

ПРИЛОЖЕНИЕ НА КАЛУСНИ КУЛТУРИ ПРИ СОЯ (*Glycine max*) ЗА ИЗУЧАВАНЕ НА АБИОТИЧНИ СТРЕСОВИ ФАКТОРИ

Георгина Костуркова, Трендафил Недев, Маргарита Димитрова
Институт по генетика, Българска академия на науките, София

Резюме

Костуркова Г., Т. Недев, М. Димитрова. 2006. Приложение на калусни култури при соя (*Glycine max*) за изучаване на абиотични стресови фактори.

Абиотичният стрес е важен фактор влияещ върху добива на соя в България. За ускоряване на селекционния процес е възможно да се приложат скринингови методи *in vitro*. ПЕГ и NaCl бяха използвани за симулиране на засушаване и засоляване при калусни култури от соя сорт "Ходсън". Установени бяха концентрациите, при които абиотичните селективни агенти ПЕГ и NaCl влияят растежа на калуса. Оценена бе пригодността на различните селективните агенти за създаване на моделни системи.

Ключови думи: Соя - Абиотичен стрес - *In vitro* селекция - *In vitro* моделиране - Засушаване – Засоляване

Съкращения: ПЕГ-полиетилен гликол; NaCl-натриев хлорид; MS - Murashige & Skoog;

Abstract

Kosturkova G., T. Nedev, M. Dimitrova. Application of *in vitro* cultures in soybean (*Glycine max*) to study abiotic stress factors.

Abiotic stress is an important factor influencing soybean yield in Bulgaria. *In vitro* screening methods could be applied for accelerating the breeding process. PEG and NaCl were used for simulation of drought and salinity in callus cultures of soybean cv. "Hodson". PEG and NaCl concentrations affecting calli growth were determined. Evaluation of the suitability of different selective agents for *in vitro* modeling was evaluated.

Key words: Soybean – Abiotic stress – *In vitro* breeding - *In vitro* modeling – Drought – Salinity

Abbreviations: PEG – poly ethylene glycol, NaCl – sodium chloride; MS - Murashige & Skoog;

УВОД

Соята заема значително място сред селско-стопанските растения като източник на белтъци и растителни масла. В развиващите се страни тя често замества традиционно отглежданите зърненобобови култури. Това я прави стратегически важна за целия свят. Оценката на селектираните генотипи е силно зависима от съответните условия на околната среда. Абиотичният стрес включващ засушаването, температурата, засоляването и други намалява добива, като културите реализират до 25 % от техния потенциален добив. Засушаването е основният абиотичен стрес, а физиолого-биохимичната му основа е все още не добре изяснена. Глобалното

затопляне засилва ефекта му, а селекцията към сухоустойчивост представлява сериозно предизвикателство (Sorrels et al., 2002)

Въпреки достиженията на класическата селекция, прирастът от селско-стопанска продукция изостава в сравнение с бързо увеличаващото се население в света. Повишаването на добивите е стратегическа цел на растителната селекция, но тя е бавен и дълъг процес. Необходимо е да се разработят скринингови методи, които да са прости и възпроизводими, да не изискват големи капиталовложения и заемат дълги периоди време. Една от възможностите в помощ на растителната селекция са *in vitro* методите, които допълват класическата селекция и допринасят за преодоляването на някои нейни ограничения. *In vitro* методите са използвани широко в опитите за селекция на толерантни към абиотичен стрес линии. Употребата на *in vitro* мутагенез придружен с *in vitro* селекция формира система, която е способна значително да подобри ефективността на селекцията. (Cassels & Doyle, 2003)

Цел на настоящето изследване беше да се изпита сорт соя ползван за стандарт спрямо използваните в селекцията български линии за неговата сухоустойчивост за подбор на подходящ изходен материал за експерименти *in vitro*.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изходен материал бяха експлантите от семеначета от сорт „Ходсън“. Семената бяха повърхностно стерилизирани с 70 % етанол за 1 мин, последвано от белина (30 % v/v търговска белина и 70 % v/v дестилирана вода) за 30 min и трикратно изплакване със стерилна дестилирана вода. Обеззаразените семена бяха поставяни на среда за покълване Murashige & Skoog (1962). След образуване на котиледоните, но преди формирането на първичното стебло беше изолиран междукотиледонния възел, служещ като експлант. За формиране на калус експлантите бяха поставяни на среда MS, с четирикратно увеличени микросоли по Murashige & Skoog, витамини B₅ по Gamborg & Eveleigh (1968), 30 g/l захароза, 2.5 mg/l бензил-амино пурин, 0.5 mg/l алфа нафтил оцетна киселина, 7 g/l агар. Средите бяха автоклавиращи за 20 min при 121° C и налягане – 1 атмосфера. За определяне на въздействието на различни абиотични стресови фактори в хранителната среда бяха добавяни полиетилен гликол (ПЕГ) с молекулно тегло 6000 при концентрация 3 %, 6 % и 8 % или натриев хлорид (NaCl) при концентрация 1 %, 2 % и 3 %. На тези среди бяха поставяни калуси. Калусите бяха култивирани в епруветки при температура 26° C, фотопериод 8/16 h и осветление 2000 lx. Фрагментите от калуси, които оживяваха бяха претегляни и прехвърляни на следващ пасаж през 25 дневен период. Нарастването на калусите беше оценявано на свежо тегло, след субкултивиране. В опитите бяха изследвани от 30 до 50 калуса за всеки вариант. Беше определян и процента на нарастване спрямо контролата. Изчислени са средно-аритметичните стойности (X) и техните стандартни грешки (m) с помощта на Jandel Scientific Software SigmaPlot version 2.0.

РЕЗУЛТАТИ

Сорт „Ходсън“ използван в нашето изследване показва способност за продължително поддържане в култура без селективен натиск (до 10 пасажа). Контролните калуси нарастваха бързо. Малки части от калусите (100 mg) бяха използвани като изходни експлантите за да се осигури цялостен достъп на селективните агенти до експлантите. В първото и второто субкултивиране при 8 % ПЕГ имаше видимо подтискане на развитието. Явно третираните клетки не могат да реализират жизнения си потенциал. Концентрациите на 3 % и 6% ПЕГ не подтискаха нарастването на калусите, дори беше наблюдавано стимулиращо действие след първото субкултивиране, последвано от загуба на теглото след второто субкултивиране.

Данните са показани в таблица 1.

Таблица 1. Влияние на осмотика полиетилен гликол (ПЕГ) върху нарастването на калусни култури от соя

Table 1. Poly ethylene glycol (PEG) influence on the growth of soybean callus cultures

Концентрация на ПЕГ Concentration of PEG (%)	Тегло на калуса			
	През I ^{ви} пасаж		През II ^{ви} пасаж	
	X ± m (mg)	(% ^r) от K from C	X ± m (mg)	(% ^r) от K from C
0 K/C ¹	1210.2 ± 183	100.	2269.2 ± 121	100
3	2164.2 ± 237	180.	1730.8 ± 223	76
6	1885.4 ± 387	157	1009.0 ± 205	44
8	938.9 ± 105	78	745.4 ± 91	33

¹ K – Контрола; C – Control; %^r – Процент спрямо контролата,
%^r - Percentage relative to control

По устойчивост към натриев хлорид (NaCl) изпитаният сорт показва контрастни различия. Теглото на нарастващите калуси намаляваше при повишаване на концентрациите на NaCl. Нарастването на калусите при 3 % NaCl беше само 8.52 % спрямо теглото на контролата. Загиване на калусите беше отчетено при първото субкултивиране на 3 % NaCl. Компенсацията в растежа при второ субкултивиране се дължи вероятно на селективния подбор и развитието на клетки адаптирали се към съответната концентрация (табл. 2).

Таблица 2. Влияние на натриев хлорид (NaCl) върху нарастването на калусни култури от соя.

Table 2. NaCl influence on the growth of soybean callus cultures

Концентрация на NaCl Concentration of NaCl (%)	Тегло на калуса			
	През I ^{ви} пасаж		През II ^{ви} пасаж	
	X ± m (mg)	(% ^r) от K from C	X ± m (mg)	(% ^r) от K from C
0 K/C ¹	1557 ± 187	100	681 ± 62	681 ± 62
1	502 ± 183	32	565 ± 71	565 ± 71
2	1344 ± 239	86	669 ± 82	669 ± 82
3	133 ± 4	8	636 ± 66	636 ± 66

¹ K – Контрола; C – Control; %^r – Процент спрямо контролата,
%^r - Percentage relative to control

ОБСЪЖДАНЕ

В нашите опити бяха установени параметрите, при които абиотичните селективни агенти ПЕГ и NaCl подтискат/стимулират растежа на калусни култури от соя и бе установена възможността на използваните агенти за създаване на селективна система *in vitro*. Съпоставянето на устойчивостта към ПЕГ и NaCl на калусно равнище не показва корелация. Устойчивостта на тъканните култури към високи концентрации ПЕГ не съответства на устойчивостта към другия селективен агент. Причина за отчетеното различие може да е различната основа за формиране на тази устойчивост. Освен по различието към селективния агент, резултатите от *in vitro* опитите при други

автори дават противоречиви резултати и в зависимост от изпитвания вид. При изследванията на Handa & Bressan (1983) с приложение на ПЕГ при калусни култури от домати се съобщават негативни резултати, докато за успехи при *in vitro* култури при царевицата съобщават Dolgih & Larina (1994). Важен въпрос е, дали наблюдаваната устойчивост е резултат на селекция, или е формирана в условията на култивиране *in vitro*. По-широк кръг изследвания с включване на разнообразен изходен материал биха могли да осветят по-добре този въпрос.

Успешното *in vitro* култивиране на сорт "Ходсън" е добро начало за моделиране на абиотичен стрес при български сортове и линии. *In vitro* условията които бяха установени, позволяват подбора на мутантни форми, при които да се провежда селекция към сухоустойчиви и солеустойчиви линии соя, което е стъпка по посока на създаване на нови форми растения.

БЛАГОДАРНОСТ

Изследванията са финансирани от ФНИ към МОН, договор СС1201, и проект към Първа Българо-Индийска междуправителствена програма за научно и техническо сътрудничество.

ЛИТЕРАТУРА

- Cassels A.C., B.M. Doyle, 2003.** Genetic engineering and mutation breeding for tolerance to abiotic and biotic stresses: science, technology and safety. *Bulg. J. Plant Physiol. Spec. Issue*: 52-82.
- Dolgih Y.I. and S.N. Larina 1994** Drought Tolerance of Maize Plants Obtained from Cell Lines Resistant to Osmotic Stress Produced by Polyethylene Glycol. *Russ. J. Plant Physiol.* 41 (6): 748-753.
- Gamborg B., A. Eveleigh, 1968.** Culture methods and detection of glucanes in cultures of wheat and barley. *Canad. J. Biochem.* 46: 417-421.
- Handa A.K., R.A. Bressan, 1983.** Clonal Variation for Tolerance to Polyethylene glycol-Induced water Stress in Cultured Tomato Cells *Plant Physiol.*72(5): 645-652.
- Murashige T., F. Skoog, 1962** A revised medium for rapid grow and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.*15: 473-497.
- Sorrels M.E., A. Diaband, M. Nachit, 2002.** Comparative genetics of drought tolerance CIHEAM – Options Mediterraneennes Symposium, Nica, France 2-7 Nov. 2002, pp 191- 201.