

СЕРГЕЕВА Л. Е.[✉], БРОННИКОВА Л. И.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,

Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: Sergeeva_lara@ukr.net[✉] Zlenko_lora@ukr.net, (096) 753-16-31, (095) 127-91-32НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ *IN VITRO* БИОТЕХНОЛОГИИ ПШЕНИЦЫ

Цель. Кардинальные изменения климатических условий обуславливают возрастающий дефицит сельскохозяйственных растений, а также стимулируют развитие новых биотехнологий. Для ускорения селекционного процесса активно задействуются разнообразные методы, использующие преимущества системы *in vitro*. В то же время, наряду с общими подходами, система *in vitro* требует адаптации к конкретному виду растения. Это относится к злакам вообще и пшенице в частности. Здесь выделяется ряд аспектов: оптимизация условий культивирования; получение клеточных культур пшеницы и изучение особенностей их пролиферации; выявление значимых параметров жизнедеятельности организма, реализуемых на уровне целостного растения, и сравнение с показателями, характеризующими недифференцированные клетки. **Методы.** Используются отработанные стандартные протоколы выделения первичных эксплантатов, индукции первичного каллуса и стимуляции каллусогенеза. **Результаты.** Получены клеточные культуры новых хозяйственно-ценных генотипов пшеницы озимой селекции ИФРГ НАНУ. Оптимизированы условия их культивирования. Установлены характерные особенности развития клеточных систем. **Выводы.** Клеточные культуры, полученные из новых генотипов пшеницы озимой, отчетливо проявляли особенности своего метаболизма, совпадающие с реакциями молодых растений. Параллельные исследования некоторых биохимических показателей, реализуемых на клеточном уровне, у клеточных культур и молодых растений могут ускорить селекцию форм улучшенными характеристиками.

Ключевые слова: пшеница озимая, система *in vitro*, клеточная культура.

Для соответствия меняющимся условиям сельскохозяйственного производства перед современной наукой стоит задача максимального ускорения селекционного процесса. Создание сортов с улучшенными характеристиками веге-

тации, качества продукции является приоритетным направлением разработок. Поэтому пшеница оказывается в числе наиболее важных объектов биотехнологических манипуляций. Для генетического улучшения пшеницы используют методы как традиционные, так и альтернативные. При этом все они постоянно совершенствуются и модифицируются.

Новые методологии селекции в значительной мере предполагают разнообразное воздействие системы *in vitro*. Известно, что система *in vitro* представляет собой комплексный эффектор, который изменяет генетическую программу растений. В свою очередь успех биотехнологических манипуляций *in vitro* требует оптимизации многих составляющих, а именно: состава сред культивирования; скрининга перспективных для процедур генотипов; поиска приемлемых первичных эксплантатов и подготовки их тканей; использования и/или чередования особых условий выращивания и т. д.

Для пшеницы уже разработаны протоколы культивирования различных ее тканей *in vitro* [1–3], однако, непрекращающийся селекционный поиск требует постоянной их адаптации, вплоть до значительных модификаций. С другой стороны, получение и изучение клеточных культур (возможно, оригинальных) предоставит новую информацию о процессах дедифференциации вообще.

Материалы и методы

В качестве объекта манипуляций *in vitro* были выбраны генотипы пшеницы озимой селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины: Фаворитка, Подолянка, УК 95/17, УК 322/17, УК209/h, УК 065, а также Мироновская–808 (М-808), Зимоярка. Использовали проростки зрелых зерновок, всхожесть которых предварительно проверялась, а также незрелые зародыши.

Отобранные зрелые зерновки в асептических условиях стерилизовали и проращивали на среде Мурасиге-Скуга без регуляторов рос-

та [4]. По достижению проростками длины 0,8–1,5 см их разрезали на сегменты толщиной 0,1 см и помещали на агаризованную питательную среду В5 Гамборга для инициации первичного каллуса [5]. В дальнейшем клеточные культуры пшеницы выращивали на этой питательной среде.

Незрелые зародыши выделяли по стандартному протоколу из колосьев, выращенных на опытных полях ИФРГ НАНУ и полученных после принудительного опыления в контролируемых условиях [3]. Первичные эксплантаты пассировали на среду В5 Гамборга.

Оптимальность создаваемых условий контролировали, используя показатель относительного прироста свежей биомассы каллуса, (D_m), определяемый: $D_m = (m_k - m_i) / m_i$, где m_i и m_k – исходная и конечная массы каллуса соответственно [6, 7]. Для сравнения типа реакций морфогенеза и интенсивности пролиферации клеточные культуры пассировали на среде, содержащей 1/3 макросолей по Мурасиге-Скугу, а также на среде FS1 с пониженным содержанием сахарозы [8].

Результаты и обсуждение

Из различных первичных эксплантатов генотипов пшеницы озимой иницированы клеточные культуры. Первичными эксплантатами были незрелые зародыши. Таблица 1 отображает типы первичных реакций незрелых зародышей на среду культивирования.

Продолжительность первичного пассажа не превышала 30-ти суток. За это время культуры активно наращивали биомассу либо прекращали рост. В обоих случаях требовалось перемещение на свежую/новую питательную среду. У линии УК 206 перемещение даже индуцировало пролиферацию, которая отсутствовала в первичном пассаже.

Анализ полученных результатов дает воз-

можность сделать ряд заключений. Во-первых, при взаимодействии генотип/среда *in vitro* могут проявиться генотипические различия исходного материала. Поэтому для достижения поставленной цели в число биотехнологических манипуляций необходимо включать эксперименты, направленные на адаптацию количественного и качественного состава сред. Во-вторых, успешность биотехнологических манипуляций в значительной степени обуславливается исходным материалом.

Данные заключения подтвердились при использовании эксплантатов, сформированных из молодых проростков зрелых зерновок пшеницы озимой. В этом случае при культивировании фрагментов на среде В5 отмечалось два типа реакций, а именно: каллусогенез и каллусогенез/прорастание. Это интересный факт, поскольку в состав среды входил гидролизат казеина. (Уже давно известно, что исключение гидролизата казеина способствует подавлению прорастания [6, 9]).

Различия в реакциях, по нашему мнению, может отражать различный функциональный статус тканей. Это подтвердилось при анализе содержания свободного пролина в индуцированных культурах. Ранее нами отмечался этот факт при анализе различных эксплантатов подсолнечника. В этом случае было отмечено событие аккумуляции свободного L-пролина в морфогенных структурах и тканях с повышенной морфогенной активностью [10].

На рисунке 1 отображены показатели содержания свободного пролина в культурах, полученных из генотипов пшеницы озимой.

Отчетливо прослеживаются генотипические особенности клеточных культур. Содержание свободного пролина координировалось с показателем D_m , о котором говорилось выше. Наибольшим темпом роста характеризовалась культура УК 065.

Таблица 1. Реакции первичных эксплантатов генотипов пшеницы озимой (% к посаженным) на среду культивирования

Генотип	Среда FS1			Среда В5 Гамборга		
	1	2	3	1	2	3
М-808	–	56,86	38,20	–	65,70	30,30
Зимоярка	–	90,30	–	–	63,90	4,20
УК322/17	–	69,80	8,05	–	50,70	48,88
УК 95/17	–	34,70	–	–	37,30	31,40
УК 065	–	62,20	36,80	–	77,30	20,70
УК 206h	–	53,50	29,70	–	–	–

Примечания: * типы реакции 1 – прямое прорастание; 2 – каллусогенез; 3 – каллусогенез/прорастание.

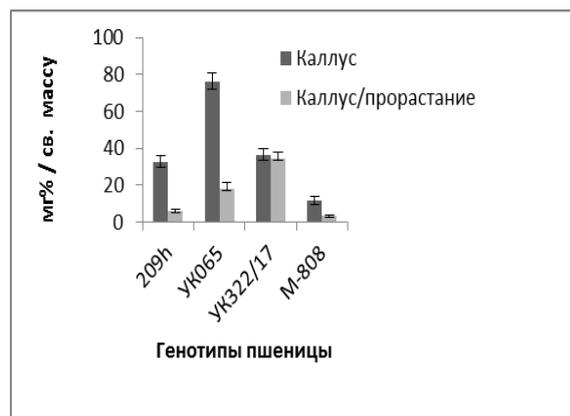


Рис. 1. Содержание свободного пролина в клеточных культурах пшеницы озимой; 3-й пассаж.

Поскольку анализировалась биомасса третьего пассажа, то можно говорить о практически сформированной культуре. Содержание аминокислоты свидетельствует в пользу активного ее синтеза.

Здесь, однако, следует обратить внимание на культуры линий УК 322/17 и УК 065. Уровень пролина в каллусах пшеницы УК322/17 был равным. В случае тестирования одной культуры такое положение вещей могло быть отражением события ее разделения с формированием двух типов. О вероятности такого процесса отмечалось в других публикациях [11]. Однако данная линия изначально проявляла два типа реакций. При этом оба события протекали с равной вероятностью, поскольку активность метаболизма (синтез пролина) была одинаковой. Возможно, это событие было следствием различий гормонального статуса незрелых зародышей, поскольку культуры сформировались из различных первичных эксплантатов.

В клетках культуры УК065 в процессе каллусогенеза происходила аккумуляция пролина. Известно, что накопление пролина является успешной протекторной реакцией многих видов растений, в том числе и злаковых. В биотехнологии (генетической инженерии) даже используются конструкции, стимулирующие аккумуляцию свободного пролина в тканях для повышения стрессоустойчивости [12]. Однако в данном случае культура находилась в оптимизированных условиях. Поэтому, по нашему мнению, данный факт можно считать генотипической особенностью культуры. В пользу этого предположения могут свидетельствовать данные диаграммы, приведенные на рисунке 2.

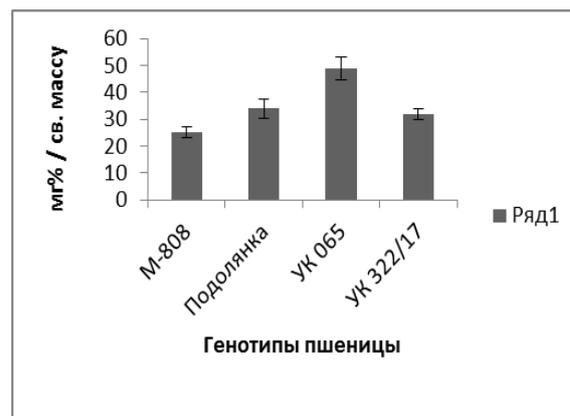


Рис. 2. Содержание свободного пролина в 15-ти суточных растениях пшеницы озимой.

Содержание свободного пролина измеряли в надземной части (листьях) молодых растений различных генотипов пшеницы озимой. Прослеживаются генотипические особенности вариантов по этому показателю. Также заметно, что по уровню аминокислоты новая линия пшеницы УК 065 превосходила остальные, т. е. наблюдается аналогия с клеточными культурами. Возможно, таким способом реализовывались особенности метаболизма клеточного уровня.

Учитывая протекторные свойства пролина, можно предположить, что новый генотип пшеницы озимой УК 065 будет отличаться повышенным уровнем стрессоустойчивости.

В системе *in vitro* были получены и проанализированы клеточные культуры новых генотипов пшеницы озимой. Данный экспериментальный подход подтвердил свою актуальность. Сравнительное исследование клеточных культур и растений на ранних стадиях онтогенеза/вегетации уже позволяет выявить генотипические особенности вариантов. Это может значительно ускорить процесс отбора новых форм растений.

Выводы

Клеточные культуры, полученные из новых генотипов пшеницы озимой, отчетливо проявляли особенности своего метаболизма, совпадающие с реакциями молодых растений. Параллельное исследование некоторых биохимических показателей, реализуемых на клеточном уровне, у клеточных линий и молодых растений может ускорить селекцию генотипов с улучшенными характеристиками.

References

1. Larkin P.G., Scowcroft W.R. Somaclonal variation – source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 1981. Vol. 60. P. 197–214.
2. Bannikova V.P., Morgun V.V., Maistrov P.D., Varabanova E.A., Logvinenko V.F., Karpets A.I. Vliyanie nitrozometilmocheviny na protsessy kallusoobrazovaniya i regeneratsii v kultiviruemyykh *in vitro* zarodyshakh pshenitsy. *Tsytologia i genetika.* 1990. T. 24, № 6. P. 31–34. [in Russian] / Банникова В.П., Моргун В.В., Майстров П.Д., Барабанова Е.А., Логвиненко В.Ф., Карпец А.И. Влияние нитрозометилмочевины на процессы каллусообразования и регенерации в культивируемых *in vitro* зародышах пшеницы. *Цитология и генетика.* 1990. Т. 24, № 6. С. 31–34.
3. Bannikova V.P., Sidorova N.V., Kolyuchaya G.S., Sytnik K.M. Regeneratsiya rastenii iz kallusnykh tkanei nezrelykh gibridnykh zarodyshei pshenitsy. *Dokl. AN USSR. Ser. Biologia.* 1985. № 5. P. 62–64. [in Russian] / Банникова В.П., Сидорова Н.В., Колючая Г.С., Сытник К.М. Регенерация растений из каллусных тканей незрелых гибридных зародышей пшеницы. *Докл. АН УССР. Сер. Биология.* 1985. № 5. С. 62–64.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 1962. 15. P. 473–497.
5. Gamborg J.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean roots. *Exp. Cell Res.* 1968. 509. P. 151–158.
6. Maliga P. Isolation and characterization of mutants in plant cell culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1984. 35. P. 519–542.
7. Sidorov V.A. Biotekhnologiya rastenii. Kiev: Naukova dumka, 1990. 280 s. [in Russian] / Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. К.: Наукова думка, 1990. 280 с.
8. Green C.E., Phillips R.L. Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Sci.* 1975. 15. P. 417–421.
9. Chu C.C. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. *Plant Sci.* 1990. Vol. 66. P. 225–262.
10. Sergeeva L.E., Mykhalska S.I., Komisarenko A.G., Bronnikova L.I., Tishchenko O.M. Sposib otsinky morfo-genetychnoho potentsialu tkanyn sonyashnyka za rivnem endohennoho prolinu Patent for utility model Ukraine No. 64611 A 01 N4/00; applied on 21.04.2011, published on 10.11.2011, Bull. № 21. [in Ukrainian] / Спосіб оцінки морфо-генетичного потенціалу тканин соняшника за рівнем ендогенного проліну Україна: патент № 64611 А 01 N4/00; заяв. 21.04.2011; опубл. 10.11.2011, Бюл. № 21.
11. Sergeeva L.E. Ismeneniya kultury kletok pod deistviem stressa. Kiev: LOGOS, 2001. 100 s. [in Russian] / Сергеева Л.Е. Изменения культуры клеток под действием стресса. К.: ЛОГОС, 2001. 100 с.
12. Tishchenko O.M., Mykhalska S.I., Morgun V.V. Genetychna inzheneriia ta klitynna selektsiia dlya pidvyshchennya osmotolerantnosti kulturnykh roslyn. *Fiziologia rastenii i genetika.* 2016. T. 48, № 3. P. 257–266. [in Ukrainian] / Генетична інженерія та клітинна селекція для підвищення осмотолерантності культурних рослин. *Фізіологія рослин і генетика.* 2016. Т. 48, № 3. С. 257–266.

SERGEEVA L. E., BRONNIKOVA L. I.

Institute of Plant Physiology and Genetics, Natl. Acad. Sci. of Ukraine,

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17 e-mail: Sergeeva_lara@ukr.net, Zlenko_lora@ukr.net

SOME ASPECTS OF *IN VITRO* WHEAT BIOTECHNOLOGY

Aim. Drastic climate changes lead to decrease of the appropriate agricultural plants and stimulate the elaboration of new biotechnologies. The preferences of *in vitro* system are used for providing the acceleration of the plant selection. The cultivating *in vitro* is a procedure combined common approaches and special adaptation to plant species. This ideology is essential for all cereals and for wheat in particular. There are several aspects of this ideology: the optimization of cultural conditions; the obtaining wheat cultures and studying distinctive features of their proliferation; the detection parameters of viability, realized on the entire plant level; the comparison of those reactions with cells characteristics. **Methods.** The standard manipulations of primary explants dissection and several protocols of callus induction and raise are used. **Results.** Cell cultures of new wheat genotypes were obtained. Those forms were selected in the Institute of Plant Physiology and Genetics NAS of Ukraine. The peculiar features of wheat cell cultures were revealed and investigated. **Conclusions.** Cell cultures obtained from new genotypes of winter wheat demonstrated common reactions with young plants. Parallel investigations of some biochemical parameters realized on cellular level in cell cultures and plant cells is a possible way to acceleration the genotypes with better characteristics selection.

Keywords: winter wheat, *in vitro* system, cell culture.

СЕРГЄЄВА Л. Є., БРОННІКОВА Л. І.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: Sergeeva_lara@ukr.net, Zlenko_lora@ukr.net

ДЕЯКІ АСПЕКТИ *IN VITRO* БІОТЕХНОЛОГІЇ ПШЕНИЦІ

Мета. Зміни кліматичних умов зумовлюють дефіцит сільськогосподарських рослин, а також стимулюють розвиток нових біотехнологій. Для прискорення селекційного процесу активно залучаються різноманітні методи, які реалізують переваги системи *in vitro*. Однак, поряд із загальними підходами, система *in vitro* потребує адаптації до конкретного виду рослини. Це стосується злаків загалом та пшениці зокрема. Тут виділяється декілька аспектів: оптимізація умов культивування; отримання клітинних культур пшениці та вивчення особливостей їх

проліферації; встановлення значимих параметрів життєдіяльності організму, котрі реалізуються на рівні цілісної рослини, та порівняння із показниками, характерними для недиференційованих клітин. **Методи.** Використано напрацьовані протоколи виділення експлантатів, індукції первинного калюсу та стимуляції калюсогенезу. **Результати.** Отримано клітинні культури нових господарсько-цінних генотипів пшениці озимої селекції ІФРГ НАНУ. Оптимізовано умови їх культивування. Встановлено характерні особливості розвитку клітинних систем. **Висновки.** Клітинні культури, отримані з нових генотипів, чітко проявляли особливості метаболізму, притаманні реакціям молодих рослин. Паралельні дослідження деяких біохімічних показників, які реалізуються на клітинному рівні, у рослин і в клітинних культур можуть прискорити селекцію форм із покращеними характеристиками.

Ключові слова: пшениця озима, система *in vitro*, клітинна культура.