ISSN 1992-4917. ВІСНИК ХАРКІВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО АГРАРНОГО УНІВЕРСИТЕТУ СЕРІЯ БІОЛОГІЯ, 2018, вип. 1 (43), с. 46-56

УДК 581.2 581.143.6: 633.111.1

ВПЛИВ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ МІКРОМІЦЕТІВ РОДУ *FUSARIUM* НА РОСТОВУ РЕАКЦІЮ І АКТИВНІСТЬ ПЕРОКСИДАЗИ У ІЗОГЕННИХ ЗА ГЕНАМИ *VRN* ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ В УМОВАХ *IN VIVO* ТА *IN VITRO*

© 2018 р. О. О. Авксентьєва[1, 2], Н. В.Терентьєва[1]

[1]*Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна*

(Харків, Україна)

[2]*Київський національний університет ім. Тараса Шевченка*

(Київ, Україна)

Вивчали відповідь моногеннодомінантних ізогенних за генами *VRN* ліній (NILs) пшениці м'якої, створених у генофоні сорту Миронівська 808, на дію екзометаболітів (культуральних фільтратів – КФ) штамів видів *Fusarium oxysporum* та *Fusarium moniliforme* у системі *in vivo* та *in vitro*. У вегетаційних дослідах (*in vivo*) досліджували фітотоксичну дію КФ на листки рослин, їх вплив на ростові процеси та активність пероксидази. У культурі *in vitro* визначали ріст калюсів за ростовим індексом (PI), їх морфологічні та цитологічні показники і активність пероксидази. Встановлено, що лінії *VRN-A1a* та *VRN-D1a*, які швидко розвиваються, за всіма показниками як *in vivo* так і *in vitro* проявляють більший рівень реакції на вплив КФ штамів обох видів фузаріїв, ніж лінія *VRN-B1a* і сорт з уповільненим розвитком. Рівень прояву цієї реакції в усіх ліній на дію КФ у культурі *in vitro* був аналогічний тому, що проявлявся *in vivo*. Отримані результати дозволяють припустити, що гени *VRN* опосередковано беруть участь у формуванні стійкості до екзометаболітів роду *Fusarium*, а культура *in vitro* є адекватною системою для дослідження ефектів конкретних генів (зокрема *VRN*) на перебіг стресових реакцій у рослин пшениці.

Ключові слова: *Triticum aestivum, Fusarium oxysporum, Fusarium moniliforme, гени VRN, NILs, калюсна культура, фітотоксичність, ростовий індекс, пероксидаза, стійкість до фітопатогенів*

Пшениця м'яка – найцінніша продовольча культура, продуктивність якої залежить від реалізації генетично закладених властивостей, а також впливу умов навколишнього середовища, що діють на кожному етапі онтогенезу рослини (Моргун та ін., 2010).

Одним з факторів, що обмежують продуктивність пшениці м'якої, є ураження фузаріозними хворобами – кореневою гниллю, фузаріозною цвіллю та іншими, спричинюваними різними видами мікроміцетів роду *Fusarium* (Грицюк, 2013). Фітопатогенні гриби викликають у рослинах різні порушення метаболічних та фізіологічних процесів, що призводить до зниження їх продуктивності. Втрати зерна від фузаріозу складають в середньому близько 15-20% від потенційного врожаю. Факторами патогенності грибів є ферменти, мікотоксини та інші фізіологічно активні речовини, які продукуються ними.

Мікроміцети роду *Fusarium* поширені практично всюди. У біологічному плані вони вкрай неоднорідні – є яскраво виражені паразити, факультативні паразити і численні сапрофіти. Останніми роками паразитичні форми стають все більш агресивними і токсиногенними, випереджаючи у своїй еволюції еволюцію культурних рослин. Тому дослідження багатьох вчених спрямовані на удосконалення методів боротьби з цим небезпечним патогеном (Bruins, 1998).

Культура *in vitro* є сучасною модельною системою в фітобіологічних дослідженнях і широко використовується в клітинній селекції для отримання стійких до хвороб сортів рослин (Бавол та ін., 2009; Корня, 2011). Калюсоутво-

Адреса для кореспонденції: Авксентьєва Ольга Олександрівна, Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, майдан Свободи 4, Харків, 61022, Україна; e-mail: avksentyeva@karazin.ua

рення – це процес дедиференціації та активної проліферації і росту дедиференційованих клітин. Ці процеси в системі *in vitro* супроводжуються суттєвими структурно-функціональними, а саме гістологічними, біохімічними, цитоморфологічними перебудовами клітин (Кунах, 1998). Також в культурі *in vitro* спостерігається високий рівень геномної мінливості, що є однією з характерних рис калюсної культури (Кунах, 1998). Геномна нестабільність в популяції калюсних дедиференційованих клітин виникає за дії різноманітних внутрішніх та зовнішніх чинників. Геномні порушення можуть спостерігатися на рівні хромосом (поліплоїдія, анеуплоїдія, різні аномалії мітозу та ін.) та на рівні ДНК, що пов'язують зі змінами ступеня метилування нуклеїнових кислот, як в первинному калюсі (primery callus), так і у пересадковій калюсній культурі. Отже, у культурі *in vitro* відбуваються певні порушення у функціонуванні генетичного апарату рослинної клітини. Разом з тим, культура *in vitro* широко використовується як модель для вивчення різних аспектів морфогенетичних процесів у рослин. У зв'язку з цим постає питання адекватності цієї моделі тим процесам, які відбуваються у системі цілісної рослини, тобто *in vivo*. Це стосується, зокрема, функціонування системи генів *VRN*, яка є головною у регуляції темпів розвитку (швидкості морфогенетичних процесів) пшениці м'якої *in vivo* (Потокина и др., 2012).

Відомо, що тривалість онтогенезу, тип розвитку (ярий/озимий) і швидкість розвитку у пшениці м'якої *Triticum aestivum* L. детерміновані системою генів *VRN* (Стельмах та ін., 2000; Cockram et al., 2007). Гени системи *VRN* є регуляторними, вони клоновані і останніми роками для пшениці описано декілька їх алельних варіантів. Показано, що гени *Vrn-A1a* і *Vrn-B1a* кодують транскрипційні фактори: ген *Vrn-A1* кодує MADS-box транкріпційний фактор (Trevaskis, 2010), локус *Vrn-B1* містить два тандемно дуплікованих гени, що пригнічують фактор цвітіння ZCCT (Distelfeld et. al., 2009), а *Vrn-D1* кодує білок, схожий з інгібіторами Raf-кіназ (Мутерко та ін.., 2015). Ці гени, впливаючи на швидкість розвитку рослин, визначають також ряд інших господарсько-цінних ознак: структуру урожаю, морозо- та зимостійкість (Khotyljov, 2002).

Отже, на рівні цілісного рослинного організму досить детально досліджені вагомі аспекти функціонування системи генів *VRN*. Оскільки кожна рослинна клітина містить повну спадкову інформацію (повний «геном»), то логічно вважати, що при порушенні цілісності рослинного організму, зокрема, у системі *in vitro*, зберігатимуться ті ж ефекти генів *VRN*, що й у системі *in vivo*. Однак це питання не досліджене, хоча його вирішення може поглибити існуючі уявлення про функціонування рослинного організму як системи.

Вивчення молекулярно-генетичних механізмів функціонування *VRN* генів проводили переважно на моделях сортів або заміщених ліній пшениці ярої, що несуть один з генів *VRN* у домінантному або рецесивному стані (Потокина и др., 2012). Однак, для глибшого розуміння закономірностей прояву ефектів генів важливе вивчення їх усіх алельних варіантів, поєднаних в одному генотипі (генофоні), як цілісній системі генетичного контролю розвитку пшениці м'якої. Для цієї мети найбільш адекватними моделями можуть слугувати моногеннодомінантні майже ізогенні лінії (NILs) (Авксетьєва, 2013), які несуть в певному поєднанні (домінантне/рецесивне) всі три головних гени *VRN*.

Оскільки у формуванні стійкості до фітопатогенів істотну роль відіграє вік, фаза онтогенезу рослини, яка зазнала біотичного стресу, а біотехнологічні методи селекції стійких до патогенів сортів нині є пріоритетними (Моргун та ін., 2017), становить інтерес вивчити переддетермінацію генами контролю темпів розвитку пшениці *VRN* формування механізмів стійкості до біотичних стресів та порівняти ефекти за умов *in vivo* та *in vitro*.

Метою роботи було проведення скринінгу стійкості ізогенних за генами *VRN* ліній пшениці сорту Миронівська 808 до екзометаболітів роду *Fusarium* на рівні цілісного рослинного організму *in vivo* та популяції калюсних клітин *in vitro*.

МЕТОДИКА

Як рослинний матеріал використовували майже ізогенні NILs за генами *VRN* моногеннодомінантні лінії м'якої пшениці сорту Миронівська 808, що різняться за темпами розвитку: ізолінії *VRN-A1a* та *VRN-D1a*, що розвиваються швидкими темпами, та ізолінію *VRN-B1a*, яка розвивається повільно (Авксентьєва и др., 2015), а також вихідний сорт Миронівська 808, в генофоні якого були створені досліджувані лінії (Стельмах и др., 2000). Для дослідження впливу екзометаболітів використовували колекційні штами мікроміцетів *Fusarium oxysporum* та *Fusarium moniliforme* з колекції культур мікроорганізмів кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів ХНУ ім.В.Н. Каразіна.

Отримання культурального фільтрату (КФ). Для отримання культурального фільтрату мікроміцетів штами *Fusarium oxysporum* та *Fusarium moniliforme* культивували протягом 14 діб на неагаризованому живильному середовищі Чапека (Билай, 1977) за температури 22°С, після чого проводили фільтрацію через бактеріальний фільтр МСЕ 22. Отриманий стерильний фільтрат, що містив екзометаболіти мікроміцетів роду *Fusarium*, використовували для дослідів *in vivo* та додавали до живильного середовища Мурасиге і Скуга в співвідношенні 1:20 для проведення експериментів за умов *in vitro*.

Вегетаційні експерименти in vivo. Простерилізоване насіння дослідних ліній NILs сорту Миронівська 808 за асептичних умов пророщували у чашках Петрі по 15 насінин в кожній на фільтрувальному папері, додаючи по 5 мл стерильної води протягом 5 діб без освітлення. Потім у дослідні варіанти додавали по 5 мл стерильного культурального фільтрату (КФ) мікроміцетів роду *Fusarium*, в контрольні варіанти – 5 мл стерильного середовища Чапека. Чашки Петрі з проростками культивували у люмінестаті за освітлення 15 клк, 16-годинного фотоперіоду, температури 22/18°С (день/ніч). З використанням 10-денних проростків аналізували ростову реакцію за загальною довжиною та біомасою проростка та проводили визначення активності неспецифічних пероксидаз.

Проба на фітотоксичність за Білай. З надземної частини 10-добових проростків NILs робили висічки листів 2-3 см довжиною, поміщали в чашки Петрі на фільтрувальний папір та додавали у дослідні варіанти по 5 мл стерильного культурального фільтрату мікроміцетів роду *Fusarium*, в контрольні – 5 мл середовища Чапека. Чашки Петрі протягом 7 діб культивували у люмінестаті. Оцінку стійкості проводили візуально за морфологічними змінами висічок та визначали ступінь ураження за чотирибальною шкалою (Методи …, 1982).

Експерименти in vitro. У дослідах *in vitro* використовували пересадкові калюсні культури 2-3 пасажу ізогенних ліній пшениці, які були отримані зі зрілих зародків. У дослідні варіанти у живильне середовище Мурасиге-Скуга (МС) вносили КФ *Fusarium oxysporum* та *Fusarium moniliforme* у співвідношенні 1:20. Контрольні варіанти культивували на живильному середовищі МС + 2 мг/л 2,4 Д. Калюсні культури культивували у термостаті за температури 26°С протягом чотирьох тижнів, аналізуючи ростову реакцію за ростовим індексом (РІ), та проводячи цитологічну і морфологічну характеристику, також визначали активність пероксидази.

Ростовий індекс розраховували за формулою $S_1 – S_0/S_0 \times 100\%$ (Носов, 2011). Цитологічні дослідження проводили на тимчасових мікропрепаратах за допомогою світлового мікроскопа БІОЛАМ (Росія), попередньо мацеруючи калюсні тканини розчином 10% хромової кислоти (Барыкина и др., 2004). Кількість клітин розраховували, використовуючи камеру Фукса-Розенталя. Довжину клітин вимірювали за допомогою відео-окуляра. Для кожної лінії було проаналізовано не менш 400 клітин.

Активність неспецифічної пероксидази. Визначення активності пероксидази (КФ 1.11.1.7) в проростках та калюсах ізоліній проводили за методом Бояркіна (Методы …, 1987). Рослинний матеріал гомогенізували в ацетатному буфері (рН 5,4), гомогенат центрифугували протягом 15 хв при 1000 g, у супернатанті визначали активність, використовуючи як донор водню бензидин, а як субстрат – пероксид водню. Активність ферменту виражали в умов. од./(г сирої речовини · хв.).

Статистичний аналіз. Проведено три біологічні серії експериментів *in vivo* та дві серії експериментів *in vitro*. Статистичну обробку результатів проводили з використанням *t*- критерію Стьюдента за допомогою пакету програм Excel 2010. Достовірними вважали відмінності при $P \leq 0{,}05$ (Атраментова, Утевская, 2008). У таблицях наведені середні арифметичні значення та їх стандартні похибки.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що ростова реакція та зміни накопичення біомаси є інтегральними показниками відповіді рослинного організму на дію стресорів. За дії КФ *Fusarium oxysporum* та *Fusarium moniliforme* загальна довжина проростків (лінійний ріст) у ліній *VRN-A1a* і *VRN-B1a* практично не змінювалася порівняно з контролем (табл. 1). Водночас, цей показник у лінії *VRN-D1a* і сорту знижувався за впливу *F. oxysporum*. КФ *F. moniliforme* не викликав зміни лінійного росту у лінії *VRN-D1a*, але істотно інгібував його у рослин сорту.

Зазначимо, що КФ *F. moniliforme* проявляв меншу інгібуючу дію на лінійний ріст досліджуваних ліній, ніж КФ *F. oxysporum*, і навіть незначною мірою стимулював його у ізолінії *VRN-B1a*. Ймовірно, це може бути пов’язане з відмінностями між досліджуваними видами (штамами) фузаріїв за характером метаболіч-

Таблиця 1. Вплив КФ мікроміцетів роду Fusarium на ростову реакцію проростків ізогенних за генами *VRN* ліній пшениці сорту Миронівська 808

Ізолінія	Контроль	*F. oxysporum*	*F. moniliforme*
Загальна довжина, см			
VRN A1a	20,68±1,03	19,78±0,98	20,36±0,10
VRN B1a	16,80±0,84	17,4±0,87	17,92±0,89*
VRN D1a	22,96±1,14	19,86±0,99*	21,66±0,10
сорт**	10,83±0,54	5,88±0,29*	7,28±0,36*
Загальна біомаса, мг			
VRN A1a	212±10,60	120±6,0*	165±8,25*
VRN B1a	103±5,15	78±3,90*	97±4,85
VRN D1a	178±8,90	143±7,15*	173±8,75
сорт**	67±3,35	35±1,75*	52±2,60 *
Відношення маса/довжина, мг/см			
VRN A1a	10,25±0,53	6,06±0,50*	8,10±0,46*
VRN B1a	6,14±0,40	4,48±0,43*	5,41±0,45
VRN D1a	7,75±0,63	7,20±0,46	7,99±0,52
сорт**	6,18±0,15	5,95±0,21	7,14±0,13*

Примітки.* відмінності між варіантами та контролем істотні при $P \leq 0,05$; ** всі гени *vrn* представлені рецесивними алелями (генотип *vrn A1b B1b D1b*).

Таблиця 2. Фітотоксична дія екзометаболітів мікроміцетів *Fusarium oxysporum* та *Fusarium moniliforme* на висічках листків ізогенних ліній пшениці сорту Миронівська 808

Ізолінія	Контроль	*F. oxysporum*	*F. moniliforme*
Ступінь стійкості			
VRN A1a	++++	++	+++
VRN B1a	+++	+	++
VRN D1a	++++	++	+++
сорт*	++	+	++
Морфологічні зміни висічок листків			
VRN A1a	легке пожовтіння	пожовтіння	жовті плями
VRN B1a	окремі жовті плями	некротичні ділянки	пожовтіння
VRN D1a	легке пожовтіння	пожовтіння	жовті плями
сорт*	пожовтіння	некротичні ділянки	пожовтіння

Примітки. ++++ - листки майже без змін зеленого кольору; +++ - пожовтіння у вигляді окремих плям; ++ - рівномірне пожовтіння всієї висічки листків; + повна втрата кольору, некроз асиміляційних тканин листків; * всі гени *vrn* представлені рецесивними алелями (генотип *vrn A1b B1b D1b*).

них процесів, а отже і складом метаболітів їх культуральних фільтратів.

Зокрема, це може бути спричинене різним вмістом рістстимулюючих чи/або рістінгібуючих речовин у складі КФ. Відомо, що фузарії синтезують речовини фітогормональної природи, у тому числі гібереліно- та ауксиноподібні сполуки (Nikolson et al., 2007).

Визначення загальної біомаси рослин, яка відображає перебіг біосинтетичних процесів, показало, що КФ обох штамів пригнічували її накопичення у всіх ліній і сорту порівняно з контролем (табл. 1). При цьому пригнічення більшою мірою проявлялося за дії КФ *F. oxysporum*, ніж *F. moniliforme*.

Однак, ступінь пригнічення накопичення біомаси залежав від генотипу ізоліній за генами *VRN*. Так, КФ *F. oxysporum* знижував рівень біомаси у лінії *VRN-A1a* та сорту на 43 і 48% відповідно, у ліній *VRN-B1a* на 34%, а у лінії *VRN-D1a* тільки на 20% порівняно з контролем (табл. 1). КФ *F. moniliforme* помітно (на 22%) пригнічував накопичення біомаси тільки у лінії *VRN-A1a* і сорту, в той час як у ліній *VRN-B1a* і *VRN-D1a* це пригнічення було неістотним.

Виявлені нами відмінності ростової дії КФ досліджуваних штамів фузаріїв збігаються

Рис. 1. Вплив КФ *Fusarium moniliforme* та *Fusarium oxysporume* на фізіологічний стан листків ізогенних за генами *VRN* ліній сорту Миронівська 808.

з даними літератури, згідно з якими штами *F. graminearum* проявляли різний рівень фітотоксичності (Корня, Игнатова, 2008; Мазур, Игнатова, 2008).

Для з'ясування можливого зв'язку між лінійним ростом та процесом утворення біомаси за дії КФ фузаріозних грибів на рослини досліджуваних ліній ми розраховували відношення маси до довжини проростків (Корня, 2011). Цей показник до певної міри може відображати ефективність перебігу біосинтетичних процесів у рослин за дії стресових чинників.

Результати показали, що відношення маса/довжина проростків знижувалося за впливу КФ *F. oxysporum* в усіх ліній і сорту, а за обробки КФ *F. moniliforme* у ліній *VRN-A1a* і *VRN-B1a*, але дещо підвищувалося у лінії *VRN-D1a* і сорту порівняно з контролем (табл. 1). Найбільш помітним це зниження було у ліній *VRN-A1a* і *VRN-B1a* за дії КФ *F. oxysporum* (на 41 та 27% відповідно) та у цих ліній за впливу КФ *F. moniliforme* (на 21 і 12% відповідно) (табл. 1).

Таким чином, одержані результати показали, що під впливом КФ штамів фузаріїв зміна ростових процесів залежить від генотипу ізогенних за генами *VRN* ліній пшениці м'якої.

На нашу думку, це можна пояснити тим фактом, що досліджені лінії розрізняються за темпами ростових процесів та розвитку. Ізоліній *VRN-A1a* і *VRN-D1a* властиві більш інтенсивні ростові процеси і прискорені темпи розвитку порівняно з лінією *VRN-B1a* та сортом (Авксентьєва и др., 2015). Крім того, показано, що лінії *VRN-A1a* і *VRN-D1a*, які швидко розвиваються, відрізняються від лінії зі сповільненими темпами розвитку *VRN-B1a* та сорту за інтенсивністю обміну вуглеводів і азоту, а також за фітогормональним статусом і активністю ряду ферментів (Жмурко та ін., 2017). Виявлені відмінності цих генотипів і за стійкістю до абіотичних стресорів (Avksentyeva, Zhmurko, 2014). Ймовірно, що ці відмінності між лініями можуть зумовити їх різну ростову реакцію на обробку КФ досліджених штамів фузаріїв.

Нами проведено також визначення фітотоксичності КФ штамів *F. oxysporum* та *F. moniliforme* у тестах на висічках листків досліджуваних ізогенних ліній. Результати показали, що КФ обох штамів грибів проявляли фітотоксичну дію на всі лінії, хоча штам *F. moniliforme* значно меншою мірою, ніж штам *F. oxysporum* (табл. 2). Проте, ефект залежав від генотипу ліній за генами *VRN*. Так, найбільш істотні пошкодження виявлені на висічках листків лінії *VRN-B1a* (рис. 1).

Це може бути пов'язано з вищою інтенсивністю фізіолого-біохімічних процесів у ліній *VRN-A1a* і *VRN-D1a* порівняно з *VRN-B1a*,

Таблиця 3. Вплив КФ мікроміцетів роду *Fusarium* на ростовий індекс (PI) та морфологічну характеристику калюсів ізогенних ліній пшениці сорту Миронівська 808

Ізолінія	Контроль	*F. oxysporum*	*F. moniliforme*
Ростовий індекс (PI), %			
VRN A1a	21,2±0,92	26,8±1,05*	31,5±1,63*
VRN B1a	18,2±0,51	11,4±0,42*	21,1±0,92*
VRN D1a	15,3±0,49	24,3±0,98*	37,6±1,74*
сорт**	18,9±0,83	16,3±0,53	25,9±1,17*
Морфологічна характеристика калюсів			
VRN A1a	оводнені,	підсохлі,	крупні,
VRN B1a	прозорі,	сіро- жовтуваті,	оводнені, прозорі, білу-
VRN D1a	біло-жовтуваті,	з некротичними ділянками	ваті, гетерогенні
сорт**	компактні		

Примітки. Тут і в табл. 4, 5: * відмінності між варіантами та контролем істотні при $P \leq 0,05$; ** всі гени *vrn* представлені рецесивними алелями (генотип *vrn A1b B1b D1b*)

Таблиця 4. Вплив КФ мікроміцетів роду *Fusarium* на цитологічні характеристики калюсів ізогенних ліній пшениці сорту Миронівська 808

Ізолінія	Контроль	*F. oxysporum*	*F. moniliforme*
Число клітин $N \cdot 10^6$/г сирої маси			
VRN A1a	12,5±0,63	9,9±0,48*	9,1±0,39*
VRN B1a	5,9±0,27	7,7±0,33*	12,7±0,63*
VRN D1a	6,0±0,25	5,2±0,24	5,9±0,27
сорт**	5,6±0,28	7,2±0,32*	8,1±0,40*
Довжина клітини, мкм			
VRN A1a	60,0±3,12	102,1±5,38*	95,2±4,62*
VRN B1a	133,3±7,18	93,7±4,62*	125,1±6,75
VRN D1a	61,0±2,36	67,3±2,72	84,7±4,58*
сорт**	93,4±4,62	63,5±2,61*	71,6±3,29*

що може бути одним із чинників підтримання достатнього рівня функціонування листка за дії несприятливих чинників (у наших дослідах КФ фузаріїв).

Отже, одержані результати дозволяють припустити, що в умовах *in vivo* різний рівень прояву реакцій досліджених ізогенних ліній на дію КФ штамів *Fusarium oxysporum* та *Fusarium moniliforme* визначається станом генів *VRN* у ліній – домінантний або рецесивний, за яким вони різняться між собою. Ймовірно, що реалізація ефектів цих генів у відповідь на обробку КФ відбувається опосередковано, через їх участь у регуляції фізіолого-біохімічних процесів.

Для дослідження ефектів генів *VRN* на вплив КФ фузарій при порушенні цілісності рослинного організму слугувала модель калюсної культури ізогенних ліній.

Вивчення дії КФ мікроміцетів роду *Fusarium* на ростовий індекс (PI) калюсів показало, що цей показник по-різному змінювався залежно від штаму і генотипу ліній за генами *VRN* (табл. 3). Так, КФ *F. moniliforme* викликав збільшення відносно контролю PI всіх ліній і сорту на відміну від КФ *F. oxysporum*. КФ *F. oxysporum* збільшував PI у лінії *VRN-A1a* і *VRN-D1a*, але зменшував його у лінії *VRN-B1a* і сорту порівняно з контролем. Найбільш значне зменшення PI виявлено у лінії *VRN-B1a*, меншим, воно було у сорту. КФ *F. moniliforme*, хоча й стимулював ріст калюсів досліджених ліній, але по-різному: найменше стимулювання виявлене для калюсів лінії *VRN-B1a*.

За дії КФ обох штамів калюси досліджуваних ліній відрізнялися за морфологічними характеристиками, які певною мірою відображали зміни у PI (табл. 3, рис. 2). Дія екзометаболітів фітопатогенів роду *Fusarium* за культивування протягом чотирьох тижнів проявлялася у змінах морфологічної структури калюсів. Так, у контрольних варіантах формувалися типові калюсні маси – невеликі, компактні, прозорі, біло-жовтуватого кольору. Найбільші зміни калюсів за морфологічними ознаками спостерігалися за впливу екзометаболітів *F. oxysporum*. При цьому в усіх ізоліній калюси дещо змен-

А Б В

Рис. 2. Вплив екзометаболітів на калюсогенез ізогенної лінії *VRN-A1a* за культивування на середовищі: А – МС + 2мг/л 2,4 Д (контроль); Б – МС + 2 мг/л 2,4 Д + КФ *Fusarium oxysporum*; В – МС + 2мг/л 2,4 Д + КФ *Fusarium moniliforme*.

шувалися у розмірах, підсихали, ставали щільними, непрозорими, змінювали колір на сірий, жовтувато-коричневий, іноді спостерігалися некрози. За впливу КФ *F. moniliforme* калюси ізоліній змінювали колір на жовто-коричневий, ставали менш структурованими, гетерогенними, значно збільшували розмір, але залишалися оводненими та прозорими. Ізолінія *VRN-D1a* зазнавала найменших змін за морфологічною структурою калюса під впливом КФ *F. oxysporum* та *F. moniliforme*, відбувалися тільки зміни кольору калюсних тканин.

Внесення культурального фільтрату мікроміцетів роду *Fusarium* в середовище культивування калюсів ізоліній пшениці впливало на їх цитологічні характеристики. Ріст калюсної тканини забезпечується одночасним перебігом двох процесів – інтенсивною проліферацією калюсних клітин та їх ростом розтягуванням. Ріст клітин розтягуванням в рослинах здійснюється симпластним шляхом, супроводжується посиленням синтетичних процесів і накопиченням в клітині осмолітів, що призводить до збільшення об’єму клітини. Відомо, що в калюсній тканині поділ та розтягування відбуваються одночасно та не розділені у просторі. Оскільки ростова реакція калюсів може забезпечуватися як проліферацією, так і вакуолізацією клітин, ми визначали щільність калюсів – кількість клітин в 1 г сирої маси калюсів та максимальну довжину калюсних клітин (табл. 4).

Результати наших дослідів показали, що ізолінії, які розрізняються за темпами розвитку за умов *in vivo*, по-різному реагують на дію екзометаболітів фітопатогенів. У ізолінії *VRN-A1a*, яка відрізняється швидким ростом, в умовах *in vivo* в калюсній культурі під дією КФ фітопатогенів показник кількості клітин в 1 г калюсу знижувався, але зростала довжина калюсних клітин. У ізолінії *VRN B1a*, яка розвивається повільно, та сорту Миронівська 808 за дії екзометаболітів, навпаки, зростала кількість клітин в 1 г калюсної маси, але зменшувалися їх розміри. Таким чином, в калюсах ізолінії *VRN-A1a* за впливу екзометаболітів гальмувалися процеси проліферації клітин, а у ізолінії *VRN-B1a* та сорту – пригнічувався ріст розтягуванням. Результати дослідження цитологічних характеристик калюсів дають підстави припустити, що серед ізоліній максимальну стійкість до КФ фузаріїв виявляє ізолінія *VRN-D1a*.

Отже, залежно від генотипу за генами *VRN*, у досліджуваних ізоліній проявлявся різний рівень реакції на дію КФ штамів обох видів фузаріїв.

Рослинні пероксидази (КФ 1.11.1.7) є широко досліджуваною групою ферментів, що зумовлено їх участю в багатьох фізіологічних процесах в рослинах, в першу чергу пов'язаних з механізмами захисту, метаболізмом ауксину і біосинтезу полімерів клітинної стінки, таких як лігнін і суберин, що виконують функції фізичного бар'єру при впливі біотичних і абіотичних стресових факторів (Шарова, Медведев, 2017). Відомо, що активність та ізоферментний спектр пероксидаз змінюється за дії абіотичних та біотичних стресорів (Андреева, 1989; Молодченкова, 2009; Minibaeva et al., 2009; Weissinger et. al., 2013; Колупаєв, 2017).

Таблиця 5. Вплив КФ мікроміцетів роду *Fusarium* на активність пероксидази в проростках та калюсах ізогенних ліній пшениці сорту Миронівська 808 (умов. од./(г сирої речовини · хв.))

Ізолінія	Контроль	*F. oxysporum*	*F. moniliforme*
Листки *(in vivo)*			
VRN A1a	7,98±0,39	12,05±0,60*	20,27±1,01*
VRN B1a	19,20±0,96	21,84±1,09	15,33±0,76*
VRN D1a	6,73±0,33	9,82±0,49*	7,40±0,37
сорт**	14,4±0,72	11,9±0,59*	9,82±0,49*
Калюси (*in vitro*)			
VRN A1a	2,54±0,13	4,08±0,23	3,47±0,16
VRN B1a	8,83±0,44	2,63±0,12*	2,89±0,14*
VRN D1a	1,05±0,09	2,23±0,13	1,87±0,10
сорт**	4,16±0,23	1,95±0,09*	2,57±0,13*

Зважаючи на це, ми визначали активність пероксидази у проростках (*in vivo*) та у калюсах (*in vitro*) рослин ізогенних за генами *VRN* ліній пшениці м'якої. Встановлено, що в контролі (за відсутності дії КФ фузараїв) лінії істотно різнилися за активністю пероксидаз в умовах як *in vivo*, так і *in vitro* (табл. 5). На нашу думку, це може свідчити про залежність пероксидазної активності від генотипу ліній за генами *VRN*. Разом з тим, під впливом КФ обох штамів фузаріїв відбувалася зміна активності пероксидази у ліній *in vivo* та у калюсах *in vitro*. Так, порівняно з контролем у проростках ліній *VRN-A1a* і *VRN-D1a*, які швидко розвиваються, виявлене істотне підвищення активності ферменту, а у лінії *VRN-B1a* і сорту, які розвиваються повільно, її значне зниження.

У калюсах досліджених ліній і сорту виявлена така сама закономірність у зміні активності пероксидази за впливу КФ штамів фузаріїв обох видів, як у рослин *in vivo* – підвищення її у ліній *VRN-A1a* і *VRN-D1a* та зниження у лінії *VRN-B1a* і сорту порівняно з контролем (табл. 5).

Враховуючи численні відомості про позитивний зв'язок між активністю пероксидази і стійкістю рослин до стресорів різної природи (Abedini, Daie-Hassani, 2015; Синькевич и др., 2016), ми схиляємось до думки, що лінії *VRN-A1a* і *VRN-D1a*, які швидко розвиваються, можуть бути стійкішими до біотичного стресу (у наших дослідах до грибів роду *Fusarium*), ніж лінія *VRN-B1a* і сорт (гени *vrn* у рецесивному стані), що розвиваються повільно.

Таким чином, одержані результати свідчать, по-перше, про різний рівень відповіді досліджених ліній на дію КФ двох видів фузаріїв, який залежить від стану генів *VRN*, а по-друге, про аналогічні закономірності у прояві відповіді ліній на стресор у системі *in vivo* та *in vitro*.

Спираючись на ці, одержані нами раніше (Авксентьєва, Шулік, 2016) та літературні дані, ми припускаємо, що гени *VRN* можуть бути задіяними у формуванні стійкості до біотичних стресорів, зокрема до фузаріїв. Безумовно, що прояву фенотипового ефекту генів передує функціонування складної генної сітки регуляції молекулярних процесів, в якій задіяні не тільки гени *VRN*, а цілі системи генів (Маркель, 2016). Тим не менше, досліджені лінії при однаковому генофоні сорту Миронівська 808, по-різному реагували на дію біотичного стресора, що залежало від їх генотипу за генами *VRN*, а саме від стану цих генів (домінантний/рецесивний). На нашу думку, не стан окремих алелів *VRN* як такий, а саме певне поєднання рецесивних і домінантних алелів є вагомим чинником у регуляції функціонування механізмів стійкості. Можливо, що гени *VRN* здатні її детермінувати опосередковано, через їх участь у регуляції фізіолого-біохімічних процесів, про що свідчать показники зміни ростових процесів, фітотоксичності та активності пероксидази як у системі цілісної рослини (*in vivo*), так і в калюсній культурі (*in vitro*).

Припущення про участь системи генів *VRN* у формуванні стійкості може підтверджуватися тим фактом, що порушення цілісної рослини (культра *in vitro)* практично не призводить до зміни реакції досліджуваних ліній на дію КФ роду *Fusarium*. Тобто, ефекти генів *VRN* як складової геному клітини здатні опосередковано детермінувати механізми стійкості *in vitro*, подібно до того, як це відбувається *in vivo*. Отже, культура *in vitro* може слугувати адекватною моделлю для вивчення ефектів конкретних

генів (у нашому випадку *VRN*) на закономірності перебігу стресових реакцій.

ЛІТЕРАТУРА

Авксентьева О.А. Характеристика объектов исследования в современной фитофизиологии // Матли науково-методичного семінару «Фізіологія рослин у системі сучасних біологічних знань та наук» (Харків, 20 березня 2013 р.). – Х.: Вид. центр ХНУ, 2013. – С. 8-10.

Авксентьева О.А., Шулик В.В., Жмурко В.В. Аллельные варианты генов *VRN* и темпы развития изогенных линий пшеницы // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. – Т. 17. – С. 17-22.

Авксентьєва О.О., Шулік В.В. Алельний стан і ефекти генів *VRN* пшениці м'якої у системі in vivo та in vitro // Вісн. Дніпр. ун-ту. Біологія, екологія. – 2016. – Вип. 24 (1). – С. 222-230.

Андреева В.А. Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений. – М.: Наука, 1988. – 128 с.

Атраментова Л.А., Утевская О.М. Статистические методы в биологии. – Горловка, 2008. – 247 с.

Бавол А.В., Дубровная О.В., Лялько И.И. Селекция in vitro мягкой пшеницы на устойчивость к *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т.41. №4. – С. 314-321.

Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. – М.: Изд-во МГУ, 2004. – 312 с.

Билай В.И. Фузарии. – Киев: Наук. думка, 1977. – 442 с.

Грицюк Н.В. Стійкість сортів пшениці озимої проти фузаріозної інфекції за різних строків ураження // Карантин и защита растений. – 2013. – № 10. – С. 1-3.

Жмурко В.В., Авксентьєва О.О., Юхно Ю.Ю., Попова Ю.В., Самойлов А.М., Тимошенко В.Ф., Васильченко М.С., Шулик В.В., Зубрич О.І. Ефекти генів фотоперіодичної чутливості та потреби в яровизації на фізіолого-біохімічні процеси у рослин пшениці м'якої та сої культурної // Фізіологія рослин: досягнення та нові напрями розвитку. – К.: Логос, 2017. – С. 187-197.

Колупаєв Ю.Є. Антиоксиданти рослин: протекторні та сигнально-регуляторні функції // Фізіологія рослин: досягнення та нові напрями розвитку. – К.: Логос, 2017. – С. 253-281.

Корня Т.М. Эффективность использования морфофизиологических признаков для оценки *in vitro* устойчивости образцов мягкой пшеницы к *Fusarium graminearum* // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2011. – Вип. 1 (22). – С. 76-83.

Корня Т.М., Ігнатова С.О. Вивчення селективних властивостей фільтрату культуральної рідини *Fusarium graminearum* schwabe в культурі пилякiв м'якої пшениці // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 3 (15). – С. 99-106.

Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 4. Изменчивость в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Биополимеры и клетка. – 1998. –Т. 14, № 4. – С. 298-319.

Мазур А.Л., Игнатова С.А. Влияние фильтрата культуральной жидкости *Fusarium graminearum* на индукцию каллуса и регенерацию растений в культуре *in vitro* незрелых зародышей мягкой пшеницы // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 1 (13). – С. 71-76.

Маркель А.Л. Физиологическая генетика // Вавиловский журнал селекции и генетики. – 2014. – Т.18, № 1. – С. 112-124.

Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 429 с.

Методы экспериментальной микологии. Справочник / Под ред. В.И. Билай. – Киев: Наук. думка, 1982. – 552 с.

Молодченкова О.О. Активность НАДФН-оксидазы, содержание пероксида водорода и салициловой кислоты в проростках ярового ячменя при фузариозной инфекции и действии салициловой кислоты // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, №4. – С. 321-327.

Моргун В.В., Дубровна О.В., Моргун Б.В. Отримання стійких до стресів рослин пшениці біотехнологічними методами // Фізіологія рослин: досягнення та нові напрями розвитку. – К.: Логос, 2017. – С. 393-412.

Моргун В.В., Швартау В.В., Киризий Д.А. Физиологические основы формирования высокой продуктивности зерновых злаков // Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. – Т.42, № 5. – С. 371-393.

Мутерко О.Ф., Балашова І.А., Файт В.І., Сиволап Ю.М. Молекулярно-генетичні механізми регуляції типу розвитку пшениці // Цитология и генетика. – 2015. – Т. 49, № 1. – С. 71-86.

Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – С. 386-402.

Потокина Е.К, Кошкин В.А., Алексеева Е.А., Матвиенко И.И., Филобок В.А., Беспалова Л.А. Комбинация аллелей генов *PPD* и *VRN* определяют сроки колошения у сортов мягкой пшеницы // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16, № 1. – С. 77-84.

Синькевич М.С., Селиванов А.А., Антипина О.В., Кропочева Е. В., Алиева Г.П., Суворова Т.А., Астахова Н.В. Мошков И.Е. Активность антиоксидантных ферментов у растений *Arabidopsis thaliana* при закаливании // Физиология растений. – 2016. – Т. 63, №6. – С. 777-782.

Стельмах А.Ф., Файт В.И., Мартынюк В.Р. Генетические системы типа и контроля скорости развития мягкой пшеницы // Цитология и генетика. – 2000. –Т. 34, № 2. – С. 39-45.

Шарова Е.И., Медведев С.С. Редокс-реакции в апопласте растущих клеток // Физиология растений. – 2017. – Т. 64, № 1. – С. 3-19.

Abedini M., Daie-Hasani B. Salicylic acid affects wheat cultivars antioxidant system under saline and non-saline condition // Russ. J. Plant Physiol. – 2015. – V. 62. – P. 604-610.

Avksentyeva O.A., Zhmurko V.V. Genes Ppd and Vrn as components of molecular genetic system of wheat regulation resistance (*Triticum aestivum* L.) to abiotic stress // Molecular Approaches in Plan Abiotic Stress / Eds. R.K. Gaur, P. Sharma. – CRC Press, 2014. – P. 1-20.

Bruins M.B.M. Fusarium head blight resistance in wheat. – Wageningen, 1998. – 131 p.

Cockram J, Jones H, Leigh F., O'Sullivan D, Powell W, Laurie D., Greenland A. Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication and sustainable productivity // J. Exp. Bot. – 2007. – V. 58. – P. 1231-1244.

Distelfeld A., Tranquilli G., Li C., Yan L., Dubcovsky J. Focus issue on the grasses: genetic and molecular characterization of the *VRN2* loci in tetraploid wheat // Plant Physiol. – 2009. – V. 149. – P. 245-257.

Khotyljov L. ,Kaminskaya L., Koren L. Influence of genetic systems of *Vrn*- and *Ppd* genes on the ecological adaptation of wheat and triticale // Pradzia. LEIDINIA L. Biologija. – 2002. – № 4. – P. 45-48.

Minibaeva F., Kolesnikov O., Chasov A., Beckett R.P., Luthje S., Vylegzhanina N., Buck F., Bottger M. Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species // Plant Cell Environ. – 2009. – V. 32. – P. 497-508.

Nicolson P., Gosman N., Draeger R. The Fusarium head blight pathosystem // Wheat Production in Stressed Environments. Developments in Plant Breeding / Eds. H.T. Buck, J.E. Nisi, N. Salomón. – Dordrecht: Springer, 2007. – V. 12. – P. 23-36.

Trevaskis B. The central role of the *VERNALIZATION1* gene in the vernalization response of cereals // Funct. Plant Biol. – 2010. – V. 37. – P. 479–487.

Weissinger H., Gosch C., Abdel-Fattah H., Spornberger A., Stich K. Peroxidase activity in roots and root exudates of strawberry – linked to the resistance to root pathogens? // Mitteilungen Klosterneuburg. – 2013. – V. 63. – P. 208-212.

Надійшла до редакції
06.11.2017 р.

INFLUENCE OF EXOMETABOLITES OF *FUSARIUM* MICROMYCETES ON GROWTH REACTION AND PEROXIDASE ACTIVITY IN WHEAT LINES ISOGENIC BY *VRN* GENES *IN VIVO* AND *IN VITRO*

O. O. Avksentiieva[1, 2], N. V. Terentiieva[1]

[1]*Karazin Kharkiv National University*
(Kharkiv, Ukraine)
E-mail: avksentyeva@karazin.ua
[2]*Taras Shevchenko National University of Kyiv*
(Kyiv, Ukraine)

On models of monogenodominant, isogenic by *VRN* genes, lines of soft wheat genotypes of Myronivskaya 808, level of their response to the action of exometabolites (culture filtrate, CF) of species *Fusarium oxysporum* and *Fusarium moniliforme* in the *in vivo* and *in vitro* system was studied. In growth experiments (*in vivo*) the phytotoxic action of CF on leaves of plants, their influence on growth processes and activity of peroxidase were determined. *In vitro* culture there were determined growth of the callus with growth index (GI), its morphological and cytological characteristics, and activity of peroxidase. It has been established that fast-growing *VRN-A1a* and *VRN-D1a* lines exhibit a higher response rate to the influence of CF strains of both species of *Fusarium* than the *VRN-B1a* line and the slow-growing variety, this was shown on all indicators, both *in vivo* and *in vitro*. Moreover, the level of manifestation of this reaction in all the lines to the action of CF *in vitro* was similar to that was manifested *in vivo*. The obtained results suggest that the *VRN* genes indirectly

contribute to the formation of resistance to exometabolites g. *Fusarium*, and *in vitro* culture is an adequate system for investigating the effects of specific genes (in particular, *VRN*) on course of stress reactions in wheat plants.

Key words: *Triticum aestivum, Fusarium oxysporum, Fusarium moniliforme, VRN genes, NILs, callus culture, phytotoxicity, growth index, peroxidase, resistance to phytopathogens*

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *FUSARIUM* НА РОСТОВУЮ РЕАКЦИЮ И АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДЫ У ИЗОГЕННЫХ ПО ГЕНАМ *VRN* ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ *IN VIVO* И *IN VITRO*

О. А. Авксентьева[1,2], Н. В.Терентьева[1]

[1]*Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина (Харьков, Украина)*
E-mail: avksentyeva@karazin.ua
[2]*Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко (Киев, Украина)*

Изучали ответ на действие экзометаболитов (культуральных фильтратов – КФ) штаммов видов *Fusarium oxysporum* и *Fusarium moniliforme* в системе *in vivo* и *in vitro* моногеннодоминантных изогенных по генам *VRN* линий (NILs) пшеницы мягкой, созданных в генофоне сорта Мироновская 808. В вегетационных опытах (*in vivo*) исследовали фитотоксическое действие КФ на листья растений, их влияние на ростовые процессы и активность пероксидазы. В культуре *in vitro* определяли рост каллусов по ростовому индексу (РИ), их морфологические и цитологические показатели и активность пероксидазы. Установлено, что линии *VRN-A1a* и *VRN-D1a*, которые быстро развиваются, по всем показателям как *in vivo* так и *in vitro* проявляют больший уровень реакции на воздействие КФ штаммов обоих видов фузариев, чем линия *VRN-B1a* и сорт с замедленным развитием. Уровень проявления этой реакции у всех линий на действие КФ в культуре *in vitro* был аналогичен проявлявшемуся *in vivo*. Полученные результаты позволяют предположить, что гены *VRN* опосредованно участвуют в формировании устойчивости к экзометаболитам рода *Fusarium*, а культура *in vitro* является адекватной системой для исследования влияния конкретных генов (в частности *VRN*) на проявление стрессовых реакций у растений пшеницы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum, Fusarium oxysporum, Fusarium moniliforme, гены VRN, NILs, каллусная культура, фитотоксичность, ростовой индекс, пероксидаза, устойчивость к фитопатогенам*