

УДК 561.143.6

КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КОМПЛЕКСУ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ И АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ ФОРМ

©2013 М.А. Зинченко, О.В. Дубровная, А.В. Бавол

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев

Поступила 13.05.2013

Методом клеточной селекции получены каллусные линии мягкой пшеницы с перекрестной устойчивостью к метаболитам возбудителя офиоболлезной корневой гнили и водному дефициту. В процессе отбора проведен цитологический анализ и проанализирован уровень полиморфизма участков ДНК, фланкированных инвертированными LTR повторами ретротранспозона *Cassandra*, у клеточных культур и растений-регенерантов.

Ключевые слова: мягкая пшеница, клеточная селекция, офиоболлез, водный дефицит, цитологический анализ, IRAP-анализ.

В условиях глобальных изменений климата, когда на растительный организм действует ряд биотических и абиотических стрессовых факторов, отбор на комплексную устойчивость является особенно актуальной и важной частью селекционного процесса. Одним из таких методов является клеточная селекция, т.е. отбор желаемых генотипов с новыми наследственными признаками на уровне культивируемых *in vitro* клеток в специфических условиях. На основе применения методов клеточной селекции у пшеницы уже получены растения, устойчивые к болезням и различным абиотическим стрессам [1-3]. Благодаря общим неспецифическим механизмам устойчивости, резистентность к одному неблагоприятному фактору может приводить к повышению устойчивости и к другому [4]. Отобранные клеточные линии и растения-регенеранты могут проявлять устойчивость к двум и более типам стресса, иногда даже не похожих по физико-химической природе и за мишенями действия [5]. Следует отметить, что биотехнологические подходы получения растений пшеницы с перекрестной и комплексной устойчивостью практически не исследованы.

Нами впервые биотехнологическим путем получены соматоклональные линии мягкой пшеницы, устойчивые к офиоболлезной корневой гнили (возбудитель - *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) [6]. Для разработки эффективной системы методов, направленной на получение новых форм пшеницы с комплексной устойчивостью к стрессам, у каллусных линий, резистентных к метаболитам возбудителя офиоболлеза, была изучена реакция на моделируемый водный дефицит [7]. Показано, что селективная система с маннитом более эффективна, поскольку обеспечила полную элиминацию чувствительных клеток и более высокую жизнеспособность регенерантов.

Установлено, что стрессовые факторы индуцируют изменчивость и нестабильность генома в культуре *in vitro*, которая проявляется на различных уровнях исследований [8]. Особенности цитогенетической изменчивости каллусных культур пшеницы в процессе получения форм, устойчивых к стрессовым факторам, исследованы недостаточно. Однако цитогенетическая нестабильность при культивировании *in vitro* может приводить как к потере устойчивости к стрессорам, так и к снижению морфогенетического потенциала [9]. Для повышения эффективности селекции *in vitro* и решения проблемы управления соматоклональной вариабельностью, важно понять причины ее возникновения и размах. Для этого все шире используют молекулярные маркеры, позволяющие выявить генетические изменения как у клеточных форм, так и индуцированных из них растений. Одним из таких методов является IRAP ПЦР, который дает возможность одновременного анализа многих локусов в различных участках генома, что особенно важно при культивировании *in vitro*.

В связи с этим, целью работы было проведение селекции *in vitro* для получения клеточных линий и растений-регенерантов мягкой пшеницы, устойчивых к комплексу стрессовых факторов, в частности метаболитам возбудителя офиоболлеза и водному дефициту, а также цитологический и молекулярно-генетический анализ полученных форм.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для введения в культуру *in vitro* использовали зрелые семена мягкой пшеницы сорта Зимоярка (контроль), а также семена растений R₂ регенерантов, устойчивых к метаболитам возбудителя офиоболлеза. Семена проращивали на модифицированной питательной среде МС [10] без фитогормонов. Культура каллусной ткани была получена из апикальной меристемы 3-суточных проростков, предварительно выращенных в условиях *in vitro*. Для индукции каллуса использовали среду МС, дополненную 2,4-Д в концентрации 2,0 мг/л. Экспланты культивировали при 26°C в темноте в течение двух недель. Затем их переносили на свет и далее выращивали при освещении 3-4 клк, относительной

Зинченко Мария Александровна, аспирант, e-mail: maria.zinch@gmail.com; Дубровная Оксана Васильевна, д.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: dubrony@ukr.net; Бавол Андрей Васильевич, к.б.н., младший научный сотрудник, e-mail: bavol1@rambler.ru

влажности воздуха 70% и 16-часовом фотопериоде еще в течение трех недель. Как селективный агент применяли маннит в различных концентрациях – 0,4, 0,6; 0,8; и 1,0 М, который добавляли к модифицированной среде МС. Для того чтобы все клетки подлежали действию осмотика, использовали маленькие инокулюмы (не более 10 мг). Каллус высаживали в чашки Петри (по 40 в каждой) в 10-ти повторностях. После 3 недель культивирования оценивали долю живых каллусов. Для индукции морфогенеза каллусы переносили на регенерационную среду МС, дополненную 1 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК. После 3 недель культивирования проростки переносили на модифицированную среду для укоренения. Укорененные растения высаживали в грунт для получения семенного поколения.

Цитологический анализ проводили с использованием методики давленных препаратов и окрашиванием 2% ацетоорсеином [11]. Цитогенетический эффект действия маннита на культуру тканей пшеницы определяли изменением соотношения клеток разного уровня ploидности, а также частотой структурных перестроек хромосом и аномалий митоза. Для изучения уровня ploидности растений-регенерантов использовали автоматический анализатор "Partec" (Германия).

Экстракцию ДНК проводили с помощью СТАБ-метода [12] из проростков, листьев растений-регенерантов и каллусных тканей. Амплификацию осуществляли на приборе «Терцик» фирмы «ДНК-Технология». Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл: 10mM TRIS-HCl, 50 mM KCl, 1,5-2,0 mM хлорида магния, 2 mM каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата (dNTP), 0,2 мкл праймера, 1 ед. акт. Таq полимеразы и 100 -120 нг исследуемой ДНК. Амплификация проводилась по следующей программе: начальная денатурация при 94 °С 5 мин, 37 циклов (денатурация 94 °С - 30 с, отжиг 55 °С - 1 мин, элонгация 72 °С - 1,5 мин) и финальная элонгация 72 °С 7 мин. В исследованиях были использованы IRAP-праймеры к инвертированным LTR-повторам ретротранспозона Cassandra: 5'-GGTGTGTCCGGGGCGTTACA-3' и 5'-CCGGGAGCCATTTCGAAC-3' [13]. Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Для оценки размеров продуктов амплификации использовали маркер Step Ladder DNA S7025 (SIGMA).

Экспериментально полученные данные обрабатывали с помощью методов статистического анализа [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для отбора резистентных клеточных линий проводили прямую и ступенчатую клеточную селекцию. Прямую по схеме: 0,8 М маннит (3 пассажа) → основная среда МС (1 пассаж) → 0,8 М маннит

(2 пассажа) → регенерация и укоренение побегов (2 пассажа). Ступенчатая селекция проводилась по схеме: 0,4М маннит (1 пассаж) → 0,6 М маннит (1 пассаж) → 0,8 М маннит (1 пассаж) → основная среда МС (1 пассаж) → 0,8 М маннит (2 пассажа) → регенерация и укоренение побегов (2 пассажа). Поскольку многие клетки каллуса непосредственно не контактируют с селективным агентом, отобранные формы могут быть смесью измененных клеток и клеток дикого типа. Поэтому в своей работе мы использовали несколько циклов отбора при точной селекции.

При прямом отборе на средах с сублетальной дозой маннита (0,8 М) к концу первого пассажа выжило до 42% каллусов, а после трех – от 12,8 до 31%. После пассажа на контрольной среде без селективного фактора и проверки роста в селективных условиях было выделено от 3 до 11,8% живых клонов. Из них получено 12 вариантов, которые характеризовались приростом массы на селективной среде и стабильно сохраняли признак устойчивости в течение 2 пассажей.

Наряду с экспериментами по прямому отбору каллусов, проводили селекцию на средах с постепенным повышением концентрации стрессового фактора (ступенчатую селекцию). В таблице 1 приведены данные о динамике выживания каллусов на селективных средах с 0,4–1,0 М маннита. Выявлено, что в отличие от контроля, концентрация осмотика 1М не оказывает летального действия на каллусные линии, устойчивые к метаболитам возбудителя офиоболлеза – выживало от 1,3 до 2,8% каллусов. В целом, при ступенчатом отборе жизнеспособность клеточных культур оказалась сравнительно высокой - выжило от 8,8 до 17% культур. В результате селекции выделено 23 варианта, которые характеризовались способностью к росту на селективной среде с осмотически активным веществом и стабильно сохраняли признак устойчивости в течение 2 пассажей. Таким образом, ступенчатый отбор оказался эффективнее, поскольку в результате его применения выделено больше устойчивых каллусных форм.

Из выделенных вариантов, способных расти на селективных средах с 0,8 М маннита, было получено 6 устойчивых линий (№ 1 см - 6см), которые сохраняли морфогенетический потенциал. Следует отметить, что из каллусов, полученных путем прямой селекции, было индуцировано меньше регенерантов, кроме того, часто наблюдался ризогенез или образовывались побеги, постепенно прекращающие свой рост. Частота регенерации из устойчивых клеточных линий, полученных путем ступенчатого отбора, была на уровне 3-9%. Нами модифицирована среда МС, что позволило повысить регенерацию до 6-17% (табл. 2).

Таблица 1. Динамика выживания каллусов на селективных средах при ступенчатом отборе

Генотип	Количество высаженных каллусов, шт.	Количество живых каллусов по пассажам, %			
		1 (0,4 М маннита)	3 (0,8М маннита)	6 (0,8М маннита)	7 (1М маннита)
контроль	400	50,0±2,5	24,5±2,1	6,8±1,3	-
линия 2/9	400	54,0±2,5	37,5±2,4	13,3±1,7	2,0±0,7
линия 2/13	400	50,5±2,5	28,8±2,3	17,0±1,9	2,8±0,8
линия 19/6	400	48,5±2,5	23,8±2,0	12,0±1,6	1,5±0,6
линия 19/7	400	40,8±2,5	18,3±1,9	8,8±1,4	1,3±0,6

Таблица 2. Частота регенерации побегов из устойчивых каллусных линий на среде МС-3/7

Каллусная линия	Частота регенерации, %	Всего получено растений-регенерантов, шт.
Контроль	33,0±4,7	42
Линия 1см	11,0± 3,2	11
Линия 2см	17,0± 3,8	15
Линия 3см	7,6±3,6	6
Линия 4см	14,0± 3,2	10
Линия 5см	8,6±3,6	6
Линия 6см	6,3±3,3	5

Для стимуляции процессов ризогенеза и массового укоренения побегов нами было проанализировано несколько вариантов сред с различными регуляторами роста. В частности, с этой целью была испытана среда МС с половинным и полным содержанием макроэлементов, дополненная НУК и 2,4-Д в концентрации 0,5-3 мг/л. Лучшие результаты получены на среде МС с половинным содержанием макроэлементов и НУК в концентрации 1 мг/л. Через 15-20 дней в такой среде получали ≈50% растений-регенерантов с полноценной корневой системой.

Определение стабильности признака устойчивости к комплексу стрессовых факторов у полученных линий проводили, используя разработанную нами систему пересадок на питательные среды со стрессовыми факторами и без них. Селективные среды содержали сублетальные дозы культурального фильтрата возбудителя офиоболлеза (50%) и маннита 0,8М. Общая схема проверки стабильности признака устойчивости была следующей: устойчивая каллусная линия → среда МС (1 пассаж) → селективная среда (2 пассажа) → среда МС (1 пассаж) → селективная среда (2 пассажа) → среда МС. Стабильность проявления признака резистентности к комплексу стрессовых факторов у полученных клеточных линий была достаточно высокой и составляла 57-70%. Признак устойчивости у регенерантов был на уровне 46-78%.

У растений-регенерантов получено первое семенное поколение R1. Для проверки стабильности признака устойчивости у растений R1 семена стерилизовали и проращивали в чашках Петри, содержащих водные растворы 0,8 М маннита и 50% КФ *G. graminis* var. *tritici*. Контрольный вариант

содержал дистиллированную воду. Все варианты выдерживали трое суток в темноте в термостате при температуре 24-25°C, после чего подсчитывали количество проросших семян. Затем чашки переносили для выращивания в условиях 16-часового фотопериода и температурой 22-24°C. На десятый день проводили подсчет сформировавшийся проростков. Наши исследования показали достаточно высокую частоту прорастания семян. У разных линий она составляла от 57 до 84% на 3 сутки и от 71 до 92% на десятые.

Нами исследован цитологический эффект действия маннита на каллусные линии, устойчивые и неустойчивые к метаболитам возбудителя офиоболлеза. Показано, что осмотик в низкой концентрации (0,4М) не оказывает выраженного цитогенетического эффекта на клеточные культуры. В условиях осмотического стресса (0,8М) выявлено: конденсацию и фрагментацию ядер, хромосомные aberrации в виде хроматидных мостов, слипание отдельных хромосом и их клампинг, а также нарушения веретена деления в виде многополюсных митозов, отставание хромосом, образование микроядер. Установлено, что при действии сублетальной дозы маннита (0,8 М) у неустойчивых линий частота aberrаций хромосом увеличивалась почти в 4 раза (15%), в то время как у устойчивых – только в 2 раза – до 9%. То есть высокие концентрации стрессора имеют выраженный кластогенный эффект на хромосомный аппарат пшеницы. Наиболее выраженным цитогенетическим эффектом действия маннита был клампинг хромосом – множественное их слипание в виде комков, что делает невозможным нормальный цитокинез, приводя к апоптозу. В целом, устойчивые к метаболитам возбудителя

офиоболлеза каллусные линии характеризуются достоверно более низкой частотой цитологических нарушений. Это может быть результатом того, что клетки, устойчивы к одному стрессовому фактору, проявляют резистентность и к другому стрессору.

Анализ уровня ploидности 53 регенерантов выявил среди гексаплоидных растений ($2n=42$) 9 анеуплоидных форм.

Поскольку при относительно длительной адаптации к стрессовому фактору (ступенчатая селекция) и относительно быстром экстремальном воздействии (прямая селекция) могут быть задейство-

ваны разные механизмы формирования адаптации, то в нашей работе мы отдельно исследовали полиморфизм ДНК при различных схемах отбора. При ступенчатом отборе анализировали каллусы на ранних и поздних этапах отбора. Контролем служил первичный каллус и каллус 6-го пассажа, который культивировался на среде без селективного фактора.

Полученные результаты (рис. 1) показывают, что при ступенчатой селекции в спектрах продуктов амплификации ДНК каллуса наблюдается исчезновение отдельных ампликонов.

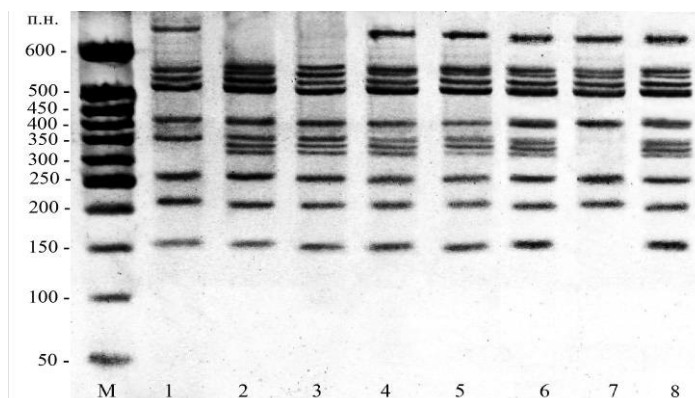


Рис. 1. Спектр продуктов амплификации ДНК при ступенчатой селекции: М – маркер м.м. (Step Ladder DNA S7025), 1 – растение-регенерант; 2 – растение R2 соматклональной линии; 3 – первичный каллус; 4 – каллус 1-го пассажа (0,4 М маннита); 5 – каллус 3-го пассажа (0,8 М маннита); 6 – каллус 4-го пассажа на контрольной среде; 7 – каллус 6-го пассажа (0,8 М манита); 8 – каллус 6-го пассажа на контрольной среде

В частности, на среде с 0,4 М маннита у одной из линий отмечено отсутствие ампликона длиной 581 п.н. На более поздних этапах клеточной селекции (среда с 0,8 М маннита) наблюдали еще большие изменения. Так, у линии № 4 отмечено потерю ампликонов длиной 154, 334, 347 и 362 п.н. (рис. 1, дорожка 7). Отсутствие определенных фрагментов в спектрах амплификации было отмечено и у регенерантов. Так, обнаружено растение, у которого отсутствовали ампликоны размером 334 и 347 п.н. (рис. 1, дорожка 1).

Следующим этапом исследований было выявление полиморфизма ДНК при прямой клеточной селекции. Для этого анализировали образцы ДНК каллуса на ранних (1 пассаж) и поздних (4 пассаж) этапах отбора. Показано, что в спектрах продуктов амплификации (рис. 2), могут происходить как потери ампликонов, в частности длиной 221, 552 и 571 п.н., так и появление нового уникального ампликона, размером 455 п.н. Следует отметить, что данный ампликон обнаружен только в ДНК каллусных линий, полученных при прямой селекции.

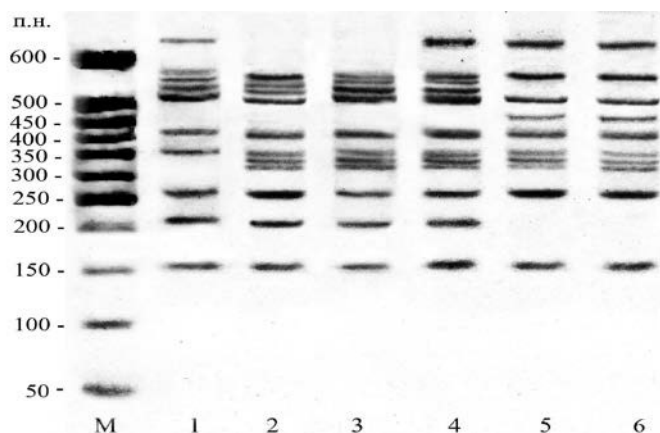


Рис. 2. Спектр продуктов амплификации ДНК при прямой селекции: М - маркер м. м. (Step Ladder DNA S7025); 1 – растение-регенерант; 2 - растение R2 соматклональной линии; 3 - первичный каллус; 4 - контрольный каллус 4-го пассажа; 5 - каллус 1-го пассажа (0,8 М маннита); 6 - каллус 4-го пассажа (0,8 М маннита)

Кроме специфических изменений в спектрах продуктов амплификации ДНК, обращает на себя внимание тот факт, что при культивировании *in vitro* у всех исследуемых объектов отмечено появление относительно высокомолекулярного авпликона длиной около 638 п.н. (рис 1, 2). Это может свидетельствовать об активации, и, соответственно транспозиции ретротранспозона *Cassandra* в условиях культивирования *in vitro*.

Существует мнение, что в культуре *in vitro* клетки, в которых присутствуют активные мобильные генетические элементы, генетически более нестабильны чем те, в которых эти участки генома неактивны [15]. Согласно полученным данным, мы предполагаем, что одним из механизмов адаптации к стрессовым условиям является увеличение генетической нестабильности и соответственно расширения генетического разнообразия, что в данных конкретных условиях проявляется на уровне популяций клеток. При клеточной селекции могут происходить множественные точечные мутации или делеции, в частности в сайтах связывания с праймерами к LTR-повторам ретротранспозона *Cassandra*, которые приводят к исчезновению отдельных авпликонов в спектрах продуктов амплификации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lu W., Zhou M., Zhang X. Studies and improvement of wheat breeding for scab resistance using biotechnology // Wheat improvement for Scab resistance: Proc. Intern. Symp. 5-11 May 2000. Sunghou and Nanjing, China, 2000. P. 151-156.
2. Джос Л., Калашишкова Е. Клеточная селекция пшеницы на устойчивость к септориозу // Сельскохозяйственная биотехнология. Избранные работы / под ред. В.С. Шевелухи М.: Евразия+, 2000. С. 61-71.
3. Aly M., Sabry S., Abdelfatah O., Elgharabawy 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. V. 2. N 1. P. 1-11.
4. Swaaij A., Jacobsen E., Keil I., Feenstra W. Selection, characterization and regeneration of hydroxyproline-resistant cell lines of *Solanum tuberosum*: tolerance to NaCl and freezing stress // *Physiol. Plant.* 1986. V. 68. N 3. P. 359-366.
5. Губанова Н.Я., Дубровная О.В., Чузункова Т.В. Клеточная селекция кормовой свеклы на устойчивость к нескольким стрессовым факторам // *Биополимеры и клетка.* 2002. Т. 18. № 3. С. 565-571.
6. Бавол А. В., Дубровная О.В., Лялько И.И. Селекция *in vitro* мягкой пшеницы на стойкость до *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41. № 4. С. 314-320.
7. Дубровная О.В., Бавол А. В., Зинченко М.О., Лялько И.И., Круглова Н.М. Вплив осмотичних речовин на калосні лінії м'якої пшениці, стійкі до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів 2011. Т. 9. № 1. С. 10-16.
8. Errabii T., Bernard C., Gandonou C., Essalmani H., Abrini J., Idoamar M., Skali-Senhaji N. Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures // *Acta Physiologiae Plantarum* 2007. V. 29. P. 95-102.
9. Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Тищенко Е.Н. Цитогенетический анализ клеточной линии сои, устойчивой к оксианионам вольфрама // Физиология и биохимия культурных растений. 2010. Т. 42. № 2. С. 125-131.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473-497.
11. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1988. С. 168-170.
12. Dellaport S.L., Wood J., Hicks J. A plant DNA miniprep: Version II [J] // *Plant Molecular Biology Reporter.* 1983. V. 1. N 14. P. 19-21.
13. Kalendar R., Tanskanen J., Chang W. et al. *Cassandra* retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008. V. 105. N 15. P. 5833-5838.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
15. Evrensel C., Yilmaz S., Temel A. et al. Variations in BARE-1 insertion patterns in barley callus cultures // *Genet. Mol. Res.* 2011. V. 10. N 2. P. 980-987.

IN VITRO SELECTION OF WHEAT FOR COMPLEX RESISTANCE AND ANALYSIS OF OBTAINED FORM

©2013 M.A. Zinchenko, O.V. Dubrovnaya, A.V. Bavol

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

Callus lines of wheat with cross-resistance to the pathogen metabolites of ophiobolus root rot and water deficit have been received by *in vitro* selection method. The cytological analysis was carried out during the selection process. The polymorphism of DNA loci, flanked by inverted repeats of LTR retrotransposon *Cassandra*, in cell lines of bread wheat, resistant to the metabolites of ophiobolus root rot (*G. graminis* var. *tritici*), under osmotic stress and induced from them plant-regenerants was analyzed using IRAP-method.

Key words: bread wheat, cell selection, ophiobolus root rot, water deficit, cytological analysis, IRAP-analysis.

Maria Zinchenko, postgraduate student, e-mail: maria.zinch@gmail.com; Oksana Dubrovnaya, Doctor of Biology, senior researcher, e-mail: dubrovny@ukr.net; Andrey Bavol, Candidate of Biology, junior researcher, e-mail: bavoll@rambler.ru