

ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРИЙОМІВ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ЦУКРОНАКОПІЧЕННЯ ТА СТІЙКОСТІ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ ДО НЕСПРИЯТЛИВИХ ЧИННИКІВ ДОВКІЛЛЯ

О.В. ДУБРОВНА, доктор біологічних наук;

О.М. ТИЩЕНКО, доктор біологічних наук; В.Д. САКАЛО, доктор біологічних наук; Т.В.
ЧУГУНКОВА, доктор біологічних наук;

І.І. ЛЯЛЬКО, кандидат біологічних наук

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ

Вступ

Розвиток сучасних біотехнологій розкриває нові перспективи для вирішення глобальних проблем людства, одна з яких пов'язана з удосконаленням нових енергетичних джерел. Цукрові буряки можуть бути перспективною культурою для одержання біопалива, зокрема біоетанолів та біобутанолів, які є альтернативним джерелом бензину та газу. Біобутанол – це наступний значний етап розвитку біопалива, до того ж саме виробництво біобутанолу з технічної точки зору значно простіше, ніж етанолу. Разом з тим, використання цукрових буряків як сировини для біопалива потребує стабільно високого виходу сировини, що забезпечується створенням нових форм рослин, які поєднують високу продуктивність зі стійкістю до стресових чинників довкілля. Різноманітні біотехнологічні прийоми, зокрема клітинна селекція, є перспективним сучасним методом отримання таких матеріалів. Крім того, одним з пріоритетних напрямів біотехнологій є регуляція метаболічних процесів, спрямованих на синтез продуктів з поліпшеними якостями, що дозволяє підвищувати енергетичну цінність рослин при використанні їх у промисловому виробництві. У зв'язку з цим, метою роботи було створення нових форм буряків, які характеризуються стійкістю до абіотичних стресових чинників довкілля, та оптимізація у цих рослин шляхів регуляції вуглеводного метаболізму.

Об'єкти та методи досліджень

Калюсні культури цукрових буряків були отримані з листкових експлантів диплоїдних рослин сорту Індустріальний, попередньо введених в культуру *in vitro*. Як абіотичні стресові чинники використовували сольовий та низькотемпературний стрес. Для створення стійких до засолення клітинних ліній як селективні чинники застосовували солі хлориду натрію (NaCl) та сульфату натрію (Na_2SO_4), які в різних концентраціях додавали до живильних середовищ.

Для отримання резистентних форм використовували методи прямої та ступінчастої клітинної селекції. За прямого добору у живильне середовище МС додавали солі хлориду та сульфату натрію у сублетальних концентраціях – 2% NaCl , та 2,5% Na_2SO_4 . Стійкі клони добирали через 4 тижні. Згідно зі стандартною схемою клітинної селекції, калюси перевіряли в селективних і неселективних умовах. Ступінчасту селекцію проводили за схемою: 1,5% NaCl (3 пасажі) \rightarrow 2,0% NaCl (3 пасажі) \rightarrow 2,5% NaCl (3 пасажі) \rightarrow основне середовище МС (3 пасажі); а також 2,0% Na_2SO_4 (3 пасажі) \rightarrow 2,5% Na_2SO_4 (3 пасажі) \rightarrow 3,0% Na_2SO_4 (3 пасажі) \rightarrow основне середовище МС (3 пасажі).

Вивчення дії позакореневого підживлення мінеральним мікродобривом (акварином № 5) та регулятором росту (бетастимуліном) на біосинтетичні процеси і продуктивність цукрових буряків проводили в умовах вегетаційних дослідів. У дослідах були використані: рослини лінії 1, які характеризуються перехресною стійкістю до хлоридного засолення та низьких температур, а також рослини лінії 2, які мають перехресну стійкість до сульфатного типу засолення і низьких температур. Рослини вирощували в посудинах із темно-сірим підзоленим ґрунтом (15 кг) з внесенням поживної суміші ВНІС і одноразовим підживленням у середині вегетації

нітроамофоскою (5 г на посудину). Повторність досліду 15-разова. Обробку листків проводили двічі протягом вегетації розчином акварину № 5 разом з бетастимуліном (70 мкл бетастимуліну в 1,5 л 1,5% акварину). Перша обробка в фазу 6-8 листків (23.06), друга – через місяць (14.07), у період інтенсивного цукронакопичення.

В онтогенезі рослин визначали активність ферменту синтезу сахарози – СФС; вміст сахарози в листках, судинно-провідних пучках черешків, коренеплодах. Аналізували ріст гічки і коренеплодів, розраховували врожайність і продуктивність. Активність СФС визначали за модифікованим нами методом Губера зі співат. [4]. Виділення СС (сахарозосинтази) з коренеплодів цукрових буряків і визначення її активності проводили за методикою, описанаю в [4]. Аналіз сахарози проводили резорциновим методом [5]. Цукристість коренеплодів визначали поляриметричним методом [3]. Урожайність розраховували виходячи з того, що на 1 гектарі 76 000 рослин.

Результати та обговорення

Методами прямої та ступінчастої селекції отримано калюсні лінії цукрових буряків, стійкі до 2,0% хлоридного і 2,5% сульфатного засолення [1]. Була проведена серія експериментів з визначення перехресної стійкості цих форм і до температурного стресу. Експерименти проводили в два етапи – початкове загартування з наступною обробкою негативними температурами. Загартування дослідного матеріалу здійснювали у 2-х режимах: 7 діб при +2°C і 14 діб з послідовною з тижневим інтервалом зміною температур – +6°C і +2°C. Наступна обробка загартованих калюсів температурою -2°C протягом 1, 8 і 16 годин не привела до загибелі клітинних ліній у жодному з випробуваних варіантів. Солестійкі клітинні лінії були повторно оброблені температурою -5°C протягом 21 години. Через 7 тижнів виявлено близько 40% живих калюсів. Після перенесення на свіже живильне середовище калюси з перехресною стійкістю добре росли протягом кількох пасажів при низьких позитивних температурах (+4 °C).

Частота регенерації у отриманих ліній, стійких до комплексу абіотичних стресів, виявилась низькою – її рівень не перевищував 10%. З калюсних культур цукрових буряків з перехресною стійкістю було регенеровано кілька десятків рослин.

Враховуючи специфічність отриманого нами матеріалу, для збільшення кількості рослин було проведено клональне мікророзмноження отриманих форм удосконаленим нами методом прямої регенерації пагонів із тканин вегетативних органів, який дозволяє репродуктувати у чистоті генетично-цінний матеріал та збільшує вихід регенерантів на один експланкт [2].

Перевірка ознаки стійкості отриманих регенерантів показала, що серед рослин, індукованих із клітинних ліній з хлоридним типом засолення, після десяти пасажів було виявлено 40-45% стійких (рис. 1), тоді як із клітинних ліній з сульфатним типом засолення – у межах 50-54%. Одержані результати можуть свідчити про те, що клітинні лінії та регенеранти, які зберігали нормальній ріст за дії комплексу стресових чинників, мають генетично обумовлену ознаку стійкості. Це підтверджив і аналіз збереження ознаки у насіннєвих поколіннях.

Нами вивчено спільній вплив препаратів «Бетастимулін» та «Акварин» на біосинтетичні процеси (активність ключових ферментів вуглеводного обміну – сахарозофосфатсинтази в листках і сахарозосинтази в коренеплодах) на продуктивність нових форм цукрових буряків. Враховуючи можливість регуляції цукронакопичення через вплив біологічно активних речовин на ферментні системи, які відповідають за синтез та метаболізм сахарози, доцільним є поєднання двох біотехнологічних підходів, що, імовірно, буде сприяти одночасному поліпшенню селекційних та технологічних якостей цукрових буряків.



Рис. 1. Регенерант цукрових буряків з перехресною стійкістю до хлоридного засолення та низьких позитивних температур

Обробка рослин акварином та бетастимуліном стимулювала активність СФС починаючи з періоду початку цукронакопичення. У рослин лінії активність СФС практично не відрізнялася від рослин вихідного сорту. Так, у рослин лінії 1 у другу половину вегетації питома активність СФС збільшувалася на 96%, загальна – на 70%, а в інші періоди онтогенезу відмічена тенденція до активації ферменту. У рослин лінії 2 практично протягом усієї вегетації відмічено значне збільшення як питомої, так і загальної активності ферменту (71-172%).

У середині вегетації вміст сахарози в листках і судинно-проводідних пучках у генотипів, оброблених ФАР, підвищувався. Це корелює зі значною активацією СФС у цей період. Разом з тим активність ферменту до кінця вегетації поступово знижувалася, і тому високий рівень сахарози в тканинах може свідчити про деяке уповільнення відтоку в цей період. Обробка ФАР змінює розподіл сахарози, активуючи транспорт її в коренеплід, в основному в середині вегетації.

Обробка листків фізіологічно активними речовинами також впливало на вміст легкорозчинних білків. У рослин лінії 2 відмічено стабільне підвищення рівня легкорозчинних білків протягом усього онтогенезу, а у рослин лінії 1 – незначне збільшення в кінці вегетації при майже дворазовому зменшенні рівня білків у контролі.

Спільне використання мінерального добрива і бетастимуліну позитивно впливало на ростові процеси та накопичення сухої речовини в листках. Маса гички у рослин ліній 1 та 2 була достовірно вища в кінці вегетації. Взагалі можна сказати, що обробка ліній акварином і бетастимуліном позитивно впливала на формування біомаси цукрових буряків. Збільшення маси гички, разом з активацією СФС, підвищеннем рівня сахарози в листках і в руслі транспорту, примножують ефект від застосування акварину і бетастимуліну на нових формах буряків. Виходячи з того, що для виробництва біопалива може використовуватись рослинницька продукція технічного характеру, відходи виробництва, надлишки сировини, імовірно, збагачена сахарозою гичка цукрових буряків теж могла б використовуватись у цьому виробництві.

Таким чином, позакореневі обробки цукрових буряків мінеральним мікродобривом (акварином № 5) у комплексі з бетастимуліном у період утворення 6-8 листків і інтенсивного цукронакопичення підтримувала до кінця онтогенезу функціональну активність листків рослин ліній, які відрізняються високою стійкістю до стресових факторів довкілля. Біохімічно це виявлялося в активації ферменту синтезу сахарози в листках (СФС), підтриманні високого рівня хлорофілу, білків, стимуляції відтоку сахарози, збільшенні маси гички.

Обробка ФАР призводить до збільшення відношення реакцій синтез/розщеплення.

Щодо рослин лінії 1 можна сказати, що розщеплення сахарози в коренеплодах на початку вегетації було практично на рівні контролю, а в кінці дещо інгібувалося, але відношення реакцій синтез/розділення було вище в контролі. За цим показником можна сказати, що обробка ФАР більш сприяє процесу розщеплення сахарози, хоча різниця у відношенні цих реакцій незначна. В коренеплодах рослин лінії 2 активація СС в реакції розщеплення сахарози при обробці посівів ФАР відмічена тільки в кінці вегетації (26-23%), у той же час як синтез сахарози залишився практично на рівні контролю. На початку вегетації відношення реакцій синтез/розділення сахарози було на користь розщеплення, а в кінці – синтезу, що є дуже позитивним для забезпечення як ростових процесів, так і цукронакопичення.

У рослин лінії 1 метаболізм сахарози при обробці акварином спільно з бетастимуліном був спрямований на збільшення цукронакопичення, що призвело до підвищення цукристості коренеплодів на 0,4% і збільшило збір цукру на 4,6%, проте розрахункова врожайність залишалась на рівні контролю. Найкращі результати були отримані у рослин лінії 2, де на фоні підвищення урожайності цукристість підвищувалась на 0,8%, що дало розрахункове збільшення збору цукру на 16%. Обробка посівів акварином спільно з бетастимуліном позитивно впливала і на доброкісність цукросировини. Так, вміст «нецукарів» у складі сухої речовини знижувався у рослин ліній, а співвідношення сахароза / «нецукри» було вище в усіх досліджених генотипів, що свідчить про фізіологічну зрілість коренеплодів.

Обробка посівів цукрових буряків акварином і бетастимуліном збільшувала функціональну активність листків: активацію СФС у листках, підсилення ростових процесів і відтоку сахарози в коренеплоди. Регуляція СС у коренеплодах стимулювала або їх ріст, або цукронакопичення. Як результат – вихід цукру збільшувався не тільки за рахунок підвищення врожайності, але й внаслідок підвищення цукристості. Одержані дані свідчать про те, що, змінюючи дози добрив і співвідношення в них елементів живлення, використовуючи їх з регуляторами росту, можна впливати на спрямованість метаболічних процесів, які визначають як інтенсивність росту коренеплодів, так і їх цукристість.

Висновки

Вперше за допомогою методів клітинної селекції отримано нові форми цукрових буряків, у яких поєднуються стійкість до кількох стресових чинників. Експериментально обґрунтована можливість регуляції цукронакопичення через вплив біологічно активних речовин на ферментні системи, які відповідають за синтез та метаболізм сахарози, що пов’язано з підвищенням продуктивності цукрових буряків. Поєднання двох біотехнологічних підходів сприяє одночасному поліпшенню селекційних та технологічних якостей буряків.

Список літератури

1. Дубровна О.В., Лялько І.І., Хомочкіна М.П. Добір закріплювачів стерильності О-типу цукрових буряків з підвищеною стійкістю до хлоридного засолення в культурі *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів: Збірник наукових праць. – К.: Логос, 2006. – Т. 3. – С. 556-560.
2. Дубровна О.В., Лялько І.І. Мікроклональне відтворення селекційно-цінних форм цукрових та кормових буряків // Фактори експериментальної еволюції організмів: Збірник наукових праць. – К.: Аграрна наука, 2003. – С. 410-414.
3. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений. – К.: Наукова думка, 1976. – С. 154-157.
4. Сакало В.Д. Активация сахарозосинтазы в “стареющих” тканях корнеплодов сахарной свеклы // Физиология и биохимия культ. растений. – 1993. – Т. 25, № 1. – С. 66-72.

5. Huber S.C., Huber J.L. Role and regulation of sucrose phosphate synthase in higher plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1996. – V. 47. – P. 431-444.
6. Roe J.H. A Colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine // J. Biol. Chem. – 1954. – V. 107. – P. 15-22.

ЭФФЕКТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS L.*) ДЛЯ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ СИНТЕТИЧЕСКИМ ГЕНОМ *CRY1AC*

В.В. ИВАНИЦКАЯ; Д.И. ЛИТВИН, кандидат биологических наук;

А.И. ЕМЕЦ, кандидат биологических наук;

Я.Б. БЛЮМ, доктор биологических наук

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев

Введение

Сахарная свекла (*Beta vulgaris L.*) является одной из наиболее важных технических культур, поскольку около 40% сахара в мире изготавливается из сахарной свеклы [11]. В прошлом году площадь посевов данной культуры на Украине составляла примерно 400 тыс. га с урожайностью около 300 ц/га. Данная культура используется не только для производства сахара, но и для получения патоки, а зеленую массу используют в качестве корма для домашних животных. Поэтому развитие селекционно-генетических работ, направленных на улучшение потенциала выращивания сахарной свеклы и производство сахара, имеет большое экономическое значение для нашей страны. Однако ввиду вариабельности генотипа, низкого регенерационного и трансформационного потенциала сахарной свеклы существуют серьезные ограничения для применения основных биотехнологических манипуляций *in vitro* с исходным экспериментальным материалом этой культуры, призванных обеспечить ускорение и технологическое обновление арсенала селекционных возможностей, направленных на повышение показателей урожайности и устойчивости данной культуры к различного рода патогенам и вредителям.

Результаты ряда работ указывают на то, что регенерация сахарной свеклы в условиях *in vitro* является достаточно сложным процессом. И хотя были получены регенеранты из листьев, черешков [1-3], гипокотилей [5], семядолей [2], базальной части побега [4, 7] и узлов семядольных листьев [6], воспроизводимость данных методик для различных генотипов сахарной свеклы является проблематичной. Также отсутствует хорошо разработанная универсальная методика агробактериальной трансформации для этой культуры [4, 6, 7, 9].

Поэтому целью данного исследования был подбор оптимальных условий для регенерации растений сахарной свеклы из листовых дисков и оптимизация протокола агробактериальной трансформации данного типа эксплантов для переноса синтетического гена *cry1Ac*, обеспечивающего устойчивость к ряду насекомых-вредителей отряда Lepidoptera (Чешуекрылые).

Объекты и методы исследования

Растительный материал. В работе использовали исходную отцовскую селекционную линию свеклы ММ1/2, любезно предоставленную Институтом сахарной свеклы УААН. Стерильные побеги выращивали на среде Мурасиге и Скуга (МС) [8], содержащей либо 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрации 1 мг/л, либо комбинацию регуляторов роста 0,25 мг/л БАП и 0,1 мг/л β-индолил-3-масляную кислоту (ИМК). Для индукции корнеобразования культивируемые микропобеги пересаживали на безгормональную среду МС.