

УДК 633.1:631.527.3

А. Л. Мазур¹, асп., **С. А. Игнатова**¹, д-р биол. наук, зав. лаб. культуры тканей, **О. В. Бабаянц**², канд. биол. наук, зав. отделом фитопатологии и энтомологии

¹ Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН, лаборатория культуры тканей.

Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина. Тел. 395214

² Селекционно-генетический институт — Национальный центр семеноводства и сортоиспытания УААН, отдел фитопатологии и энтомологии, Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина. Тел. 395427

ВЛИЯНИЕ ФИЛЬТРАТОВ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ГРИБА *FUSARIUM GRAMINEARUM* SHWABE НА ПРОРАСТАНИЕ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Изучено влияние разных концентраций фильтратов культуральной жидкости двух штаммов гриба *Fusarium graminearum*, различающихся по патогенности, на процесс прорастания изолированных зрелых зародышей пшеницы в условиях in vitro. Выявлена различная ответная реакция проростков разных сортов пшеницы на воздействие грибных фильтратов в зависимости от степени устойчивости проростков к грибному патогену.

Ключевые слова: мягкая пшеница, зрелые зародыши, условия in vitro, фильтрат культуральной жидкости гриба, эффекты влияния.

Методология селекции растений, в основе которой лежит культивирование клеток, тканей и органов растительного материала в условиях стерильной культуры при воздействии на них различного рода селективных агентов, на фоне которых можно выделять искомые генотипы, интенсивно совершенствуется с целью практического применения в селекции экономически ценных культур. Использование эксплантов разного уровня сложности в культурах in vitro, позволяет расширить возможности работы в направлениях отбора и оценки искомых генотипов и на этой базе создавать новые результативные биотехнологические системы. Для селекционно-генетической работы на злаках системы селекции in vitro представляют интерес как нетрадиционные технологии создания исходного материала с определёнными признаками и, что особенно важно, — с устойчивостью к болезням [1, 2, 3]. Не менее интересным для практики является использование методов in vitro для диагностики и прогнозирования уровня устойчивости возделываемых видов растений к особо опасным грибным патогенам [4, 5]. При этом исследователи уделяют большое внимание поиску критериев адекватности методов оценки устойчивости растений in vitro и in vivo [6].

В связи с этим целью настоящей работы было изучение соответствия результатов традиционных методов фитопатологической оценки устойчивости разных сортов мягкой пшеницы к фузариозу колоса, с одной стороны, и эффективности прорастания изолированных зрелых зародышей этих сортов в культуре *in vitro* при добавлении в среду фильтратов культуральной жидкости (ФКЖ) двух штаммов гриба *Fusarium graminearum* (*F. graminearum*), — с другой.

Материалы и методы исследования

Для выполнения экспериментов использован материал сортов озимой мягкой пшеницы селекции Селекционно-генетического института (Одесса), которые по данным фитопатологической оценки различались устойчивостью к фузариозу колоса, вызываемого грибом *F. graminearum*. Сорт мягкой пшеницы Обрий использован как устойчивый к данному патогену, сорт Никония — как среднеустойчивый, сорта Фантазия и Одесская полукарликовая (Од. п/к) — как восприимчивые. В качестве эксплантов для работы в условиях *in vitro* использованы изолированные зрелые зародыши указанных сортов. Для их выделения зрелые семена пшеницы стерилизовали 70 % спиртом (10 сек), затем обрабатывали раствором стабилизированной хлорной извести "Оникс" (15 мин). После промывания 0,01 н HCl (5 мин) и дистиллированной водой (4 раза), чашки Петри с семенами помещали в холодильник при температуре 2°C на сутки, после чего из них стерильно выделяли зародыши и высаживали на питательную среду MS и на варианты этой же среды с добавлением селективного агента. В качестве последнего использовали фильтраты культуральной жидкости гриба *Fusarium graminearum* патогенного штамма 56 и слабопатогенного штамма ав, полученные по общепринятой методике в среде Чапека [7] и в модифицированном солодо-агаре (МСА), разработанном в отделе фитопатологии СГИ [8]. ФКЖ гриба обоих штаммов стерилизовали при помощи фильтров *Millipore* 0,22 мкм. В опытах использовали 10% и 50% концентрации ФКЖ (от объема среды). Зародыши высаживали по 200 штук на каждый вариант питательной среды. Проращивали зародыши в течение 3 суток в термостате, в темноте при температуре 22–24°C, затем до 10-суточных проростков выращивали их при температуре 19–20°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности 1,5–2 тыс. люкс. Критериями оценки реакции исследуемых сортов пшеницы на присутствие ФКЖ обоих штаммов, полученных на питательных средах Чапека и МСА, служили количества проросших на третьи сутки зародышей и выросших из них проростков на 10 сутки относительно этих же показателей в соответствующих контрольных вариантах. Контрольные питательные среды, использованные в разных вариантах опыта: 1 — стандартная среда MS, 2 — среда MS с добавлением среды Чапека до 10%

концентрации, 3 — среда MS с добавлением среды Чапека до 50% концентрации, 4 — среда MS с добавлением МСА до 10% концентрации, 5 — среда MS с добавлением МСА до 50% концентрации.

Результаты исследования и их обсуждение

Для выяснения возможного влияния сред для выращивания гриба на прорастание зрелых зародышей *in vitro* зародыши высаживали на среду MS с добавлением сред для выращивания гриба в соответствующей концентрации (10 и 50%). Полученные в эксперименте данные по проращиванию изолированных зрелых зародышей *in vitro* на всех вариантах питательных сред, использованных в качестве контроля в разных опытах, приведены в табл. 1.

Таблица 1

Эффективность (%) прорастания изолированных зрелых зародышей пшеницы через 3 суток на разных контрольных вариантах питательной среды (в % от высаженных для культивирования)

Сорт пшеницы	Контроль 1	Контроль 2	Контроль 3	Контроль 4	Контроль 5
Обрий	88,00±2,29	94,50±1,61	98,50±0,85	98,50±0,85	98,50±0,85
Никония	72,50±3,15	77,00±2,97	77,00±2,97	76,00±3,01	83,50±2,62
Фантазия	79,00±2,88	72,50±3,15	83,00±2,65	75,00±3,06	52,50±3,53
Од. п/к	95,00±1,54	91,00±2,02	81,50±2,74	81,50±2,74	98,00±0,98

Анализируя представленные данные, можно отметить следующие особенности в прорастании изолированных зрелых зародышей сортовых генотипов на третьи сутки после высадки их в условия *in vitro*. Высокий процент прорастания на всех вариантах сред наблюдался у зародышей сорта Обрий (в среднем $95,60 \pm 1,45$), а самый низкий — у зародышей восприимчивого сорта Фантазия ($72,40 \pm 3,16$). Показатели прорастания на среде MS были ниже у сортов Од. п/к ($89,40 \pm 2,17$) и Никония ($77,20 \pm 2,96$). Наибольшее угнетение процесса прорастания изолированных зрелых зародышей на отдельных вариантах сред отмечалось у сорта Фантазия, особенно на среде с 50 % МСА. При добавлении сред Чапека и МСА в среду для культивирования зародышей у устойчивого к фузариозу колоса сорта Обрий и среднеустойчивого — Никония происходило активирование прорастания по сравнению с показателями, полученными при проращивании на среде MS. В то же время у восприимчивого сорта Од. п/к показатели прорастания зародышей на вариантах сред с добавлением 50% среды Чапека и 10% МСА снижались.

При проращивании изолированных зрелых зародышей исследуемого набора сортов на питательных средах, содержащих ФКЖ, при-

готовленных на среде Чапека, прорастание зародышей зависело от концентрации ФКЖ и штамма гриба, от которого фильтрат был получен (табл. 2).

Таблица 2

Эффективность (%) прорастания изолированных зрелых зародышей пшеницы на средах с добавлением ФКЖ штаммов 56 и ав, полученных на среде Чапека (относительно контроля 2 и контроля 3)

Сорт Пшеницы	<i>F. graminearum</i> , штамм 56		<i>F. graminearum</i> , штамм ав	
	10 % ФКЖ	50 % ФКЖ	10 % ФКЖ	50 % ФКЖ
Обрий	41,26 ± 3,48	31,47 ± 3,28	50,79 ± 3,53	10,15 ± 2,13
Никония	57,14 ± 3,49	32,46 ± 3,31	50,64 ± 3,53	6,49 ± 1,74
Фантазия	43,44 ± 3,50	4,19 ± 1,41	35,86 ± 3,39	0
Од. п/к	29,12 ± 3,21	16,80 ± 2,64	25,82 ± 3,09	0

Так, экспланты сортов Обрий и Никония проявили почти одинаковое отношение к одной и той же концентрации ФКЖ штаммов с разной патогенностью. Прорастание зародышей устойчивого сорта Обрий при наличии в среде ФКЖ штамма 56 в 10% концентрации снизилось до 40% относительно контроля 2. В то же время ФКЖ штамма ав в указанной концентрации способствовал более высокому проценту прорастания зародышей. У зародышей сорта Никония при этой же концентрации ФКЖ штамма 56 процент прорастания был несколько выше, чем у сорта Обрий. У восприимчивых сортов Фантазия и Од. п/к обнаруживалось снижение эффективности прорастания зародышей при данной концентрации ФКЖ обоих штаммов. 50%-ая концентрация ФКЖ во всех случаях оказала сильно выраженное угнетающее влияние на прорастание зародышей исследованных сортов, но в большей степени — сортов Фантазия и Од. п/к. При этом особенно сильным оказалось действие ФКЖ штамма ав.

ФКЖ, полученный при выращивании гриба на МСА, угнетал процесс прорастания зародышей устойчивого сорта Обрий и среднеустойчивого — Никония (табл. 3). Обе концентрации ФКЖ исследованных штаммов в этих случаях влияли одинаково, за исключением влияния 10% концентрации ФКЖ штамма ав, которое было менее значительным в случае сорта Никония.

Зародыши восприимчивых сортов — Фантазия и Од. п/к — оказались более чувствительными к обеим концентрациям штамма 56, нежели штамма ав. При этом зародыши сорта Фантазия при 50% концентрации ФКЖ штамма 56 вообще не прорастали.

Таким образом, изолированные зрелые зародыши восприимчивых сортов Фантазия и Од. п/к подверглись более сильному воздействию ФКЖ обоих штаммов *F. graminearum* по сравнению с зародышами сортов, обладающих устойчивостью к данному патогену.

Особенно ярко это воздействие проявилось при 50% концентрациях ФКЖ, приготовленных на средах Чапека и МСА.

Таблица 3

Эффективность (%) прорастания зрелых зародышей пшеницы на средах с добавлением ФКЖ штаммов 56 и ав, полученных на среде МСА (относительно контроля 4 и контроля 5)

Сорт пшеницы	<i>F. graminearum</i> , штамм 56		<i>F. graminearum</i> , штамм ав	
	10 % ФКЖ	50 % ФКЖ	10 % ФКЖ	50 % ФКЖ
Обрий	31.47 ± 3.28	30.45 ± 3.25	41.62 ± 3.48	38.07 ± 3.43
Никония	32.89 ± 3.32	31.73 ± 3.27	71.71 ± 3.18	36.52 ± 3.40
Фантазия	16.00 ± 2.59	0	36.67 ± 3.40	25.71 ± 3.09
О.д. п/к	16.80 ± 2.64	2.55 ± 1.11	66.87 ± 3.32	7.65 ± 1.87

Во второй серии опытов по изучению действия 10% и 50% концентраций ФКЖ обоих штаммов патогена на эффективность роста проростков из изолированных зрелых зародышей разных сортов мягкой пшеницы, контрастных по устойчивости к *F. graminearum*, на 10-е сутки культивирования выявлено неоднозначное отношение разных генотипов к влиянию ФКЖ. Влияние питательных контрольных сред на процент проростков, полученных после 10-и суток культивирования показано в табл. 4.

Таблица 4

Процент проростков, полученных из зрелых зародышей пшеницы на разных контрольных вариантах среды через 10 суток (% от высаженных для культивирования зародышей)

Сорт пшеницы	Контроль 1	Контроль 2	Контроль 3	Контроль 4	Контроль 5
Обрий	91.50±1.97	98.50±0.85	98.50±0.85	98.50±0.85	98.50±0.89
Никония	92.50±1.86	98.00±0.98	87.50±2.33	94.50±1.61	94.00±1.67
Фантазия	97.50±1.10	91.00±2.02	86.00±2.45	92.00±1.91	88.00±2.29
О.д. п/к	98.00±0.98	98.50±0.85	98.50±0.85	90.50±2.07	98.00±0.98

Учет проросших семян на 3-и и 10-е сутки показал, что всхожесть зародышей была разной. Особенно это проявилось у сортов Никония и Фантазия, у которых процент прорастания на 10-е сутки был значительно выше, чем на третьи.

По истечении 10 дней культивирования на всех контрольных вариантах питательных сред процент появившихся проростков был высоким. На отдельных вариантах сред этот показатель был снижен у сортов Фантазия и Никония. Процент появившихся проростков исследуемых сортов после десяти суток культивирования на средах с добавлением в среду MS ФКЖ, полученных при выращивании грибов на среде Чапека, показано в табл. 5.

Таблица 5

Процент проростков, полученных из зрелых зародышей пшеницы на средах с добавлением ФКЖ штаммов 56 и ав, росших на среде Чапека (относительно контроля 2 и контроля 3)

Сорт пшеницы	<i>F. graminearum</i> , штамм 56		<i>F. graminearum</i> , штамм ав	
	10 % ФКЖ	50 % ФКЖ	10 % ФКЖ	50 % ФКЖ
Обрий	63,53 ± 3,40	51,71 ± 3,53	73,38 ± 3,12	29,05 ± 3,21
Никония	82,32 ± 2,69	44,18 ± 3,51	70,56 ± 3,22	12,25 ± 2,31
Фантазия	57,33 ± 3,49	15,48 ± 2,55	53,23 ± 3,52	6,88 ± 1,78
Од. п/к	76,83 ± 2,97	30,53 ± 3,25	70,92 ± 3,21	7,38 ± 1,84

При действии 50% концентрации ФКЖ обоих штаммов, полученных на среде Чапека, процент проростков из зрелых зародышей устойчивого сорта Обрий был выше показателей среднеустойчивого сорта Никония и восприимчивых к патогену сортов Фантазия и Од. п/к. При этом, как уже отмечалось выше, действие ФКЖ штамма ав оказалось особенно сильным.

Данные этой таблицы четко отражают эффективность роста проростков из изолированных зрелых зародышей устойчивого, среднеустойчивого и восприимчивых сортов при добавлении в среду 50% концентрации ФКЖ обоих штаммов, полученных на среде Чапека.

Влияние 10% и 50% концентраций ФКЖ обоих штаммов, полученных на среде МСА, на эффективность роста 10-дневных проростков из изолированных зрелых зародышей указанных сортов показано в табл. 6.

Таблица 6

Процент проростков, полученных из зрелых зародышей пшеницы на средах с добавлением ФКЖ штаммов 56 и ав, росших на среде МСА (относительно контроля 4 и контроля 5)

Сорт пшеницы	<i>F. graminearum</i> , штамм 56		<i>F. graminearum</i> , штамм ав	
	10 % ФКЖ	50 % ФКЖ	10 % ФКЖ	50 % ФКЖ
Обрий	88,15 ± 2,28	84,71 ± 2,54	59,59 ± 3,46	53,19 ± 3,52
Никония	83,16 ± 2,64	64,86 ± 3,37	79,85 ± 2,83	78,02 ± 2,92
Фантазия	66,70 ± 3,33	59,84 ± 3,46	55,66 ± 3,51	55,44 ± 3,51
Од. п/к	73,75 ± 3,11	76,44 ± 3,00	71,49 ± 3,19	73,50 ± 3,12

Анализируя данные табл. 6, можно отметить, что процент проростков исследуемых сортов пшеницы после 10-и суток их культивирования на средах с добавлением в среду MS ФКЖ, полученных в результате выращивания двух штаммов гриба на среде МСА, не зависит от концентраций ФКЖ и штамма гриба. Снижение процента полученных проростков отмечено у устойчивого сорта Обрий при добавлении в среду ФКЖ штамма ав.

Выводы

1. Прорастание зрелых зародышей на питательной среде с добавлением ФКЖ, полученных на среде Чапека, значительно ингибируется, особенно при использовании 50% концентрации ФКЖ слабопатогенного штамма.

2. Угнетающее действие на прорастание зародышей 50% концентраций ФКЖ, полученных на среде Чапека, согласуется с уровнем чувствительности сортов пшеницы к фузариозу колоса в полевых условиях.

3. Предложенный метод можно использовать для ориентировочного прогноза степени устойчивости семенного материала к возбудителю фузариоза уже на третьи сутки культивирования зрелых зародышей.

Литература

1. Mohan S. Jain. Tissue culture - derived variation in crop improvement // Plant Breeding and Genetics FAO/IAEA Division, International Atomic Energy Agency, Vienna. Euphytica. — 2001. — V. 118. — P. 153-166.
2. Джос Л., Калашикова Е. А. Клеточная селекция пшеницы на устойчивость к септориозу // Тезисы докладов VII Международной конференции "Биология клеток растений in vitro, биотехнология и сохранение генофонда". — М., 1997. — С. 317.
3. Клечковская Е. А., Игнатова С. А., Слепченко А. И., Махновская М. Л., Литвиненко Н. А. Селекция in vitro генотипов пшеницы с комплексной устойчивостью к фузариозу злаков // Тезисы докладов VII Международной конференции "Биология клеток растений in vitro, биотехнология и сохранение генофонда". — М., 1997. — С. 372.
4. Белянская С. Л., Шамина З. Б., Волкова Л. А., Аерьянов А. А., Гайворонская Л. М. Создание схемы селекции in vitro клеточных клонов риса, устойчивых к *pyricularia orizae* sav // Тезисы докладов VII Международной конференции "Биология клеток растений in vitro, биотехнология и сохранение генофонда". — М., 1997. — С. 316.
5. Гайворонская Л. М., Магальонс Л. Б. Э., Ланикова В. П., Пасечник Т. Д. Экзометаболиты каллусов риса, устойчивых к пирикулярнозу сортов токсичных для возбудителя этой болезни // Тезисы докладов VII Международной конференции "Биология клеток растений in vitro, биотехнология и сохранение генофонда". — М., 1997. — С. 362.
6. Шарова А. П., Давыдова Ю. В., Кривоцов Г. Г., Ванюшин Б. Ф., Мелик-Саркисов О. С., Аветисов В. А. Пектолитические ферменты микроорганизмов в клеточной селекции растений на устойчивость // Тезисы докладов VII Международной конференции "Биология клеток растений in vitro, биотехнология и сохранение генофонда". — М., 1997. — С. 388.
7. Методы экспериментальной микологии / Под ред. Билай В. И. — К.: Наукова думка, 1982. — 550 с.
8. Комплексная оценка устойчивых генотипов пшеницы к фузариозу колоса. Методическое руководство / Составители: Бабаянц Л. Т., Гонтаренко О. В. — О.: СГИ, 1994. — 23 с.

Г. Л. Мазур¹, С. О. Ігнатова¹, О. В. Бабаянц²

¹ Південний біотехнологічний центр у рослинництві УААН, лабораторія культури тканин

Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна. Тел.: 395214

² Селекційно-генетичний інститут — національний науковий центр насінництва та сортовивчення УААН, відділ фітопатології та ентомології
Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна. Тел.: 395427

**ВПЛИВ ФІЛЬТРАТИВ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ ГРИБА
FUSARIUM GRAMINEARUM SHWABE НА ПРОРАСТАННЯ
ЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ ПШЕНИЦІ В КУЛЬТУРІ IN VITRO**

Резюме

Вивчено вплив різних концентрацій фільтратів культуральної рідини (ФКР) двох штамів гриба *Fusarium graminearum*, що відрізняються за патогенністю, на процес проростання ізольованих зрілих зародків пшениці та ріст паростків протягом 10 діб культивування *in vitro*. Виявлена різна відповідна реакція досліджуваних паростків на вплив ФКР в залежності від рівня стійкості сортів пшениці до грибного патогену.

Ключові слова: м'яка пшениця, зрілі зародки, умови *in vitro*, фільтрат культуральної рідини, ефекти впливу.

A. L. Mazur¹, S. A. Ignatova¹, O. V. Babayans²

¹ South Plant Biotechnology Center, Tissue Culture Laboratory,
Ovidiopskaya dor., 3, Odessa, 65036, Ukraine

² Plant Breeding and Genetics Institute UAAS,
Ovidiopskaya dor., 3, Odessa, 65036, Ukraine

**INFLUENCE OF THE CULTURED LIQUID STRAINS OF FUNGUS
FUSARIUM GRAMINEARUM SHWABE IN VITRO CULTURE OF
MATURE EBRYOS WHEAT**

Summary

It was studied the influence of different concentrations of the cultured liquid of fungus *F. graminearum*, two strains with different pathogenicity on the process of sprouting and growth of 10-days shoots from isolated mature embryos of common wheat. It was revealed the different return reaction of investigated material in connection with certain extent resistance degree of varieties to fungus pathogen.

Keywords: common wheat, embryos mature, *in vitro* culture, influence of cultured liquid of fungus, sprouting and growth.