

The peculiarities of callusogenesis and plant regeneration in isolated tissue culture of *Aloe vera* have been investigated. The influence of nutrient medium composition on these processes was shown. Juice of *Aloe vera* can reduce the frequency of induced by N-nitro-N-nitrosoguanidine mutations *S. typhimurium* TA 100. Juice of *Aloe vera* reduce the induced mutagenesis *S. typhimurium* TA100 on 52 %.

КОРНЯ Т. М., ИГНАТОВА С. А.

Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН

Украина, 65036, Одесса, ул. Овидиопольская дорога 3, e-mail: odonata@mail.ru

МОРФОГЕНЕЗ ЭКСПЛАНТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ОТБОРА IN VITRO ТОЛЕРАНТНЫХ К ФИЛЬТАТУ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ГРИБА FUSARIUM GRAMINEARUM SCHWABE ОБРАЗЦОВ

Одними из важных критериев селекции при создании качественного зерна пшеницы являются: продуктивность колосьев, устойчивость к полеганию, гербицидам, засухе, низким температурам и, конечно же, к болезням [1]. *Fusarium graminearum* Schwabe – возбудитель фузариоза колоса пшеницы, при котором потери урожая достигают в годы эпифитотий более 50%, при этом зерно становится непригодным для дальнейшего производства продуктов питания, в первую очередь из-за его низкого качества и содержащихся в зерне микотоксинов. Токсины разных штаммов данного гриба не разрушаются при обычной термической обработке в процессе приготовления пищи и способны вызывать тяжелые токсикозы, как у животных, так и у человека [2,3]. *F. graminearum* – представитель несовершенных грибов Deuteromycetes [4]. Патоген широко распространен в почве, способен наносить существенный вред сельскохозяйственным растениям [5]. В Одесском регионе по данным фитопатологов непатогенные и слабопатогенные изоляты фузариевых грибов способны вызывать чрезмерный рост растений, в то время как сильнопатогенные штаммы существенно сокращают количество и качество урожая [6]. Экологически чистым способом борьбы с фузариозом является создание устойчивых сортов. Однако селекция устойчивых к грибным патогенам сортов пшеницы длится около 10 лет. Поэтому для сокращения сроков создания устойчивых форм на некоторых этапах отбора целесообразным является применение методов биотехнологии, а именно – селекции *in vitro* и метода культуры пыльников пшеницы, что основывается на феномене андрогенеза [7,8].

В литературе описаны методы клеточной селекции с применением культуральных фильтратов, что дает возможность получать устойчивые к болезням растения с новыми ценными признаками [9,10]. Перспективным направлением селекции *in vitro* является метод гаплоидии или культуры пыльников [8], позволяющий создавать стабильные формы удвоенных дигаплоидов на селективном фоне патогена, что имеет ряд преимуществ. Однако регенерация растений мягкой пшеницы в культуре пыльников остаётся все еще низкой, поэтому актуальным для повышения эффективности создания толерантных форм пшеницы на селективном фоне является подбор питательных сред и условий культивирования пыльников пшеницы в присутствии селективного фактора.

Культивирование различных эксплантов пшеницы на таком селективном фоне как фильтрат культуральной жидкости (ФКЖ) *F. graminearum* в оптимальной концентрации направлено на получение толерантных к метаболитам гриба регенерантов. Вследствие этого необходимым является подбор концентрации в питательной среде ФКЖ *F. graminearum* для культивирования соматических эксплантов контрастных по полевой устойчивости сортов пшеницы для последующего использования данного уровня селективного фона в лабораторной оценке и отборе в условиях *in vitro* на устойчивость к фузариозу колоса. Ответ растения на действие культурального фильтрата в *in vitro* условиях проявляется в морфогенетических реакциях его эксплантов. Вследствие этого, целью работы было

изучение морфогенеза эксплантов пшеницы разного уровня растительной организации под влиянием ФКЖ *F. graminearum*.

Материал и методика

Материалом для выделения эксплантов служили 3 разных по полевой устойчивости к фузариозу колоса сорта мягкой пшеницы: Обрий (устойчивый), Фантазия одесская (среднеустойчивая) и Одесская полукарликовая (восприимчивый).

Эксплантами служили изолированные пыльники, зрелая пыльца, зрелые и незрелые изолированные зародыши. В качестве селективного агента использовали ФКЖ слабо- (*ab*) и сильнопатогенного (*5b*) штаммов *Fusarium graminearum*.

Приготовление культуральных фильтратов проводили после предварительной реактивации гриба на проросших семенах пшеницы и последующим посевом его мицелия на стандартную среду Чапека по описанной ранее методике [11]. Для культивирования зрелой пыльцы использовали концентрацию 15% ФКЖ. В среду 190-2 для культивирования пыльников ФКЖ добавляли в концентрациях 15% и 30% после автоклавирования питательной среды. В культуре незрелых зародышей использовали 50%- концентрацию ФКЖ. С целью определения природы селективного фактора ФКЖ вносили в питательную среду MS для культивирования зрелых зародышей в объёме 50% до и после автоклавирования питательной среды.

Результаты и их обсуждение

В результате исследований было выявлено ростостимулирующее влияние неавтоклавированных ФКЖ обоих штаммов на длину проростка зрелых зародышей устойчивого сорта Обрий. ФКЖ, которые не обрабатывали термически, стимулировали образование раневого каллуса у исследуемых сортов в культуре изолированных зрелых зародышей. При добавлении ФКЖ *F. graminearum* в первичную индукционную среду MS для культивирования незрелых зародышей отмечено положительное влияние на частоту регенерации зелёных растений только устойчивого сорта (табл. 1).

Таблица 1

Воздействие ФКЖ *F. graminearum* на разные признаки растения мягкой пшеницы в культуре *in vitro*

Сорта мягкой пшеницы	Обрий (устойчивый)		Фантазия одесская (среднеустойчивый)		Одесская полукарликовая (восприимчивый)	
	Навт	Авт	Навт	Авт	Навт	Авт
Варианты ФКЖ						
Исследуемый признак						
Прорастание изолированных зрелых зародышей	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	–	–
Частота образования раневого каллуса в культуре зрелых зародышей	+	Нет влияния	+	Нет влияния	+	Нет влияния
Длина проростка	+	Нет влияния			Нет влияния	Нет влияния
Длина корешка	Нет влияния	Нет влияния			–	–
Регенерация зеленых растений в культуре незрелых зародышей	+	+	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния
Прорастание пыльцы	Нет влияния		–		–	

Примечание:

Навт – неавтоклавированный ФКЖ;

«-» – достоверное отрицательное влияние ($p < 0,05$)

Авт – автоклавированный ФКЖ;

«+» – достоверное положительное влияние ($p < 0,05$);

ФКЖ двух штаммов *F. graminearum* независимо от термической обработки ингибировали рост главного корешка восприимчивого к фузариозу колоса сорта Одесская полукарликовая. Отрицательное влияние было также отмечено на прорастание зрелых зародышей восприимчивого сорта. ФКЖ двух штаммов подавлял прорастание пыльцевой трубки в культуре *in vitro* зрелой пыльцы. На уровне зрелого пыльцевого зерна были выявлены различия по степени воздействия ФКЖ сильно- и слабопатогенного штаммов у разных по устойчивости к фузариозу колоса сортов. При этом ФКЖ сильнопатогенного штамма в значительной мере подавлял образование пыльцевой трубки у среднеустойчивых сортов и практически полностью ингибировал прорастание пыльцы восприимчивого сорта.

При добавлении в индукционную среду для культивирования пыльников ФКЖ в зависимости от концентрации и от штамма гриба отрицательно влиял на частоту появления новообразований у всех сортов. На этапе регенерации растений из каллусов устойчивого сорта Обрий были получены зелёные растения практически на всех вариантах с ФКЖ; у среднеустойчивого сорта Фантазия одесская – на низких концентрациях с ФКЖ двух штаммов; у сорта Никония – только на контрольной питательной среде и на среде с низкой концентрацией ФКЖ слабопатогенного штамма. Не получено ни одного зелёного растения-регенеранта на селективных средах с ФКЖ у восприимчивого сорта Одесская полукарликовая. ФКЖ двух штаммов положительно влиял на частоту появления регенерационноспособного каллуса у среднеустойчивых и устойчивых сортов и большинства гибридных комбинаций (табл. 2).

Таблица 2

Воздействие неавтоклавированного ФКЖ *F. graminearum* на морфогенез эксплантов мягкой пшеницы в культуре *in vitro* пыльников

	Обрий (устойчивый)	Фантазия одесская (среднеустойчивый)	Одесская полукарликовая (восприимчивый)
Индукция новообразований в культуре пыльников	–	–	–
Процент морфогенного каллуса в культуре пыльников	+	+	–
Регенерация зеленых растений	Регенерация практически на всех вариантах	Регенерация <u>отсутствует</u> на высоких концентрациях ФКЖ	Регенерация <u>отсутствует</u>

Примечание:

«+» – достоверное положительное влияние ($p < 0,05$);

«-» – достоверное отрицательное влияние ($p < 0,05$)

Анализируя полученные данные можно заключить, что положительное влияние неавтоклавированных ФКЖ на уровне образования раневого каллуса, роста проростков в культуре изолированных зародышей, а также повышения морфогенного каллуса в культуре пыльников и изолированных незрелых зародышей связаны с содержанием в ФКЖ неких веществ гормональной природы. Можно сделать предположение о содержании в них гормонов гибберелловой группы. Отрицательное влияние ФКЖ независимо от его термической обработки на параметры роста и прорастания зрелых зародышей и морфогенетический потенциал восприимчивого сорта Одесская полукарликовая указывает на возможное наличие в ФКЖ термостабильных веществ, как, например, фузариевых микотоксинов.

Использование селективного фактора в виде ФКЖ представляет интерес, поскольку он способен положительно влиять на экспланты разных уровней

организации устойчивых к фузариозу колоса форм пшеницы и одновременно подавлять морфогенез восприимчивых образцов. Данное свойство культурального фильтрата может быть использовано при моделировании условий отбора в биотехнологических системах *in vitro* устойчивых к *F. graminearum* форм мягкой пшеницы.

Литература

1. Пшеницы мира / В. Ф. Дорофеев, Р. А. Удачин, Л. В. Семенова и др.; Под ред. акад. В. Ф. Дорофеева; Сост. Р.А. Удачин. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: ВО Агропромиздат. Ленингр. Отд-ние, 1987. – 560 с.
2. *Доброзракова Т. Л.* Сельскохозяйственная фитопатология / Под ред. д. б. н. М. К. Хохрякова. – Л.: отд. изд-ва «Колос», 1966 – 328 с.
3. Определитель паразитных грибов на плодах и семенах культурных растений / А. Я. Семенов, Л. П. Абрамова, М. К. Хохряков. – Л.: Колос. Ленингр. отд-ние, 1980 – 302 с.: ил.
4. *Билай В. И.* Фузариозы. Изд-е второе дополн., АН УССР Ин-т микробиологии и вирусологии им Д. К. Заболотного. – К.: «Наукова думка», - 1977. - 442 с.
5. *Волощук Г. Д.* Суспензійна культура пшениці *Triticum aestivum* L. та її використання в генетико-селекційних дослідженнях: Автореферат дис. .. канд. біол. наук. 03.00.12/ Інститут фізіології рослин і генетики НАНУ. – К., 2000. - 19 с.
6. *Бабаянц О. В.* Видовой состав и вредоносность микробиоты колосьев озимой пшеницы южной степи Украины // Междунар. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы иммунитета и защиты сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей» СГИ-НЦСС. – Одесса, 2007. – С. 42.
7. *Sunderland N.* Anther and pollen culture // Proceed. IV John Innes Sympos. "The plant genome". Norwich, 1980, P. 171-183.
8. *Wolf-Hall C.E., Hanna M.A., Bullerman L.B.* Stability of deoxynivalenol in heat-treated foods // J. Food Prot. – 1999. – V.62. – N 8. – P.962–964.
9. *Bruins M.B.M.* Fusarium Head Blight resistance in wheat. Wageningen, – 1998. – 131 p.
10. *Корня Т. М., Ігнатова С. А.* Вивчення селективних властивостей фільтрату культуральної рідини *Fusarium graminearum* Schwabe в культурі пиляків м'якої пшениці // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. – 2008. – вип. 3(15), С. 99-106
11. *Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І. І.* Цитогенетичний та молекулярно-генетичний аналіз клітинних ліній м'якої пшениці, стійких до культурального фільтрату *G. graminis* var. *tritici* // Геном рослин. Українське товариство генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова ПБЦ УААН: Зб. наук. статей. – Одеса, 2008. – С. 45-48

Резюме

Показано, что селектирующим агентом в ФКЖ *F. graminearum* являются вещества, претерпевающие термическую обработку. Отмечено стимулирующее влияние не подвергнувшегося высоким температурам ФКЖ на рост проростка, образование раневого каллуса в культуре зародышей и долю регенерационноспособных новообразований в культуре пыльников мягкой пшеницы.

Показано, що селектуючим фактором в ФКР *F. graminearum* є речовини, що витримують термічну обробку. Відзначено стимулюючий вплив ФКР, що не підлягли впливу високих температур, на довжину паростків, появу раневого калюсу в культурі зародків і відсоток регенераційноспроможних новоутворень в культурі пиляків м'якої пшениці.

Results of the experiments were shown that the inhibition of germination of the isolated mature embryos and repression of the length of main root at the susceptible cultivars did not depend on the thermal processing investigated CLF. Positive influence CLF on frequency of regeneration of green plants from quantity of newformations in comparison to the control that

was observed on different variants CLF depending on the genotype of an investigated material of wheat was noticed.

КРУГЛОВА Н.Н.

Институт биологии Уфимского НЦ РАН,

Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: Kruglova@anrb.ru

К ПРОБЛЕМЕ УНИФИКАЦИИ ТЕРМИНОЛОГИИ ПРИ РАЗРАБОТКЕ БИОТЕХНОЛОГИИ АНДРОКЛИННОЙ ГАПЛОИДИИ *IN VITRO*

Современные инновационные биотехнологии растений во многом базируются на данных клеточной биологии и клеточной инженерии *in vitro*. Приоритетное направление в этой области – метод культуры *in vitro* пыльников, приводящий к формированию гаплоидных растений-регенерантов из микроспор/клеток пыльцевого зерна. К настоящему времени в этой области накоплен значительный фактический материал (например, по хозяйственно ценным злакам [Сатарова, 2002; Игнатова, 2004; Белинская, 2007; Бишимбаева, 2007]). Необходима, тем не менее, дальнейшая разработка методологических основ изучения культуры *in vitro* пыльников. Одна из самых важных проблем в этой области – унификация используемой терминологии.

Материал и методы

Цель данной работы – проанализировать терминологию, используемую при культивировании пыльников *in vitro*, на примере яровой мягкой пшеницы. Метод культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы разработан в лаборатории экспериментальной эмбриологии растений Института биологии Уфимского НЦ РАН в творческом содружестве с лабораторией эмбриологии и репродуктивной биологии Ботанического института им. В.Л.Комарова РАН (г. Санкт-Петербург, зав. лабораторией – член-корр. РАН Т.Б.Батыгина) и с лабораторией селекции яровой пшеницы Селекционного центра по растениеводству Башкирского НИИ СХ РАСХН (г. Уфа, зав.лабораторией – к. с.-х. н. В.И.Никонов) [Круглова, Батыгина, 2002; Круглова с соавт., 2005; Круглова, Сельдиминова, 2008]. За основу был взят метод культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы в разработке кафедры генетики Саратовского государственного университета (зав. кафедрой – проф. В.С.Тырнов) [Суханов, Тырнов, 1976; Суханов, 1983].

Результаты и обсуждение

Рассмотрим используемую терминологию с позиции эмбриологии растений.

Для обозначения самого феномена образования гаплоидного растения-регенеранта в культуре *in vitro* пыльников используются различные термины: «пыльцевой эмбриогенез», «пыльцевой андрогенез», «микроспориальный эмбриогенез», «андрогенный эмбриогенез», «экспериментальный андрогенез», «гаплоидный андрогенез», «экспериментальная гаплоидия», «экспериментальная андроклиния» и наиболее часто, особенно в западной литературе, – «андрогенез *in vitro*» («androgenesis *in vitro*»). Мы предлагаем активно использовать предложенный С.С.Хохловым [1976] термин «андроклиния» (от греч. *ανδρος* – мужской, *κλίνας* – имеющий склонность) как наиболее верно отражающий суть явления. Применять же распространенный термин «андрогенез *in vitro*» некорректно. Нельзя не согласиться с мнением В.С.Тырнова [1998, 2005] о том, что, согласно существующей терминологии, биолог (как ботаник, так и зоолог) подразумевает под «андрогенезом» («мужским партеногенезом») развитие нового организма из гаметы – спермия. Немаловажно и то, что андрогенез в его классическом значении связан с аллоплазматическим состоянием организма (особь имеет материнскую цитоплазму и отцовское ядро), тогда как при так