

УДК 602:57.085.2:633.63

КЛЯЧЕНКО О.Л., кандидат біол. наук, доцент,

КРИЛОВСЬКА С.А., асистент

Національний університет біоресурсів і природокористування України

e-mail: krylovskaya.sv@mail.ru

ОТРИМАННЯ КЛІТИННИХ СУСПЕНЗІЙ РІЗНИХ ГЕНОТИПІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ (*BETA VULGARIS L.*)

*Показано вплив генотипу вихідних рослин цукрових буряків (*Beta vulgaris L.*) на динаміку росту клітинних суспензій. Підібрані оптимальні живильні середовища, умови культивування суспензійних культур з метою їх подальшого використання у схемах клітинної селекції на стійкість.*

Ключові слова: цукрові буряки, клітинні суспензії, *in vitro*, *Beta vulgaris L.*, динаміка росту

Вступ. Калюсні тканини є важливим матеріалом при роботі з культурою рослинних клітин в умовах *in vitro*, так як слугують джерелом отримання клітинних суспензій. Перевагою використання суспензійних культур над калюсними є їхня вища здатність до клітинного ділення та наявність великої кількості клітинних поколінь [2]. Використання клітинних суспензій цукрових буряків дозволяє експериментально впливати на клітини та отримувати з них рослини зі зміненим морфогенезом та підвищеним адаптивним потенціалом, які можуть у подальшому використовуватись в якості вихідного матеріалу для селекційних досліджень [1].

Суспензійні культури є зручним об'єктом для використання в клітинній селекції на стійкість до абіотичних та біотичних факторів, оскільки клітини, що культивуються в умовах *in vitro*, характеризуються фізіологічною, цитологічною та генетичною гетерогенністю [6]. Також, з літературних джерел відомо, що тканина має більш інтенсивний ріст, ніж уся цілісна рослина, що значно спрощує та прискорює селективну роботу. Умови вирощування клітин у суспензії можуть контролюватись за складом живильного середовища та клітинної популяції, що є значною перевагою за їхнього використання в різних схемах клітинної селекції на стійкість [1, 5, 3].

Саме тому, встановлення параметрів росту клітинних культур цукрових буряків у циклі вирощування, надання їхньої морфологічної характеристики являються важливою задачею на попередніх етапах роботи з клітинної селекції [4]. Метою нашої роботи було отримання клітинних суспензій цукрових буряків та вивчення їх динаміки росту.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводили в лабораторії біотехнології рослин Національного університету біоресурсів і природокористування України впродовж 2012-2013 рр. Об'єктом досліджень були сорти цукрових буряків Ялтушківський однонасінний 64 та Білоцерківський однонасінний 45, диплоїдні гібриди Ялтушківський ЧС 72, Український ЧС 70, Український ЧС 72, Уладово-Верхняцький ЧС 37, Уладово-Веселоподолянський ЧС 84, Іванівський ЧС 33, Катюша, Ворскла, Атаманша та триплоїдні гібриди Олександрія та Білоцерківський ЧС 57.

Отримання суспензійної культури. Для ініціації росту клітинної суспензії нами була використана проліферуюча калюсна тканина рихлої консистенції різних генотипів цукрових буряків, яку подрібнювали стерильним пінцетом і 2-3 г поміщали в колби Ерленмейера з рідким живильним середовищем об'ємом 100 мл за прописом Мурасіге-Скуга (1962) різних модифікацій. У наших дослідженнях культивування клітинних суспензій проводилась за трьома різними схемами на середовищах МС різних модифікацій: 1) МС1 з додаванням аскорбінової кислоти (2,5 мг/л), 6-БАП (0,4 мг/л) та НОК (2 мг/л); 2) МС2 з додаванням 6-БАП (0,25 мг/л) та 2,4-Д (0,25 мг/л); 3) МС3 з додаванням 6-БАП (0,1 мг/л) та 2,4-Д (0,25 мг/л) і культивували за регульованої температури 25-26 °С у абсолютній темряві на качалці зі швидкістю перемішування 120 об/хв. Після двох тижнів культивування (перший

пасаж) вміст колби розділяли на дві частини, кожна з яких поміщали на свіже живильне середовище. Також, за першого пасажу видаляли крупні агрегати шляхом фільтрації через нейлонове сито. Субкультування проводили кожні 14 днів.

Оцінка життєздатності клітин суспензійних культур. Для визначення життєздатності клітин суспензію зафарбовували 0,1% розчином синій Еванса і мікроскопію вали. Мертві клітини мали синє забарвлення, а живі клітини не забарвлювались узагалі.

Щільність суспензійної культури (кількість клітин на 1 мл суспензії) визначали в камері Фукса-Розенталя, проводячи мацерацію за допомогою 20% хромової кислоти при температурі 70 °С протягом 15-20 хв. Кількість клітин розраховували за наступною формулою:

$$X = \frac{1000M}{3,2},$$

M – середнє число на камеру із 6-ти повторів.

Результати досліджень. Склад живильного середовища при культивуванні клітинних суспензій суттєво впливає на ріст і розвиток клітинних популяцій. Особливо, на кількісні та якісні показники суспензійних культур, впливає присутність та співвідношення у середовищі регуляторів росту. Саме тому, основним завданням досліджень було вивчення динаміки впливу складу живильних середовищ на ріст і розвиток клітинних суспензій цукрових буряків різних сортів, ди- та триплоїдних гібридів цукрових буряків. З цією метою калюсну тканину пухкої консистенції поміщали у рідке живильне середовище трьох варіантів. Перший варіант середовища для культивування суспензій містив аскорбінову кислоту, ауксини (НОК) та цитокініни (6-БАП) у співвідношенні 1:5; другий та третій варіант живильного середовища був доповнений лише ауксинами (2,4-Д) та цитокінінами (6-БАП) у концентраціях 1:2,5 та 1:1 відповідно. Ростові характеристики, а саме кількість клітин в 1 мл суспензії, представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Динаміка росту клітинних суспензій різних генотипів цукрових буряків залежно від складу живильного середовища

Сорт, гібрид	Середовище	Кількість клітин в 1 мл суспензії ($\times 10^5$)							
		Доба культивування							
		2	4	6	8	10	12	14	16
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>
Ялтушківський однонасінний 64	МС1	5,1±0,3	7,9±0,7	10,6±0,3	19,8±1,4	23,2±1,2	25,4±0,4	25,7±0,6	25,5±0,6
	МС2	4,5±0,8	7,5±0,6	10,0±0,8	19,1±0,4	22,5±0,5	24,8±1,0	24,9±1,9	24,0±0,3
	МС3	4,0±0,4	7,1±0,7	9,6±0,7	18,5±1,3	21,9±1,4	24,2±0,7	24,2±0,9	23,5±0,5
Ялтушківський ЧС72	МС1	2,8±0,9	3,6±0,2	5,2±0,2	10,8±1,1	13,0±1,3	13,8±0,6	14,0±0,5	13,7±0,4
	МС2	2,3±0,7	3,1±0,4	4,6±0,4	10,1±0,4	12,4±0,5	13,1±0,5	13,3±0,4	12,8±0,2
	МС3	1,9±0,2	2,5±0,1	4,0±0,3	9,5±0,7	11,7±0,3	12,4±0,3	12,5±0,4	11,9±1,1
Уладово-Верхняцький ЧС37	МС1	3,2±0,6	4,1±0,3	6,8±0,7	12,5±0,8	14,9±0,3	15,3±0,4	15,6±0,8	15,0±1,1
	МС2	2,8±0,3	3,7±0,6	6,2±0,8	12,0±0,4	14,4±1,1	14,9±1,1	15,0±1,4	14,8±0,3
	МС3	2,3±0,4	3,2±0,8	5,5±0,7	11,3±0,3	13,6±0,8	14,1±0,1	14,5±0,7	14,3±0,8
Український ЧС70	МС1	3,1±0,5	3,8±1,0	5,8±0,3	11,6±1,0	13,9±0,7	14,4±0,4	14,6±0,2	14,2±1,2
	МС2	2,6±0,6	3,2±0,1	5,3±0,1	11,0±0,7	13,2±0,9	13,7±1,0	13,8±1,6	13,7±0,9
	МС3	2,2±0,2	2,6±0,3	4,7±0,8	10,4±0,8	12,6±0,8	13,1±1,8	13,3±0,9	13,1±0,2
Український ЧС 72	МС1	3,2±0,5	4,1±0,4	6,2±0,2	11,9±0,2	14,4±0,6	14,9±0,7	15,6±1,9	15,2±0,6
	МС2	2,6±0,4	3,5±0,6	5,5±0,4	11,3±0,7	13,8±0,4	14,2±1,9	15,0±1,0	14,6±0,4
	МС3	2,2±0,1	3,1±0,1	5,0±0,9	10,8±1,0	13,2±0,4	13,6±0,3	14,5±0,2	14,2±1,3
Уладово-Веселоподолянський ЧС 84	МС1	3,8±0,9	4,6±0,7	7,3±0,1	13,2±0,3	15,8±0,5	16,0±1,6	16,5±1,1	16,1±0,3
	МС2	3,3±1,2	4,1±0,6	7,4±0,2	12,3±0,2	15,0±0,8	15,2±0,7	15,7±0,2	15,5±0,9
	МС3	2,5±0,1	3,3±0,3	6,6±0,7	11,5±0,7	14,2±0,4	14,4±0,8	14,8±0,8	14,6±0,4
Іванівський ЧС 33	МС1	3,0±0,4	3,8±0,8	5,7±0,2	11,1±0,9	13,9±0,8	15,2±0,8	15,9±1,1	15,6±0,5
	МС2	2,2±0,1	3,1±0,6	5,0±0,1	10,3±0,6	13,0±1,0	14,2±0,9	14,4±0,3	14,1±0,4
	МС3	1,7±0,1	2,7±0,8	4,6±1,1	9,6±0,4	12,3±0,4	13,5±0,6	13,6±0,2	13,4±0,8
Білоцерківський ЧС 57	МС1	4,0±0,3	5,0±0,7	10,3±0,2	17,7±1,1	21,2±0,2	22,7±1,0	23,2±1,4	22,9±1,1
	МС2	3,1±0,4	4,2±0,3	9,5±0,3	16,9±1,6	20,3±0,4	21,9±0,4	21,8±0,4	21,6±0,1
	МС3	2,4±0,4	3,5±0,9	8,6±0,5	16,0±1,0	19,2±	21,0±0,2	21,2±0,7	21,0±0,5

<i>Продовження таблиці 1</i>									
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>
Білоцерківський однонасінний 45	МС1	5,2±0,6	7,6±0,6	13,3±0,4	19,2±0,3	23,6±0,4	25,0±0,1	25,9±0,6	25,2±0,8
	МС2	4,3±0,6	6,8±0,4	12,5±0,3	18,5±0,9	22,2±0,6	23,5±0,3	24,0±1,3	23,7±0,9
	МС3	3,5±0,6	5,9±1,3	11,4±1,2	17,0±0,8	20,7±0,2	22,2±0,6	22,0±0,1	21,8±1,1
Олександрія	МС1	4,1±0,4	5,0±0,6	10,3±0,9	16,0±0,1	18,8±0,6	19,6±0,6	21,5±0,2	21,0±1,4
	МС2	3,0±0,1	4,1±0,5	9,0±0,9	15,2±0,3	17,9±1,1	19,0±0,1	20,1±1,1	19,9±0,3
	МС3	2,4±0,8	3,4±0,3	8,3±0,5	14,3±0,9	16,9±0,8	18,8±0,2	18,9±0,4	18,7±0,5
Катюша	МС1	5,2±1,1	7,8±0,3	13,8±0,8	20,0±0,7	23,6±0,9	25,5±0,9	25,9±1,0	25,4±1,1
	МС2	3,8±0,4	6,2±0,4	12,1±1,1	17,8±0,9	21,2±0,2	21,9±0,8	22,3±0,6	21,9±0,6
	МС3	3,3±0,1	5,7±1,8	11,6±0,2	17,1±0,1	20,6±0,7	21,2±1,7	21,5±0,9	21,3±0,4
Ворскла	МС1	4,3±0,5	6,6±0,8	12,4±0,3	18,8±0,4	22,5±1,0	26,5±1,1	27,3±1,1	27,0±0,3
	МС2	3,8±0,3	6,0±0,6	11,6±0,2	18,0±0,9	21,5±0,3	25,5±0,4	26,0±0,6	25,9±0,9
	МС3	3,4±0,1	5,7±0,5	11,2±0,1	17,5±0,4	21,1±0,6	25,0±0,4	25,7±0,3	25,4±0,9
Атаманша	МС1	4,6±0,1	7,0±0,8	12,6±1,0	19,0±0,4	22,7±0,4	28,3±1,9	28,9±0,4	28,6±0,4
	МС2	4,0±0,6	6,5±1,6	11,8±0,4	18,1±0,7	21,8±1,2	27,0±1,5	27,8±1,0	27,5±1,6
	МС3	3,8±0,4	6,2±0,6	11,5±0,6	17,8±0,8	21,4±1,3	26,0±1,1	26,9±1,0	26,5±1,1

Як видно з представлених даних 8 пасажів у всіх варіантах живильного середовища нами була отримана суспензійна культура цукрових буряків світло-жовтого забарвлення, що мала стійку швидкість росту, але вирізнялась за кількістю клітинних популяцій. Фази ростового циклу суспензійних культур усіх генотипів визначали в першому пасажі, а проби для визначення кількості та якості клітинних популяцій, а також для побудови ростової кривої, відбирались кожні 2 доби.

Отримані дані свідчать про те, що додавання ауксинів, цитокінінів та аскорбінової кислоти (МС1) сприяло збільшенню клітинних популяцій. Клітинні суспензії всіх генотипів, що культивувались на середовищі МС1, відрізнялися наявністю невеликої кількості клітинних агрегатів. Водночас, максимальна кількість клітинних популяцій на даному варіанті середовища спостерігалась у диплоїдного сорту Ялтушківський однонасінний 64, диплоїдних гібридів Катюша, Ворскла і Атаманша та триплоїдного гібриду Білоцерківський однонасінний 45 і становила від $25,2 \times 10^5$ (Білоцерківський однонасінний 45) до $28,6 \times 10^5$ (Атаманша). За культивування клітинних популяцій на середовищах МС2 та МС3 спостерігали схожі тенденції росту, але співвідношення ауксини : цитокініни (1 : 2,5) виявилось ефективніше, ніж співвідношення даних регуляторів росту 1 : 1. Наприклад, максимальна кількість клітинних колоній на середовищі з додаванням вітаміну С спостерігалась у генотипу Атаманша ($28,6 \times 10^5$), а на другому і третьому варіанті у цього ж генотипу кількість клітинних колоній на 1 мл становила $27,5 \times 10^5$ та $26,5 \times 10^5$ відповідно.

Ріст клітин у суспензії досліджуваних генотипів у всіх варіантах живильних середовищ виражався типовою S-подібною кривою (рис. 1-4). У результаті досліджень нами було встановлено, що у всіх сортів і гібридів фази ростового циклу починалися в приблизно однаковий проміжок часу. Лаг-фаза у всіх генотипів тривала 4 дні, логарифмічна – 6 днів, лінійна – 3 дні, потім відбувався вихід кривої на плато (фаза сповільненого росту) після якої ми спостерігали поступову загибель клітин у суспензії.

Кількість клітин була максимальною на 10-14 добу культивування в залежності від використаного варіанту живильного середовища, а після двох тижнів культивування спостерігалось зменшення щільності суспензій у всіх сортів і гібридів незалежно від генотипу та співвідношення регуляторів росту в середовищі. Різниця між суспензіями різних генотипів спостерігалась лише в активності ділення клітин та, як наслідок, у кількості клітин на 1 мл культури.

Для одержання клітинних колоній цукрових буряків з метою індукції непрямого морфогенезу суспензійну культуру висівали на агаризоване живильне середовище. На третій - четвертий тиждень культивування колонії великого розміру (до 2 мм у діаметрі) виділяли і використовували для індукції органогенезу.

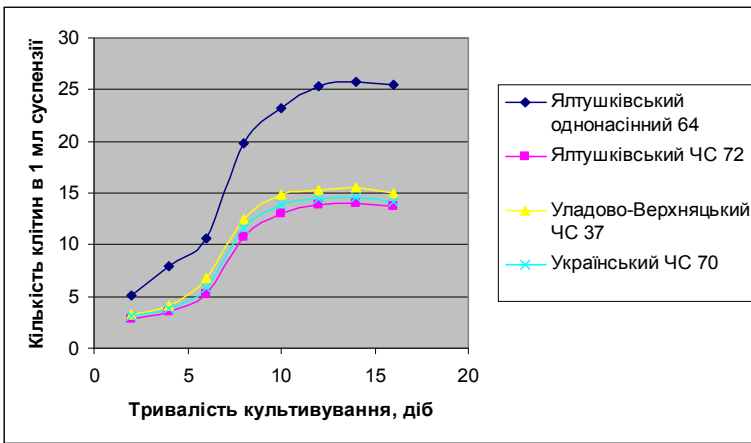


Рис. 1. Динаміка росту суспензійних культур генотипів Ялтушківський однонасінний 64, Ялтушківський ЧС 72, Уладово-Верхняцький ЧС 37 та Український ЧС 70 на середовищі МС1

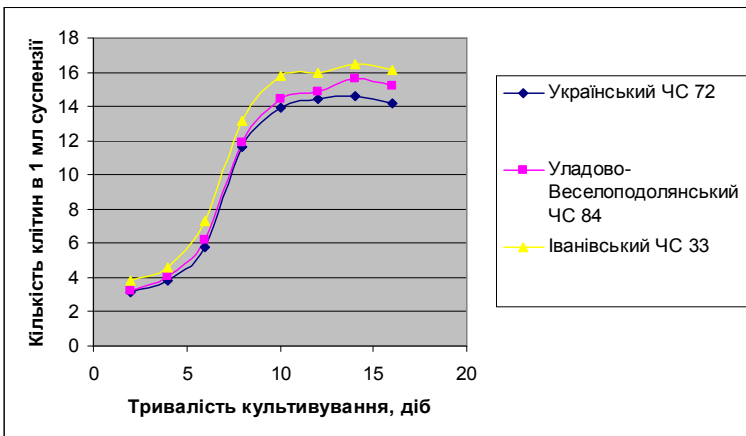


Рис. 2. Динаміка росту суспензійних культур генотипів Український ЧС 72, Уладово- Веселоподолянський ЧС 84 та Іванівський ЧС 33 на середовищі МС1

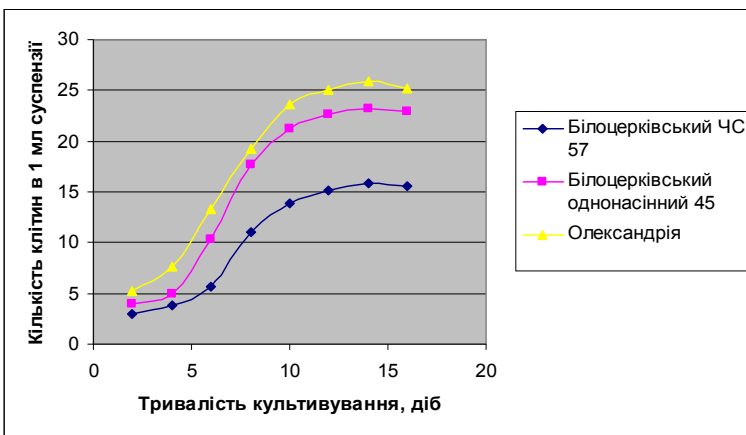


Рис. 3. Динаміка росту суспензійних культур генотипів Білоцерківський ЧС 57, Білоцерківський однонасінний 45 та Олександрія на середовищі МС1

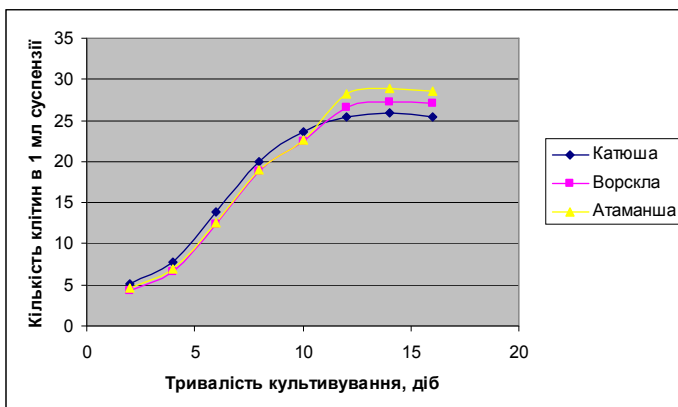


Рис. 4. Динаміка росту суспензійних культур генотипів Катюша, Ворскла та Атаманша на середовищі МС1

Висновки. Таким чином, у результаті досліджень із суспензійною культурою були встановлені відміни в активності ділення клітин та щільності суспензії в залежності від генотипу та складу живильного середовища. Найбільш інтенсивний ріст спостерігався на середовищі зі співвідношенням 6-БАП та НОК (1 : 5) з додаванням 2,5 мг/л аскорбінової кислоти в незалежності від генотипу. Ріст клітинних суспензій на середовищі МС1 також відзначався наявністю невеликої кількості клітинних агрегатів, що значно спрощувало культивування, сприяло інтенсифікації росту та прискорювало подальший органогенез та регенерацію рослин.

Список використаних літературних джерел

1. Blumwald E. Salt tolerance in suspension cultures of sugar beet / E. Blumwald, R.J. Poole // *Plant Physiology*. – 1987. – Vol. 83. – P. 884-887.
2. DeGreef W. In vitro culture of sugar beet: Description of a cell line with high regeneration capacity / W. De Greef, M. Jacobs // *Plant Sci Lett.* – 1989. – Vol. 17. – P. 55-61.
3. Gurel S. Establishment of cell suspension cultures and plant regeneration in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) / S. Gurel, E. Gurel, Z. Kaya // *Turk. J. Bot.* – 2002. – Vol. 26. – P. 197-205.
4. Бутенко Р.Г. Выращивание клеток высших растений в суспензионной культуре / Р.Г. Бутенко // *Известия АН СССР. – (серия: Биология).* – 1977. – Т. 5. – 697 с.
5. Смоленская И.Н. Культура протопластов из суспензии клеток сахарной свеклы / И.Н. Смоленская, Г.Н. Ралдугина // *Физиология растений.* – 1982. – Т. 28, – Вып. 5. – С. 1022-1028.
6. Динамика роста суспензионной культуры клеток сахарной свеклы / [Г.И. Ярмолюк, И.И. Ильенко, Н.С. Бех, В.Е. Белоус] // *Биотехнологические методы в селекции сахарной свеклы : сборник научных трудов / Под ред. акад. В.Ф. Зубенка.* – М.: ВО Агропромиздат, 1989. – С. 58-63.

Аннотация

Кляченко О.Л., Крыловская С.А.

Получение клеточных суспензий разных генотипов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.)

Показано влияние генотипа исходных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) на динамику роста клеточных суспензий. Подобраны оптимальные питательные среды, условия культивирования суспензионных культур с целью их дальнейшего использования в схемах клеточной селекции на устойчивость.

Ключевые слова: сахарная свекла, клеточные суспензии, *in vitro*, *Beta vulgaris* L., динамика роста

Annotation

Klyachenko O., Krylovska S.

Obtaining of cell suspensions of different sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genotypes

The influence of the genotype of initial sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants on the cell suspension growth was shown. Optimum nutrient media, cultivation conditions of suspension culture were chosen with the aim of its further usage in schemes of cell selection for resistance.

Key words: sugar beet, cell suspension, *in vitro*, *Beta vulgaris* L, growth dynamics

Отримано редакцією – 20.03.2014 р.