

УДК 581.143.6:633.81

ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К СОЛЕВОМУ СТРЕССУ КАЛЛЮСНЫХ КУЛЬТУР ЭФИРОМАСЛИЧНОЙ ГЕРАНИ

Н.А. ЕГОРОВА

*Институт эфиромасличных и лекарственных растений Украинской академии
аграрных наук
95493 Симферополь, ул. Киевская, 150
e-mail: yegorova.na@mail.ru*

Исследованы особенности действия солевого стресса на каллюсогенез и морфогенез в культуре изолированных тканей эфиромасличной герани (*Pelargonium roseum* Willd.) в течение нескольких пассажей. Выявлены сублетальные концентрации NaCl для неморфогенных и морфогенных каллюсных культур, проведен отбор устойчивых линий. Показано преимущество использования для селекции *in vitro* морфогенных каллюсных культур, получены растения-регенеранты, проведен их предварительный анализ.

Ключевые слова: *Pelargonium roseum* Willd., клеточная селекция, солеустойчивость, каллюсогенез, морфогенез.

Одним из стрессовых факторов окружающей среды, который наносит существенный ущерб сельскому хозяйству, является засоление почв. В последние годы в связи с интенсивным орошением значительно увеличиваются площади с вторичным засолением. Всестороннее изучение реакции растений на повышенное содержание солей в природной среде и в экспериментальных условиях позволило выявить много морфологических, физиологических и биохимических механизмов солеустойчивости [8, 12]. При этом были установлены некоторые сходные механизмы устойчивости к данному стрессовому фактору, которые проявляются на уровне как целого растения, так и его изолированных соматических клеток, что и послужило основанием для развития методов клеточной селекции *in vitro* [12, 15].

Следует отметить, что в настоящее время нет единой схемы клеточной селекции или общих экспериментальных подходов, применимых для разных видов растений и разных стрессовых факторов. Существует много теоретических и методологических проблем, с которыми сталкиваются исследователи при создании адекватных селективных систем на устойчивость к абиотическим факторам среды, в том числе и к засолению. В литературе имеются достаточно разнообразные данные, касающиеся используемых биотехнологических объектов и критериев для отбора *in vitro*, особенностей создания селективных систем, длительности действия стрессового фактора, а также эффективности использования мутагенеза или повторного стрессового воздействия [1—4, 9, 11, 12].

Эфиромасличная герань, к которой относится ряд видов рода *Pelargonium*, является ценной культурой, возделываемой во многих странах в

основном для получения эфирного масла, применяемого в парфюмерно-косметической, пищевой промышленности и медицине [13]. Разработка биотехнологических методов, в частности клеточной селекции, позволит повысить эффективность традиционного селекционного процесса и решить ряд проблем, связанных с созданием устойчивых к неблагоприятным стрессовым факторам форм. В литературе представлены данные, касающиеся изучения процессов каллюсогенеза, морфогенеза и разных аспектов микроразмножения эфиромасличной герани *in vitro* при использовании разнообразных питательных сред и типов эксплантатов [17, 18]. В наших исследованиях ранее была показана возможность получения растений-регенерантов из каллюсных культур у разных сортов герани и их широкая вариабельность по морфологии, числу хромосом и хозяйственно-полезным признакам [6, 10]. Исследования с этой культурой, касающиеся разработки методов клеточной селекции к стрессовым факторам среды, насколько нам известно, ранее не проводились.

Целью настоящей работы было изучение особенностей действия NaCl на процессы каллюсогенеза и морфогенеза у эфиромасличной герани *in vitro* для разработки методов клеточной селекции на устойчивость к засолению.

Методика

Материалом для исследования служил основной возделываемый сорт эфиромасличной герани Розовая (*Pelargonium roseum* Willd.) [13]. Для получения каллюсных тканей в качестве эксплантатов использовали сегменты черешков листьев взрослых растений. Приготовление питательных сред, введение в культуру и субкультивирование проводили с применением традиционных методик, принятых в работах по культуре тканей [7, 15]. Каллюсные культуры культивировали на агаризованной среде Мурасиге и Скуга (МС), дополненной фитогормонами в различных модификациях. Для инициации и пассирования каллюсы использовали среду МС с добавлением 2,4,5-Т (1,0 мг/л) и кинетина (0,5 мг/л). Пассирование каллюсных тканей осуществляли каждые 30—40 дней. Масса каллюсных трансплантатов составляла примерно 80 мг. В экспериментах по изучению солевого стресса использовали каллюсные ткани 4—5 пассажей.

В опытах по изучению влияния засоления каллюсы переносили на среду с добавлением NaCl в концентрациях 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 %. В качестве контроля использовали среду без NaCl. В конце цикла выращивания определяли массу сырого каллюсы, ростовой индекс (РИ), который рассчитывали как отношение прироста массы каллюсной ткани к массе трансплантата, и РИ в процентах к контролю. При ступенчатом отборе каллюсы культивировали на среде с 0,25 % NaCl (1 пассаж), затем хорошо растущие линии культивировали на среде с 0,5 % NaCl (1 пассаж) и с 0,75 % NaCl (2 пассажа).

Для индукции морфогенеза каллюсные ткани переносили на среду МС с добавлением БАП (0,5 мг/л). Через 1—1,5 мес культивирования на регенерационной среде определяли частоту морфогенеза как количество каллюсов с почками и побегами в процентах от общего числа анализируемых каллюсов. Каллюсные культуры выращивали при температуре +26 °С, 70 %-й влажности и интенсивности освещения 600 лк с 16-часовым фотопериодом. Морфогенные каллюсные ткани и проростки вы-

рашивали при 2—3 тыс. лк. Полученные в каллюсной культуре проростки адаптировали в условиях *in vivo* в торфо-перлитной смеси, а затем высаживали в сосуды с землей и выращивали в условиях защищенного грунта. При анализе влияния засоления на развитие меристемных культур проводили эксплантацию меристем (0,5—0,7 мм) исходного сорта и полученных из отобранных устойчивых линий растений-регенерантов (№ 414-1; № 414-17) на контрольную среду и среду с добавлением 1 % NaCl.

Все эксперименты повторяли не менее 2—3 раз. Полученные данные обработаны статистически на персональном компьютере с использованием программы Microsoft Office Excel 2003. На графиках представлены средние арифметические значения и доверительные интервалы.

Результаты и обсуждение

Одним из наиболее удачных объектов для селекции *in vitro* является суспензионная культура, особенно с применением метода плейтинга. Тем не менее во многих работах при создании селективных систем успешно используются и каллюсные ткани [1—5, 9, 14]. Разработанные в наших предыдущих исследованиях методы получения и длительного пассирования каллюса послужили основанием для использования каллюсных трансплантатов в качестве материала при изучении действия солевого стресса и отбора устойчивых линий у герани. Для многих видов растений при моделировании солевого стресса в питательную среду вводят NaCl, Na₂SO₄ или соли морской воды [3, 9, 12, 14]. Иногда для получения солеустойчивых генотипов используются и другие подходы, в частности, показана возможность отбора солеустойчивых линий табака, сои и подсолнечника с применением селективной системы с ионами бария [11]. Мы в экспериментах при создании селективных сред использовали хлоридное засоление. Основной задачей на первых этапах была оценка действия различных концентраций NaCl на прирост массы каллюса. Для этого в конце цикла выращивания в течение нескольких пассажей определяли ростовой индекс и прирост по отношению к контролю (ростовой индекс в контроле составлял в 1—4 пассажах эксперимента 10,8—11,4). Установлено, что концентрация 0,25 % NaCl оказывала селективное действие, снижая прирост каллюса (рис. 1). По мере культивирования в те-

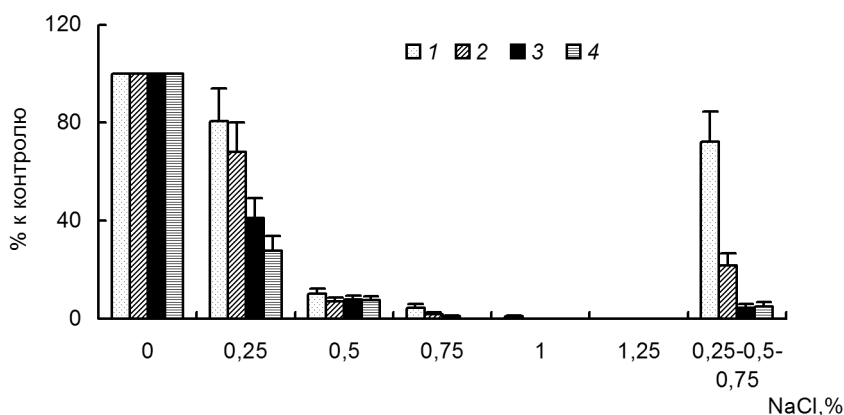


Рис. 1. Влияние различных концентраций NaCl в питательной среде и пассажа на ростовой индекс (% к контролю) неморфогенного каллюса герани. Здесь и на рис. 2—4:

1—4 — соответственно 1—4-й пассажи

чение 4 пассажей прирост каллюса на этой среде снижался с 80,6 до 27,6 % контроля. Концентрации NaCl выше 1 % оказывали летальное действие, приводя к полному угнетению пролиферации каллюса, его почернению и некрозу. Для отбора устойчивых к засолению линий герани на этом этапе исследований было целесообразно использовать в качестве сублетальной концентрации NaCl 0,75 %, при которой в течение двух пассажей наблюдался небольшой прирост — в среднем до 5 % контроля (см. рис. 1). Однако при этом выделялось до 17–26 % каллюсных линий, которые на селективной среде имели 10–20 % прироста к контролю, а после снятия селективной нагрузки постепенно наращивали массу.

Для получения устойчивых линий некоторых видов растений довольно успешным оказался метод ступенчатого отбора, при котором постепенно повышается уровень стрессового фактора [2, 3, 9, 12, 14]. У герани проанализированы различные варианты ступенчатого отбора, наиболее эффективным оказался вариант, в котором культивирование проводили на средах с добавлением 0,25 % NaCl (1 пассаж) — 0,5 % NaCl (1 пассаж) — 0,75 % NaCl (2 пассажа). Такой вариант отбора позволил немного повысить прирост каллюсных тканей в 3–4 пассажах по сравнению с прямым отбором (см. рис. 1) и получить 3 устойчивые линии с ростовым индексом 1,3–1,6. Однако необходимо дальнейшее изучение эффективности и целесообразности использования ступенчатого отбора у герани.

Важной проблемой при разработке методов клеточной селекции является индукция морфогенеза и регенерация растений у отобранных на селективном фоне линий, так как имеются данные о том, что резистентные линии могут снижать регенерационную способность при переводе на соответствующие регенерационные среды [1, 4, 9, 16]. Установлено, что у герани отобранные солеустойчивые каллюсные линии при переносе на регенерационную среду сохраняли способность к морфогенезу. Как видно из представленных данных, частота морфогенеза снижалась с повышением концентрации стрессового фактора и длительности культивирования (рис. 2). Однако даже при переносе линий, отобранных на среде с 0,75 % NaCl, на среду для индукции морфогенеза наблюдался хороший прирост массы, и частота морфогенеза в 1–4 пассажах составила 18,2–36,7 %. Следует отметить, что у отобранных линий (особенно при концентрации NaCl 0,50–0,75 %) морфогенез проходил медленнее,

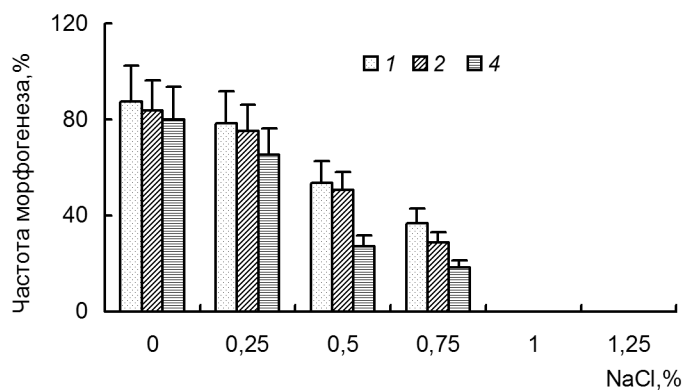


Рис. 2. Влияние различных концентраций NaCl в питательной среде для каллюсогенеза и пассажа на индукцию морфогенеза при переносе неморфогенного каллюса герани на регенерационную среду

чем в контроле, отмечалась задержка развития побегов, образование большого числа аномальных и витрифицированных проростков.

В литературе имеются противоречивые данные, касающиеся необходимости проведения регенерации растений при селективной нагрузке. В одних исследованиях авторы проводят индукцию морфогенеза из отобранных устойчивых линий на средах без селективного фактора [1, 5], в других — отмечается необходимость использования органогенных каллюсов или наличия стрессового фактора в период регенерации растений [2, 4, 14]. В описанных выше экспериментах на герани при селекции *in vitro* отобранные на средах с NaCl устойчивые линии мы переносили на регенерационную среду без селективной нагрузки. При этом сублетальная концентрация соли была не очень высокой (0,75 % NaCl) по сравнению с другими видами растений, у которых сублетальные концентрации достигали 2–3 % [3, 9, 12].

В дальнейшей серии опытов с целью поиска более эффективных селективных систем мы исследовали действие хлоридного засоления при добавлении NaCl в питательную среду для индукции морфогенеза. Для этого неморфогенные каллюсные ткани культивировали на среде для каллюсогенеза без селективного фактора, а затем переносили на регенерационную среду с добавлением разных концентраций NaCl. Установлено, что введение стрессового фактора в регенерационную среду является достаточно эффективным методическим приемом. В данной системе была более высокая сублетальная концентрация соли (1,0 % NaCl) и отмечалась лучшая пролиферация каллюсных тканей по сравнению с неморфогенным каллюсом — в течение 3 пассажей наблюдался 20–25 % прирост биомассы каллюса относительно контроля (рис. 3). При этом выделялось 11,8 % хорошо растущих каллюсных линий с ростовым индексом почти на уровне контроля (8,2–9,8). В течение 1-го пассажа каллюсов на регенерационной среде с 1,0 % NaCl отмечалось активное образование зеленых меристематических центров, однако почки и затем небольшие побеги появлялись только в следующем, 2-м пассаже, с частотой 12,5 % (рис. 4). Индукция морфогенеза и регенерация побегов в 3-м пассаже при сублетальной концентрации соли проходила еще с большей частотой (38,4 %), что может быть связано с задержкой процесса морфогенеза в предыдущих пассажах. Следует отметить, что наряду со значительным числом витрифицированных побегов на среде с сублетальной концентрацией NaCl появлялись нормальные проростки, которые

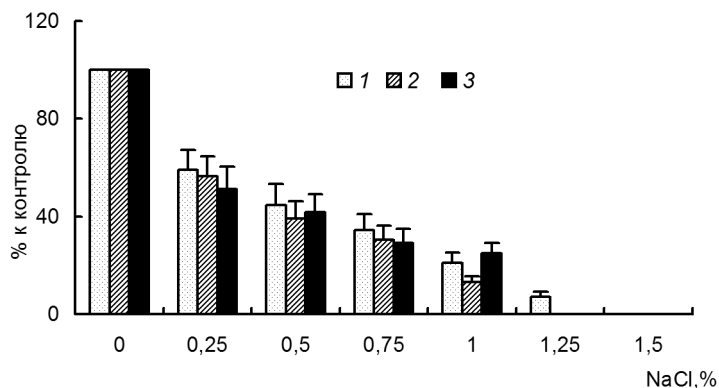


Рис. 3. Влияние различных концентраций NaCl в регенерационной питательной среде и пассажа на ростовой индекс (% к контролю) каллюса герани

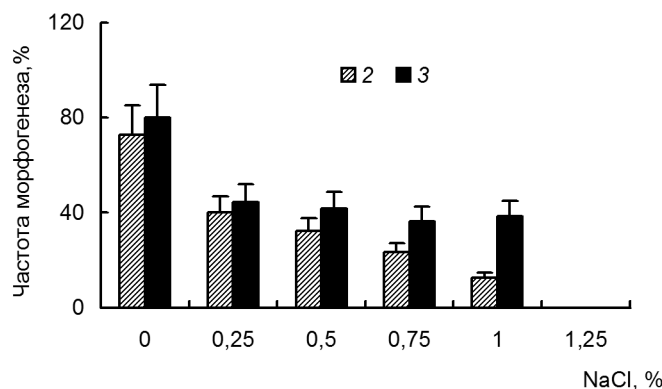


Рис. 4. Влияние различных концентраций NaCl в регенерационной питательной среде и пассажа на индукцию морфогенеза в каллюсной культуре герани

иногда имели антоциановую окраску стеблей и листьев. Хорошо развитые проростки с корнями в дальнейшем переносили для адаптации в обычные условия выращивания. Из-за слабой приживаемости регенерантов, выделенных после 3 пассажей культивирования на среде с селективной нагрузкой, в данном опыте было получено всего 8 растений. У многих видов растений также отмечалось развитие из устойчивых клеточных линий значительного числа аномальных или стерильных растений-регенерантов, их плохая приживаемость при адаптации *in vivo* [1, 4, 5, 9, 16].

Проведен предварительный сравнительный анализ растений-регенерантов (№ 414-1, № 414-17), полученных из устойчивых каллюсных линий, культивируемых на регенерационной среде с 1 % NaCl в течение 3 пассажей, и исходного сорта Розовая при эксплантации меристем на среду с 1 % NaCl (таблица). Установлено, что у сорта Розовая на среде с засолением все показатели развития меристем снижались более чем в 4 раза по сравнению с контрольной средой, а адвентивные побеги вообще не формировались. Развитие изолированных меристем у отобранных *in vitro* растений-регенерантов на среде с засолением было угнетено в меньшей степени, большинство изученных показателей достоверно не отличалось по сравнению со средой без NaCl (см. таблицу). Данные факты, по-видимому, могут косвенно свидетельствовать о большей солеустойчивости растений, выделенных из каллюсных линий.

Влияние NaCl в питательной среде на развитие меристемных культур герани различного происхождения

Происхождение образца	Содержание NaCl в среде, %	Приживаемость меристем, %	Высота побега, мм	Количество листьев, шт.	Количество адвентивных побегов на эксплантат, шт.
Сорт Розовая	0,0	100,0	20,7 ± 3,2	3,8 ± 0,2	3,9 ± 0,4
	1,0	21,3 ± 3,7	4,6 ± 0,3	1,3 ± 0,1	0,0
Регенерант № 414-1	0,0	100,0	14,3 ± 1,1	2,6 ± 0,3	2,8 ± 0,6
	1,0	81,8 ± 7,5	9,2 ± 0,9	1,7 ± 0,2	1,9 ± 0,5
Регенерант № 414-17	0,0	100,0	16,4 ± 1,4	3,1 ± 0,4	2,2 ± 0,7
	1,0	92,3 ± 8,3	11,7 ± 1,2	2,3 ± 0,3	2,0 ± 0,7

Таким образом, проведенные исследования влияния засоления на процессы каллюсо- и морфогенеза у эфиромасличной герани позволили выявить сублетальную концентрацию NaCl для неморфогенного каллюса (0,75 %). Показано, что отобранные устойчивые каллюсные линии сохраняли способность к морфогенезу, однако процесс развития побегов был угнетен. Более эффективным методическим приемом селекции на солеустойчивость было введение NaCl в питательную среду для индукции морфогенеза и проведение отборов морфогенных каллюсных линий на фоне стрессового фактора. В такой селективной системе отмечена более высокая сублетальная концентрация NaCl (1,0 %), лучший прирост массы и возможность получения жизнеспособных проростков. Предварительный анализ солеустойчивости выделенных *in vitro* растений-регенерантов показал их повышенную устойчивость к NaCl на уровне изолированных меристем по сравнению с исходным сортом. Безусловно, необходимы дальнейшие исследования вопросов, касающихся возможности использования ступенчатого отбора, мутагенной предобработки, а также анализа выделенных растений-регенерантов. Однако полученные данные являются хорошей основой для разработки метода клеточной селекции на солеустойчивость, который позволит создавать ценный селекционный материал эфиромасличной герани.

1. Белянская С.Л., Шамина З.Б., Кучеренко Л.А. Морфогенез в клонах риса, резистентных к стрессовым факторам // Физиология растений. — 1994. — 41, № 4. — С. 573—577.
2. Гладков Е.А. Получение растений полевицы побегоносной, обладающей повышенной устойчивостью к кадмию // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. Тез. докл. 9-й Междунар. конф. — М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. — С. 90—91.
3. Губанова Н.Я., Дубровная О.В., ЧуGUNKOVA Т.В. Отбор и сравнительный анализ устойчивости к солевому стрессу каллюсных культур кормовой свеклы, полученных из эксплантов различной плоидности // Физиология и биохимия культ. растений. — 2000. — 32, № 5. — С. 362—368.
4. Долгих Ю.И. Соматоклональная изменчивость растений и возможности ее практического использования (на примере кукурузы): Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 2005. — 48 с.
5. Дридзе И.Л. Использование аналога пролина для отбора стрессустойчивых вариантов в культуре ткани сои и табака: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1990. — 24 с.
6. Егорова Н.А. Влияние колхицина на каллусогенез и регенерацию растений эфиромасличной герани *in vitro* // Тр. Никит. бот. сада. — 2007. — 128. — С. 66—73.
7. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. — Киев: Наук. думка, 1980. — 488 с.
8. Косулина Л.Г., Луценко Э.К., Аксенова В.А. Физиология устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды. — Ростов н/Д.: Изд-во Ростов. ун-та, 2007. — 236 с.
9. Левенко Б.А. Клеточная селекция растений на устойчивость к стрессовым факторам: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Киев, 1991. — 41 с.
10. Потемкина Н.В., Егорова Н.А., Бугара А.М. Цитогенетическое исследование растений эфиромасличной герани, полученных в культуре тканей // Цитология и генетика. — 2004. — 38, № 2. — С. 26—30.
11. Сергеева Л.Е., Михальская С.И. Солеустойчивость Ba^{2+} -резистентных клеточных линий растений // Физиология и биохимия культ. растений. — 2006. — 38, № 6. — С. 491—497.
12. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. — Киев: Наук. думка, 1990. — 280 с.
13. Смолянов А.М., Ксендз А.Т. Эфиромасличные культуры. — М.: Колос, 1976. — 336 с.
14. Тугай Ю.А., ЧуGUNKOVA Т.В., Розумна Л.Ф. Реакция каллюсных культур буряків (*Beta vulgaris* L.) на солевой стресс // Фактори експериментальної еволюції організмів / Зб. наук. праць. Т. 3. — К.: Логос, 2006. — С. 515—518.
15. Шамина З.Б. Методические указания по клеточной селекции. — М., ВАСХНИЛ, 1984. — 36 с.
16. Bajaj Y.P.S., Gupta R.K. Different tolerance of callus cultures of *Pennisetum americanum* L. and *P. purpureum* Schum. to sodium chloride // J. Plant Physiol. — 1986. — 125, N 5. — P. 491—495.

17. Brown J.T., Charlwood B.V. The control of callus formation and differentiation in scented *Pelargoniums* // Ibid. — 123, N 5. — P.409—417.
18. Murthy B.N.S., Singh R.P., Saxena P.K. Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium* × *hortorum* Bailey cv. Ringo Roso) cotyledonary cultures // Plant Cell Rep. — 1996. — 15, N 6. — P. 423—426.

Получено 06.04.2009

ДОСЛІДЖЕННЯ СТІЙКОСТІ ДО СОЛЬОВОГО СТРЕСУ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР ЕФІРООЛІЙНОЇ ГЕРАНІ

Н.О. Єгорова

Інститут ефіроолійних та лікарських рослин Української академії аграрних наук,
Сімферополь

Досліджено особливості дії сольового стресу на калюсогенез і морфогенез в культурі ізольованих тканин ефіроолійної герані (*Pelargonium roseum* Willd.) протягом кількох пасажів. Виявлено сублетальні концентрації NaCl для неморфогенних і морфогенних калюсних культур, проведено добір стійких ліній. Показано перевагу використання для селекції in vitro морфогенних калюсних культур, отримано рослини-регенеранти, проведено їх попередній аналіз.

THE INVESTIGATION OF SALT STRESS RESISTANCE OF ESSENTIAL OIL GERANIUM CALLUS CULTURES

N.A. Yegorova

Institute of Essential Oil and Medicinal Plants, Ukrainian Academy of Agricultural Sciences
150 Kievskaya St., Simferopol, 95493, Ukraine

The peculiarities of salt stress effect on the callusogenesis and morphogenesis in isolated tissue culture of essential oil geranium (*Pelargonium roseum* Willd.) during several passages have been investigated. The sublethal NaCl concentrations for non-morphogenic and morphogenic callus tissues were determined. The selection of resistant lines from callus cultures were carried out. It was shown the preference of usage of the morphogenic callus cultures for selection in vitro. The plant-regenerants have been obtained and their preliminary analyse was conducted.

Key words: *Pelargonium roseum* Willd., cell selection, salt resistance, callusogenesis, morfogenesis.