регенерантів цукрових буряків, стійких до даних патогенів.

Об'єкти досліджень. Вихідним матеріалом для досліджень була калусна культура, одержана із сім'ядольних листків і листових пластинок цукрових буряків трьох генотипів: сорту Білоцерківський однонасінний 45, триплоїдного гібриду Перла, диплоїдного гібриду Український ЧС 70. Для

одержання калусних ліній використовували модифіковане середовище Мурасіге-Скуга (МС) [12], яке містило 2,0 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК), 0,4 мг/л 6-бензиламінопурина (6-БАП) і 3,0 % сахарози. Калусні культури культивували при температурі $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 16 годинному фотоперіоді і інтенсивності освітлення 2-3 тис. лк., пересаджували один раз у два тижні, при цьому враховували наступні показники: життєздатність, приріст маси. Масу калусної тканини в процесі культивування визначали за Кучеренко і ін [8].

У роботі використовували ефективний мутаген γ -опромінення, сумарна доза якого складала 20 Гр протягом 14 хв.

В якості селективного агенту використовували суспензію клітин (20 млрд. кл/мл) *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* 8544 і *Pseudomonas wieringae* 7922, прогрітих при 100°C протягом 2,5 год і ліпополісахарид-білкові препарати (ЛПСБ) цих штамів. *P. syringae* pv. *aptata* 8544 і *P. wieringae* 7922 вирощували 24 год. при 28°C на картопляному агарі. Для виділення ЛПСБ нами був використаний метод, що базується на екстракції 0,85 % розчином NaCl [3]. Наявність ЛПСБ в препараті перевіряли в реакціях кільцепреципітації [1] і подвійної дифузії в агарі за Ouchterlony [13]. Жирнокислотний склад ЛПСБ вивчали методом газорідинної хроматографії метилових ефірів жирних кислот [11]. Концентрація прогрітих клітин (ПК) в селективному середовищі складала 2, 4, 6, 8 і 10 % для *P. syringae* pv. *aptata* 8544; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 і 1,0 % – для *P. wieringae*. Для первинного відбору клітинних колоній була використана стандартна методика плейтинга. Протягом 4-х тижнів спостерігали за розвитком калусних колоній. Для подальшого пасування відбирали колонії діаметром > 1 мм, оскільки для формування життєздатного клона клітина повинна пройти не менше 9 клітинних ділень. Через 4 тижні культивування проводили підрахунок життєздатних клонів на стандартному і селективному середовищі. Селекцію проводили з використанням сублетальної дози ПК (6 %, 8 % для *P. syringae* pv. *aptata* 8544; 0,6 %, 0,8 % для *P. wieringae*) за схемою: селективне середовище (3 пасажа) – контрольне середовище (3 пасажа) – селективне середовище (3 пасажа). Для одержання рослин-регенерантів мікрокалус переносили на поживне середовище МС, доповнене 1 мг/л 6-БАП, 2 мг/л гліцину і 3 % сахарози. При цьому враховували частку морфогенного і неморфогенного калусу (%), початок морфогенезу.

З метою одержання морфологічно нормальних рослин регенеранти переносили в пробірки на поживне середовище МС, яке містило 2 мг/л індолілмасляної кислоти (ІМК), 0,05 мг/л 6-БАП, 2,5 мг/л гіберелової кислоти (ГК), 20 мг/л аскорбінової кислоти і 3 % сахарози. Стійкість до бактеріальних хвороб визначали за допомогою штучного зараження, як контроль використовували рослини-регенеранти, одержані без впливу

селективного фактору [4]. Математично результати опрацьовували за Лакінім [9].

Результати досліджень

У грамнегативних бактерій токсичні властивості щодо рослини-хазяїна, окрім інших сполук, проявляють ліпополісахарид-білкові комплекси зовнішньої мембрани. За токсичну активність макромолекули ЛПСБ відповідає ліпід А, до складу якого входять жирні кислоти [2]. В жирнокислотному складі досліджуваних нами ЛПСБ виявлені насичені (додеканова, гексадеканова, октадеканова, *cis*-9,10-метилгексадеканова), ненасичені (гексадеценава, октадеценава), та гідроксизаміщені (3-гідроксидеканова, 2-гідроксидодеканова) жирні кислоти, що характерно для бактерій роду *Pseudomonas*. У клітинах бактерій виявлені жирні кислоти переважно з парним числом вуглецевих атомів. З них 49,3 % становили ненасичені жирні кислоти для *P. syringae* pv. *aptata* 8544, 49,81 % – для *P. wieringae* 7922 (табл. 1).

Таблиця 1. Жирнокислотний склад ліпідів А
(% від загальної площі піків)

Жирні кислоти	<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> 8544	<i>P. wieringae</i> 7922
3-гідроксидеканова (C 10 : 03-ОН)*	1,43	1,58
Додеканова (C 12 : 0)	14,37	14,96
2-гідроксидодеканова (C 12 : 02-ОН)	8,17	7,48
Гексадеценава (C 16 : 1)	27,79	30,84
Гексадеканова (C 16 : 0)	24,73	24,49
<i>cis</i> -9,10метилгексадеканова (C 17 : 0 cyclo)	4,09	1,36
Октадеценава (C 18 : 1)	21,66	18,37
Октадеканова (C 18 : 0)	1,43	0,91

* Примітка. Перша цифра – кількість атомів вуглецю, друга – кількість подвійних зв'язків; в оксизаміщених жирних кислотах вказано також положення гідроксильної групи.

ЛПСБ *P. wieringae* 7922 характеризувався високою О-специфічною активністю в реакціях кільцепреципітації (титр 1:500000), він давав не менше двох чітких ліній агарпреципітації в тесті Ouchterlony. ЛПСБ *P. syringae* pv. *aptata* 8544 також був активним в наведених реакціях (титри 1:100000 в реакції кільцепреципітації, одна чітка лінія агарпреципітації).

За хімічним складом жирних кислот, моносахаридів, та О-антигенною активністю одержані нами препарати відповідають характеристикам ЛПСБ [7]. Тобто, ці препарати можуть бути використані як селективний фактор. Так як одержання ЛПСБ-комплексів це досить трудоемкий процес, для роботи була взята і суспензія прогрітих клітин, яка широко використовується як О-антигени бактерій.

Першим етапом нашої роботи було порівняльне визначення чутливості калусних тканин цукрових буряків ПК *P. syringae* pv. *aptata* 8544 і *P. wieringae* 7922 в діапазоні концентрацій від 2 до 10 % і від 0,2 до 1,0 % відповідно. Калусні клітини цукрових буряків без обробки і після обробки γ -опроміненням висівали на поживні середовища з різними концентраціями ПК. Через 3–4 тижні культивування виростали різні за розміром калусні колонії. Внесення ПК в поживне середовище негативно впливало як на інтенсивність формування калусів, так і на їхню масу. ПК в концентрації 1,0 % *P. wieringae* 7922 і 10 % *P. syringae* pv. *aptata* 8544 викликали утворення лише нежиттєздатні колонії. Найменша концентрація ПК 0,2 % і 2 % відповідно суттєво не впливала на приріст і життєздатність калусної тканини. Суттєву різницю в зменшенні приросту калусної маси спостерігали при концентраціях ПК *P. wieringae* 7922 0,6-0,8 % і *P. syringae* pv. *aptata* 8544 6-8 %. При висіві колоній без обробки γ -опроміненням на середовище з концентрацією ПК *P. syringae* pv. *aptata* 8544 8 % кількість життєздатних клонів для сорту Білоцерківський однонасінний 45 і триплоїдного гібриду Перла було біля 13 %, а для диплоїдного гібриду Український ЧС 70 – 2 %. При цьому приріст калусної маси для сорту Білоцерківський однонасінний 45 зменшився на 44 %, гібриду Перла – на 70 % і для диплоїдного гібриду Український ЧС 70 – на 78 %. При обробці клітин γ -опроміненням частка життєздатних клонів складала біля 22 % для сорту Білоцерківський однонасінний 45 і триплоїдного гібриду Перла та 10 % для диплоїдного гібриду Український ЧС 70 (табл. 2).

Таблиця 2. Інтенсивність калусоутворення і приріст калусної маси цукрових буряків після обробки γ -опроміненням

Умови культивування		Генотип	Інтенсивність калусоутворення, %		Середня маса калуса, г	
штам 8544	штам 7922		штам 8544	штам 7922	штам 8544	штам 7922
контроль		Білоцерківський однонасінний 45	100		1,56 ± 0,03	
ПК 6 %	ПК 0,6 %		40	40	0,30 ± 0,15	0,27 ± 0,12
ПК 8 %	ПК 0,8 %		24	22	0,21 ± 0,12	0,17 ± 0,11
контроль		Український ЧС 70	100		0,88 ± 0,05	
ПК 6 %	ПК 0,6 %		17	20	0,12 ± 0,09	0,10 ± 0,08
ПК 8 %	ПК 0,8 %		11	10	0,10 ± 0,10	0,06 ± 0,09
контроль		Перла	100		0,97 ± 0,05	
ПК 6 %	ПК 0,6 %		38	36	0,25 ± 0,13	0,22 ± 0,12
ПК 8 %	ПК 0,8 %		24	22	0,16 ± 0,15	0,15 ± 0,15

Нами виявлено, що γ -опромінення індукує зміни у клітинах, які дозволили стабільно рости цим клітинам на селективному середовищі. При цьому відмічено утворення поодиноких колоній на селективному середовищі і стимуляцію їх росту вже через 2,5 тижні культивування, тоді як у варіантах без обробки γ -опроміненням – лише через 4 тижні. Мікрокалуси були рихлого типу світло-жовтого кольору.

В подальшому клітинні колонії виймали із шару агаризованого середовища і культивували окремо. Дія стресу по різному відображалась на їх рості і розвитку: калуси зберігали попередні характеристики або тканини некрозувались. Протягом культивування виростали три типи калусів: 1) які практично не росли; 2) світло-жовтого кольору, які помірно росли та 3) щільні морфогенні калуси. Початок морфогенезу відмічали на 4–6 тижнів культивування, частота формування морфогенного резистентного калусу для генотипів Білоцерківський виявилась наступною: однонасінний 45 – 26 %, Перла – 24 %, Український ЧС 70 – 11 % (табл. 3).

Таблиця 3. Морфогенез в калусній культурі цукрових буряків

Генотип	Початок морфогенезу, тиж.		Морфогенний калус, %		
	конт- роль	після селекції	конт- роль	після селекції	
				<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> 8544	<i>P. wieringae</i> 7922
Білоцерківський однонасінний 45	2	4	88	26	19
Український ЧС 70	2	6	72	11	9
Перла	2	4	78	24	18

Для індукції соматичного морфогенезу в резистентній калусній тканині цукрових буряків змінювали концентрацію екзогенних гормонів у поживному середовищі. Резистентні калуси висаджували на поживне середовище, яке містило 2 мг/л 6-БАП, на якому утворювались соматичні ембріїди у всіх досліджуваних генотипів цукрових буряків.

Спочатку всі резистентні лінії мали здатність до регенерації. Але протягом тривалого селективного відбору деякі з них втратили морфогенетичну здатність. На даному поживному середовищі соматичні ембріїди досить швидко розвивались в нормальні проростки цукрових буряків (табл. 4).

Із наведених даних у таблиці 4 видно, що кількість одержаних рослин-регенерантів залежить від досліджуваного генотипу і від схеми клітинної селекції.

Таблиця 4. Регенерація резистентних рослин-регенерантів

Генотип	Схема селекції	Число рослин, шт
<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> 8544		
Білоцерківський однонасінний 45	8 % ПК	53 ± 0,2
	6 % ПК	61 ± 0,3
Український ЧС 70	8 % ПК	10 ± 0,2
	6 % ПК	27 ± 0,2
Перла	8 % ПК	55 ± 0,3
	6 % ПК	60 ± 0,3
<i>P. wieringae</i> 7922		
Білоцерківський однонасінний 45	0,8 % ПК	45 ± 0,3
	0,6 % ПК	58 ± 0,4
Український ЧС 70	0,8 % ПК	8 ± 0,2
	0,6 % ПК	25 ± 0,2
Перла	0,8 % ПК	50 ± 0,3
	0,6 % ПК	57 ± 0,2

Рослини-регенеранти, одержані на контрольному і селективних середовищах були перевірені на стійкість до *P. syringae* pv. *aptata* 8544 і *P. wieringae* 7922. Для цього рослини із пробірки були занурені в суспензію клітин патогенів титром 20 млрд. кл/мл (табл. 5).

Результати інфікування показали, що в контрольних рослинах вже через 3–4 години відмічали втрату тургору у листках, з наступною повною некротизацією листків, в'яненням цілих рослин. У рослин, одержаних після клітинної селекції, була виявлена різниця в реакції на збудників бактеріозів *P. syringae* pv. *aptata* 8544 і *P. wieringae* 7922. Серед рослин-регенерантів сорту Білоцерківський однонасінний 45 50 % склали рослини, які мали підвищену стійкість порівняно з контролем. Вони не втрачали тургор, лише у деяких спостерігали частковий некроз листків, тоді як лінії із підвищеною стійкістю у диплоїдного гібриду Український ЧС 70 не перевищували 19 % від загальної кількості одержаних рослин.

Таблиця 5. Реакція рослин-регенерантів на інфікування збудниками *P. syringae* pv. *aptata* 8544 і *P. wieringae* 7922

Генотип	Варіант	Рослини-регенеранти, %			
		живі		мертві	
		штам 8544	штам 7922	штам 8544	штам 7922
Білоцерківський однонасінний 45	контроль	15	15	85	85
	після селекції	50	48	50	52
Український ЧС 70	контроль	2	2	98	98
	після селекції	19	17	81	83
Перла	контроль	10	10	90	90
	після селекції	42	40	58	60

Висновки та перспективи подальших досліджень

У результаті проведених досліджень в культурі калусних клітин цукрових буряків з використанням мутагену і сублетальних концентрацій ПК, одержані стійкі клітинні лінії до збудників бактеріозів *P. syringae* pv.

aptata 8544 і *P. wieringae* 7922. Показана можливість одержання клітинних культур і рослин-регенерантів цукрових буряків, які зберігають до росту в присутності метаболітів *P. syringae* pv. *aptata* 8544 і *P. wieringae* 7922. Розроблена схема клітинної селекції на стійкість до *P. syringae* pv. *aptata* 8544 і *P. wieringae* 7922 з використанням індукованого мутагенезу, культури калусних клітин і селективних середовищ.

Запропонована схема клітинної селекції дозволяє відбирати клітинні лінії і рослини-регенеранти цукрових буряків з підвищеною стійкістю до збудників бактеріозів з подальшим їх використанням селекціонерами для створення стійких генотипів.

Література

1. Бельтюкова К.И., Матышевская М.С., Куликовская М.Д., Сидоренко С.С. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений. – К.: Наук. думка, 1968. – 316 с.
2. Варбанец Л.Д. Эндотоксины грамотрицательных бактерий: структура и биологическая роль // Микробиол. журн. – 1994. – 56, №3. – С. 76–97.
3. Здоровенко Г.М., Яковлева Л.М., Гвоздяк Р.И., Захарова И.Я., Кошечкина Л.Н. Выделение, химический состав и серологическая характеристика полисахарида *Pseudomonas wieringae* // Микробиол. журн. – 1981. – 43, №5. – С. 65–70
4. Иванова Н.Г. Разработка бактериального теста и оценка устойчивости соматоклональных вариантных линий картофеля к кольцевой гнили // Использование клеточных технологий в селекции картофеля. – М.: Агропромиздат, 1987. – С. 29–32
5. Калашиникова Е.А. Клеточная селекция на устойчивость к грибным болезням: Автореф. Дис. ... д-ра биол.наук. – Москва, 2003. – 54 с.
6. Каранова С.Л. Принципы получения практически ценных штаммов кудьтивиреуемых клеток растений методом экспериментального мутагенеза. Автореф. дисс...д.б.н., М., РХТУ, 42 с.
7. Коломієць Ю.В., Яковлева Л.М., Кляченко О.Л., Ващенко Л.М. Метаболіти бактерій роду *Pseudomonas* як селекційний фактор стійкості цукрових буряків до бактеріозів // Микробиол. Журн. – 2005. – т. 67, №6. – С. 30–39.
8. Кучеренко Л.А., Маддумаже Р.П., Гужов Ю.Л. К методике определения массы калусных тканей в процессе культивирования // С.-х. биология. – 1991. – № 3. – С. 84–85.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для университетов и педагогических институтов. – М.: Высш. шк., 1973. – 344 с.
10. Роїк М.В. Буряки. – К.: XXI Вік “РІТА” – “ТРУД” – “КІЇВ”, 2001. – 320 с.
11. Brian B.L., Gardner E.W. Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gas-liquid chromatography // Appl. Microbiol. – 1967. – Vol. 15, N6, – p. 1499–1500
12. Murasige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. plant. – 1962. – 15. – P. 473–497

13. *Ouchterlony O.* Diffusion-in-gell methods for immunological analysis // *Progr. in Allergy.* – 1958. – 5, N 1. – P. 1–78.
