



Розділ I. Ботаніка

УДК 581.1:58.02

Динамічні характеристики генотипів пшениці озимої

Лариса Броннікова, Марія Дикун

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Україна, м. Київ

Адреса для листування: Zlenko_lora@ukr.net

Отримано: 03.02.21; прийнято до друку: 15.06.21; опубліковано: 02.09.21

Резюме. Для пришвидшення селекційного процесу активно залучаються різноманітні методи, які реалізують динамічні реакції недиференційованих клітин. У той же час виникає потреба у порівняльному аналізі показників, які в об'єкті дослідження протікають як на клітинному рівні, так і в інтактної рослини. Це стосується і пшениці озимої. З цією метою здійснюється моніторинг несуперечливих параметрів життєдіяльності організму, які реалізуються як на рівні цілісної рослини, так і в недиференційованих клітин. Застосовано стандартні протоколи культури клітин, біохімічні та електрофоретичні методи. Отримано клітинні культури нових господарсько-цінних генотипів пшениці озимої селекції ІФРГ НАНУ. Встановлено особливості розвитку клітинних систем за біохімічними показниками та зроблено їх порівняння із характеристиками рослин. Генотипи пшениці озимої при культивуванні за нормальних умов проявляли спільні риси функціонування. Рослини та клітинні культури, отримані з нових генотипів пшениці озимої, проявляли особливості свого метаболізму, залежні від умов культивування. Встановлено подібність між показниками рівня вільного проліну в рослин та отриманих із них клітинних культур. Рівень вільного проліну доцільно аналізувати при паралельному дослідженні білкового пулу генотипів.

Ключові слова: пшениця озима, клітинна культура, білок, пролін.

Dynamic characteristics of winter wheat genotypes

Larysa Bronnikova, Mariya Dykun

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

Correspondence: Zlenko_lora@ukr.net

Abstract. Various methods connected with the implementation of single cells dynamic characteristics are actively used to speed up the selection process. At the same time the necessity of compared analysis of reactions developed on cellular and whole organism levels appears. This question is related to winter wheat. Due to this aim monitoring of reliable markers of organism viability developed both on cellular and organism levels is provided. There were used standard protocols of cell culture as well as biochemical methods and electrophoresis. Cell cultures of new perspective genotypes of winter wheat (author Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine) were obtained. According to biochemical data their development peculiarities were detected and compared with parameters of initial plants. There were no differences among genotypes developed under normal conditions. Plants as well as cell cultures initiated from those new winter wheat genotypes demonstrated metabolism changes depended on external conditions. Plant and cell proline parameters had similar features. It is better to combine the proline analysis with protein status controlling.

Keywords: winter wheat, cell culture, protein, proline.

ВСТУП

Задля відповідності змінним зовнішнім впливам на сільськогосподарське виробництво сучасна наука має максимально прискорити селекційний процес,

спрямований на створення сортів із поліпшеними характеристиками вегетації, якості продукції. Наразі *in vitro* біотехнології за рівнем пріоритетності починають випереджати традиційні методи отримання генетично змінених форм, з огляду на їх встановлені

переваги. У цьому напрямку спостерігаються значні досягнення. В той же час існує значна кількість рослин, особливо господарсько-цінних, для яких протоколи маніпуляцій потребують суттєвих адаптацій.

Давно встановлено, що система *in vitro* являє собою комбінований фактор, котрий здатний змінювати генетичну програму рослин. Звідси очевидно, що досягнення успіху спряжено із оптимізацією низки складових, а саме: складу живильних середовищ; пошуку первинних експлантатів і спеціальної їхньої підготовки; застосування/ротації умов вирощування тощо.

З іншого боку, необхідно постійно здійснювати моніторинг динамічних реакцій життєдіяльності об'єкта маніпуляції, порівнюючи їх реалізацію як на клітинному рівні *in vitro*, так і в інтактній рослині. В результаті порівняльних досліджень будуть встановлені ключові показники оптимального розвитку, які визначають інтегральні характеристики. Така ідеологія може сприяти встановленню базису селекції.

Це стосується пшениці озимої – стратегічної для нашої держави культури. Дана обставина пояснюється тим, що механізм регуляції морфогенезу у злаків у загальному випадку відрізняється рядом особливостей. Злакам властива висока гетерогенність калюсних тканин, низький морфогенетичний потенціал, послаблення аж до повного припинення регенераційної здатності при тривалому культивуванні.

Для деяких генотипів уже є протоколи отримання та культивування різних тканин і клітинних культур, але деталізація деяких ланок процедури для актуальних і перспективних сортів постійно продовжується [1–3].

Одночасно вивчають фізіолого-біохімічні показники життєдіяльності культур. Паралельний аналіз деяких із них надає можливість встановлювати діапазон норми реакції та стресу. Адаптація рослин до стресу включає зміни в регуляторних і метаболічних структурах. У ряді випадків життєдіяльність може підтримуватись як за рахунок реакцій клітинного рівня, так і за умов кооперативної (узгодженої) роботи організму. В цьому разі порівняльний аналіз функціонування клітина/організм має виключне значення.

Серед механізмів стресу/адаптації рослин суттєву роль відіграють сумісні низькомолекулярні протекторні сполуки. В першу чергу вільний пролін (*pro*). Відомо, що в загальному випадку рівень *pro* регулюється координованою дією систем синтезу/деградації/транспорту [4, 16]. При цьому цей факт зафіксовано як для інтактної рослини, так і для клітинних культур [5]. Водночас переміщення *pro* в межах клітини виявляє та окреслює внесок систем метаболізму; і навпаки, транспорт амінокислоти між органами, часто суттєво віддаленими, може маскувати місце синтезу осмоліту.

За стресових умов рівень вільного *pro* може збільшуватись. Однак високий рівень амінокислоти, як

такий, не може свідчити на користь механізмів його утворення, оскільки його акумуляція може виникати не тільки внаслідок активізації синтезу, але й у результаті деградації збагачених проліном білків. Про існування та метаболізм таких протеїнів повідомлялось [6, 17, 18].

Отже, має місце координація між вмістом вільного *pro* та білковим пулом. З огляду на це здійснювали паралельне дослідження вмісту цих показників життєдіяльності рослинних форм.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єктом дослідження було обрано генотипи пшениці озимої: УК 95/17, УК 322/17 селекції Інституту фізіології і генетики НАН України; клітинні культури отримані із проростків зрілих зернівок.

Калюс індукували із проростків зрілих зернівок розміром 1,0-1,5мм. Для отримання первинних експлантатів зернівки стерилізували та пророщували в асептичних умовах на живильному середовищі (МС) [7]. Індукцію калюсу здійснювали на середовищі В5 Гамборга [8]. У середовища для індукції калюсогенезу додавали ауксини та цитокініни у різному співвідношенні.

Активність життєдіяльності генотипів пшениці озимої за різних зовнішніх впливів оцінювали за інтегральними показниками. Для рослин було обрано активність проростання зернівок; зернівки пшениці озимої пророщували в чашках Петрі на фільтрувальному папері, змоченому водою (нормальні умови) або 0,5М розчином маніту (водний стрес).

Показником проліферації клітинних культур був відносний приріст сирової маси калюсу, Δm – традиційний показник інтенсивності життєдіяльності клітинних культур ($\Delta m = m_k - m_n / m_n$; m_k і m_n маси калюсу на початку та в кінці дискретного пасажу відповідно). Нормальні умови забезпечувало середовище В5 Гамборга; стресові умови створювали додаванням летальних для клітинних культур доз маніту або катіонів важкого металу кадмію, Cd^{2+} .

Вміст вільного проліну (*pro*) в рослинах і клітинних варіантах визначали за стандартною методикою [9]. Білковий склад визначали за [10].

Досліди здійснювались у триразовій біологічній повторюваності. Первинні дані статистично оброблялись.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Для більшості вищих рослин насіння є етапом онтогенезу, для розвитку якого потрібна вода, дефіцит якої негативно впливає на проростання. Зернівки пшениці озимої пророщували за різних умов (таблиця 1).

Таблиця 1

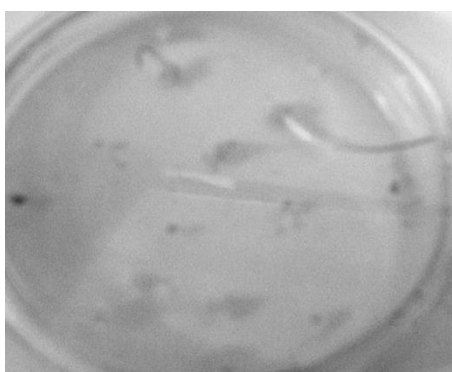
Вплив середовища на інтенсивність проростання зернівок генотипів пшениці озимої (%)

Генотип / Умови	5 доба		7 доба	
	H ₂ O	0,5M маніт	H ₂ O	0,5M маніт
УК 95/17	100	45,1 ± 1,7	100	68,3 ± 1,3
УК 322/17	100	58,7 ± 3,5	100	83,0 ± 2,3

З таблиці помітна стресова дія. Додавання маніту (зниження осмотичного тиску) викликало затримку проростання зернівок, особливо на початку досліді (5-а доба). Це, ймовірно, було пов'язано з обмеженістю доступу води, оскільки відомо, що маніт здатен відтягувати вологу з клітин рослин. На це можуть вказувати показники 7-ї доби: кількість

пророслих зернівок збільшилась. При цьому в генотипу УК 95/17 негативна дія водного стресу проявлена істотноше. Такий факт був відзначений у друках [11, 14, 15].

Із проростків зрілих зернівок отримано калюс. На рис. 1, а, б зафіксовано різні стадії формування клітинної культури.



а



б

Рис. 1. Калюсні культури, отримані із проростків пшениці озимої, генотип УК 95/17; а – реакції первинного експлантата на систему *in vitro*; б – нарощування біомаси; 3-й пасаж

Рисунок 1а відображає реакції первинного експлантату. Спостерігали всі типи реакцій, а саме: калюсогенез, пряме проростання, поєднання обох подій. Рисунок 1б фіксує активну проліферацію калюсу після оптимізації складу живильного середовища.

На рисунку зображено генотип УК 95/17, реакції генотипу УК 322/17 були аналогічними. Після отримання достатньої кількості біомаси калюс ділили на рівні частини і переносили на свіжі живильні середовища, які формували умови культивування, а саме: нормальні умови або стресові (додавання маніту або катіонів Cd²⁺).

Клітинні культури, отримані із вказаних генотипів, реагували на умови культивування відповідно до складу середовищ (таблиця 2). На це вказують дані відносного приросту. Додавання летальних для

клітинних культур доз маніту або катіонів важкого металу кадмію (Cd²⁺) призводило до загибелі культур у межах одного пасажу, що безумовно було очікуваною подією. З літератури відомо, що іони Cd²⁺ можуть негативно впливати на водний статус рослин [12, 13, 19]. Тобто середовища з додаванням різних токсичних агентів діяли аналогічним чином.

Іншими словами, можна припустити, що в обох випадках рослинні системи (клітинна популяція та багатоклітинний організм) потерпали від жорсткого зневоднення. Хоча у випадку іонного стресу (Cd²⁺) не виключена додаткова специфічна дія токсиканта на клітини калюсу. (Інтактні рослини можуть бути навіть гіперакумуляторами Cd²⁺).

Таблиця 2

Відносний приріст біомаси калюсу пшениці озимої при культивуванні за різних умов

Лінія / Середовище	Δm, відносний приріст біомаси		
	Середовище B5, н.у.	B5 + Cd ²⁺	B5 + маніт
95/17	4,16±0,11	елімінація	елімінація
322/17	3,97±0,29	елімінація	елімінація

Генотипи пшениці озимої УК 95/17 і УК 322/17 тестували за різних умов (таблиці 1, 2). Інтегральні реакції багатоклітинного організму або клітинної культури були аналогічними, з деякими geno-

типовими відмінностями. Ймовірно припустити, що причиною цього були аналогії в перебігах динамічних метаболічних процесів. Звичайно, за стресових умов могли виникнути певні (істотні) розбіжності.

Появу такої події доцільно відслідковувати за параметрами, пов'язаними з чутливістю/стійкістю. Одним із таких індикаторів є рівень вільного *pro*. Поліфункціональність даної сполуки є причиною її активного використання організмом за стресових умов, при адаптації та відновленні [4]. При цьому *pro* може діяти, акумулюючись у значних кількостях сам по собі, а також виступаючи як резервне трофічне та енергетичне джерело.

У генотипів пшениці озимої УК 95/17 і УК 322/17 аналізували вміст вільного *pro*. Фіксували аналогічні факти для всіх досліджуваних об'єктів.

Так, у молодих рослин за нормальних умов рівень амінокислоти був незначний, знаходився в межах $5,83 \div 8,00$ мг% / сиру речовину. У клітинних культур за абсолютною величиною він був практично такий – $7,25 \div 8,90$ мг% / сиру речовину. При цьому генотипової різниці не відзначали. Можна припустити, що за нормальних умов у рослинному організмі працюють внутрішньо клітинні механізми регуляції метаболізму *pro*.

За стресових умов рівень вільного проліну зростає. Для рослин зростання складало $12,71 \div 18,34$ мг% / сиру речовину. Обидва генотипи не виходили за межі рамок. Оскільки рівень *pro* вимірювали у надземній частині, то не виключена ймовірність підпорядкування диференційній просторовій експресії генів.

Для клітинних культур пшениці озимої відзначали значне збільшення рівня вільного *pro*. Так, для

генотипу УК 95/17 вміст амінокислоти у клітинах, культивованих у присутності Cd^{2+} , зростає до $49,33 \div 55,13$ мг% / сиру речовину; у присутності маніту збільшувався до $75,13 \div 81,21$. Для генотипу УК 322/17 дані були відповідно: $45,45 \div 48,09$ і $81,00 \div 113,12$ мг% / сиру речовину.

На наш погляд, таку ситуацію можна оцінити таким чином. По-перше, у досліджуваних генотипів пшениці озимої існують різні механізми адаптації до іонного (Cd^{2+}) та осмотичного (маніт) стресів. По-друге, у клітинній культурі УК 95/17 можливе існування незалежної від проліну системи осмопротекції. В літературі є чисельні дані про сахарозу і гексози як сумісні осмоліти [3].

Існує і третє пояснення. Клітинні культури пшениці озимої тестували за умов летальних стресів. Тому високий рівень проліну міг утворитись внаслідок деградації клітинних протеїнів, особливо збагачених проліном та оксипроліном [6].

Н. Терлецька (2012), з'ясувала вплив сумарних препаратів пептидів, отриманих із рослин і калюсних культур пшениці, різних за стійкістю до абіотичних стресів на хлоропласти *Elodea densa*. Препарати, отримані із стійких варіантів, відрізнялись більшим стимулюючим ефектом. Автор пояснює цей факт збереженням функціональної активності пептидів [11].

На рисунку 2 наведено електрофоретичний спектр пептидів, отриманих із калюсних культур генотипу пшениці озимої УК 322/17.

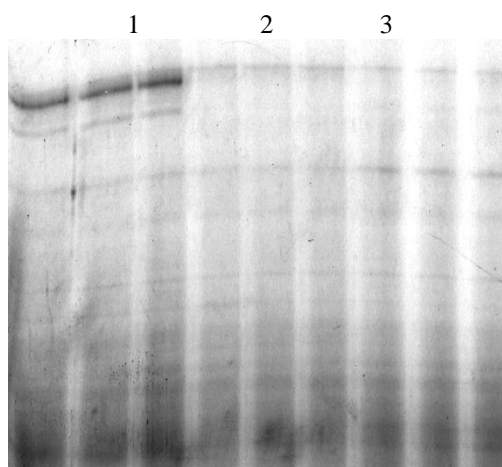


Рис. 2. Електрофорез препарату сумарних пептидів, отриманих із калюсних культур пшениці озимої; генотип УК 322/17. 1 – нормальні умови; 2 – маніт; 3 – іони кадмію

Спостерігається кількісне зменшення окремих пептидів у препараті, отриманому з калюсів, які перебували на середовищах із додаванням токсичних чинників. В той же час значного якісного збіднення спектру не відбувалось. Тобто зростання рівня проліну швидше за все відбувалось внаслідок деградації клітинних пептидів.

Досліджувани генотипи пшениці озимої мали типові аналогічні характеристики. При культивуванні за нормальних умов різниця між генотипами не встановлювалась. Однак дія жорсткими стресами створила можливість ранжування зразків. Порівняне

дослідження рослин і клітинних культур сприяло встановленню особливостей життєдіяльності. Такий підхід загалом може пришвидшити загальний селекційний процес.

ВИСНОВКИ

Генотипи пшениці озимої при культивуванні за нормальних умов проявляли спільні риси функціонування. Рослини та клітинні культури, отримані з нових генотипів пшениці озимої, проявляли особливості свого метаболізму, залежні від умов

культивування. Встановлено подібність між показниками рівня вільного проліну в рослин та отриманих із них клітинних культур. Рівень вільного проліну доцільно аналізувати при паралельному дослідженні білкового пулу генотипів.

ЛІТЕРАТУРА

- Larkin, P. G.; Scowcroft, W. R. Somaclonal variation – source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*; 1981, 60, pp 197–214.
- 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.
- Сергеева, Л. Е. Биология и биотехнология злаков *in vitro*. Клеточная селекция для повышения осмоустойчивости кукурузы и пшеницы. Кондор: Киев, 2020; 125 с.
- Szabados, L.; Savoure, A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci*; 2010, 15, pp 89–97. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.11.009
- Kaur, D.; Grewal, S. K.; Kaur, J.; Singh, S. Differential proline metabolism in vegetative and reproductive tissues determine drought tolerance in chickpea. *Biol. Plant.*; 2017, 61(2), pp 359–366. URL: <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0695-2>
- Battaglia, M.; Solorzano, R. M.; Hernandez, M.; et al. Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings. *Planta*; 2007, 225, pp 1121–1133. URL: <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0423-9>
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*; 1962, 15, pp 473–497.
- Gamborg, J. L.; Miller, R. A.; Ojima, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean roots. *Exp. Cell Res.*; 1968, 509, pp 151–158.
- Андрющенко, В. К.; Саянова, В. В.; Жученко, А. А.; Дьяченко, Н. И.; Чиликина, Л. А.; Дроздов, В. В.; Корочкина, С. К.; Череп, Г. И.; Медведев, В. В.; Нютин, Ю. И. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon Tournef.* *Изв. АН Молдавской ССР*; 1981, 4, с 55–60.
- Laemmli, V. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 1970, 227, 52–59, pp 680–685.
- Терлецкая, Н. В. Неспецифические реакции зерновых злаков на абиотические стрессы *in vivo* и *in vitro*. *Алматы*, 2012; 207 с.
- Tamás, L.; Mistrik, I.; Huttová, J.; Halusková, L.; Valentovicová, K.; Zelinova, V. Role of reactive oxygen species-generating enzymes and hydrogen peroxide during cadmium, mercury and osmotic stresses in barley root tip. *Planta*; 2010, 221, p 231. URL: <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1042-z>
- Singh, S.; Parihar, P.; Singh, R.; Singh, V. P.; Prasad, S. M. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics and ionomics *Frontiers in Plant Science*; 2016. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.201501143>
- Kaur, G.; Asthir, B. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biol. Plant.*; 2015, 59(4), pp 609–619. URL: <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0549-3>
- Polavarapu, B.; Kishor, K. P.; Kumari, H.; Sunita, M.S.L.; Sreenivasulu, N. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Front. Plant Sci.*; 20 July 2015. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00544>
- Noreena, S.; Akhtera, S.; Yaanind, T.; Arfan, M. The ameliorative effect of exogenously applied proline on physiological and biochemical parameters of wheat (*Triticum aestivum* L.) crop under copper stress condition. *J. of Plant Interaction*; 2018, V.13, 1, pp 221–230. URL: <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1437480>
- Khedr, H. A.; Abdas, M. A.; Wahid, A.A.A.; Quick, W. P.; Abogadallah, G. M. Proline induces the expression of salt responsive protein and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *J. of Experimental Botany*; V.54, 392, pp 2553–2562. URL: <https://doi.org/10.1093/jxb/erg277>
- Smith, S.; Zhu, S.; Joos, L.; Roberts, I.; et al. The CEP5 peptide promotes abiotic stress tolerance, as revealed by quantitative proteomics, and attenuates the AUX/IAA equilibrium in *Arabidopsis*. *Mol. Cell Proteomics*; 2020, 19(8), pp 1248–1262. URL: <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001826>
- Farhat, F.; Arfan, M.; Wang, X.; Taniq, A.; et al. The impact of bio-stimulation on Cd-stressed wheat (*Triticum aestivum* L.): insights into growth, chlorophyll fluorescence, Cd accumulation, and osmolyte regulation. *J. Frontiers in Plant Science*; 2022, V.13, pp 1–15. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.850567>