

Міністерство освіти і науки України
Всеукраїнський науковий інститут селекції
Уманський національний університет садівництва
Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАНУ
Українське товариство генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова

**МАТЕРІАЛИ XII МІЖНАРОДНОЇ
НАУКОВОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ**

**«СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНА
НАУКА І ОСВІТА»**

(Парієві читання)

20–22 березня 2023 року

Умань – 2023

КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ З ІОНАМИ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ – НОВІТНЯ МЕТОДОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ ФОРМ ІЗ ПІДВИЩЕНИМ РІВНЕМ ОСМОСТІЙКОСТІ

Л. І. Броннікова¹, І. О. Зайцева², І. П. Упатова³

¹Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, м. Київ

e-mail: Zlenko_lora@ukr.net

²Дніпровський національний Університет імені Олеся Гончара, Україна

e – mail: irinaza.ldfr@gmail.com

³КЗ «Харківська гуманітарно-педагогічна академія», Україна

e-mail: handiy63@gmail.com

Осмотичні стреси вважаються одними із найбільш шкодо чинних факторів, оскільки викликають комплексні негативні зміни у рослинному організмі. А в останні роки біологічна проблема чутливості та стійкості до осмотичних чинників перетворилась на глобальну проблему виживання багатьох рослинних генотипів як у дикій природі, так і на сільськогосподарських угіддях. Ця критична ситуація мотивує науковий загал до висування креативних гіпотез і ідей, а також до розробки нових технологій *in vivo* і *in vitro*.

Серед альтернативних біологічних технологій увагу привертає клітинна селекція. З 70-80-тих років минулого сторіччя цей метод виявив свою ефективність при отриманні генетично змінених форм рослин із покращеними характеристиками [1]. Цьому сприяє схожість маніпуляцій із рослиною та клітинною культурою, отриманою із нею; можливість моделювати природні стреси в системі *in vitro*. Як будь-яка технологія клітинна селекція складається із низки послідовних маніпуляцій, кожна з яких може здійснювати одночасно як позитивний, так і негативний тиск на генетичний апарат рослини. У ряді випадків зміни, котрі мають місце можуть обмежуватись фізіологічними коливаннями. Тому результат клітинної селекції нерідко важко передбачити [2].

Оскільки осмотичні стреси (сольовий і водний) відзначаються суттєвою тотожністю проявів логічно передбачити існування низки чинників, котрі здійснюють аналогічний деструктивний вплив. До цієї групи відносяться іони важких металів, ІВМ.

За своєю фізіологічною дією ІВМ діляться на дві категорії, а саме: мікроелементи, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mo^{6+} , Co^{2+} , шкодо чинні у значних дозах, і токсичні у залишкових кількостях [3]. До останньої категорії токсикантів належать катіони барію (Ba^{2+}) і кадмію (Cd^{2+}).

Публікації відмічають, що Ba^{2+} порушує переміщення іонів калію, K^+ , причому це переміщення як внутрішньоклітинне, так і витікання назовні. Крім того іони Ba^{2+} можуть впливати і на пересування в середину клітини іонів Na^+ [4]. Остання подія, як відомо, є головною патологічною дією засолення. З іншого боку встановлено що, іони Cd^{2+} здійснюють різноспрямований патологічний вплив на рослину. Зокрема Cd^{2+} негативно діє

на один вид транспортерів води, а саме LEA (*late embryogenesis abundant proteins*), білків, що належать до групи дегідринів [5]. LEA широко поширені у ядрі, цитоплазмі, мітохондріях. Вони можуть спрацьовувати подібно до шаперонів, захищаючи клітинні компартменти. З іншої сторони LEA суттєво ушкоджуються за дії водного дефіциту.

Літературні дані дозволили запропонувати ідею використання властивостей катіонів Ba^{2+} і Cd^{2+} у клітинній селекції для отримання форм, стійких до засолення та водного дефіциту. Алгоритм клітинної селекції наведено на рисунку.



Рис. Схема отримання та тестування клітинних ліній із комплексною стійкістю

Примітка: відбір і тестування здійснювались за умов летальних стресів

Системи відбору та аналізу створювались із додаванням летальних для клітинних культур дикого типу доз стресових агентів. Ними вважали найменшу кількість токсиканта, котра викликала елімінацію калюсу. Для кожного виду рослин доза визначалась окремо.

При перевірці дієвості гіпотези задіяно модельний тютюн, класичний глікофіт. Універсальність гіпотези була підтверджена при дослідженні рослин різних таксономічних груп.

На селективних середовищах з катіонами Ba^{2+} та Cd^{2+} були відібрані стійкі клітинні лінії тютюну, сої, соняшника, пшениці озимої. Стійкі варіанти утворились із окремих генетично змінених клітин. На користь факту генетичної зміни свідчила частота відбору, яка не перевищувала 10^{-6} . Оскільки передбачалось тестування за різних умов, то клітинну біомасу для прискорення росту впродовж 2-3 пасажів культивували за нормальних умов.

Для проведення аналізу культури ділили на рівні частини. З нормальних умов калюс стійких клітинних ліній переміщували на селективні середовища, а саме: стрес I – селективне середовище первинного відбору (катіони Ba^{2+} і Cd^{2+}); стрес II – осмотичний стрес. При цьому для Ba -стійких ліній стрес створювався додаванням солей морської води; для Cd -стійких додаванням маніту. Солі морської води (морська сіль, полі компонентна іонна суміш) є адекватною імітацією природного засолення. Маніт є молекулярною чистою сполукою; використовується в системі *in vitro* для моделювання водного стресу. Маніт після потрапляння в рослину практично не метаболізується в

клітинах. В летальних дозах, які були задіяні при тестуваннях, маніт провокував зневоднення у культивованих клітин.

Клітинні культури відзначались стійкістю до всіх застосованих стресових чинників. Це постійно контролювалось вимірюванням відносного приросту свіжої біомаси калюсу Δm . $\Delta m = (m_k - m_n) / m_n$, де m_n и m_k маси культур на початку та в кінці дискретного пасажу. Цей показник застосовується в клітинній селекції як маркер активності проліферації культури

Таблиці 1, 2 відображають цей показник для різних калюсних культур і різних умов. В стресові умови культури переносили з нормальних умов, н.у.

1. Відносний приріст свіжої маси, (Δm) тютюну Ва-стійких клітинних ліній (Ва-СКЛ) при культивуванні за різних умов

Стойкі лінії	Нормальні умови (контроль)	Катіони Ва ²⁺	Морська сіль
Ва-СКЛ № 2	4.59 ± 0.24	1.67 ± 0.19	2.25 ± 0.25
Ва-СКЛ № 21	5.08 ± 0.43	2.06 ± 0.23	2.89 ± 0.21
Ва-СКЛ № 4	5.75 ± 0.12	2.15 ± 0.03	3.10 ± 0.12
Дикий тип	5.93 ± 0.44	елімінація	елімінація

Ва-стійкі клітинні лінії зберігали розвиток на усіх типах середовищ (табл. 1). Проте за стресових умов відмічали зниження відносного приросту біомаси. В той же час, цей факт, на наш погляд, не може незаперечно вказувати на зниження активності росту. В літературі та цей феномен детально висвітлений. Причиною сукупного зменшення приросту культури за умов засолення було зменшення розміру окремих клітин у загальному масиві. Це явище було адаптивним пристосуванням клітини, яке сприяє спрощенню підтримання потрібного осмотичного статусу; його вирівнюванню за рахунок акумуляції низькомолекулярних сумісних осмолітів [6]. Зменшення діаметру клітин може сприяти підтриманню співвідношення K^+/Ca^{2+} [7]. У Ва-стійких варіантів це співвідношення у присутності катіону Ва²⁺ перевищувало показники норми в 1,5 – 3,0 рази. На фоні дії засолення цей ефект не проявлявся. Ця характеристика властива комплексно стійким культурам. Тому ймовірно припустити існування незалежних механізмів стійкості до засолення та селективного агента.

У таблиці 2 представлено дані відносного приросту свіжої біомаси калюсу тютюну при його вирощуванні за умов водного стресу.

Сd-стійкі клітинні лінії при вирощуванні у присутності токсичного катіону відбору характеризувались особливістю, а саме: показник відносного приросту свіжої маси не знижувався. Більше того, збільшення дози стресового чинника у 1,5 і 2,0 рази викликало зростання цього показника. На наш погляд ця подія могла бути пов'язана із збереженням обводнення клітин. Цей феномен відслідковувався при культивуванні у присутності маніту.

Рівень вологи у калюсі Cd-стійких варіантів не знижувався впродовж пасажу на відміну від культури дикого типу. Цьому могло сприяти і зменшення об'єму клітин у присутності молекулярного осмотика.

2. Відносний приріст свіжої маси, (Δm) тютюну Cd-стійких клітинних ліній (Cd-СКЛ) при культивуванні за різних умов

Стіькі лінії	Нормальні умови (контроль)	Катіони Cd ²⁺	Маніт
Cd-СКЛ № 3	3.68 ± 0.24	4.77 ± 0.40	1.75 ± 0.25
Cd-СКЛ № 5	5.08 ± 0.15	5.06 ± 0.23	2.89 ± 0.20
Дикий тип	6.03 ± 0.34	елімінація	елімінація

У загальному випадку дані відносного приросту маси дають підстави стверджувати реалізацію факту стійкості до летальних осмотичних стресів у клітинних ліній, відібраних на середовищах з ІВМ. В той же час цей показник, як такий, не відкриває причин життєздатності.

Осмотичний стрес у рослин, як будь-яка патологічна зміна, поширюється у часі та просторі та спричиняє істотні нерідко незворотні зміни. Специфічно спрямовані реакції сприяють підтриманню життєдіяльності організму. Значна їхня кількість спряжена із синтезом чисельних протекторних сполук, На відміну від Δm аналіз динаміки акумуляції цих речовин може надати інформацію про динаміку метаболізму, що особливо необхідно для адекватної оцінки чутливості/стійкості генотипу.

Генетичний контроль здійснюється на всіх стадіях онтогенезу за рахунок диференційної експресії генів. Активність метаболізму координується узгодженою дією іоному, протеому, метаболу, транскриптому. Прямі та перехресні зв'язки між цими аспектами життєдіяльності встановлюються та розвиваються постійно та проявляються у формі динамічних фенотипових ефектів паралельно з боку структурних і функціональних компартментів. Порушення як у середині ланцюгів метаболізму, так і деструкція зв'язків окремими складовими покаже різницю між стійкими та чутливими варіантами.

Порівняльні дослідження динаміки життєдіяльності відкриють причини координованого процесу комунікації як у межах клітини, так між тканинами/органами багатоклітинного організму.

У клітинній селекції на осмостійкість застосування комбінацій “omic tools” сприятиме відкриттю перспективних кандидатів серед структурних і регуляторних генів. Використання іонів важких металів для рішення задачі має гарну перспективу.

Література

1. Maliga P. Isolation and characterization of mutants in plant cell culture. *Ann. Rev. Plant Physiology.* – 1984, 35, pp. 519-542. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.002511>.

2. Dracup M. Why does *in vitro* cell selection not improve the salt tolerance of plants? / Genetic aspects of plant mineral nutrition. Eds. Randall P.J. et al. Kluwer Academic Publishers, 1993, pp.137-142.

3. Nies D.H. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiology Biotechnology*, 1999. 51, pp.730-750.

4. Wang S.-M., Zhang J.-L., Flowers T.J. Low-affinity Na⁺ uptake in the halophyte *Suaeda maritima*. *Plant Physiology*. - 2007, 145, pp.559-571. doi: 10.1104/pp.107.104315.

5. Tioleter D., Jaquinod M., Mangavel C., Passirani C., Saulner P., Manon S., Teyssier E., Payet N., Avelange-Macherel M.-H., Macherel D. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein by desiccation *Plant Cell*, 2007, 19, pp.1580-1587. DOI:10.1105/tpc.107.050104.

6. Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K. & Bohnert H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2000. 51, pp. 463-499. DOI: 10.1146/annurev.arplant.51.1.463.

7. Sergeeva L.E., Bronnikova L.I. Cell selection with barium ions for obtaining genetically modified salt tolerant tobacco forms *Visn. Cherkassy Univ. Ser. Biology* 2020, 1, pp. 71-78. DOI: 10.31651/2076-5835-2018-1-2020-1-71-78.

Summery

Osmotic stresses and the deficit of tolerant plants become the main problems. Genetic changes that improve the genotype tolerance are the aims of various investigations. Cell selection with heavy metal ions is the appropriate biotechnology for obtaining plant forms that challenged osmotic stresses.

Barium (Ba²⁺) and cadmium (Cd²⁺) ions are harmful at trace concentrations. It is known that Ba²⁺ interferes the K⁺ inward/outward transport; Cd²⁺ injures the water status of the organism So Ba²⁺ and Cd²⁺ ions were used in cell selection for obtaining plant forms that tolerate salinity and water stress.

Ion-resistant colonies were obtained on selective media with addition of Ba²⁺ and Cd²⁺. The frequency of the appearance was 10⁻⁶. All cation-resistant cell lines challenged osmotic stresses.

ХАРАКТЕРИСТИКА ГІБРИДІВ ЛАВАНДИ ВУЗЬКОЛИСТОЇ ЗА КІЛЬКІСНИМИ ОЗНАКАМИ ПРОДУКТИВНОСТІ

В. І. Бутнараш, Л. А. Котеля, З. К. Балмуш

Молдовський державний університет (Інститут генетики, фізіології та захисту рослин), м. Кишинів

e-mail: butnarasvioleta@gmail.com

Створення різноманітного вихідного селекційного матеріалу є першорядним завданням у селекції будь-якої культури, зокрема і лаванди.

НАУКОВЕ ВИДАННЯ

**МАТЕРІАЛИ XII МІЖНАРОДНОЇ
НАУКОВОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ**

**«СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНА
НАУКА І ОСВІТА»**

(Парієві читання)

20–22 березня 2023 року

Селекційно-генетична наука і освіта (Парієві читання). Матеріали XII Міжнародної наукової конференції (20–22 березня 2023 р.). Умань, 2023. 264 с.

Адреса редакції:

20305, вул. Інститутська, 1, м. Умань, Черкаської обл.
Уманський національний університет садівництва, тел.: 4–69–77.

Підписано до друку 31.03.2022 р. Формат 60x84 ¹/₁₆. Друк офсет.
Умов. друк. арк. 15,81. Наклад 300 екз. Зам. №109.

Надруковано:

Видавничо-поліграфічний центр “Візаві”
20300, м. Умань, вул. Тищика, 18/19.
Тел. (04744) 4–64–88, 4–67–77.
E-mail: vizavi08@mail. ru.
Свідоцтво суб’єкта видавничої справи
ДК № 2521 від 08. 06. 2006 р.