

УДК 561.143.6

## СЕЛЕКЦИЯ IN VITRO ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ

О.В. ДУБРОВНАЯ

*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук  
Украины  
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17  
e-mail: dubrovny@ukr.net*

Освещены достижения отечественных и зарубежных ученых по селекции in vitro пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам окружающей среды. Уделено внимание основным направлениям, методам отбора и оценки, возможностям, перспективам и проблемам одной из важнейших отраслей современной биотехнологии растений.

*Ключевые слова:* *Triticum L.*, селекция in vitro, абиотические стрессовые факторы.

Ведущую роль в пищевом обеспечении человечества играют зерновые злаки, три из которых — пшеница, кукуруза и рис — занимают лидирующие позиции. Однако исследователи считают, что значение пшеницы в дальнейшем будет расти и именно эта культура станет ведущей [15]. Распространенность пшеницы обусловлена ее высокой биологической пластичностью по отношению к экологическим условиям, а также высокой питательностью зерна, из которого получают много пищевых продуктов. В Украине этой культурой засевают в среднем 6,5 млн га, или 40 % площади посевов всех зерновых. На сегодня в Государственном реестре сортов Украины насчитывается около 260 сортов пшеницы, среди которых преобладает озимая мягкая.

Генетический потенциал продуктивности отечественных сортов озимой мягкой пшеницы находится в пределах 8–13 т/га, однако в производственных условиях он реализуется лишь на 40 %. Существует много факторов, препятствующих реализации в полной мере детерминированного генетического потенциала сортов, среди которых видное место занимают абиотические стрессовые факторы. Установлено, что до 50 % урожая теряется при действии таких экологических факторов (абиотических стрессов), как экстремальная температура, засуха, засоление, токсичные металлы, гербициды, ультрафиолетовое облучение и др.

Для решения многогранной проблемы устойчивости организмов к стрессовым факторам необходимо применить новые эффективные подходы. В настоящее время одним из таких перспективных направлений повышения эффективности создания новых форм сельскохозяйственных культур является использование методов биотехнологии. Биотехнологические методы играют значительную роль в селекционном процессе, поскольку дают возможность с высокой эффективностью создавать широ-

кий спектр исходного материала, получать устойчивые генотипы, воздействовать непосредственно на генетический аппарат растений, сокращают объемы и продолжительность селекционных схем. Исходя из определения адаптационных свойств растений как генетически детерминированного процесса формирования систем устойчивости организма, который осуществляется на различных структурных уровнях, его совершенствование возможно в условиях *in vitro* [20, 24].

Одним из важнейших методов современной биотехнологии, который уже получил широкое практическое применение, является клеточная селекция *in vitro* как метод создания новых форм растений путем выделения мутантных клеток и соматональных вариаций в селективных условиях. Данный метод является как бы развитием мутационной селекции, однако реализуется на уровне единичных клеток с применением техники *in vitro*, что придает ей, с одной стороны, более широкие возможности, а с другой — создает значительные трудности при необходимости регенерации из отдельных клеток полноценных растений. Преимущества клеточной селекции по сравнению с традиционными методами заключаются прежде всего в экономии места и возможности работать с большими выборками генотипов; большей скорости скрининга селекционного материала; меньших объемах материальных затрат; возможности контроля условий внешней среды. Кроме того, части тканей или даже отдельные клетки можно тестировать вне растительного организма и таким образом избегать неудобств, связанных с физиологическими взаимодействиями, обусловленными поступлением и выведением веществ, оценивать только реакции клеток, находящихся в одинаковых условиях питания; генетические изменения возможно усилить путем создания новых генетических комбинаций, их отбора и передачи регенерантам; новые комбинации признаков можно создавать за счет соматональной изменчивости или индуцированного мутагенеза; существует возможность получения устойчивости к нескольким стрессовым факторам одновременно [3, 12, 18, 34, 57].

Наряду с перечисленными преимуществами методы селекции *in vitro* имеют также и целый ряд недостатков, среди которых надо выделить следующие: в связи с комплексным генетическим контролем или отсутствием адекватных знаний о генетической детерминации селективного признака зачастую очень сложно или даже невозможно найти приемлемый для отбора в культуре маркер; трудно или даже невозможно вести селекцию на признаки, проявляющиеся на уровне клеточной специализации, клеточных связей и целого растения; низкий уровень или невозможность регенерации растений из устойчивых клеточных культур; измененные клеточные линии со временем теряют способность к регенерации, что является главным препятствием для широкого распространения этих методов; существует проблема нарушения корреляции между проявлением селективного признака на уровне культуры и интактного растения; легкость появления и нестабильность эпигенетических изменений в культивируемых клетках и высокая вероятность их селекции *in vitro*; хозяйственно-ценные признаки растений-регенерантов часто могут быть сцеплены с нежелательными; действие селективных факторов может зависеть от фазы развития клеточной популяции; при отборе накладывается влияние физиологически активных веществ; генетическая нестабильность в культуре и возможные нарушения генома;

оценка ведется в искусственных условиях и всегда существует риск, что желаемые признаки будут иначе проявляться в полевых условиях [14, 25, 40].

Несмотря на определенные трудности, сегодня во многих ведущих странах мира селекция *in vitro* является важным компонентом селекционной работы и дополняет классические методы отбора. В большинстве случаев клеточную селекцию применяют для получения форм растений, и в частности пшеницы, устойчивых к абиотическим стрессам (экстремальные температуры, водный и осмотический стрессы, засоление, действие токсичных металлов, солей тяжелых металлов, гербицидов, ультрафиолетового облучения) [13, 20, 23, 26, 27, 29, 30, 40, 41, 61].

Технологии селекции *in vitro*, которые разрабатываются для основных злаковых сельскохозяйственных культур, базируются на общих механизмах устойчивости для изолированных клеток и целых растений [17, 52, 56]. Селекция *in vitro* может проводиться на признаки, которые проявляются на клеточном уровне, в частности, на увеличенную экспрессию определенных генов, обеспечивающих толерантность к абиотическим стрессам [52, 56]. Для создания результативных биотехнологических систем необходим подбор селективного фактора, условий культивирования эксплантатов, а также изучение последовательности и воспроизводимости результатов на этапах отбора для получения форм с максимальным проявлением желаемого признака. В литературе практически отсутствуют две одинаковые схемы клеточной селекции *in vitro*. Схема отбора зависит от вида растения, признака, по которому получают устойчивые формы, особенностей каллюсо- и морфогенеза, методики проведения экспериментов, степени изученности действия стрессового фактора и других субъективных причин.

**Водный дефицит.** Среди природных факторов, которые наиболее негативно влияют на все физиологические процессы роста и развития растений и в конечном счете приводят к потерям урожая, ведущую роль играет водный дефицит, вызванный засухой [65]. Известно, что недостаток воды в почве наносит значительно больший вред растениеводству, чем все остальные стрессовые факторы вместе взятые [39, 43]. Ожидается, что в связи с глобальным потеплением периодичность повторения засух с годами будет только учащаться. Установлено, что засуха также может спровоцировать засоление почв [32]. Стресс, вызванный водным дефицитом, бывает первичным в случае засухи и вторичным при засолении [65]. Устойчивость к данному типу стресса является очень сложным признаком, который находится под контролем многих различных генов. На сегодня все еще не выяснено, что наиболее важно для устойчивости — морфологические признаки или физиологические аспекты. Многие ученые пытались получить устойчивые к водному дефициту формы пшеницы в культуре *in vitro* [20, 23, 27, 29, 30, 44, 46, 51].

С целью имитации *in vitro* стрессового эффекта водного дефицита применяют питательные среды, дополненные осмотически активными веществами, которые снижают внешний водный потенциал. В качестве стрессового фактора чаще всего используют высокомолекулярный (6000—10 000) полиэтиленгликоль (ПЭГ) или низкомолекулярный маннит.

При сравнении реакций различных сортов сорго на засуху с реакцией каллюсов, полученных от растений этих сортов, на полиэтиленгликоль авторами было показано, что ПЭГ-6000 хорошо имитирует *in vitro*

чувствительность к водному дефициту проростков и молодых растений [58]. Подобные данные были получены также для твердой пшеницы [45]. В работе Хемайд и соавт. [45] показано, что при клеточной селекции твердой пшеницы на устойчивость к водному дефициту с постепенным повышением концентрации ПЭГ-8000 с 50 до 250 г/л наблюдается снижение прироста биомассы и регенерационной способности каллюса. В результате были выделены линии с повышенной устойчивостью к водному дефициту.

Изучив эффекты различных концентраций ПЭГ (10, 20 и 30 %) на жизнеспособность культуры тканей пшеницы, Кондик-Спика и Зесек [51] установили, что эти концентрации являются летальными для каллюсных культур. Галовик и соавт. [44] показали, что 5 %-я концентрация высокомолекулярного ПЭГ может быть селективным маркером, поскольку были обнаружены как существенные различия между генотипами, так и сокращение прироста биомассы каллюса на 50 % и более. В результате проведенного ими анализа уровня засухоустойчивости 13 генотипов озимой пшеницы разного географического происхождения установлено, что различные по устойчивости формы характеризуются неодинаковым снижением массы сырого каллюса. Меньше всего снижалась масса относительно контроля у устойчивого генотипа Rozofskaja (14,4 %), больше всего — у неустойчивого сорта Miranovska (58,4 %), что может не только свидетельствовать об уровне устойчивости к засухе, но и применяться как лабораторный тест.

Соматоклональная вариабельность была использована как источник изменчивости для улучшения засухоустойчивости генотипов пшеницы (*Triticum durum* Desf.) [27, 46]. Растения-регенеранты  $R_0$  с повышенной устойчивостью к засухе получены после селекции *in vitro* с высокомолекулярным ПЭГ. Применение осмотического стресса во время фазы регенерации оказалось достаточно эффективным [46]. Из 30 полученных растений 13 обнаружили повышенную устойчивость, которая наследовалась как в потомстве  $R_1$ , так и у растений  $R_2$ — $R_4$ . Между родительскими сортами и устойчивыми линиями установлены различия в вытекании электролита, флуоресценции хлорофилла ( $F_v/F_m$ ), проводимости устьиц и сокращении периода времени до колошения [27].

Таким образом, в большинстве работ для получения устойчивых к водному дефициту растений в качестве селективного фактора использован ПЭГ. Значительно реже при клеточной селекции толерантных к водному дефициту растений применяли маннит [1]. Следует отметить, что по сравнению с непроникающим полиэтиленгликолем маннит проникает в растительную клетку, снижает нормальный водный потенциал, чем вызывает обезвоживание и торможение многих физиологических и метаболических процессов [2]. При проведении селекции *in vitro* пшеницы на устойчивость к водному дефициту с использованием двух селективных агентов — ПЭГ и маннита показано, что селективная система с маннитом эффективнее, поскольку обеспечивает более полную элиминацию чувствительных клеток и более высокую жизнеспособность растений-регенерантов [7, 8]. При этом было подтверждено сохранение повышенной толерантности к засухе у потомков большинства полученных после клеточной селекции форм, что указывает на мутационную природу толерантности [8, 10, 36].

Египетские исследователи [20] анализировали рост и регенерацию из каллюсов при различных концентрациях маннита (осмотические по-

тенциалы 0; 0,6; 0,9; 1,2 МПа) и сравнивали различия в их росте с ростом растений и их урожайностью в поле. Установлена четкая положительная корреляция между засухоустойчивостью сорта и выживаемостью каллюсов на селективных средах, а также жизнеспособностью этих генотипов в полевых условиях.

Активация генов при действии экологических стрессов играет чрезвычайно важную роль в адаптации растений и вызывает появление определенных стрессовых белков. Некоторые группы белков могут использоваться как маркеры для косвенного отбора на устойчивость к водному дефициту в культуре *in vitro*. Так, при различных концентрациях ПЭГ (5, 10, 20 %) у устойчивых генотипов появлялись белки с молекулярной массой 120, 84 и 38 кД. Кроме того, выявлялись глиадины с молекулярными массами 80, 38, 25 и 8 кД [21, 22].

**Засоление.** К настоящему времени опубликовано большое количество работ по получению солеустойчивых линий культурных растений методами селекции *in vitro*, в том числе и пшеницы [9, 16, 31, 53, 63]. Из многих литературных источников очевидно, что чаще всего при отборе солеустойчивых вариантов используют хлорид натрия различных концентраций. Три сорта мягкой пшеницы были протестированы на солеустойчивость в каллюсной культуре *in vitro* с добавлением NaCl в концентрации 3, 6, и 9 г/л [59]. Среди всех изученных генотипов устойчивым оказался сорт пшеницы Nona, поскольку при концентрации NaCl 9 г/л прирост биомассы каллюса этого генотипа был самым высоким (20,3 %). В исследованиях Никитиной и соавт. [16] показано влияние различных концентраций хлорида натрия на процессы индукции каллюса и регенерацию растений в культуре незрелых зародышей пяти сортов мягкой яровой пшеницы. Авторами установлено, что оптимальной концентрацией NaCl для отбора клеточных линий является 1,2–1,3 %.

Эмбриогенный каллюс четырех сортов пшеницы был использован для селекции *in vitro* на солеустойчивость с применением как селективного фактора хлорида натрия [31]. Согласно полученным результатам, ступенчатая селекция на устойчивость к NaCl более эффективна для регенерации, чем прямая. Выявлено, что устойчивые линии имели достоверно больший прирост массы при наличии хлорида натрия в среде по сравнению с контролем, а также накапливали значительно больше пролина. В устойчивых каллюсах обнаружено большее количество ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  при различных уровнях засоления по сравнению с контролем, в то время как у неустойчивых форм на том же уровне засоления существенно повышалось содержание ионов  $\text{K}^+$ .

В селекции *in vitro* на устойчивость к сульфатному засолению достигнуты сравнительно меньшие успехи, что обусловлено высокой фитотоксичностью сульфат-анионов и связано с сильным поглощением катионов  $\text{Na}^+$ . Лутс и соавт. [53] анализировали влияние различных типов солей ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , соли морской воды) на каллюсные культуры риса по показателям роста, накопления в тканях пролина и токсичных ионов. Установлено, что среди изученных солей более сильное угнетение роста каллюсных культур было вызвано ингибирующим действием  $\text{KCl}$ . Согласно полученным результатам, среди исследованных генотипов риса в целом выявлена различная реакция каллюсов на действие селективных агентов. Авторы пришли к заключению, что накопление специфических токсичных ионов является важным аспектом действия солево-

го стресса на клетки каллюса риса, а накопление пролина служит показателем устойчивости к осмотическому стрессу.

Еще одним селективным фактором, имитирующим сульфатно-хлоридное засоление, является морская соль, добавленная к питательной среде в концентрациях, ингибирующих рост клеток. При изучении эффекта повышения уровня засоления (0; 0,6 и 0,9 г морской соли) на рост и биохимические показатели каллюса пшеницы [25] была обнаружена прямая зависимость между содержанием общего азота, соотношением K/Na в клетках и увеличением концентрации морской соли.

Как известно, у культивируемых клеток наиболее чувствительной к селективному фактору является не рост, а дифференциация, поэтому засоление в культуре *in vitro* существенно угнетает способность клеток к морфогенезу. Так, у 8 протестированных сортов пшеницы в условиях контроля формировалось от 40 до 80 эмбриоидов на эксплантатах, а в условиях засоления их число уменьшилось до 10–40 в зависимости от сорта [63].

Каллюсные культуры, полученные из растений устойчивого к засолению генотипа мягкой пшеницы LU-26S и чувствительного Potohar, были использованы для исследования механизмов солеустойчивости [47–49]. У обоих типов каллюсов выявлен рост общего количества растворимых белков, свободных аминокислот и углеводов с повышением концентрации NaCl. Автор пришел к заключению, что устойчивый генотип накапливает больше органических веществ в клетках каллюса. Дальнейшими исследованиями установлено, что в каллюсе устойчивого сорта больше снижаются водный и осмотический потенциалы и меньше — тургорный по сравнению с чувствительным генотипом. Каллюс устойчивого генотипа также накапливал больше ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ , чем чувствительный. Таким образом, механизмы солеустойчивости пшеницы на уровне каллюс/клетка, согласно результатам этих и предыдущих исследований, связаны с высоким тургорным потенциалом и высоким содержанием ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ .

Для отбора устойчивых к засолению форм пшеницы также может быть полезным мутагенез *in vitro*, так как он увеличивает частоту и спектр мутаций в сочетании с более быстрым получением растений. Гамма-облучение в дозе 40, 80 и 120 Гр применяли для отбора устойчивых генотипов с использованием 0,9 и 1,2 % NaCl [42]. Показано, что солеустойчивые линии накапливали в 8–9 раз больше пролина при уровне засоления 1,2 %. Максимальное его накопление наблюдалось при дозе облучения 120 Гр и засолении 1,2 %. С помощью электрофоретического анализа в полиакриламидном геле обнаружено 28 групп белков различной молекулярной массы — от 234 до 15 кД, среди которых 11 оказались полиморфными. В результате изучения четырех ферментов — эстеразы, полифенолоксидазы, кислой фосфатазы и пероксидазы выявлены генетические эффекты гамма-лучей при действии засоления. В частности, анализом полифенолоксидазы обнаружено 11 изоформ, 3 из которых были полиморфными. При исследовании кислой фосфатазы выявлено 12 изоформ, 3 из которых появлялись только после облучения. Под действием засоления среди 10 изоформ пероксидазы обнаружены 2 новые изоформы. Эти дополнительные изоформы появляются в результате мутаций, вызванных гамма-облучением. Отличающиеся группы белков и появление новых изоформ могут быть использованы в качестве биохимических маркеров на засоление в культуре *in vitro*.

**Экстремальные температуры.** Для получения устойчивых к высоко-температурному стрессу форм озимой пшеницы Вонг и соавт. [61] применили многократную обработку каллюса температурой 48 °С. Обработка высокой температурой клеточных линий вызывала элиминацию и образование политенных хромосом, геномные перестройки, рост частоты экстрахромосомной ДНК. Анализом с помощью меченого <sup>35</sup>S-метионина установлено, что устойчивые линии поддерживали синтез большинства нормальных белков при температуре 40 °С в течение 4 ч, вместе с тем синтезировалось несколько уникальных низкомолекулярных белков теплового шока. Согласно результатам исследований, устойчивые к высокой температуре клеточные линии можно получить *in vitro*, и это явление может быть связано с синтезом определенных белков.

Дерфлинг и соавт. [40, 41] при использовании в качестве селективного фактора гидроксипролина получили линии озимой пшеницы с повышенной толерантностью к морозу и увеличенным содержанием пролина. Исследование наследования этих признаков показало, что потомство гибридов F<sub>1</sub>, полученное от опыления растений-регенерантов пылью дикого типа, имело более высокую степень устойчивости к морозу (ниже LD<sub>50</sub>) и более высокие уровни содержания пролина по сравнению как с регенерантами, так и растениями дикого типа [40]. В F<sub>2</sub> наблюдалось расщепление Нур-линий в соотношении 3 : 1. Как считают авторы, мутация произошла в одном гене с неполным доминированием. Кроме того, устойчивость к морозу сохранялась у растений поколения F<sub>3</sub>, а у одного из отобранных мутантов наблюдалась и в F<sub>4</sub>. Эти результаты убедительно подтвердили наследование признаков морозоустойчивости, увеличенного содержания пролина и свидетельствуют о возможности повышения морозоустойчивости методами селекции *in vitro*.

**Устойчивость к ионам алюминия.** Селекция *in vitro* с использованием ионов алюминия — один из способов улучшения устойчивости зерновых культур к ионам токсичных металлов. Установлено, что степень токсичности и эффективность селекции к данному стрессору зависит от концентрации и способа действия. Так, в культуре пыльников и полученных от них структур после единичной обработки (0,6 и 1,6 мМ Al) отобраны устойчивые линии удвоенных гаплоидов [28]. Повторная обработка летально влияла на деление микроспор даже в минимальной дозе 0,6 мМ. Хотя стенки пыльника задерживали появление признаков токсичности, цитологические изменения подобные тем, которые проявлялись в клетках корней (задержка клеточного деления, интенсивная вакуолизация, возникновение микроядер и утолщение клеточной стенки), обнаруживались и в микроспорах. Полученные результаты подтвердили, что эмбриогенез в культуре микроспор может быть использован не только для повышения устойчивости пшеницы к действию тяжелых металлов, но и для изучения цитологических эффектов действия алюминия.

**Устойчивость к воздействию УФ-Б-радиации.** Влияние ультрафиолетовой солнечной радиации (УФ-радиации), которая достигает поверхности земли, на растительные объекты привлекает пристальное внимание ученых в связи с изменениями состояния озонового слоя атмосферы. Значительное его утончение приводит к тому, что на поверхности земли повышается уровень облучения в диапазоне длин волн 280—320 нм, который относится к ультрафиолетовой области спектра. УФ-облучение, действуя на ДНК, вызывает значительное количество хромосомных aberrаций в клетках растений, что является причиной повышения уров-

ня мутаций и негативно сказывается на сохранении генофонда живых организмов. В связи с этим исследования воздействия УФ-Б-радиации на растительные объекты и получение устойчивых к данному фактору форм имеют важное хозяйственное значение. На примере двух генотипов яровой мягкой пшеницы *T. aestivum* (сорт Таежная и линия Фотос) исследовали возможность получения методами культуры *in vitro* клеток с повышенной устойчивостью к средневолновому УФ-облучению в диапазоне длин волн 280—320 нм (УФ-Б) [13]. В результате индивидуального отбора по признаку прироста биомассы были выделены несколько клеточных линий, способных сохранять высокий уровень прироста массы при действии УФ-Б-облучения. Жизнеспособность каллуса в значительной степени зависела от интенсивности и длительности воздействия этого стрессового фактора.

**Селекция *in vitro* на комплексную устойчивость к стрессовым факторам.** Успехи в селекции на устойчивость к комплексу стрессовых факторов в настоящее время редкость, поскольку толерантность контролируется многими генами, а их одновременный отбор является сложной задачей [11, 56]. Опубликованы сведения о том, что благодаря общим неспецифическим механизмам устойчивости резистентность к одному неблагоприятному фактору может приводить к повышению устойчивости и к другому [4, 8, 11, 19, 60]. Отобранные клеточные линии и растения-регенеранты способны проявлять устойчивость к двум и более типам стресса, порой даже не подобным по физико-химической природе и мишеням действия [8, 60]. В то же время перекрестная устойчивость не всегда однозначна по проявлению — устойчивость к одному стрессу может привести к повышению резистентности и к другому, но может и не проявляться в противоположном случае [60].

Формирование устойчивости растений к ряду абиотических стрессов (солевому, осмотическому, температурному) на клеточном и тканевом уровнях имеет некоторые сходные механизмы и в значительной степени связано с синтезом пролина и абсцизовой кислоты (АБК). Поэтому указанные вещества применяются в качестве селективных агентов при отборе линий, устойчивых к различным стрессам. Так, у табака и сои при использовании селекции к токсическому аналогу пролина были выделены линии, устойчивые к NaCl, осмотическому и температурному стрессам [6]. Важно подчеркнуть, что проявление фенотипа перекрестной устойчивости при действии на клетку стрессового фактора может быть обусловлено не только индукцией различных защитных реакций, но и способностью конкретных защитных продуктов (белков и малых органических молекул) выполнять многочисленные неспецифические функции.

Установлено, что линии, резистентные к одному стрессовому фактору, могут проявлять комплексную устойчивость и к другим стрессорам. Показана перекрестная устойчивость каллюсных линий и растений-регенерантов кормовой свеклы, устойчивых к токсину возбудителя бактериоза и к низким температурам [10]. Стабильность признака устойчивости к комплексу стрессовых факторов у полученных клеточных линий составляла 66—74 %, а у индуцированных растений-регенерантов была на уровне 44—54 %.

В опытах на кукурузе проведение отбора на среде с ПЭГ способствовало повышению устойчивости регенерантов не только к засухе, но и к засолению и низкой температуре [6]. Пакистанские ученые [33] изуча-

ли перекрестную устойчивость двух клеточных линий риса, адаптированных к осмотическому (20 % ПЭГ) и ионному (20 мМ LiCl) стрессам, к высоким (36 °С) и низким (8 °С) температурам. Оказалось, что обе адаптированные линии проявляли высокую толерантность к температурному стрессу, а уровень пролина в 17 раз превышал контрольный. Ерофеева [11] установила закономерности формирования кросс-адаптации к осмотическому стрессу у мягкой пшеницы при действии солей свинца, кадмия и меди в широком диапазоне их концентраций. Оказалось, что кросс-адаптация возникает при воздействии дополнительного стрессового фактора, при адаптации растения к дозе 0,128 % тяжелого металла, при условии еще не истощенного адаптационного потенциала защитных систем, участвующих в этом процессе. Таким образом, при использовании селекции in vitro экспериментально подтверждена возможность получения злаковых растений, устойчивых к нескольким стрессовым факторам.

#### **Генетическая регуляция устойчивости к стрессовым факторам.**

Стресс-толерантность растительных клеток является следствием индуцированной дифференциальной экспрессии генов, объединения сигнальных и координации различных физиологических, метаболических и биохимических реакций. Генетическая регуляция устойчивости осуществляется на транскрипционном, посттранскрипционном, а также посттрансляционном уровнях. До наступления эры геномики исследователи в основном использовали подход «gene-by-gene» для расшифровки функции генов, участвующих в реакциях на стресс. Тем не менее устойчивость к стрессу является сложным признаком, и хотя было идентифицировано большое количество генов, участвующих в реакциях на стресс, в понимании этого вопроса остается много невыясненного. В результате расшифровки нуклеотидных последовательностей геномов некоторых важных видов растений путем анализа мутантных и трансгенных растений выявлены гены, связанные со стресс-реакцией [60].

Известны две основные группы генов, которые экспрессируются в ответ на абиотические стрессы. Первая — это гены, продукты которых непосредственно участвуют в защите растительных клеток. Гены второй группы регулируют экспрессию стресс-чувствительных генов, а также связаны с путями передачи сигналов. На основе биологических функций эти гены могут быть разделены на следующие три категории: 1) регуляция транскрипции в ответ на стресс (*DREB1*, *AREB*, *NF-YB*); 2) посттранскрипционные модификации белка или РНК, такие как фосфорилирование/дефосфорилирование (например, *SnRK2*, *ABI1*) и фарнезиляция (например, *ERA1*); 3) осмопротекторный метаболизм или молекулярные шапероны (например, *CspB*) [54].

Дикие сородичи пшеницы менее уязвимы к засухе. В частности, в роде *Thinopyrum* были обнаружены и исследованы функции генов засухоустойчивости [5]. Например, связанный с солеустойчивостью ген *HVA1* повышает и засухоустойчивость. Кроме того, белки DHN-5 у твердых сортов пшеницы также связаны с засухой. Накопление фосфорилированных белков DHN-5 у устойчивых сортов вероятно играет определенную роль в сохранении целостности клетки во время позднего эмбриогенеза и десикации. Гены *ABI1* и *ABI3* независимо от типа и интенсивности стресса аналогично реагируют на дефицит воды у двух различных видов растений — арабидопсиса и ячменя. Оба гена связаны с АБК-опосредованной метаболической реакцией на стресс. Во время засухи для *ABI1* транскрипции характерна up-регуляция, а для *ABI3* —

down-регуляция. Гипотетически *ABI3* имеет важное значение для протекания процессов восстановления после действия водного дефицита [64].

В эволюционно сложившемся ответе растений на дефицит воды также участвуют комплексы генов, относящихся к *MYB*, *HD-Zip*, *bZIP* семействам. Экспрессируются белки-переносчики липидов, транскрипционные белки *WRKY*, фактор элонгации *TU*, белки *LEA*, шапероны, *цис*-перокси-редоксин, этиленчувствительные белки. Их экспрессия повышается в условиях дегидратации, а также при действии экзогенной АБК [55]. В последнее время охарактеризовано более 100 генов растений, экспрессия которых индуцируется дегидратацией. Специфическим, эволюционно сформированным ответом на обезвоживание является накопление молекул, стабилизирующих клеточные структуры, таких как белки *LEA* [35, 37].

Многие из проанализированных генов, индуцированных засухой, также активируются высоким уровнем засоления. Среди них есть и стресс-индуцированные транскрипционные факторы. Транскрипционные факторы регулируют экспрессию генов в ответ на экологические и физиологические стрессы, а некоторые из них регулируют физиологические пути развития и адаптации растений к стрессу. Один транскрипционный фактор кодируется одним геном, но регулирует экспрессию нескольких других генов, что приводит к активизации сложных адаптивных механизмов и служит основным молекулярным инструментом для генетического улучшения толерантности культурных растений к различным стрессам [50].

Регуляция экспрессии генов, задействованных в стресс-толерантности — необходимое условие для улучшения определенного признака растений. В настоящее время именно транскрипционные факторы, задействованные в повышении толерантности к стрессу, являются одним из инструментов геной инженерии, поскольку их гиперэкспрессия может привести к up-регуляции всего ряда генов, которые находятся под их контролем. Показано, что регуляция транскрипции определенных наборов генов осуществляется общими путями [62].

*NAS*-транскрипционный фактор, задействованный в ответе на абиотические стрессы, также контролирует развитие растения. Его экспрессия индуцируется дефицитом воды, засолением, холодом и абсцизовой кислотой. Транскрипционный фактор *HARDY* в основном действует и регулирует толерантность растений к засухе и их солеустойчивость двумя способами: эффективным использованием воды и усиленным развитием корневой системы. У *HARDY* и *DREB1/CBF* пути в передаче сигнала стресса могут совпадать, так как оба транскрипционных фактора индуцируют экспрессию пула генов, которые активируются ответом на потери воды и осмотический стресс [54].

В последние годы ученые уделяют большое внимание малым РНК в регуляции ответа растения на абиотический стресс. Предполагают, что генная регуляция с помощью малых РНК является общим механизмом ответа растений на стресс [50]. Известно, что микроРНК (*miRNA*) задействованы в ответе на стрессовые факторы, например экспрессия *miR393* четко стимулируется холодом, обезвоживанием, высоким уровнем засоления и обработкой АБК, в то время как экспрессия *miR319c*, *miR389a*, *miR397b* и *miR402* регулируется многими абиотическими стрессами. Два высококонсервативных гена, расположенных на 10- и 7-й хромосомах и кодирующих *miR398*, обнаружены также у риса — *miR398a* и *miR398b*. Соответственно *miR398* связан с *Cu*- или *Zn*-супероксиддисмутазой (*CSD1* и *CSD2*) у

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Считается, что miR398 является посредником ответа на абиотические и биотические стрессы за счет регулирования экспрессии его генов-мишеней *Os-CSD1* и *Os-CSD2*. Абиотические стрессы значительно ингибируют экспрессию *Os-miR398*, стимулируя, в свою очередь, экспрессию *Os-CSD1* и *Os-CSD2* [62].

Убедительно доказано, что протеинкиназы из подсемейств SnRK2 и SnRK3 участвуют в сигнальных путях регуляции растительных реакций на дефицит питательных веществ, засуху, холод, засоление и осмотический стресс. Экспрессия всего подсемейства SnRK2 у риса индуцируется осмотическим стрессом и АБК. SnRK2 у арабидопсиса контролируют экспрессию генов стресс-реакции и повышают засухоустойчивость при гиперэкспрессии, в то время как SnRK2 у пшеницы являются посредниками в АБК-индуцированных изменениях в экспрессии генов в ответ на холод и другие стрессы [38].

Таким образом, следует подчеркнуть, что методом селекции *in vitro* можно получить оригинальные генотипы пшеницы, создание которых традиционными методами требует значительно более длительного времени и менее эффективно. Литературные данные свидетельствуют о возможности использования этого метода для расширения генетического потенциала и создания новых исходных материалов данной культуры, а также улучшения уже существующих по многим параметрам. Методы клеточной селекции постепенно совершенствуются и спектр различных мутантов, полученных *in vitro*, с каждым годом расширяется. Дальнейший прогресс в селекции *in vitro* пшеницы будет зависеть не только от развития клеточных технологий, но и от более глубокого познания молекулярных механизмов регуляции и экспрессии генов. На этой основе, очевидно, будут предложены новые схемы отбора и селективные маркеры для выделения *in vitro* ценных мутантов.

Несмотря на успехи и значительные достижения в развитии и использовании клеточных технологий, остается нерешенным ряд методических проблем, что снижает масштабы внедрения биотехнологических разработок в практику. Несмотря на то что культура *in vitro* пшеницы уже достаточно долго используется как объект исследований, она считается одной из самых сложных для биотехнологических работ. Это обусловлено биологическими особенностями злаковых — их неспособностью в природных условиях образовывать каллюс и низким морфогенетическим потенциалом культивируемых тканей. В связи с этим существует необходимость оптимизации условий каллюсообразования и регенерации в культуре разных типов эксплантатов и исследования эффективности воздействия биологически активных веществ на процессы морфогенеза.

Недостаточно изученными остаются вопросы расширения генетического разнообразия пшеницы по устойчивости к абиотическим стрессам. Фрагментарно изучена генетическая стабильность клеток данной культуры в процессе отбора устойчивых форм, что обуславливает необходимость углубленного анализа геномной изменчивости культивируемых в селективных условиях клеток и индуцированных из них растений-регенерантов. Исследования, направленные на решение данной проблемы, актуальны и значимы, поскольку ориентированы на расширение возможностей биотехнологий, повышение их эффективности и широкое внедрение новых методов для решения прикладных задач селекции пшеницы.

1. Аль-Холани Х. А. Получение стресс-толерантных растений кукурузы методом клеточной селекции: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2010. — 24 с.
2. Генерозова И.П., Маевская С.Н., Шугаев А.Г. Ингибирование метаболической активности митохондрий этиолированных проростков гороха, подвергнутых водному стрессу // Физиология растений. — 2009. — 56, № 1. — С. 45–52.
3. Гирко В.С., Волощук С.И. Действие химических и физических мутагенных факторов в культуре ткани озимой пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. — 1999. — 31, № 3. — С. 220–226.
4. Губанова Н.Я., Дубровная О.В., Чугункова Т.В. Клеточная селекция кормовой свеклы на устойчивость к нескольким стрессовым факторам // Биополимеры и клетка. — 2002. — 18, № 3. — С. 565–571.
5. Гусейнова И.М. Использование молекулярных маркеров для оценки засухоустойчивости генотипов пшеницы (*Triticum* L.) // АМЕА-нын Хябярляри (биолоэийа елмляри). — 2011. — 66, №1. — С. 53–62.
6. Долгих Ю.И. Соматическая изменчивость растений и возможности ее практического использования (на примере кукурузы): Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 2005. — 35 с.
7. Дубровна О.В., Бавол А.В., Зінченко М.О. Вплив осмотичних речовин на калюсні лінії м'якої пшениці, стійкі до культурального фільтрату *G. graminis* var. *tritici* // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2011. — 9, № 1. — С. 10–16.
8. Дубровна О.В., Моргун Б.В., Бавол А.В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. — К.: Логос, 2014. — 375 с.
9. Дубровна О.В., Моргун Б.В. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — 41, № 6. — С. 463–476.
10. Дубровна О.В., Чугункова Т.В., Бавол А.В., Лялько І.І. Біотехнологічні основи створення рослин, стійких до стресів. — К.: Логос, 2012. — 428 с.
11. Ерофеева Е.А. Возникновение кросс-адаптации к осмотическому стрессу у проростков пшеницы при действии солей тяжелых металлов. Электронный документ — Режим доступа: <http://msu-research.ru/index.php/biology/8-gidrobiology/259-cross-adaptation>.
12. Калашникова Е.А. Биологические основы клеточной селекции растений // Докл. ТСХА. — 2003. — № 275. — С.110–112.
13. Лапшин П.В., Бутенко Р.Г., Шевелуха В.С. Клеточная селекция яровой мягкой пшеницы на устойчивость к действию УФ-Б-радиации // Изв. ТСХА. — 2001. — № 2. — С. 136–144.
14. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. — СПб.: Изд-во Санкт-Петербург. ун-та, 2003. — 227 с.
15. Моргун В.В., Швартау В.В., Киризий Д.А. Физиологические основы получения высоких урожаев пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. — 2008. — 40, № 6. — С. 463–479.
16. Никитина Е.Д., Хлебова Л.П., Соколова Г.Г., Ерещенко О.В. Создание стрессоустойчивого материала яровой мягкой пшеницы с использованием клеточной селекции in vitro // Изв. Алтайск. гос. ун-та. — 2013. — № 3. — С. 2–20.
17. Решетников В.Н., Спиридович Е.В., Носов А.М. Биотехнология растений и перспективы ее развития // Физиология растений и генетика. — 2014. — 46, № 1. — С. 3–18.
18. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. — Киев: Наук. думка, 1990. — 280 с.
19. Шуплецова О.Н. Клеточная селекция ячменя на устойчивость к эдафическим стрессам // Тез. докл. IX Междунар. конф. «Биология клеток растений in vitro и биотехнология» (8–12 сент. 2008) — Звенигород, 2008. — С. 215–225.
20. Abdel-Ghany H., Nawar A., Ibrahim M. Using tissue culture to select for drought tolerance in bread wheat // New directions for a diverse planet: Proc. of the 4-th Intern. Crop Sci. Congress.— Brisbane, Australia, 2004. — P. 345.
21. Abdel-Hady M., El-Sayed O., Solaiman E. et al. Genetic detection of protein markers in some drought tolerant wheat cultivars regeneration from somatic embryogenesis // J. Agr. Sci. — 2001. — 26. — P. 5981–5997.
22. Abdel-Hady M., Hoda M., El-Naggar H. Wheat genotypic variation and protein markers in relation with in vitro selection for drought tolerance // J. Appl. Sci. Res. — 2007. — 3, N 10. — P. 926–934.
23. Ahmed A. Response of immature embryos in vitro regeneration of some wheat (*T. aestivum*) genotypes under different osmotic stress of mannitol // J. Agr. Sci. — 1999. — 30, N 3. — P. 25–34.
24. Ahmed K., Mesterházy Á., Bartók T., Sági F. In vitro techniques for selecting wheat (*Triticum aestivum* L.) for *Fusarium*-resistance. II. Culture filtrate technique and inheritance of *Fusarium*-resistance in the somaclones // Euphytica. — 1996. — 91, N 3. — P. 341–349.

25. Aly M., Sabry S., Abdelfatah O., Elgharbawy H. In vitro screening for the effect of sea water salinity stress on growth and biochemical characteristics of wheat *Triticum aestivum* L. // Int. J. Appl. Agr. Res. — 2007. — 2, N 1. — P. 1—11.
26. Arzani A., Mirodjagh S. Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and in vitro salt stress // Plant Cell, Tissue Organ. Cult. — 1999. — N 58. — P. 67—72.
27. Bajji M., Lutts S., Kinet J. Physiological changes after exposure to and recovery from polyethyleneglycol induced water deficit in callus cultures issued from durum wheat (*Triticum durum*) cultivars differing in drought resistance // J. Plant Physiol. — 2001. — 156. — P. 75—83.
28. Bakos F., Darko E, Ascough G. et al. A cytological study on aluminium-treated wheat anther cultures resulting in plants with increased Al tolerance // Plant Breed. — 2008. — 127, N1. — P. 236—240.
29. Barakat M., Abdel-Latif T. In vitro selection for drought tolerant lines in wheat. I. Effect of polyethyleneglycol on the embryogenic cultures // J. Agr. Res. — 1995. — 40, N 1. — P. 97—112.
30. Barakat M., Abdel-Latif T. In vitro selection for drought-tolerant lines in wheat. II. In vitro characterization of cell lines and plant regeneration // J. Agr. Res. — 1995. — 40, N 1. — P. 167—190.
31. Barakat M., Abdel-Latif T. In vitro selection of wheat callus tolerant to high levels of salt and plant regeneration // Euphytica. — 1996. — 91, N 2. — P. 127—140.
32. Bartels D., Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants // Crit. Rev. Plant Sci. — 2005. — 24, N 1. — P. 23—58.
33. Biswas B., Chowdhury A., Bhattacharya B., Mandal A. In vitro screening for increases drought tolerance in rice // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. — 2002. — 38. — P. 525—530.
34. Bozorgipour R., Snape J. An assessment of somaclonal variation as a breeding tool for generating herbicide tolerant genotypes in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Euphytica. — 1997. — 94, N 3. — P. 335—340.
35. Bray E.A. Classification of genes differentially expressed during water deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis microarray and differential expression data // Ann. Bot. — 2002. — 89, N 5. — P. 803—811.
36. Butt A., Ahmed N., Mubin M. Effect of peg and mannitol induced water stress on regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Pakistan J. Agr. Sci. — 2015. — 52, N 4. — P. 1025—1033.
37. Chinnusamy V., Schumaker K., Zhu J. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants // J. Exp. Bot. — 2003. — 55, N 395. — P. 225—236.
38. Coello P., Hey S., Halford N. The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield // Ibid. — 2011. — 62, N 3. — P. 883—893.
39. Dai A. Increasing drought under global warming in observations and models // Nature climate change. — 2013. — 3. — P. 52—58.
40. Dorffling K., Dorffling H., Lesselich G. et al. Heritable improvement of frost tolerance in winter wheat by in vitro-selection of hydroxyproline-resistant proline overproducing mutants // Euphytica. — 1997. — 93, N 1. — P. 1—10.
41. Dorffling K., Dorffling H., Lesselich G. In vitro selection of winter wheat callus tolerant to frost // J. Plant Physiol. — 1993. — 142. — P. 222—225.
42. El-Sayed O., Rizkalla A., Sabri S. In vitro mutagenesis for genetic improvement of salinity tolerance in wheat // Res. J. Agr. Biol. Sci. — 2007. — 4, N 5. — P. 377—383.
43. Fang Y., Xiong L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants // Cell. Mol. Life Sci. — 2015. — 72, N 4. — P. 673—689.
44. Galovic V., Kotaranin Z., Dincic S. In vitro assessment of wheat tolerance to drought // Genetika. — 2005. — 37, N 2. — P. 165—171.
45. Hemaid I., Soliman H., Hendawy M. Selection for drought tolerance genotypes in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) under in vitro conditions // Middle-East J. Sci. Res. — 2013. — 14, N 1. — P. 69—78.
46. Hsissou D., Bouharmon J. In vitro selection and characterization of drought-tolerant plants of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) // Agronomie. — 1994. — N 2. — P. 65—70.
47. Javed F. In vitro salt tolerance in wheat I. Growth and ion accumulation // Int. J. Agr. Biol. — 2002. — 4, N 4. — P. 458—461.
48. Javed F. In vitro salt tolerance in wheat II. Organic solute accumulation in callus // Ibid. — P. 462—464.
49. Javed F. In vitro salt tolerance in wheat. III. Water relations in callus // Ibid. — P. 465—467.
50. Khong G., Richaud F., Coudert Y. et al. Modulating rice stress tolerance by transcription factors // Biotechnol. Genet. Eng. Rev. — 2008. — 25, N 25. — P. 381—403.
51. Kondic-Spika A., Sesek S. Koriscenje kalusne kulture za ispitivanje tolerantnosti genotipova pšenice prema susi // Selekcija i semenarstvo. — 2000. — 7, N 1—2. — P. 57—59.
52. Lestari E.G. In vitro selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance // Biodiversitas. — 2006. — 7. — P. 297—301.

53. *Lutts S., Kinet J., Bouharmont J.* Effects of various salts and of mannitol on ion and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) // *Plant Physiol.* — 1996. — **149**. — P. 186–195.
54. *Morran S., Eini O., Pyvovarenko T.* Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors // *Plant Biotechnol. J.* — 2011. — **9**, N 2. — P. 230–249.
55. *Pinheiro C., Chaves M.* Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data // *J. Exp. Bot.* — 2011. — **62**, N 3. — P. 869–882.
56. *Rai M., Kalia R., Singh R.* Developing stress tolerant plants through in vitro selection — an overview of the recent progress // *Environ. Exp. Bot.* — 2011. — **71**. — P. 89–98.
57. *Sigurbjornsson E.* Application of in vitro mutation techniques for crop improvement // *Euphytica.* — 1995. — **85**. — P. 303–315.
58. *Smith R., Bhashkaran S., Miller F.* Screening for drought tolerance in sorghum using cell culture // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* — 1995. — **21**. — P. 541–543.
59. *Sudyova V., Slikova S., Galova Z.* Testing wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (*Triticosecale* Witt.) callus to salt tolerance // *Acta Pyrotechnol. Zootechnol.* — 2002. — **3**. — P. 67–71.
60. *Vij S., Tyagi A.* Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants // *Plant Biotechnol. J.* — 2007. — **3**. — P. 361–380.
61. *Wang W., Shang X., Yucel M., Nguyen H.* Selection of cultured wheat cells for tolerance to high temperature stress // *Crop Sci.* — 1993. — **33**. — P. 315–320.
62. *Yadav R., Sehgal D., Vadez V.* Using genetic mapping and genomics approaches in understanding and improving drought tolerance in pearl millet // *J. Exp. Bot.* — 2011. — **62**, N 2. — P. 397–408.
63. *Zair I., Chlyah A., Sabounji K.* Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of in vitro selection pressure // *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* — 2003. — **73**, N 3. — P. 237–244.
64. *Zhang G., Meng L., Mao P.* Study on the identification of the drought resistance of *Elytrigia repens* and *E. intermedia* at seedling stage // *Acta Agr. Bor. Sin.* — 2007. — **22**. — P. 54–59.
65. *Zhu J.-K.* Salt and drought stress signal transduction in plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2002. — **53**. — P. 247–273.

Получено 22.06.2017

## СЕЛЕКЦІЯ IN VITRO ПШЕНИЦІ НА СТІЙКІСТЬ ДО АБІОТИЧНИХ СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ

О.В. Дубровна

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

Висвітлено досягнення вітчизняних і закордонних учених щодо селекції in vitro пшениці на стійкість до абіотичних стресових чинників довкілля. Приділено увагу основним напрямам, методам добору та оцінювання, можливостям, перспективам і проблемам однієї з найважливіших галузей сучасної біотехнології рослин.

## IN VITRO SELECTION OF WHEAT FOR RESISTANCE TO ABIOTIC STRESS FACTORS

O.V. Dubrovna

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

In the review achievements of Ukrainian and foreign scientists in the field of in vitro selection of wheat for resistance to abiotic stress factors of environment have been observed. The attention have been paid to the basic directions, methods of selection and estimation, to possibilities, prospects and problems of one of the major branches of modern biotechnology of plants.

*Key words:* *Triticum* L., in vitro selection, abiotic stress factors.