

УДК 633.1: 631.527.3

ВЛИЯНИЕ ФИЛЬТРАТА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *FUSARIUM GRAMINEARUM* НА ИНДУКЦИЮ КАЛЛУСА И РЕГЕНЕРАЦИЮ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

© 2008 г. А. Л. Мазур, С. А. Игнатова

Южный биотехнологический центр в растениеводстве

*Украинской академии аграрных наук и Министерства образования и науки Украины
(Одесса, Украина)*

Изучено влияние концентрации фильтрата культуральной жидкости двух штаммов гриба *Fusarium graminearum*, различающихся по патогенности, на процессы индукции каллуса и регенерации растений в культуре *in vitro* незрелых зародышей мягкой пшеницы. Реакция незрелых зародышей, проявившаяся в снижении частоты и интенсивности каллусогенеза, а также регенерации растений, соответствовала фитопатологической оценке сортов. Выявлен более сильный ингибирующий эффект культурального фильтрата слабопатогенного штамма на этапы морфогенеза в условиях *in vitro*. Получены растения-регенеранты.

Ключевые слова: *Triticum aestivum L.*, незрелые зародыши, каллус, фильтрат культуральной жидкости, штаммы гриба

С возможностью построения различных модельных систем *in vitro*, имитирующих природные стрессы на уровне растительных эксплантов и клеточных популяций, открылись перспективы для разработки методик отбора *in vitro* форм растений, устойчивых к биотическим стрессам, в частности, к болезням [4, 5, 9, 14, 16]. При этом большое внимание уделяется использованию методов *in vitro* для диагностики и прогнозирования уровня устойчивости возделываемых видов растений к особо опасным грибным патогенам и поиску критериев адекватности оценки устойчивости растений *in vitro* и *in vivo* [6, 13]. Необходимость проведения таких работ вызвана тем, что на создание устойчивых к патогенным грибам линий и сортов методами традиционной селекции уходит не менее 10 лет [1, 7], а при использовании методов *in vitro* можно существенно ускорить создание перспективного исходного материала для селекции.

Гриб *Fusarium graminearum* Schwabe, который считается одним из наиболее вредоносных патогенов, вызывает гниль колоса, проявляющуюся из года в год в разной степени в посевах пшеницы во многих регионах Украины. Это приводит к значительным потерям урожая, загрязнению зерна токсинами, опасными для людей и животных [2, 7, 10, 13]. Поскольку применение химических средств защиты растений при фузариозе не эффективно, то поиск и создание генетических источников устойчивости к этому заболеванию остается актуальной задачей генетики и селекции пшеницы [7, 13].

В настоящее время известно, что для достижения успеха при отборе устойчивых к грибам рода *Fusarium* генотипов пшеницы и других видов растений в условиях *in vitro* можно использовать биотехнологические системы с разными эксплантами и селективными факторами.

Так, в ранних экспериментах изучалась ростовая реакция проростков 25 образцов мягкой пшеницы, различающихся по полевой устойчивости к фузариозному поражению, при воздействии на них изолятов из спор и мицелия *F. graminearum* и *F. culmorum* [19]. M. Bruins

Адрес для корреспонденции: Мазур Анна Леонидовна, Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН И МОН Украины, Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина;
e-mail: anna.mazur@mail.ru

[17] в качестве селективного фактора применил два токсина, которые были включены в состав питательной среды для культивирования проростков из семян, сегментов колеоптиля и гаплоидных каллусов, полученных в культуре пыльников *in vitro*, однако в этой работе не было выявлено корреляции между толерантностью материала *in vitro* и полевой устойчивостью полученных растений-регенерантов. Нами разработан метод „прямого контакта”, который основан на инфицировании суспензией фузариевых грибов изолированных зрелых зародышей мягкой пшеницы, позволяющий за короткий срок выявлять генетически обусловленные различия по устойчивости к фузариозу в популяциях изучаемых образцов [11].

Однако наиболее часто в качестве селектирующего фактора в экспериментах по клеточной селекции *in vitro* используется фильтрат культуральной жидкости гриба (ФКЖ) [8, 9, 18]. В частности, Волощук [4, 5] показал, что, используя ФКЖ *F. graminearum* в сублетальной концентрации, можно проводить скрининг селекционных образцов на устойчивость к патогену как на уровне суспензии клеток из соматических тканей, так и в культуре отсеченного колоса. По данным этого автора, достоверная дифференциация генотипов в условиях *in vitro* по устойчивости к ФКЖ находилась в соответствии с их полевой оценкой. Такая же дифференциация проявлялась и на уровне пролиферирующего каллуса из незрелых зародышей и затем – в процессе регенерации растений из этого каллуса.

Исходя из приведенных выше результатов по селекции *in vitro* на устойчивость к грибам рода *Fusarium*, нельзя не отметить возрастающий интерес исследователей не только к поиску возможности решения проблемы создания устойчивого материала методами биотехнологии, но и к исследованию возникающих в этой работе теоретических и методических вопросов. В частности, важным и недостаточно изученным вопросом в аспекте повышения эффективности оценки и отбора *in vitro* является исследование патогенности штаммов гриба в проявлении селектирующих свойств фильтрата культуральной жидкости.

Целью настоящей работы было исследование характера воздействия ФКЖ разных по патогенности штаммов *F. graminearum*, выявленных на пшенице в полевых условиях выращивания, на скорость, частоту индукции каллуса из незрелых зародышей и регенерацию растений у сортового материала с разной устойчи-

востью к патогену. Такие сведения необходимы для разработки оптимальных условий оценки и отбора устойчивых форм мягкой пшеницы в системе *in vitro*.

МЕТОДИКА

В экспериментах был использован семенной материал сортов озимой мягкой пшеницы селекции Селекционно-генетического института (СГИ). Согласно фитопатологической оценке сорта различались по устойчивости к фузариозу: Обрий – устойчивый, Никония – среднеустойчивый, Фантазия и Одесская полукарликовая (Одесская п/к) – восприимчивые сорта.

Для выделения зародышей незрелые семена пшеницы (10-12 сут после опыления), стерилизовали 70% этиловым спиртом в течение 10 с, затем 15 мин раствором стабилизированной хлорной извести «Оникс», промывали 0, 01 н HCl 5 мин и четыре раза дистиллированной водой.

Фильтрат культуральной жидкости (ФКЖ) гриба *F. graminearum* патогенного штамма 5б и слабопатогенного штамма ав получали по общепринятой методике на среде Чапека [3], стерилизовали при помощи фильтров Millipore 0, 22 мкм.

Для индукции каллусов изолированные из семян незрелые зародыши помещали по 200 штук для каждого варианта опыта в пробирки с агаризованной питательной средой МС с 2 мг/л 2,4-Д, содержащей фильтрат культуральной жидкости (ФКЖ) обоих штаммов в двух концентрациях – 30 % и 50 % (от объёма). Контрольным вариантом служила питательная среда МС без добавления ФКЖ.

С целью изучения влияния среды Чапека на морфогенез в культуре изолированных незрелых зародышей пшеницы был проведен предварительный опыт с добавлением в среду МС среды Чапека (без ФКЖ) в концентрациях 30 % и 50 %. Изолированные зародыши культивировали в термостате при температуре 24°C.

Влияние концентраций ФКЖ на частоту образования каллуса определяли в процентах относительно значений образования каллусов в контрольных вариантах питательной среды МС (без ФКЖ).

Регенерация растений из отобранных на ФКЖ каллусов проведена на чистой питательной среде МС, не содержащей ФКЖ и 2, 4-Д, но с добавлением в неё 0,5 мг/л кинетина и 1

ВЛИЯНИЕ ФИЛЬТРАТА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

мг/л ИУК, при освещенности 1,5 кЛк и 16-часовом фотопериоде. Частоту регенерации определяли по количеству каллусов с появившимися побегами от общего числа каллусов, высаженных на среду для регенерации (не менее 50 штук в опыте). Оценку достоверности полученных данных проводили по критерию Стьюдента [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первом опыте изучено влияние добавления среды Чапека в 30 % и 50 % от объема к среде МС на прохождение каллусогенеза в культуре изолированных зародышей озимой мягкой пшеницы. Из представленных в табл. 1 данных видно, что добавление среды Чапека в указанных выше концентрациях практически не влияло на прохождение процесса каллусогенеза у 4-х сортов пшеницы, различающихся по уровню устойчивости к фузариозу колоса.

Это позволило использовать питательную среду Чапека в дальнейшей работе для получения фильтрата культуральной жидкости и проводить сравнение вариантов опыта со средой МС как с контролем.

В вариантах опытов, где в среду для культивирования зародышей добавляли ФКЖ обоих штаммов в концентрации 30% и 50% (от объема среды), было выявлено фитотоксическое действие фильтрата на индукцию каллуса у всех изученных генотипов, которое проявлялось в замедлении индукции и снижении частоты каллусогенеза (табл. 2). В частности, на средах, содержащих ФКЖ, появление каллуса у всех сортов наблюдалась на 5-6 сут, в то время как в контрольном варианте появление каллусов отмечено на 2-3 сут.

Полученные данные позволили установить, что ответные реакции незрелых зародышей по формированию первичного каллуса при воздействии ФКЖ штаммов 56 и *ав* соответствовали фитопатологической оценке сортов. При этом из двух использованных концентраций ФКЖ более сильное угнетающее воздействие на процесс каллусогенеза у всех образцов оказала концентрация 50 % ФКЖ обоих штаммов. Однако ФКЖ слабопатогенного штамма *ав*, по сравнению с патогенным штаммом 56, оказывал более сильное угнетающее действие на каллусогенез всех сортов.

Таблица 1

Индукция каллуса из незрелых зародышей мягкой пшеницы в контрольных вариантах питательной среды (в % от высаженных зародышей)

Сорт	Среда МС (контроль)	Среда МС + 30% Чапека	Среда МС + 50% Чапека
Обрий (устойчивый)	93,50±1,74	95,50±1,47	96,50±1,30
Никосия (среднеустойчивый)	92,00±1,92	94,50±1,62	93,00±1,80
Фантазия (восприимчивый)	91,50±1,97	90,50±2,07	88,00±2,30
Од. п/к (восприимчивый)	96,00±1,39	94,00±1,68	95,00±1,54

Таблица 2

Частота индукции каллусов из незрелых зародышей сортов мягкой пшеницы при культивировании с ФКЖ, разных по патогенности штаммов *Fusarium graminearum* (%)

Сорт	ФКЖ, штамм 56		ФКЖ, штамм <i>ав</i>	
	30%	50%	30%	50%
Обрий (устойчивый)	64,71±3,41	39,57±3,44	56,15±3,52	28,34±3,16
Никосия (среднеустойчивый)	52,72±3,53*	28,80±3,19*	42,93±3,50*	18,48±2,73*
Фантазия (восприимчивый)	48,63±3,53*	25,68±3,13*	40,98±3,48*	15,85±2,62*
Од. п/к (восприимчивый)	38,02±3,45*	14,58±2,52*	28,13±3,20*	9,37±2,07*

Примечание. Показатели каждого сорта сравнивали с показателями устойчивого сорта Обрий: * – достоверно при P < 0, 05.

Частота регенерации растений озимой мягкой пшеницы в процентах от каллусов, полученных на средах, содержащих ФКЖ *Fusarium graminearum* (%)

Сорт	Контроль	Штамм 56		Штамм <i>ав</i>	
		ФКЖ 30%	ФКЖ 50%	ФКЖ 30%	ФКЖ 50%
Обрий (устойчивый)	24,06±3,02*	23,97±3,02	20,27±2,84	20,00±2,83	11,32±2,24*
Никосия (среднеустойчивый)	31,52±3,29*	24,74±3,05	16,98±2,65*	17,72±2,70*	8,82±2,01*
Фантазия (восприимчивый)	33,33±3,33*	17,98±2,72*	14,89±2,52*	12,00±2,30*	6,90±1,79*
Од. п/к (восприимчивый)	34,90±3,37*	16,44±2,64*	0	9,26±2,05*	0

Примечание. Показатели каждого сорта сравнивали с контрольным вариантом каждого сорта:
* – достоверно при $P < 0,01$.

Каллусы, полученные после 24 сут культивирования на контрольной среде и средах, содержавших ФКЖ, пересаживали для получения растений-регенерантов на среду МС без ФКЖ, в состав которой были введены ауксины и цитокинины.

В результате проведенной работы были получены растения-регенеранты (табл. 3).

Количество полученных растений регенерантов из каллусов, индуцированных на средах с ФКЖ обоих штаммов, было меньше, чем в контрольном варианте у всех исследуемых сортов, кроме сорта Обрий. У этого устойчивого сорта снижение количества регенерантов наблюдалось лишь при добавлении в питательную среду ФКЖ штамма *ав* в 50% концентрации, тогда как у восприимчивых к фузариозу колоса сортов – Фантазия и Одесская полукарликовая – достоверное снижение количества полученных растений-регенерантов наблюдалось во всех исследованных вариантах. У среднеустойчивого сорта Никония количество регенерированных растений было ниже контрольного варианта при добавлении в питательную среду ФКЖ штамма *ав* в 30% концентрации и ФКЖ в 50% концентрации обоих штаммов.

Оказалось, что в данных условиях культивирования каллусов пшеницы, полученных из незрелых зародышей, ФКЖ слабопатогенного штамма *ав* является более жестким селективным фактором, чем ФКЖ патогенного штамма 56.

К сожалению, в настоящее время невозможно указать истинную причину такого воздействия слабопатогенного штамма гриба *Fusarium graminearum* на каллусную культуру пшеницы. Можно лишь предположить, что в процессе патогенеза взаимодействие данного

штамма гриба с поражаемым растением пшеницы физиологически отличается от условий поражения растений штаммом 56.

Отличия по силе воздействия использованных штаммов, проявившиеся на уровне ФКЖ, могут также определяться разными токсинобразующими и ферментными системами, на основе которых происходит фитотоксическое воздействие гриба на растение в поле. Возможно, продукты этих систем у *ав* штамма в большей мере синтезировались в условиях культивирования гриба *in vitro* и проявились в полученном нами ФКЖ. Однако для точного ответа на вопрос о причине выявленных различий воздействия ФКЖ разных по патогенности штаммов гриба на экспланты необходимо проведение дополнительных экспериментов по изучению биохимических свойств обоих ФКЖ.

Таким образом, при добавлении в питательную среду для культивирования незрелых зародышей ФКЖ разных по патогенности штаммов *Fusarium graminearum* наблюдалось снижение скорости индукции каллуса и интенсивности его пролиферации у исследованных сортов озимой мягкой пшеницы. Наименьшее снижение этих параметров отмечено у устойчивого сорта Обрий. Полученные в опытах *in vitro* данные совпадали с фитопатологической оценкой сортов. Количество полученных регенерантов у устойчивого к фузариозу колоса сорта Обрий было снижено лишь при добавлении в питательную среду ФКЖ штамма *ав* в 50 % концентрации, у восприимчивых сортов оно выявлено во всех вариантах опыта. Это позволяет сделать заключение о возможности использования слабопатогенного штамма гриба *ав Fusarium graminearum* для получения ФКЖ, как более жесткого селективного агента для биотехнологической системы по созданию ус-

ВЛИЯНИЕ ФИЛЬТРАТА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

тойчивого к данному патогену исходного материала пшеницы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабаянц Л. Т., Гонтаренко О. В.* Устойчивость пшеницы к фузариозу колоса на юге Украины // Докл. Рос. акад. с.-х. наук. – 1992. – № 9-10. – С. 6-10.
2. *Бабаянц Л. Т., Мирось С. Л., Тоцкий В. Н., Бабаянц О. В.* Генетическая детерминация и наследование признака устойчивости пшеницы к *Fusarium graminearum* L. // Цитология и генетика. – 2001. – Т. 35, № 3. – С. 22-29.
3. *Билай В.И.* Фузариоз. – Киев: Наукова думка, 1977. – 441 с.
4. *Волощук С. І., Волощук Г. Д., Гірко В. С.* Добір *in vitro* на стійкість до некротрофних грибних патогенів з гібридних популяцій пшениці // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть – К.: Логос. – 2001. – Т. 1, № 4. – С. 610-614.
5. *Волощук С. І.* Клітинна селекція пшениці на стійкість до *Fusarium Graminearum* Schwabe : Автореф. дис ... канд. с.-г. наук. – Київ, 2006. – 20 с.
6. *Гайворонская Л. М., Магальонс Л. Б., Ланикова В. П., Пасечник Т. Д.* Экзометаболиты каллусов риса, устойчивых к пирикулярнозу сортов токсичных для возбудителя этой болезни // Тез. докл. VII Междунар. конф. «Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда». – М., 1997. – С. 362.
7. *Гонтаренко О. В.* Фузариоз колоса пшеницы в условиях юга Украины // Методы интенсификации селекционного процесса. – Одесса: ВСГИ. – 1990. – С. 76.
8. *Игнатова С.А., Овсяк Т.Н., Лукьянюк С.Ф.* Создание исходного фузариозоустойчивого материала люцерны с использованием биотехнологических приёмов // Биология культивируемых клеток и биотехнология. – М.: Наука, 1991. – С. 137-141.
9. *Калашикова Е.А.* Клеточная селекция растений на устойчивость к грибным болезням: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – М., 2003. – 53 с.
10. *Кислых Т.М., Шевчук О.В.* Шкодочинність основних збудників фузариозу колоса озимої пшениці в Лісостепу // Вісн. аграрн. науки. – 2006. - № 1. – С. 16-18.
11. *Клечковская Е. А., Игнатова С. А., Слепченко А. И.* Биотехнологические способы отбора растений пшеницы, устойчивых к возбудителям фузариозных гнилей // Роль адаптивной интенсификации земледелия в повышении эффективности аграрного производства. – Жодино, 1998. – Т. 2. – С. 159 – 161.
12. *Лакин Г. Ф.* Биометрия. – М. Высшая школа, 1990. – 352 с.
13. *Левитин М. М., Иващенко В. Г., Шипилова И. П.* Фузариоз колоса пшеницы // Микология и фитопатология. – 1990. – Т. 24, вып. 5. – С. 446-453.
14. *Сидоров В.А.* Биотехнология растений. Клеточная селекция.– Киев: Наук. думка, 1990. – 280 с.
15. *Шамина З.Б.* Методические указания по клеточной селекции. – М.: ВАСХНИЛ, 1984. – 36 с.
16. *Bruins M.B.M.* Fusarium Head Blight Resistance in Wheat. – Wageningen, 1998. – 131 p.
17. *Buiatti M., Scala A., Bettini P.* Correlations between *in vivo* resistance to Fusarium and *in vitro* response to fungal elicitors and toxic substances in carnation // Theor. and Appl. Genet. – 1985. – V. 70, № 1. – P. 42-47.
18. *Mesterhazy A.* Selection of Head Blight Resistant Wheats Through Improved Seedling Resistance // Plant Breeding. – 1987. – V. 98, № 1.– P. 25-36.

Поступила в редакцию
22.11.2006 г.

INFLUENCE OF FILTRATE OF THE *FUSARIUM GRAMINEARUM* CULTURE LIQUID ON CALLUS INDUCTION AND PLANTS REGENERATION IN CULTURE *IN VITRO* IMMATURE EMBRYOS OF SOFT WHEAT

G. L. Masur, S. O. Ignatova

*South plant biotechnology center of Ukrainian academy of agrarian science
and Ministry of Education and Science of Ukraine
(Odesa, Ukraine)*

Influence of different concentration of culture filtrates 30% and 50% of two stamms of fungus *Fusarium graminearum* that are different from its pathogenicity on process of a callus induction from immature embryos in *in vitro* conditions was investigated. The immature embryos reactions of soft

wheat cultivars on influence of culture filtrates were shown in decrease of callusogenesis according to a phytopathologic estimation. In this selective conditions plantlets have been received.

Key words: *Triticum aestivum L., immature embryos, callus cultures, culture filtrate, fungus stamms*

**ВПЛИВ ФІЛЬТРАТУ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ *FUSARIUM GRAMINEARUM*
НА ІНДУКЦІЮ КАЛУСУ І РЕГЕНЕРАЦІЮ РОСЛИН В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*
НЕЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ**

Г. Л. Мазур, С. О. Ігнатова

*Південний біотехнологічний центр в рослинництві
Української академії аграрних наук і Міністерства освіти і науки України
(Одеса, Україна)*

Вивчено вплив концентрації фільтрату культуральної рідини двох штамів гриба *Fusarium graminearum*, які розрізняються за патогенністю, на процес індукції калусу з незрілих зародків м'якої пшениці в умовах *in vitro*. Реакція незрілих зародків сортів м'якої пшениці, що виявлялася у зниженні частоти їх калусогенезу, відповідала фітопатологічній оцінці. Виявлений сильніший інгібуючий ефект культурального фільтрату слабопатогенного штаму на етапи морфогенезу в умовах *in vitro*. Отримані рослини регенеранти.

Ключові слова: *Triticum aestivum L., незрілі зародки, культура калусів, фільтрат культуральної рідини, штами гриба*