



БАВОЛ
Андрій Васильович —
кандидат біологічних наук,
науковий співробітник відділу
генетичної інженерії Інституту
фізіології рослин і генетики
НАН України,
bavol1@rambler.ru

УДК 561.143.6; 581.143.6:58.085

РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ РОСЛИН ПШЕНИЦІ, СТІЙКИХ ДО СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ

За матеріалами наукового повідомлення
на засіданні Президії НАН України
11 березня 2015 року

У процесі досліджень експериментально обґрунтовано можливість отримання методом клітинної селекції рослин м'якої пшениці, стійких до комплексу стресових чинників, зокрема метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі та модельованого водного дефіциту. Виявлено особливості мінливості геному пшениці за дії стресових чинників, що дозволяє з більшою ефективністю використовувати технологію клітинної селекції, соматоклональну мінливість та інші біотехнологічні підходи для вирішення генетико-селекційних завдань щодо цієї культури.

Ключові слова: пшениця, клітинна селекція, офіобольозна коренева гниль, водний дефіцит, комплексна стійкість, мінливість геному.

Вступ

Сучасні біотехнології — це потужний інноваційний інструмент і нова стадія розвитку науково обґрунтованої селекції сільськогосподарських культур. Досягнення останніх десятиліть у цій галузі зумовили появу нових методів селекційної роботи, що ґрунтуються на використанні клітинної селекції і спрямованої генно-інженерної модифікації рослин. Технології, основані на культивуванні клітин і тканин, істотно доповнюють та прискорюють процес створення нових високопродуктивних сортів, зокрема м'якої пшениці — найважливішої продовольчої культури України.

Одним із найперспективніших напрямів сучасної біотехнології, який уже широко застосовують на практиці, є клітинна селекція, як метод створення нових форм рослин шляхом виділення мутантних клітин і соматоклональних варіацій за селективних умов *in vitro* [1, 2]. Експериментально доведено, що стійкі до стресових чинників генотипи можна добирати в куль-

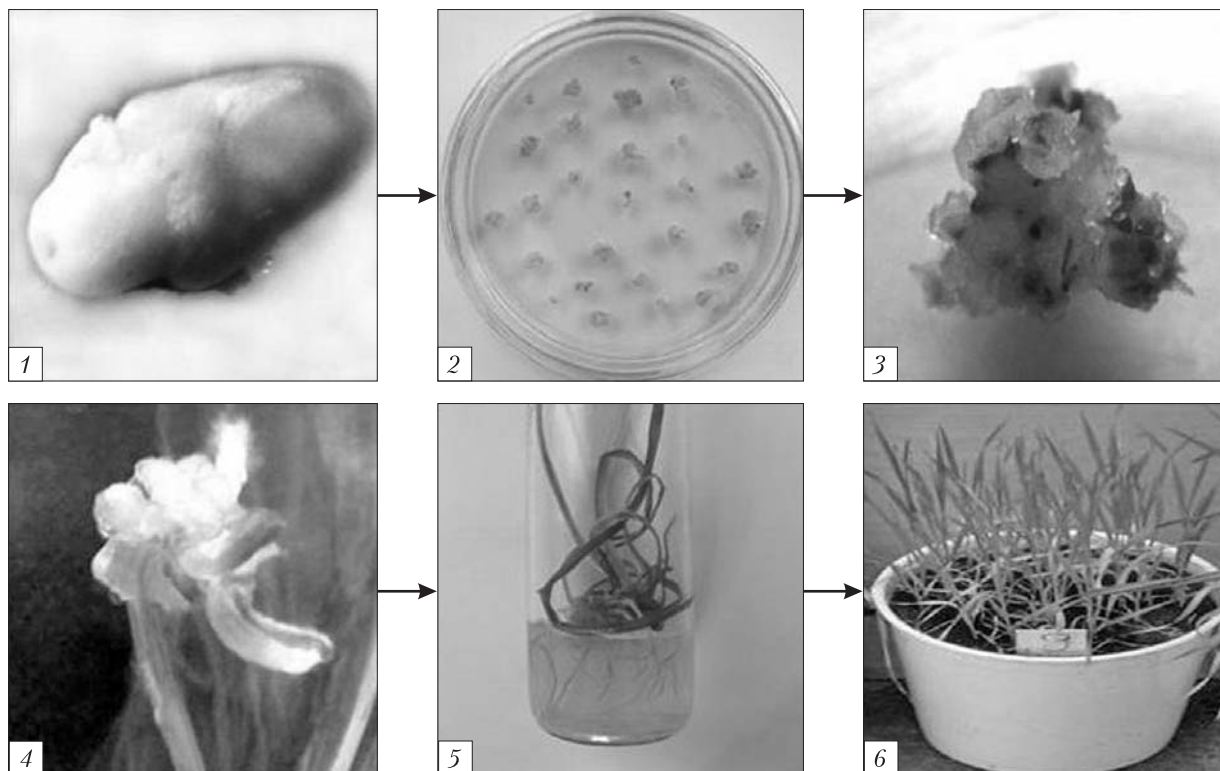


Рис. 1. Отримання рослин-регенерантів пшениці в культурі апікальних меристем тридобових стерильних проростків: 1 – апікальна меристема пагона; 2 – первинний калюс; 3 – морфогенний калюс; 4 – регенерація пагонів; 5 – укорінення регенерантів; 6 – переведення рослин в умови *in vivo*

турі *in vitro* і залучати їх до селекційного процесу [3–6]. Проте на сьогодні біотехнологічні підходи отримання рослин пшениці, стійких до абіотичних і біотичних стресових чинників, розроблено ще недостатньо. У багатьох країнах світу застосування цих технологій стає невід’ємною частиною селекційного процесу, однак в Україні їх розроблення та впровадження тільки започатковується, що зумовлює актуальність і практичну значущість пропонованих досліджень. Отже, метою нашої роботи було розроблення ефективної біотехнології отримання рослин пшениці, стійких до стресових чинників довкілля.

Результати досліджень

Для проведення робіт з отримання стійких до стресових чинників рослин біотехнологічними методами потрібно мати ефектив-

ну систему розмноження рослин *in vitro*, яка ґрунтується на використанні певного типу експланта. Незрілі зародки є традиційним експлантом для пшениці, проте їх застосування має деякі обмеження: вони доступні тільки впродовж короткого проміжку часу за вегетаційний період, а калюсні культури, одержані з них, швидко втрачають регенераційний потенціал [7]. Тому останнім часом дослідники приділяють дедалі більше уваги пошуку альтернативних типів експлантів. Ми розробили комплекс біотехнологічних прийомів отримання рослин на основі використання нового для пшениці типу експланта – апікальних меристем пагонів 3-добових стерильних проростків [8] (рис. 1).

Перевагою цього типу експланта є можливість подолання генотипних особливостей форм, що характеризуються низьким регенераційним потенціалом, та можливість отри-

мання значної кількості вихідного матеріалу за короткий проміжок часу в будь-яку пору року.

Запропонована технологія захищена патентом України і дозволяє підвищити коефіцієнт розмноження в 2–3 рази та скоротити час одержання цінних форм. З використанням цієї біотехнологічної системи ми розробили й апробували оригінальні схеми селекції *in vitro* і методом прямого добору отримали рослини пшениці, стійкі до офіобольозної кореневої гнилі [9].

В умовах глобальних змін клімату, коли на рослинний організм діє сукупність біотичних і абіотичних факторів, значно підвищується попит на високопродуктивні пластичні сорти, стійкі одночасно до кількох стресових чинників. Проте сьогодні, на жаль, у селекції на стійкість пшениці до комплексу стресових чинників спостерігаються лише поодинокі успіхи, оскільки толерантність контролюється багатьма генами, а їх одночасний добір є складним завданням. Завдяки загальним неспецифічним механізмам стійкості резистентність до одного несприятливого чинника іноді приводить до підвищення стійкості й до іншого [10], унаслідок чого відібрані клітинні лінії та рослини-регенеранти можуть виявляти стійкість до двох і більшого числа типів стресу, інколи навіть не подібних за фізико-хімічною природою та мішенями дії. Ми розробили оригінальну схему ступінчастої клітинної селекції для одержання калюсних ліній м'якої пшениці, стійких до модельованого водного дефіциту, та індукції з них рослин-регенерантів [11]. На її основі вперше отримано рослини-регенеранти м'якої пшениці, стійкі до комплексу стресових чинників, зокрема метаболітів збудника офіобольозу та водного дефіциту (рис. 2).

Відомо, що частота регенерації зі стійких до різних стресових чинників калюсних ліній завжди низька, що й спостерігалось в наших дослідженнях. Для підвищення регенераційної здатності та збільшення кількості рослин-регенерантів ми розробили і запатентували середовище MC-3/CR [12], що дало змогу підвищити частоту регенерації у 2–3 рази.

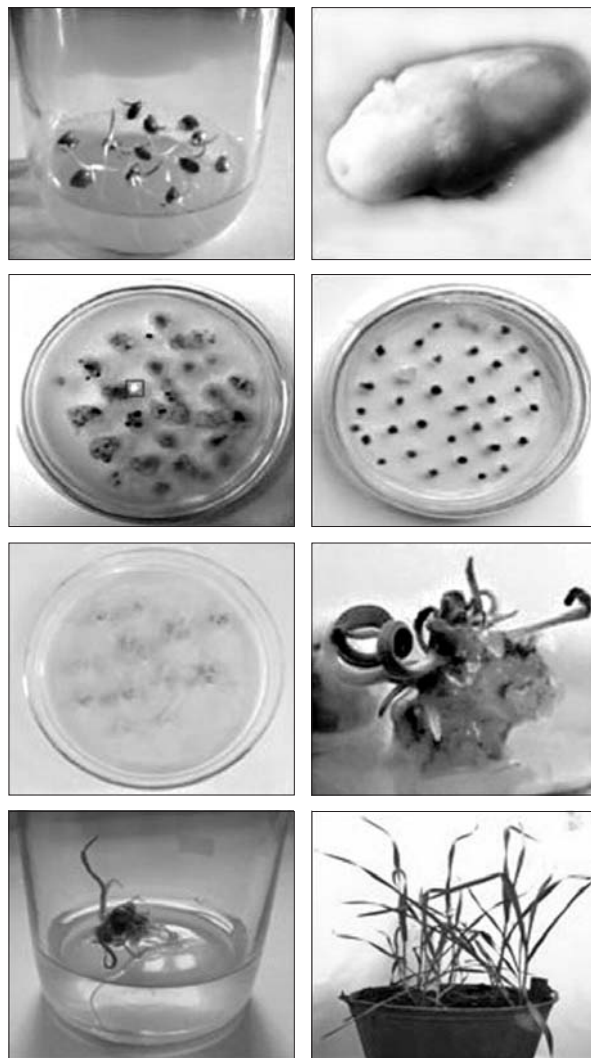


Рис. 2. Отримання рослин пшениці, стійких до комплексу стресових чинників, методом селекції *in vitro*

Невід'ємною частиною впровадження сучасних біотехнологій у селекційний процес є дослідження індукованої стресовими чинниками мінливості та пошук надійних молекулярних маркерів, які дозволяють прискорити і спростити процес добору резистентних генотипів.

За результатами цитогенетичних досліджень калюсних культур (рис. 3), стійких до метаболітів збудника офіобольозу за дії модельованого водного дефіциту, ми встановили, що резистентність до одного стресового чин-

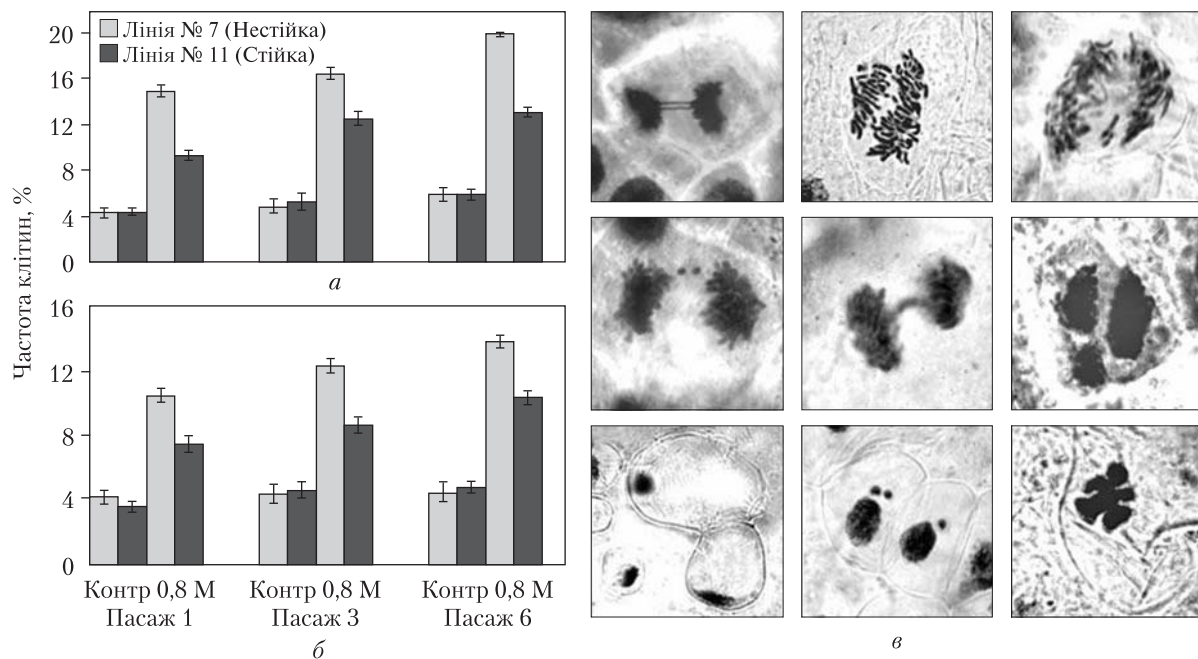


Рис. 3. Цитогенетичний аналіз калюсних культур за добору *in vitro*: *а* – частота хромосомних аберацій; *б* – частота виникнення турбогенних ефектів; *в* – порушення в клітинах калюсу пшениці

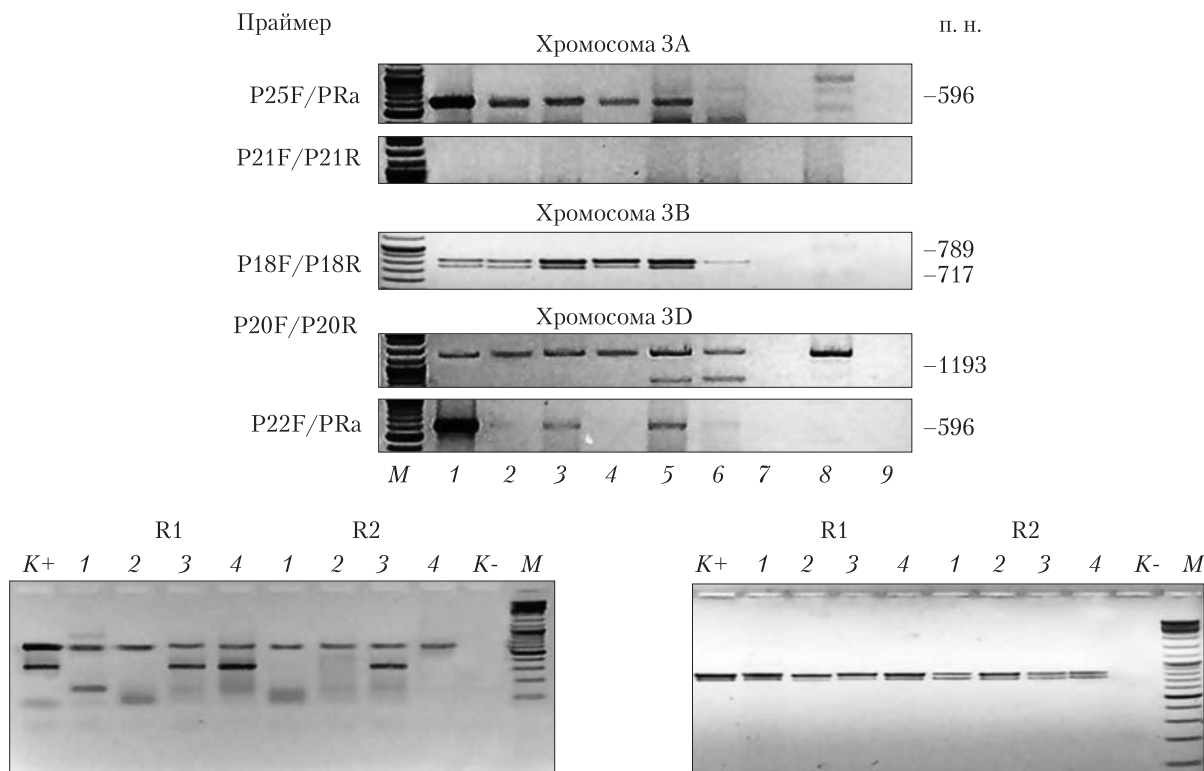


Рис. 4. Ідентифікації генів *Dreb1* у рослин пшениці: *а* – рослини-регенеранти; *б, в* – рослини R1 та R2

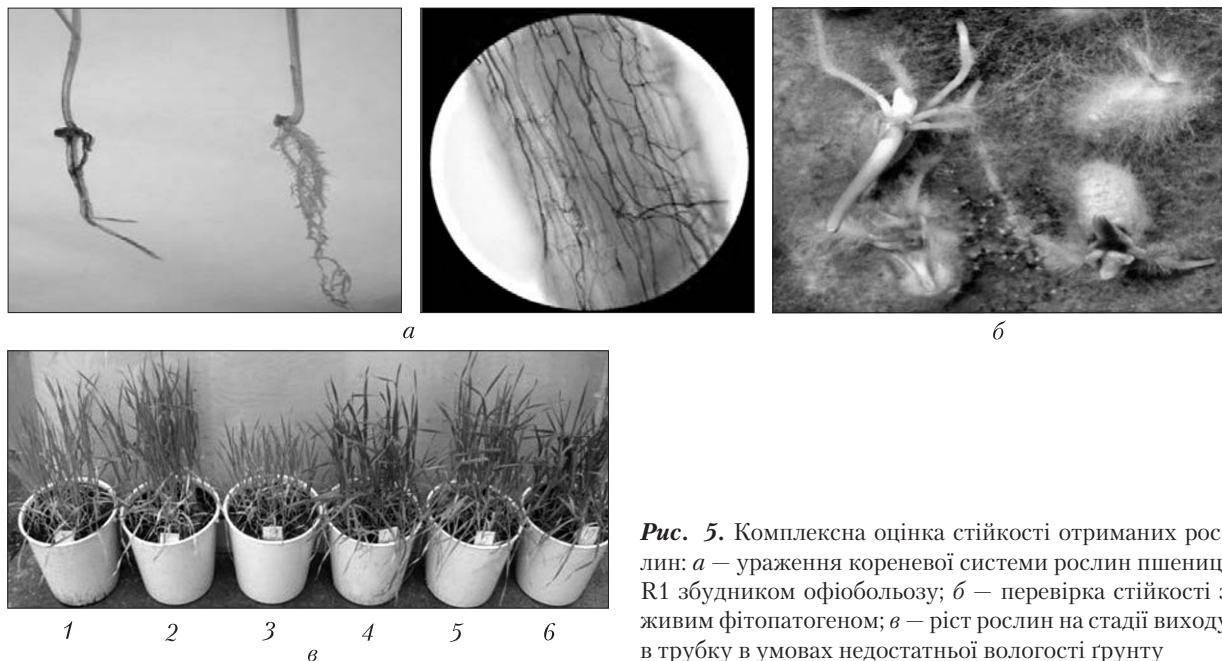


Рис. 5. Комплексна оцінка стійкості отриманих рослин: *a* – ураження кореневої системи рослин пшениці R1 збудником офіобользу; *б* – перевірка стійкості з живим фітопатогеном; *в* – ріст рослин на стадії виходу в трубку в умовах недостатньої вологості ґрунту

ника може зумовлювати підвищення стійкості до іншого фактора.

З метою виявлення специфічних змін у полінуклеотидних послідовностях ДНК та пошуку маркерів стійкості було проведено молекулярно-генетичний аналіз міжкросателітних локусів у стійких і нестійких до офіобользу форм (ISSR-маркери). За результатами аналізу 227 локусів у спектрах продуктів ПЛР виявлено два унікальних локуси, характерних виключно для стійких форм. У подальшому саме ці локуси можна використовувати як маркери стійкості до офіобользу.

Відомо, що в процесах адаптації рослин до несприятливих факторів велике значення має активація генів, що кодують білки, які безпосередньо беруть участь у реакціях відповіді на стрес. Ключову роль в активації зазначених генів відіграють транскрипційні фактори. Саме тому ми провели ідентифікацію генів *Dreb1*, продукти яких винятково важливі для формування стійкості до посухи [13]. Фрагменти розміром 596 п.н. та 717 п.н. – продукти ампліфікації генів *Dreb A1* та *Dreb B1* відповідно – виявлено лише у стійких до водного дефіци-

ту регенерантів, у нестійких форм їх немає (рис. 4). Встановлено, що наявність цих генів є необхідною умовою формування стійкості до водного дефіциту. Аналіз насіння поколінь R1 та R2 підтверджує отримані дані.

Для підтвердження генетично зумовленої комплексної стійкості оцінювали регенеранти і рослини насінневих поколінь фітопатологічними, біохімічними, фізіологічними та генетичними методами (рис. 5). Усі проаналізовані рослини показали значно вищу толерантність до стресів порівняно з рослинами вихідного сорту, що свідчить про можливість утворення генного комплексу, відповідального за зменшення сприйнятливості до збудника офіобользу і підвищення стійкості до водного дефіциту.

Результатом проведених досліджень стала розроблена ефективна біотехнологія прискореного одержання нових форм пшениці з комплексною стійкістю до абіотичних і біотичних стресових чинників. Цю технологію можна застосовувати з метою створення нових та поліпшення вже наявних сортів м'якої пшениці, а також інших злакових культур.

Висновки

Розроблено комплекс біотехнологічних прийомів для отримання рослин м'якої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів, що дає змогу підвищити коефіцієнт розмноження і скоротити час одержання цінних форм.

На клітинному рівні встановлено, що резистентність до одного стресового чинника може зумовлювати підвищення стійкості й до іншого, навіть якщо вони не подібні за фізико-хімічною природою і мішенями дії.

З використанням ISSR-аналізу виявлено специфічні амплікони, що можуть бути потенційними маркерами стійкості до офіобольозної кореневої гнилі.

У стійких до водного дефіциту рослин-регенерантів пшениці на хромосомах 3А та

3В виявлено специфічні алелі гена *Dreb1*, що дозволяє диференціювати стійкі до стресових чинників форми.

Уперше розроблено ефективну біотехнологію прискороного одержання нових форм пшениці з підвищеною стійкістю до офіобольозної кореневої гнилі і водного дефіциту.

Доповідач висловлює глибоку вдячність за допомогу в роботі й аналізі отриманих результатів директору Інституту фізіології рослин і генетики НАН України академіку НАН України Володимиру Васильовичу Моргуни, співробітникам відділу генетичної інженерії цієї установи та особисто д-ру біол. наук О.В. Дубровній, а також керівнику і співробітникам відділу молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

REFERENCES

1. Abdelsamad A., El-Sayed O.E., Hayam F.I. Development of drought tolerant double haploid wheat using biochemical genetic markers on in vitro culture. *Journal of Applied Sciences Research*. 2007. **3**: 1589–99.
2. El-Sayed O., Rizkalla A., Sabri S. In vitro mutagenesis for genetic improvement of salinity tolerance in wheat. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 2007. **4** (5): 377–83.
3. Slavov S. Phytotoxins and in vitro screening improved disease resistance plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2005. **19**: 48–55. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2005.10817285>.
4. Lavrova N.V. *Ph.D. (Biotech.) thesis (Moscow, 2006)* (in Russian).
[Лаврова Н.В. Разработка и применение биотехнологий для получения устойчивых к фузариозу растений озимой пшеницы (гаплоидная) и огурца (меристемная, каллусная и микроспорогенная): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2006].
5. Aly M., Sabry S., Abd-elfatah O.M., Elgharbawy H. In vitro screening for the effect of sea water salinity stress on growth and biochemical characteristics of wheat *Triticum aestivum* L. *International Journal of Applied Agricultural Research*. 2007. **2** (1): 1–11.
6. Kalashnikova Ye.A. *Doklady TSKHA*. 2003. **275**: 110–12 (in Russian).
[Калашникова Е.А. Биологические основы клеточной селекции растений. *Доклады ТСХА*. 2003. 275. 110–112].
7. Hassan N.S., Shaaban L.D., Hashem E.A., Seleem E.E. In vitro selection for water stress tolerant callus line of *Helianthus annuus*. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2004. **1**: 13–18.
8. Baval A.V., Dubrovna O.V., Lyal'ko I.I. *Visnyk Ukrayinskoho tovarystva henetykiv i seleksioneriv*. 2007. **5** (1–2): 3–10 (in Ukrainian).
[Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці. *Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів*. 2007. 5 (1–2). 3–10].
9. Baval A.V., Dubrovna O.V., Lyal'ko I.I. *Fyzyolohyya i byokhymyya kul'turnykh rastenyy*. 2009. **41** (4): 314–320 (in Ukrainian).
[Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Селекція in vitro м'якої пшениці на стійкість до *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2009. 41 (4). 314–320].
10. Rai M.K., Kalia R.K., Singh R., Gangolaa M.P., Dhawan A.K. Developing stress tolerant plants through in vitro selection – An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*. 2010. **71** (1): 89–98.
11. Zinchenko M.O., Dubrovna O.V., Baval A.V. *Visnyk Ukrayinskoho tovarystva henetykiv i seleksioneriv*. 2012. **10** (1): 20–27 (in Ukrainian).

- [Зінченко М.О., Дубровна О.В., Бавол А.В. Селекція *in vitro* м'якої пшениці на комплексну стійкість до метаболітів збудника офіобольозу та водного дефіциту. *Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів*. 2012. 10 (1). 20–27].
12. *Patent Ukraine № 81752*. Dubrovna O.V., Baval A.V., Zinchenko M.O. Method for raising regenerative ability of callus cultures of soft wheat resistant to metabolites of *Gaeumannomyces graminis var. tritici* and water deficit. 10.07.2013. [Дубровна О.В., Бавол А.В., Зінченко М.О. Патент України № 81752 (2013) А01Н4/00. Спосіб підвищення регенераційної здатності калусних культур м'якої пшениці, стійких до метаболітів *Gaeumannomyces graminis var. tritici* та водного дефіциту. 10.07.2013].
13. Wei B., Jing R., Wang Ch., Chen J., Mao X., Chang X., Jia J. Dreb1 genes in wheat (*Triticum aestivum* L.): development of functional markers and gene mapping based on SNPs. *Molecular Breeding*. 2009. **23**: 13–22.

A.B. Baval

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
ул. Васильковская, 31/17, Киев, 03022, Украина

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ, УСТОЙЧИВЫХ К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ

В процессе исследований экспериментально обоснована возможность получения методом клеточной селекции растений мягкой пшеницы, устойчивых к комплексу стрессовых факторов, в частности к метаболитам возбудителя офиоболезной корневой гнили и моделируемому водному дефициту. Выявленные особенности изменчивости генома пшеницы при действии стрессовых факторов позволяют с большей эффективностью использовать технологию клеточной селекции, соматоклональной изменчивости и другие биотехнологические подходы для решения генетико-селекционных задач данной культуры.

Ключевые слова: пшеница, клеточная селекция, офиоболезная корневая гниль, водный дефицит, комплексная устойчивость, изменчивость генома.

A.V. Baval

Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

DEVELOPMENT OF BIOTECHNOLOGY OF PLANTS PRODUCTION, RESISTANT TO STRESSORS

The work is devoted to development of the *in vitro* technique for obtaining wheat plants, resistant to complex of stressors, in particular metabolites of pathogen, which caused by the take-all disease and water deficit. Some aspects of wheat genome variability under stress conditions allow us to use more effectively the *in vitro* selection technology, somaclonal variability and other biotechnological techniques for solving the genetic and breeding problems of this important crop.

Keywords: wheat, *in vitro* selection, take-all disease, water deficit, complex resistance, genome variability.