

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 2, Number 38 (2017), 199 – 204

Mohammad Naim N.¹, R. S. Yerzhebayeva², A. K. Daniyarova²¹Kazakh national agrarian university, Almaty, Kazakhstan,²Kazakh scientific research institute of crop farming and production, Almalybak village, Kazakhstan**MULTI-STAGE CELLULAR AND TISSUE SELECTION
OF SOYBEAN FOR RESISTANCE TO OSMOTIC STRESS USING
PEG 6000 IN VITRO CONDITION**

Abstract. In vitro cellular and tissue selection allows the purposeful selection of the desired characteristics in hard selective conditions at the level of individual cells and tissues. On the basis of multistage cellular and tissue selection with selective agent – neutral osmotic polyethylene glycol 6000 in increasing concentrations - 5%, 10%, 15%, 20% of the final volume of culture medium, a stable osmotic stress resistant for the calluses of Zhansaya soybean variety was obtained. Regeneration from the callus marked only 8.3% of the planted calluses. From the calluses 6 resistant to osmotic stress regenerated plants of soybean were obtained.

Keywords: soybean, callus, cellular selection, osmotic stress, resistance.

УДК 633.34:57.022

Мохаммад Наим. Н.¹, Р. С. Ержебаева², А. К. Даниярова²¹Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан,²Казахский НИИ земледелия и растениеводства, п. Алмалыбак, Казахстан**МНОГОСТУПЕНЧАТАЯ КЛЕТочНАЯ И ТКАНЕВАЯ СЕЛЕКЦИЯ
СОИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ
С ПРИМЕНЕНИЕМ ПЭГ 6000 В УСЛОВИЯХ *IN VITRO***

Аннотация. Клеточная и тканевая селекция *in vitro* позволяет проводить целенаправленный отбор искомым признаков в жестких селективных условиях на уровне отдельных клеток и тканей. На основании многоступенчатой клеточной и тканевой селекции с использованием селективного агента - нейтрального осмотика полиэтиленгликоль 6000 в возрастающих концентрациях – 5%, 10%, 15%, 20% от конечного объема питательной среды получены стабильно устойчивые к осмотическому стрессу каллусы сорта сои Жансая. Регенерация из каллуса отмечена только 8,3% из высаженных каллусов. Из каллусов получено 6 устойчивых к осмотическому стрессу растений-регенерантов сои.

Ключевые слова: соя, каллус, клеточная селекция, осмотический стресс, устойчивость.

Введение. Соя – ведущая в мире масличная культура. Соевые бобы являются богатым источником растительного масла и белкового корма. Среди природных факторов, оказывающих наибольшее отрицательное воздействие на все физиологические процессы роста и развития растений сои и, в конечном счете, приводящих к потерям урожая, является водный стресс, вызванный засухой. Недостаток влаги снижает урожай сои примерно на 40% [1]. В зависимости от генотипа, растения сои используют около 450-700 мм воды в период вегетации. Однако наиболее критическим периодом для водного стресса растений сои является этап цветения и период после цветения, т.е. формирования и налива семян [2].

В последние годы производство сои в Казахстане постоянно увеличивается. Это имеет важное значение для агропромышленного комплекса страны и способствует решению проблемы дефицита белка в питании человека и кормлении животных, а также диверсификации растениеводства. Однако основным регионом возделывания сои является юг и юго-восток Казахстана. В 2016 году при общей посевной площади в Республике Казахстан 106,5 тыс. га в Алматинской области под соей было занято 97,7 тыс. га., т.е. более 90%. Продвижение сои в северные и восточные области республики является целевым индикатором программы по развитию агропромышленного комплекса в РК на 2013-2020 годы. Для большого разнообразия почвенно-климатических условий Казахстана требуются сорта сои, устойчивые к различным стрессам, и прежде всего сорта, устойчивые к засухе.

Такой метод биотехнологии как клеточная селекция *in vitro* позволяет расширить спектр исходного материала и активизировать селекционный процесс, направленный на создание высокопродуктивных засухоустойчивых сортов. Генетическое варьирование в этом случае отличается более широким спектром, а отбор искомым признаков в жестких селективных условиях клетки происходит целенаправленно на уровне отдельных клеток и тканей.

На клеточном уровне устойчивость к засухе выражается в толерантности клеток к присутствию в питательной среде осмотически активных веществ, понижающих внешний водный потенциал [3]. Для отбора *in vitro* в качестве селективных агентов, как правило, используют полиэтиленгликоль, маннит, сорбит, NaCl. Наиболее успешно в качестве фактора отбора применяется ПЭГ с молекулярной массой 6000. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) – непроникающий осмотик, вызывает коллапс клеточных стенок и сжатие протопласта, то есть хорошо имитирует водный баланс клетки в условиях осмотического стресса [4].

В настоящее время селективные системы для отбора форм, устойчивых к засухе, разработаны для основных злаковых культур: пшеницы [5], риса [6], кукурузы, [7], ячменя [8]. Были получены осмоустойчивые каллусные клоны сорго [9].

Исследования по получению биотехнологическими методами зернобобовых культур устойчивых к засухе крайне ограничены. В опубликованных работах показана главным образом только возможность проведения скрининга генотипов *in vitro* на устойчивость к осмотическому стрессу.

Работа проведена в рамках бюджетной программы 255 «Создание условий для развития производства, переработки, реализации продукции растениеводства» по проекту «Повышение продуктивности масличных культур на основе традиционных и современных методов селекции, разработка технологии их возделывания и организация первичного семеноводства»

Цель работы: Создание новых линий сои, устойчивых к засухе, с использованием клеточной и тканевой селекции на водodefицитном фоне с применением ПЭГ 6000.

Материал и методы исследований. Материалом для исследований служил сорт сои (*Glycine max L.*) Жансая, отечественной селекции, допущенный к использованию в Республике Казахстан.

Методика исследований: растения сои выращивались до стадии 5-7 дневных проростков в тепличном комплексе Казахского НИИ земледелия и растениеводства (КазНИИЗиР) при 16-часовом фотопериоде, освещении 10-15 тыс. люкс, температуре воздуха 26-28° С;

В качестве экспланта для получения первичных каллусов служили семядольные листья проростков сои. Стерилизацию эксплантов проводили с использованием 20% раствора NaOCl с каплей Твин-80 в течение 8-10 минут на шейкере, с последующей промывкой стерильной дистиллированной водой (трижды).

Получение первичной каллусной массы проводилось по стандартным методикам [10-12]. Культура тканей сои, регенерация, корнеобразование [13];

Для проведения прямой клеточной селекции в условиях *in vitro* использована питательная среда Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов (1 мг/л ИУК и 1 мг/л кинетина), 30 г/л сахарозы и 6 г/л агары, 2,5 мг/л аскорбиновой кислоты, рН -5.6-5.8.

Осмотический стресс моделировался введением в питательную среду селективного агента - нейтрального осмотика полиэтиленгликоль 6000 (ПЭГ 6000), который имитирует условия засухи в культуре *in vitro*. Каллусы поэтапно вводились в культуру *in vitro* на питательную среду, содержащую ПЭГ 6000 в возрастающих концентрациях - 5, 10, 15, 20 %. В качестве контроля была использована среда без селективного агента.

Все полученные первичные каллусы высокопродуктивного сорта Жансая размером 5-7 мм были высажены на питательные среды для каллусообразования – контрольную среду и среду, содержащую 5% ПЭГ 6000 (по 200 каллусов на каждый вариант). Продолжительность каждого пассажа составляла 20-25 суток.

Для регенерации растений в условиях *in vitro* использована питательная среда Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов (БАП от 4 мг/л до 6 мг/л + 0,5 мг/л ИУК), 30 г/л сахарозы и 6 г/л агара, 1 мл/л антибиотик цефотаксим, pH -5.6-5.8.

Результаты исследований. Наблюдения за динамикой роста каллусов на первой ступени многоступенчатой клеточной селекции сои – 5 % ПЭГ 6000 проводились каждые 10 дней. Оценка роста размеров каллусов после 20 дней культивирования показала, что на контроле зафиксирован рост каллусов от 0,62 см до 0,93 см (таблица). Прирост размера каллусов составил 0,31 см. На питательной среде содержащей 5% ПЭГ зафиксирован рост каллусов от 0,57 до 0,97 см. Прирост размера каллусов составил 0,4 см, что составляет 129% от контроля. Все каллусы по истечении 20 дней оставались светлыми, потемнение отмечалось на некоторых каллусах контрольного варианта (рисунок 1).

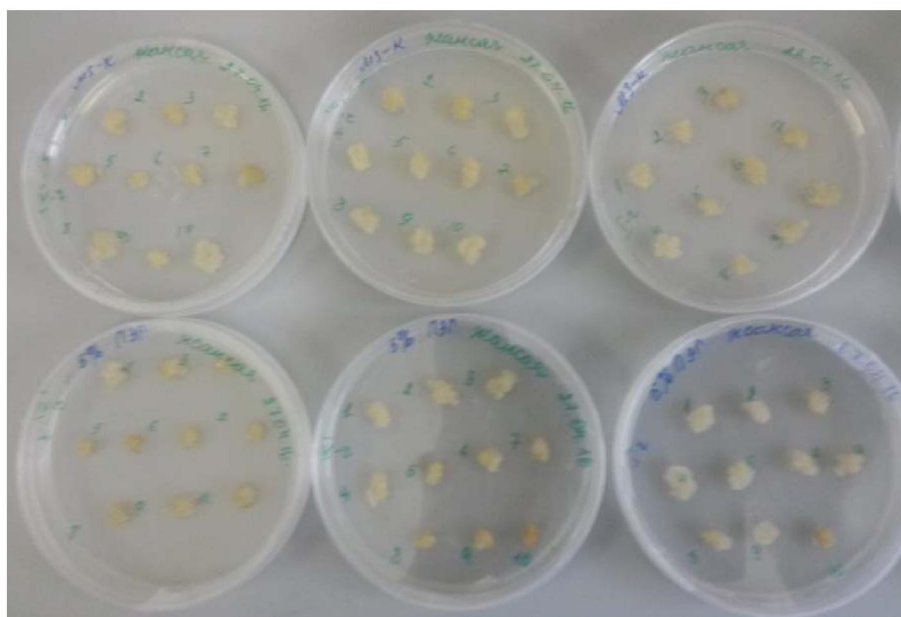


Рисунок 1 – Культивирование каллусов на контрольной среде и среде содержащей 5% ПЭГ600 (20 дней)

Результаты многоступенчатой клеточной и тканевой селекции с использованием возрастающих концентрации полиэтиленгликоля 6000 в условиях *invitro*

Наименование сорта	Прирост размера каллуса на контрольной среде, см		Прирост размера каллуса на селективной среде, см		Пророст каллуса на селективной среде относительно контроля (%)		Доля выживших каллусов, на селективной среде %
	через 10 дней	через 20 дней	через 10 дней	через 20 дней	через 10 дней	через 20 дней	
5 % ПЭГ							
Жансая	0,25	0,31	0,21	0,4	84	129	98
10 % ПЭГ							
Жансая	0,28	0,39	0,24	0,33	85,7	84,6	46
15% ПЭГ							
Жансая	0,14	0,31	0,08	0,14	57,1	45,2	39
20% ПЭГ							
Жансая	0,06	0,06	0,05	0,06	83,3	100	77,2

Таким образом, зафиксирован интенсивный рост каллусов как на контрольном варианте, так и на среде с селективным агентом. Все каллусы были разделены до 5-7 мм и пересажены на вторую ступень клеточной селекции – 10 % ПЭГ6000.

Оценка через 20 дней культивирования каллусов сои на 10% ПЭГ показала, что на контрольном варианте зафиксирован рост каллусов от 0,81 см до 1,2 см. Прирост размера каллусов составил 0,39 см (рисунок 2). На питательной среде содержащей 10% ПЭГ зафиксирован рост каллусов от 0,9 см до 1,23 см. Прирост размера каллусов составил 0,33 см, что составляет 84,6% от контроля. Почти на всех каллусах, культивированных на 10 ПЭГ 6000, по истечении 20 дней наблюдалось потемнение.

Выделено 82 каллуса, устойчивых к осмотическому стрессу. Все они были разделены (до 150 каллусов) и пересажены на 15% ПЭГ.

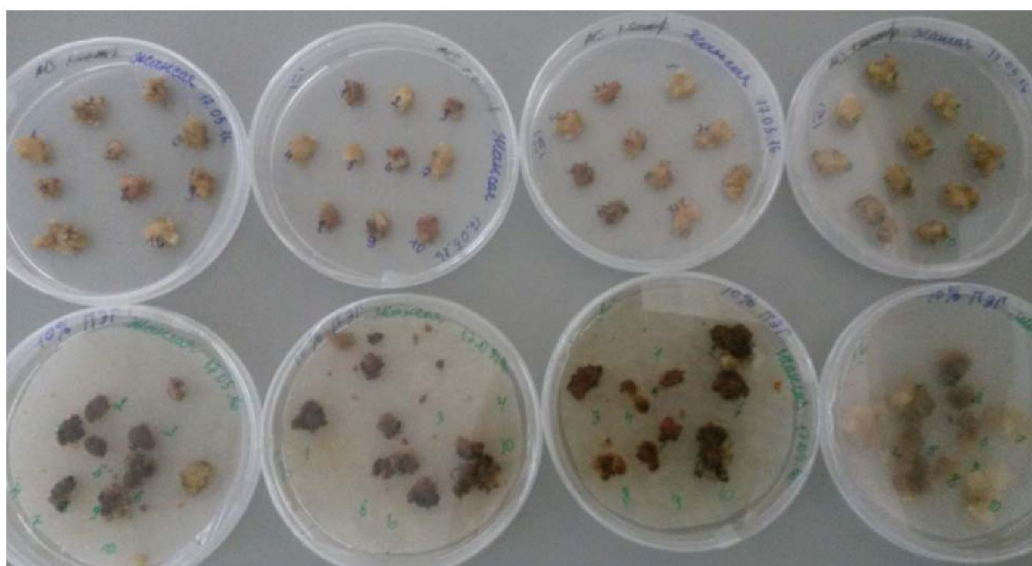


Рисунок 2 – Культивирование каллусов на контрольной среде и среде, содержащей 10% ПЭГ600 (20 дней)

Культивирование выживших каллусов на питательной среде, содержащей селективный агент 15%, показало, что прирост на контроле составил 0,31 см, а на опыте 0,14 см, что составляет 45,2% от контроля. Наблюдались гибель и потемнение каллусов. Доля выживших каллусов составила 39%. При этом зафиксирован рост и деление отдельных групп клеток. Все они были отобраны и выделены как устойчивые каллусы.

Следующий пассаж и дальнейшее культивирование устойчивых каллусов на селективной среде с 20% ПЭГ показало, что все выделенные каллусы были светлыми, но деление было медленным. Средний прирост на селективной среде через 20 дней составил 0,06 см. Доля выживших каллусов из пересаженных 44 шт составила – 77,2%. Все выжившие каллусы (34 шт) были пересажены на питательную среду без селективного агента. На питательной среде без селективного агента они субкультивировались 2 пассажа. Все устойчивые каллусы были размножены.

Проведен отбор истинно устойчивых клеток каллуса при повторном возврате на селективную среду с 15% ПЭГ. Культивирование длилось 20 дней. Выявлены каллусы, у которых наблюдалась адаптация, и после среды без селективного агента устойчивость не проявилась. Из посаженных 90 шт каллусов устойчивость проявили 75. После повторного возвращения в селективные условия на 15% ПЭГ были отобраны стабильные клоны, которые были пересажены на регенерацию.

Изучение регенерации устойчивых каллусов, полученных на основании клеточной селекции, показало, что 94% каллусов приобрели зеленый цвет, наметились точки формирования меристемных очагов (рисунок 3). Регенерация из каллуса отмечена только 8,3% из высаженных каллусов. Низкий процент регенерации, по-видимому, является следствием длительного пассирования каллусов и снижения морфогенетического потенциала. Из каллусов получено 6 устойчивых к осмотическому стрессу растений-регенерантов сои.

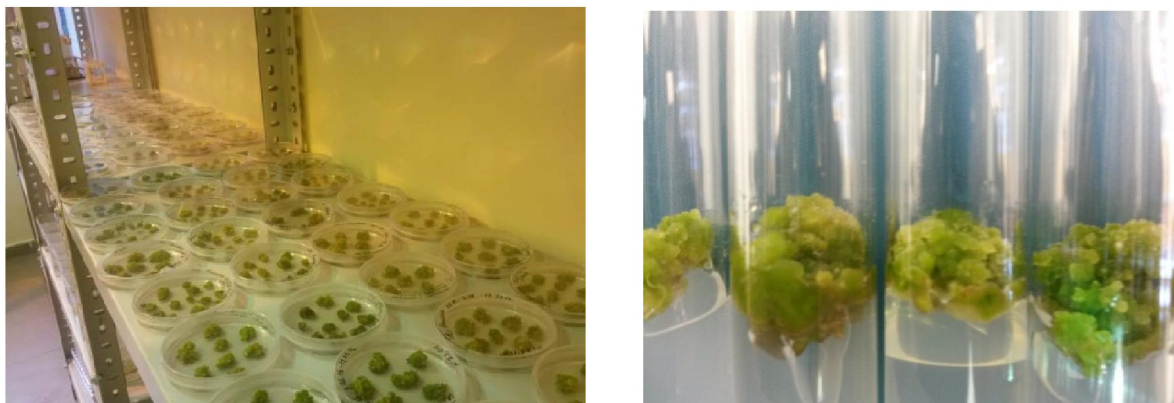


Рисунок 3 – Культивирование выделенных устойчивых каллусов на среде для регенерации растений

Выводы. На основании многоступенчатой клеточной и тканевой селекции с использованием селективного агента - нейтрального осмотика полиэтиленгликоль 6000 в концентрациях – 5%, 10%, 15%, 20% от конечного объема питательной среды получены стабильно устойчивые к осмотическому стрессу каллусы (75 шт) сорта сои Жансая.

Регенерация из каллуса отмечена только 8,3% из высаженных каллусов. Низкий процент регенерации, по-видимому, является следствием длительного пассирования каллусов и снижение морфогенетического потенциала. Из каллусов получено 6 устойчивых к осмотическому стрессу растений-регенерантов сои.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Specht J.E., Hume D.J., Kumudini S.V. Soybean yield potential – a genetic and physiological perspective // *Crop Sci.* 1999. – Vol. 39. – P. 1560-1570.
- [2] Meckel L., Egli D.B., Phillips R.E., Radcliffe D., Leggett J.E. Effect of moisture stress on seed growth in soybeans // *Agron. J.* – 1984. – Vol. 75. – P. 1027-1031.
- [3] Долгих Ю.И. Результаты и перспективы использования клеточной селекции для создания перспективных форм растений // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. – М., 2004. – С. 114-115.
- [4] Аль-Холани Х.А., Долгих Ю.И. Сравнение эффективности селективных систем с маннитом и полиэтиленгликолем для отбора засухоустойчивых растений кукурузы // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. – М.: ИД ФБК-Пресс, 2008. – С. 18-19.
- [5] Тучин С.В. Моделирование стресса обезвоживания в культуре изолированных тканей пшеницы и его биологические последствия: Автореф. ... докт. дис. – М., 2000. – 46 с.
- [6] Белянская С.Л., Шамина З.Б., Кучеренко Л.А. Морфогенез в клонах риса, резистентных к стрессовым факторам // *Физиология растений.* – 1994. – Т. 41, № 4. – С. 573-577.
- [7] Аль-Холани Х.А.М. Получение стресс-толерантных растений кукурузы методом клеточной селекции: Автореф. дис. ... к.б.н. – М., 2010. – 24 с.
- [8] Широких И.Г. и др. Физиолого-биохимические показатели и продуктивность растений ячменя, регенерированных из каллуса в селективных системах // Доклады РАСХН. – 2011. – № 2. – С. 6-9.
- [9] Smith R.H., Bhaskaran S., Miller F.R. Screening for drought tolerance in Sorghum using cell culture // *IN VITRO Cell Develop. Biology.* – 1985. – Vol. 21, N 10. – P. 541-545.
- [10] Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учеб. пособие / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
- [11] Валиханова Г.Ж. Биотехнология растений / Г.Ж. Валиханова. – Алматы: Конжык, 1996. – 272 с.
- [12] Сельскохозяйственная биотехнология: учебник / В.С. Шевелуха, Е.А., Калашникова, Е.С. Воронин и др. – М.: Высш. шк., 2003. – 469 с.
- [13] Рожанская О.А., Клеблева Н.Г. Культура тканей сои и морфогенез / Корма и их производство в Сибири / РАСХН, Сиб. Отделение. – Новосибирск, 1994. – С. 117-126.

REFERENCES

- [1] Specht J.E., Hume D.J., Kumudini S.V. Soybean yield potential - a genetic and physiological perspective // *Crop Sci.* 1999. Vol. 39. P. 1560-1570.
- [2] Meckel L., Egli D.B., Phillips R.E., Radcliffe D., Leggett J.E. Effect of moisture stress on seed growth in soybeans // *Agron. J.* 1984. Vol. 75. P. 1027-1031.
- [3] Dolgih Ju.I. Rezul'taty i perspektivy ispol'zovaniya kletочноj selekcii dlja sozdaniya perspektivnyh form rastenij // *Biotehnologija v rastenievodstve, zhivotnovodstve i veterinarii.* M., 2004. P. 114-115.

[4] Al'-Holani H.A., Dolgih Ju.I. Sravnenie jeffektivnosti selektivnyh sistem s mannitom i polijetilenglikolem dlja otbora zasuhoustojchivyyh rastenij kukuruzy // Biologija kletok rastenij in vitro i biotehnologija. M.: ID FBK-Press, 2008. P. 18-19.

[5] Tuchin S.V. Modelirovanie stressa obezvozhivaniya v kul'ture izolirovannyh tkanej pshenicy i ego biologicheskie posledstviya: Avtoref. dokt. dis. M., 2000. 46 p.

[6] Beljanskaja S.L., Shamina Z.B., Kucherenko L.A. Morfogenez v klonah risa, rezistentnyh k stressovym faktoram // Fiziologija rastenij. 1994. Vol. 41, N 4. P. 573-577.

[7] Al'-Holani H.A.M. Poluchenie stress-tolerantnyh rastenij kukuruzy metodom kletочноj selekcii: Avtoref. dis.... k.b.n. M., 2010. 24 p.

[8] Shirokih I.G. i dr. Fiziologo-biohimicheskie pokazateli i produktivnost' rastenij jachmenja, regenerirovannyh iz kallusa v selektivnyh sistemah // Doklady RASHN. 2011. N 2. P. 6-9.

[9] Smith R.H., Bhaskaran S., Miller F.R. Screening for drought tolerance in Sorghum using cell culture // IN VITRO Cell Develop. Biology. 1985. Vol. 21, N 10. P. 541-545.

[10] Butenko, R.G. Biologija kletok vysshih rastenij in vitro i biotehnologii na ih osnove: ucheb. posobie / R.G. Butenko. M.: FBK-PRESS, 1999. 160 p.

[11] Valihanova G.Zh. Biotehnologija rastenij / G.Zh. Valihanova. Almaty: Konzhyk, 1996. 272 p.

[12] Sel'skohozjajstvennaja biotehnologija: uchebnik / V.S. Sheveluha, E.A., Kalashnikova, E.S. Voronin i dr. M.: Vyssh. shk., 2003. 469 p.

[13] Rozhanskaja O. A. , Klebleeva N. G. Kul'tura tkanej soi i morfogenez / Korma i ih proizvodstvo v Sibiri / RASHN, Sib. otdelenie. Novosibirsk, 1994. P. 117-126.

Мохаммад Наим Н.¹, Р. С. Ержебаева², А. К. Даниярова²

¹Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Алматы, Қазақстан.

²Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты,
Алматы облысы, Алмалыбақ, Қазақстан

**IN VITRO ЖАҒДАЙЫНДА СОЯНЫҢ КӨПСАТЫЛЫ ЖАСУШАЛЫҚ ЖӘНЕ
ҰЛПАЛЫҚ СЕЛЕКЦИЯСЫНЫҢ ПЭГ 6000 ҚОЛДАНУ АРҚЫЛЫ
ОСМОТИКАЛЫҚ КҮЙЗЕЛІСКЕ ТӨЗІМДІЛІГІ**

Аннотация. Жасушалық және ұлпалық селекция *in vitro* - қатаң селекциялық жағдайда жекеленген жасушалық және ұлпалық деңгейде мақсатты іздену белгілеріне іріктеу жасауға мүмкіндік береді. Көпсатылы жасушалық және ұлпалық селекция негізінде, селективті агент – бейтарап осмотикалық полиэтиленгликоль 6000 ұлғайтылған мөлшерде – 5%, 10%, 15%, 20% қоректік ортаның соңғы мөлшерінен осмотикалық күйзеліске тұрақты төзімді Жансая сортының каллустары алынды. Отырғызылған каллустардан тек 8,3%-ға регенерация алынды. Каллустардан осмотикалық күйзеліске төзімді 6 регенерант өсімдік алынды.

Түйін сөздер: соя, каллус, жасушалық селекция, осмотикалық күйзеліс, төзімділік.