

Биология

УДК 581.1+621.3+635.21

Ю.Г. ПОПОВ, Дж.А. АГАДЖАНЫАН, М.Т. ПЕТРОСЯН, С.А. САРКИСЯН,
Ф.Р. КАЗАРЯН, Ж.В. ЦОВЯН

ПОЛУЧЕНИЕ СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ ЛИНИЙ ТОПИНАМБУРА

Изучено влияние солевого стресса на стерильные растения топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.) и его каллусную ткань. С целью получения устойчивых к засолению клеточных линий и стерильных растений в процессе пассирования в среде постепенно увеличивалась концентрация NaCl, под действием которого происходило накопление одного из осмопротекторов – свободного пролина. Синтез пролина стимулировался низкими концентрациями NaCl (0.5 и 1.0%). Увеличение концентрации до 2% угнетало рост как каллусной ткани, так и стерильных растений. Добавление экзогенного пролина (0.2%) в соледержащую среду косвенно подтверждает его роль как защитного фактора. В среде, содержащей наряду с NaCl пролин, угнетающее действие соли уменьшалось. У каллусов на регенерационных средах шел морфогенез, не носящий массового характера. Полученные регенеранты выращивались и сохранялись микроочеренкованием.

Сопоставление с литературными данными позволяет сделать заключение о сходстве клеточных механизмов выносливости к засолению у культивируемых *in vitro* клеток и у целых растений. Полученные солеустойчивые каллусные линии и растения-регенеранты топинамбура могут послужить основой для дальнейшей селекционной работы по выведению растущих на солончаках сортов топинамбура.

Увеличение содержания солей в искусственно орошаемых почвах засушливых зон постепенно снижает их плодородие. Поэтому исследования по физиологии солеустойчивости и селекции растений на устойчивость к засолению представляют исключительный интерес. Повышенное засоление, подобно засухе и низкотемпературным стрессам, приводит к изменению водного баланса и резкому падению тургора [1–3]. В ответ на засоление почвы растения включают специфические, определяющие их устойчивость к солевому стрессу механизмы, которые до конца не выяснены. Для изучения токсического влияния солей и клеточных механизмов формирования толерантности используются изолированные культуры. Этот метод позволяет разграничить солеустойчивость клеток и тканей, обусловленную их генетической природой и физиологическим состоянием, изучить ответную реакцию растительной клетки на стресс в зависимости от состава среды и других факторов. В культивируемых *in vitro* клетках, как и в растениях, растущих в условиях *in vivo*, происходит осморегуляция. Благодаря тому, что в изолированных культурах снимается регулирующее воздействие целого организма, в них возникают различные по устойчивости к засолению клеточные линии, среди которых могут оказаться очень ценные для практики сельско-

го хозяйства соматоклональные варианты. Основной принцип создания клеточных линий, устойчивых к засолению, заключается в том, что в культуральных средах для пассирования толерантных популяций постепенно увеличивается концентрация солей. Путем отбора возникающих при этом соматоклональных вариантов были получены устойчивые к повышенным концентрациям солей клеточные линии у нескольких видов табака, люцерны, сорго, сахарной свеклы, риса, пшеницы. Устойчивость к селективному фактору сохраняется и на уровне растений-регенерантов, например, у табака и овса. Проявление этого признака наблюдается в течение нескольких поколений [2, 4, 5].

Проблема селекции солеустойчивых культурных растений имеет особенно большое значение для Араратской долины, где находятся десятки тысяч гектаров засоленных земель. В солончаках Араратской долины преобладают хлоридные, карбонатные и бикарбонатные засоленные почвы, в которых содержание солей колеблется от 0.6 до 3.0% [6]. В представленной работе приводятся данные по изучению в регулируемых условиях устойчивости клеточных линий топинамбура к засолению. Выбор этого растения для изучения солевыносливости диктуется тем, что неприхотливый к условиям возделывания топинамбур может оказаться хорошей моделью при изучении роли пролина и образующихся под его воздействием продуктов в устойчивости растения к стрессам.

Методы исследований. Каллусные культуры и стерильные растения топинамбура выращивали при 27°C на агаризованной среде Мурасиге-Скуга (МС) [7].

Для регенерации использовали среду МС с кинетином 3 мг/л, 6-бензиламинопурином (БАП) 2 мг/л, I-нафтилуксусной кислотой (НУК) 0.2 мг/л (среда R) и МС с НУК 0.1 мг/л (среда R₁).

В питательные среды вносилось 0.5; 1.0 и 2.0% NaCl. Стерильные (пробирочные) растения в отличие от каллусных культур выращивались при 16-часовом фотопериоде (1000 лк).

Определение содержания свободного пролина проводилось по методу Бейтса с соавторами [8]. Повторность опытов трехкратная.

В таблице представлены средние данные 3-х опытов.

Результаты и их обсуждение. Влияние солевого стресса изучалось на стерильных растениях топинамбура, полученных из верхушечной меристемы клубня, и на его каллусной ткани листового происхождения. Растения и каллусы культивировались на среде МС с добавлением 0.5; 1.0 или 2.0% NaCl. Часть каллусов на средах с 0.5% и 1.0% соли росла, образуя различающиеся морфологически, интенсивностью роста и степенью устойчивости к NaCl клоны белого цвета, которые вот уже в течение нескольких лет поддерживаются на той же среде. На среде с 2.0% NaCl число таких клонов было крайне незначительно, в основном каллусная ткань быстро начинала темнеть и погибала. На солесодержащих средах с различным составом фитогормонов выживали и некоторые из стерильных растений.

Поскольку более критическим тестом на солеустойчивость служит способность растений-регенерантов выживать и расти на засоленных почвах, нами была проведена серия экспериментов по индукции морфогенеза у полученных толерантных каллусных тканей, так как спонтанный морфогенез у солеустойчивых линий происходил в темноте крайне редко. У каллусов III

пассажа на средах R_1 и R шла регенерация, неносящая, однако, массового характера. Все регенеранты – как образовавшиеся в темноте в результате спонтанного морфогенеза, так и возникшие путем индукции на средах R_1 и R – после культивирования на регенерационных средах в условиях освещения в дальнейшем размножались микрочеренкованием.

С целью получения более устойчивых к засолению линий каллусные ткани III и IV пассажей и стерильные растения переносились со среды с 0.5% NaCl на среды с 1%, 1.5% и 2.0% NaCl, а со среды с 1.0% NaCl – на среды с 1.5% и 2.0% NaCl. Однако на средах с 2% NaCl после кратковременного роста каллусные ткани и растения погибали, тогда как часть каллусов и растений на средах с 1% и 1.5% NaCl выживала.

Растительная клетка в некоторых стрессовых ситуациях, в том числе при засолении, включает такой защитный механизм, как синтез осмопротекторов, среди которых наиболее распространенным является пролин [3, 9–14]. Предполагается, что пролин стабилизирует белки и мембраны в условиях низкой водной активности и высокой температуры. Помимо действия в качестве осмопротектора пролин также участвует в регуляции редокс-потенциалов, защищает макромолекулы от денатурации [15]. Доказательством того, что накопление пролина является не только ответом на стресс, но и защитной реакцией клетки, может служить работа, в которой показано, что клеточные линии моркови, обладающие сверхсинтезом пролина, проявляют повышенную устойчивость к NaCl [16]. В другом исследовании установлено, что устойчивость клеточных линий табака к аналогу пролина – азетидин-2-карбоновой кислоте – коррелировала с устойчивостью к хлориду натрия [17]. В упомянутых работах, к сожалению, получены лишь каллусные клоны, что не позволило проследить экспрессию новых признаков на уровне растений. Синтез пролина осуществляется различными путями и контролируется разными факторами [9, 18–20].

Исходя из сказанного, представлялось интересным определение содержания свободного пролина в каллусных тканях и стерильных растениях топиамбура при культивировании на средах с различными концентрациями NaCl. Полученные данные приведены в таблице.

Объект	Концентрация NaCl, %	Содержание пролина, $\mu\text{M}/\text{г}$ сырого веса
каллус	0	0.44
	0.5	7.92
	1.0	5.78
	2.0	0.32
растения	0	0.50
	0.5	4.38
	1.0	6.67
	2.0	0.57

Как видно из таблицы, на среде с 0.5% NaCl к 20–25 дню культивирования содержание пролина в каллусах по сравнению с контролем увеличивается в 20 раз, на среде с 1.0% NaCl – в 11 раз, а на среде с 2.0% NaCl концентрация пролина, наоборот, даже несколько снижается. Сходные результаты получены и со стерильными растениями. Однако в связи с меньшей, по всей вероятности, чувствительностью целого растения к стрессу максимальный уровень содержания пролина в стерильных растениях наблюдается

при более высокой концентрации NaCl – 1.0%. Фактически относительно низкие концентрации соли в среде – 0.5% и 1.0% – вызывают стимуляцию синтеза пролина. Увеличение концентрации NaCl в среде до 2.0% угнетает рост как каллусов, так и стерильных растений. Отсутствие изменений в содержании пролина на среде с 2.0% NaCl указывает на тот предел, при котором в клетках происходят необратимые внутренние изменения и механизм ответной адаптивной реакции нарушается. Аналогичные данные получены и в отношении других растительных объектов [12, 21].

Вызванная добавлением экзогенного пролина в питательную солосодержащую среду стимуляция роста калусных тканей топинамбура также косвенно подтверждает его роль как защитного фактора. При наличии в питательной среде 1.5% NaCl рост тормозится. При добавлении же в среду вместе с 1.5% NaCl 0.2% пролина отрицательное действие солевого стресса значительно сглаживается: в этих условиях темп пролиферации частично восстанавливается.

Содержание свободного пролина ($\mu\text{M/g}$) в каллусных тканях и в стерильных растениях топинамбура, культивируемых на средах с разными концентрациями NaCl

Сопоставляя наши и литературные данные, можно прийти к заключению, что клеточные механизмы выносливости к засолению сходны для культивируемых *in vitro* клеток и целых растений. Следовательно, полученные нами солеустойчивые каллусные линии и растения-регенеранты могут послужить основой для дальнейшей селекционной работы по выведению растущих на солончаках сортов топинамбура.

*Кафедра физиологии растений
и микробиологии*

Поступила 24.01.2001

ЛИТЕРАТУРА

1. Веретенников А. В. Уч. пособие. Воронеж: Изд-во ВГУ, 1987, с. 256.
2. Сидоров В. А. Битехнология растений. Клеточная селекция. Киев: Наукова думка, 1990, с. 147–149.
3. Delauney A., Verma D. P. S. – Plant J., 1993, v. 4, p. 215–223.
4. Атанасов А. И. Биотехнология в растениеводстве. Новосибирск, 1993, с. 241.
5. Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений. Киев: Наукова думка, 1984.
6. Эдилян Р. А., Петросян Г. П., Розова Н. Н. Почвы армянской ССР. Ер.: Айастан, 1976, с. 298–311.
7. Murashige T., Skoog F. – J. Plant Physiol., 1962, v. 15, №13, p. 473–497.
8. Bates L. S., Waldren R. P., Teare I. D. – J. Plant and Soil, 1973, v. 39, p. 205–207.
9. Савицкая Н. Н. Научный доклад Высшей школы биологической науки, 1976, №2, с. 50–60.
10. Voetberg G., Steward C. R. – J. Plant Physiol, 1984, v. 76, p. 567–570.
11. Greenway H., Setter T. L. Austr. – J. Plant Physiol., 1979, v. 6, №1, p. 69.
12. Калинкина Л. Г., Строгонов Б. П. – Физиология растений, 1986, т. 3, №4, с. 746.
13. Binzel M. L., Hasegawa P. M., Rhodes D. – J. Plant Physiol., 1987, v. 84, p. 1408–1415.
14. Сохансандж А., Неумывакин Л. В., Мосейко Н. А., Пирузян Э. С. – Генетика, 1997, т. 33, №7, с. 906–913.
15. Мусийчук К. А., Курбанмагомедов М. К., Кобец Н. С., Неумывакин Л. В., Мовсесян Н. Р., Пирузян Э. С. – Материалы Меж. научно-практической конференции молодых ученых. Брянск, 2000, с. 53–54.
16. Riccardi G., Calla R., Camerino G., Ciferri O. – J. Plant and Cell Physiol, 1983, v. 24, №6, p. 1073–1078.

17. Майсурян А. Н., Хадеева Н. В., Дризде И. Л. — Тез. докл. Всесоюз. конф. по генетике соматических клеток в культуре. М.: Звенигород, 1986, с. 29–30.
18. Barnett N. M., Naylor A. W. — J. Plant Physiol., 1966, v. 41, No7, p. 1222.
19. Dasher W. V., Erickson S. S. — J. Bot. Rev., 1981, v. 47, No3, p. 349.
20. Шевякова Н. И., Дмитриева Г. А., Кузнецов Вл. В. Тезисы докладов VI съезда общества физиологов растений России. М., 1999, т.1, с. 496.
21. Ошмарина В. И. — Всесоюз. IV конференция: Культура клеток растений и биотехнология. Кишинев, 1983, с. 162.

Յու. Գ. ՊՈՊՈՎ, Զ. Ա. ԱՂԱԶՅԱՆՆ, Մ.Թ. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ, Ս.Հ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ,
Ֆ. Ռ. ԿԱԶԱՐՅԱՆ, Ժ.Վ. ԾՈՎՅԱՆ

ԳԵՏՆԱԽՆՉՈՐԻ ԱՂԱԴԻՍԱՑԿՈՒՆ ԳԾԵՐԻ ՍՏԱՑՈՒՄԸ

Ամփոփում

Ուսումնասիրվել է աղային ստրեսի ազդեցությունը գետնախնձորի (*Helianthus tuberosus* L.) ստերիլ բույսերի և կալլուսային հյուսվածքների վրա: Աղակալման նկատմամբ աղադիմացկուն բջջային գծեր և ստերիլ բույսեր ստանալու նպատակով աճման ընթացքում սննդամիջավայրում աստիճանաբար ավելացվել է NaCl-ի կոնցենտրացիան, որի ազդեցության տակ տեղի է ունենում օսմոպրոտեկտորներից մեկի՝ ազատ պրոլինի կուտակում: Պրոլինի սինթեզը խթանվել է NaCl-ի ցածր կոնցենտրացիաների (0.5%; 1.0%) դեպքում: NaCl-ի կոնցենտրացիայի մեծացումը մինչև 2% ճնշել է ինչպես կալլուսային հյուսվածքի, այնպես էլ ստերիլ բույսերի աճը: Էկզոգեն պրոլինի (0.2%) ավելացումը աղ պարունակող միջավայրին ամուղղակիորեն հաստատում է նրա դերը որպես պաշտպանական գործոն: Միջավայրում, որտեղ NaCl-ի հետ միասին պարունակվում է պրոլին, աղի ճնշող ազդեցությունը նվազում է: Ռեգեներացիոն միջավայրում կալլուսային հյուսվածքներում տեղի է ունենում մորֆոգենեզ, որը չի կրում զանգվածային բնույթ: Ստացված ռեգեներանտները աճեցվել և պահպանվել են միկրոկտրոնացման ճանապարհով:

Մեր և գրական տվյալների համադրումը փուլ է տալիս եզրակացնել, որ *in vitro* աճեցվող բջիջների և ամբողջական բույսերի աղակալման նկատմամբ դիմացկունության բջջային մեխանիզմները նման են: Աղադիմացկուն կալլուսային գծերը և ռեգեներանտ բույսերը կարող են հիմք ծառայել աղուտներում գետնախնձորի նոր սորտերի ստացման հետագա սելեկցիոն աշխատանքների համար:

Yu. G. POPOV, J.A. AGADJANIAN, M.T. PETROSSIAN, S.A. SARKISSIAN,
F.R. KAZARIAN, J.V. TSOVIAN

OBTAINING OF TOPINAMBUR'S SALT-RESISTANT LINES

Summary

The influence of salt stress upon sterile topinambur plants (*Helianthus tuberosus* L.) and its callus tissues was studied. In order to get salt-resistant cell

lines and sterile plants, the concentration of NaCl in the nutrient medium was gradually augmented during the passages which led to the accumulation of one of the osmoprotectants - the free proline - under the influence of such treating. The proline synthesis was stimulated by low concentrations of NaCl (0,5% and 1%). The increase of NaCl concentration till 2% suppressed the growth of both the callus tissue and sterile plants. The addition of exogenous proline to the salt-containing medium has confirmed indirectly its role as a defence factor. The suppressing influence of the salt was decreased in the medium, containing both NaCl and proline. There was morphogenesis of the calli upon the regeneration media, though not of mass character. The regenerants received were grown and preserved by means of micrografting.

Comparison with the literature data allows to conclude that there is a resemblance of cell mechanisms of salt-tolerance acquisition between cultivated in vitro cells and intact plants. The obtained salt-resistant callus lines and regenerant-plants of topinambur could serve as the base for subsequent selection of topinambur sorts, which will grow on the salines.