

УДК 633.11:581.143.6

Т. М. Корня, асп., С. О. Ігнатова, д-р. біол. наук, зав. лаб. культури тканин
Південний біотехнологічний центр у рослинництві УААН,
Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна, e-mail: odonata@mail.ru

ВПЛИВ ТОКСИНУ DON ТА ФІЛЬТРАТИВ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ ГРИБА *FUSARIUM GRAMINEARUM* SCHWABE НА КУЛЬТУРУ ЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

Наведено результати вивчення впливу автоклавованих та неавтоклавованих фільтратів культуральної рідини (ФКР) гриба *Fusarium graminearum* та мікотоксину DON на довжину паростка та головного корінця різних за стійкістю до фузаріозу колосу сортів озимої м'якої пшениці. Вивчено вплив ФКР на частоту проростання зрілих зародків та утворення ранового калюсу. Зроблено висновок про те, що одними з інгібуючих ріст агентів в ФКР є термостабільні речовини, можливо мікотоксини.

Ключові слова: *Fusarium graminearum* Schwabe, м'яка пшениця, фільтрат культуральної рідини, мікотоксин, ізольовані зрілі зародки, культура *in vitro*.

Фузаріоз колосу – небезпечне захворювання пшениці, під час якого втрати врожаю можуть досягати 50% і навіть більше. При цьому захворюванні в зернах накопичуються мікотоксини, що є небезпечними для тварин та людини, бо викликають важкі токсикози. Серед усіх токсинів, що синтезує *F. graminearum*, найбільш розповсюдженим є токсин Deoxynivalenol (DON). Окрім канцерогенних властивостей, токсини гриба здатні витримувати термічну обробку і тим самим зберігатись у продуктах харчування та викликати тяжкі захворювання [1]. Боротьба з фузаріозом колосу за допомогою фунгіцидів малоефективна, тому найбільш раціональним з точки зору екологічної безпеки є створення стійких до фузаріозу колосу сортів пшениці.

Традиційна селекція по створенню стійких до фузаріозу колосу ліній пшениці займає 10, а інколи й більше років. У зв'язку з цим на деяких етапах добору актуальним є використання методів біотехнології, за допомогою яких можна скоротити строки селекції до 3-х років [2, 3]. Отже, розробка та вдосконалення методів селекції *in vitro* стійких до *F. graminearum* форм пшениці з використанням ФКР гриба та мікотоксинів, як можливих селективних агентів, є перспективною [4–7]. Раніше показано, що толерантність експлантів пшениці до ФКР *F. graminearum* в умовах *in vitro* корелює з польовою стійкістю донора експланту [8].

Таким чином, метою нашого дослідження було порівняти рівень фітотоксичного впливу автоклавованих та неавтоклавованих ФКР, а також токсину DON за культивування *in vitro* зрілих зародків різних за стійкістю до фузаріозу колосу сортів пшениці.

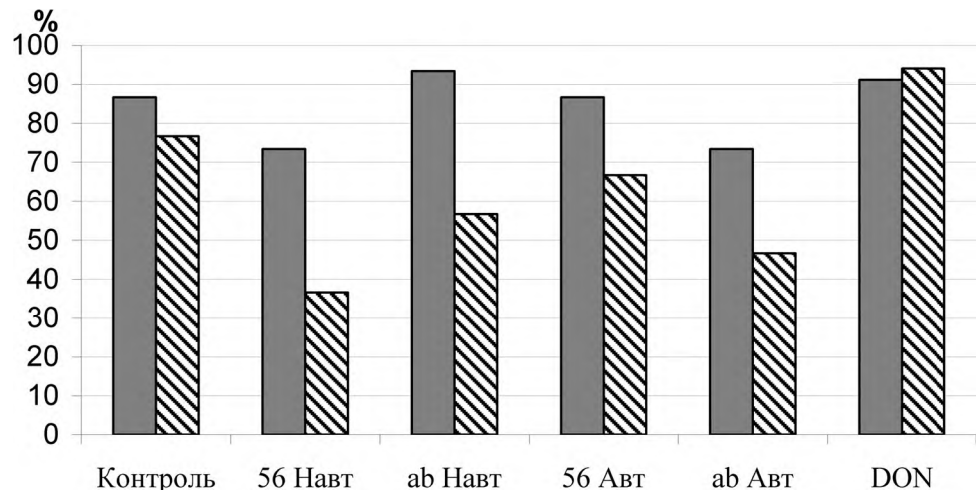
Матеріали та методи

Для більш коректного вивчення впливу ФКР на культуру зародків пшениці *in vitro* в досліджах використовували матеріал двох сортів селекції СГІ, які відрізнялися стійкістю до фузаріозу колосу: Обрій як стійкий та Одеська напівкарликова як сприйнятливий сорти. За експлант використовували зрілі зародки. Насіння стерилізували 4 хвилини 70% етиловим спиртом, після чого витримували

вали 40 хвилин у розчині стабілізованого хлорного вапна, який нейтралізували 10 хвилин 0,05 н соляною кислотою, а потім промивали 4 рази дистильованою водою. Перед виділенням зародків насіння витримували у холодильнику при температурі +2°C. Для приготування ФКР гриб був культивований на стандартному рідкому середовищі Чапека в темноті при температурі +22°C впродовж 12 днів. Після цього рідина була відділена від міцелію гриба та пропущена через фільтри Міліпоре з розміром пор 0,22 мкм. Щоб визначити природу селективного фактора у складі ФКР, останній додавали до безгормонального середовища MS (Murashige-Scoog) в концентрації 50% від об'єму середовища до та після автоклавування (Навт – неавтоклавуваний, Авт – автоклавуваний). Одним із варіантів було живильне середовище з токсином DON у концентрації 80 мкг/л. В якості контролю використовували середовище MS, що не містило ні ФКР, ні токсину. В досліді враховували кількість зародків, які проросли на третю добу, кількість утвореного ранового калюсу, а також довжину паростка та головного корінця на десяту добу культивування в порівнянні з контролем. Математичні розрахунки та статистичний аналіз проводили за допомогою комп'ютерної програми EXCEL та пакету аналізу StatPlus. Статистично вірогідну різницю між групами за ознаками частоти проростання та калюсоутворення проводили за допомогою критерію χ^2 . Перевірку розподілу величин на відповідність до нормального розподілу проводили за критерієм Шапіро-Уїлка. Статистично значущу різницю кількісних ознак визначали за допомогою непараметричного аналога дисперсійного аналізу критерію Крускала-Уоліса [9, 10].

Результати дослідження та їх обговорення

В усіх без виключення дослідях було виявлено достовірний ($p < 0,05$) інгібуючий вплив ФКР сильно- (56) та слабкопатогенного (ab) штамів *F. graminearum* на проростання ізолюваних зародків у нестійкого сорту Одеська напівкарликова (рис. 1).

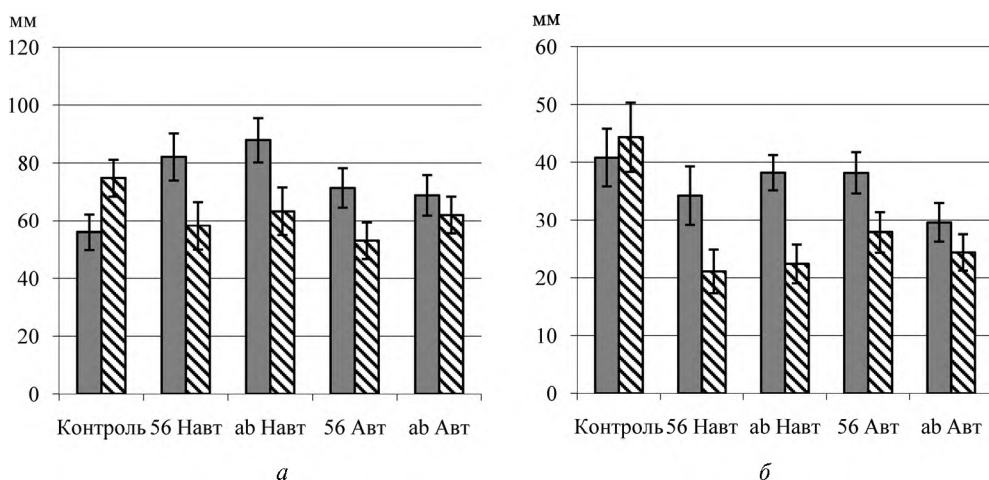


Умовні позначення: ■ – Обрій; ▨ – Одеська напівкарликова.

Рис. 1. Проростання ізолюваних зрілих зародків м'якої пшениці сортів Обрій та Одеська напівкарликова в культурі *in vitro* за наявності в середовищі ФКР *F. graminearum*

В протилежність пьому, проростання зародків стійкого сорту Обрій за впливу ФКР обох штамів *F. graminearum* не змінювалося. Токсин DON у концентрації 80 мкг/л також не впливав на досліджувані показники різних за стійкістю до фузаріозу колосу сортів.

За наявності ФКР (Навт) в живильному середовищі середня довжина паростків стійкого сорту Обрій збільшувалась у порівнянні з контролем майже на третину. Таким чином, неавтоклавовані ФКР обох штамів гриба стимулювали ріст паростків у стійкого сорту ($p < 0,05$), в той час як середня довжина паростків нестійкого сорту при додаванні ФКР як автоклавованого, так і неавтоклавованого, залишалася на рівні контролю (рис. 2, а).



Умовні позначення: ■ – Обрій; ▨ – Одеська напівкарликова.
Рис. 2. Вплив ФКР різних штамів *F. graminearum* на довжину паростків (а) та головних корінців (б) пшениць сортів Обрій та Одеська напівкарликова

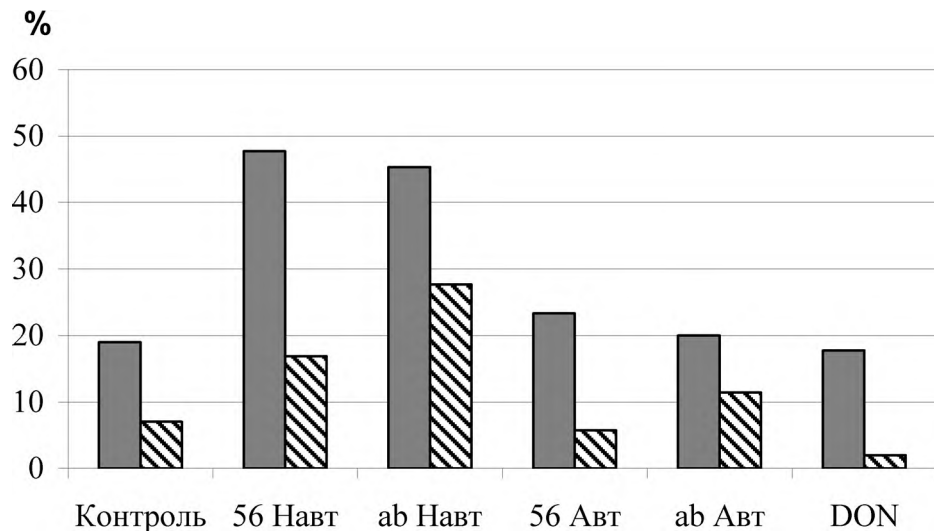
Статистично вірогідних відмінностей між зазначеними ефектами ФКР різного походження не спостерігали.

Виявлено інгібуючу дію ($p < 0,05$), як автоклавованого, так і неавтоклавованого ФКР на середню довжину головного корінця у нестійкого сорту Одеська напівкарликова. Ця довжина була меншою у порівнянні з контролем майже в два рази. Середня довжина корінця у стійкого сорту за дії ФКР різних штамів гриба залишалася на рівні контролю. Впливу DON на показник «довжина корінця» виявлено не було (рис. 2, б).

На середовищах, що містили різні за походженням ФКР гриба (без термічної обробки) у стійкого та сприйнятливо сорти спостерігалось достовірне ($p < 0,01$) збільшення частоти утворення ранового калюсу у порівнянні з контролем (рис. 3). Ймовірно, ФКР обох штамів гриба містять сполуки з гормональною активністю, що підтверджується також ростовою стимуляцією паростків стійкого сорту Обрій неавтоклавованими ФКР (рис. 1).

Утворення калюсу досить часто пригнічувало процес ризогенезу та впливало на стан паростка, що виявлялося в пригніченні його росту та стимуляції росту колеоптіля. Це істотно впливало на показники досліджуваних ознак. При використанні автоклавованих ФКР гриба та токсину DON збільшення частоти утворення ранового калюсу спостережено не було. Тому для оцінки толерант-

ності рослин до ФКР *F. graminearum* в культурі *in vitro* доцільним є використання автоклавованих ФКР.



Умовні позначення: ■ – Обрій; ▨ – Одеська напівкарликова.

Рис. 3. Утворення ранового калюсу під впливом ФКР та токсину DON

Оскільки висока температура призводить до денатурації білкових молекул, у тому числі ферментів, можна припустити, що діючими токсичними та водночас селективними агентами в ФКР гриба можуть бути речовини небілкової природи, такі як мікотоксини. Оскільки використання токсину DON у концентрації 80 мкг/л не впливало на досліджувані показники росту зрілих зародків обох сортів, то проведення наступних експериментів буде спрямовано на збільшення концентрації чистого токсину в живильному середовищі для культивування.

Висновки

1. Виявлено позитивний вплив автоклавованих ФКР сильно- (56) та слабкопатогенного (ab) штамів *F. graminearum* на ріст паростків м'якої пшениці стійкого сорту Обрій.
2. За однакових умов досліді в культурі *in vitro* не виявлено суттєвих відмінностей в дії ФКР різних за патогенністю штамів *F. graminearum* на досліджувані параметри розвитку зрілих зародків пшениці.
3. Відмічено інгібуючий вплив автоклавованих і неавтоклавованих ФКР на ріст головного корінця у сприйнятливому сорту Одеська напівкарликова.
4. Показано, що частота утворення ранового калюсу у обох сортів збільшувалася при дії неавтоклавованих ФКР.
5. Наявність у живильному середовищі токсину DON у концентрації 80 мкг/л не впливало на досліджувані показники проростання та росту зрілих зародків обох сортів.

Література

1. Билай В. И. Фузариин. Изд-е второе дополн., АН УССР Ин-т микробиологии и вирусологии им Д. К. Заболотного. – К.: Наукова думка, 1977. – 442 с.
2. Волощук С. І. Клітинна селекція пшениці на стійкість до *Fusarium graminearum* SCHWABE: Автореф. дис... канд. сільс.-госп. наук 03.00.15 / Інститут агроекології УААН. – К., 2006. – 20 с.
3. *Sélection in vitro* pour la résistance à la fusariose de l'épi le blé panifiable / Jean Collin, André Comeau, Daniel Dostaler, Sylvie Rioux, Alain Létourneau. – Gouvernement du Québec, Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation. – 2000. — projet N 4468
4. *Sélection in vitro* pour la résistance à la fusariose de l'épi chez le blé / F. Eudes, J. Collin, S. Roux, A. Comeau // 6^{ème} J. Scientifiques du Biotechnologies Végétales AUPELFUREF – Orsay, 1997. – P. 335– 336.
5. Волощук Г. Д. Суспензійна культура пшениці *Triticum aestivum* L. та її використання в генетико-селекційних дослідженнях: Автореф. дис... канд. біол. наук. 03.00.12 / Інститут фізіології рослин і генетики НАНУ. – К., 2000. – 19 с.
6. Лаврова Н. В. Разработка и применение биотехнологий для получения устойчивых к фузариозу растений озимой пшеницы (гаплоидная) и огурца (меристемная, каллусная и микроспорогенная): Автореф. дис... д-ра биол. наук. – М., 2006. – 46 с.
7. *Obtention* de pieds néoformés suite à l'induction de cals embryogènes d'embryons zygotiques de blés par le borate de sodium et un extrait de *Fusarium graminearum* / Rachid Karim, Hassan Chlian, Alain Badoc, Allal Douira // Bull. Soc. Farm. Bordeaux, N 144. – 2005. – P. 195– 210.
8. Мазур А. Л., Игнатова С. А. Определение сублетальных концентраций фильтрата *Fusarium graminearum* Schwabe для получения устойчивых форм мягкой пшеницы в культуре *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наук. праць за ред. М. В. Роїка. – К., Логос, 2006. – Т. 3. – С. 484– 489.
9. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. Ю. А. Данилова – М.: Практика, 1998. – 459 с.
10. Атраментова Л. О., Утевська О. М. Статистичні методи в біології: Підручник. – Х.: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2007. – 288 с.

Т. М. Корня, С. А. Игнатова

Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН,
Овидиопольская дорога 3, Одесса, 65036, Украина, e-mail: odonata@mail.ru

ВЛИЯНИЕ ТОКСИНА DON И ФИЛЬТРАТОВ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ГРИБА *FUSARIUM GRAMINEARUM* SCHWABE НА КУЛЬТУРУ ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Резюме

Изучено влияние автоклавированных и неавтоклавированных фильтратов культуральной жидкости двух штаммов *F. graminearum* – сильно- (5б) и слабопатогенного (ав), а также токсина DON на прорастание и рост изолированных зародышей сортов мягкой пшеницы, контрастных по устойчивости к фузариозу колоса. Результаты экспериментов показали, что угнетение прорастания изолированных зрелых зародышей и угнетение роста главного корешка у восприимчивого к грибу сорта Одесская полукарликовая не зависело от термической обработки исследуемых ФКЖ. Влияния токсина DON на изучаемые показатели не наблюдалось.

Ключові слова: *Fusarium graminearum* Schwabe, мягкая пшеница, фильтрат культуральной жидкости, микотоксин, изолированные зрелые зародыши, культура *in vitro*.

T. M. Kornya, S. A. Ignatova

South Plant Biotechnology Center,
Ovidiopolskaya St., 3, Odessa, 65036, Ukraine, e-mail: odonata@mail.ru

**THE INFLUENCING OF THE TOXIN DON END CULTURED LIQUID OF FUNGUS
FUSARIUM GRAMINEARUM SCHWABE ON CULTURE OF MATURE EMBRYOS OF
COMMON SOFT WHEAT**

Summary

The influence of the cultured liquid of fungus (CLF, autoclaved and not autoclaved) from two strains *F. graminearum* has been studied: with high – (56) and Lowpathogenesisity (aB) and influence of the toxin DON on germination and growth process of the isolated embryos of common wheat cultivars contrasted to the resistance to fungus of fusarium. The results of the experiments were shown that the inhibition of germination of the isolated mature embryos and repression of the length of the main root at the susceptible cultivars did not depend on the thermal processing of investigated CLF. Influence of the toxin DON on studied parameters has not been found out.

Keywords: *Fusarium graminearum* Schwabe, head blight, mycotoxin, cultured liquid of fungus, mature germs, culture *in vitro*.