

раньше, чем у генотипов, формирующих зеленые растения с высокой частотой. Различия в соотношении зеленых и альбиносных растений могут быть обусловлены также несинхронностью прохождения микроспорогенеза в пределах выборки растений.

Таким образом, ультраструктурный анализ клеток альбиносных растений-регенерантов на разных стадиях развития указывает, на наш взгляд, о том, что в их клетках развитие пластид блокируется на ранних этапах, в них не происходит формирование гранально-ламеллярной мембранной системы, а затем идет постепенная деградация пластид и ускоренное старение клеток.

#### **Литература**

1. *Careda S. and Clement C.* Androgenesis and albinism in Poaceae: influence of genotype and carbohydrates// *Anther and Pollen: from biology to biotechnology*. - Berlin, 1999. – P. 211–229.

2. *Kasha K. J., Hu T. C., Oro R., Simion E., Shim Y. S.* Production of haploids in cereals// *Journal of Experimental Botany*. 2001. Vol. 52. P. 1227–1238.

3. *Cistuñ L., Ramos A., Castillo A. M.* Influence of anther pretreatment and culture medium on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars// *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1999. – Vol. 55. – P. 159–166.

4. *Reinbothe S., Reinbothe C.* Regulation of chlorophyll biosynthesis in angiosperms// *Plant Physiol*. –1996. –Vol. 111.– P. 1–7.

5. *Мозгова Г. В.* Изменение хлоропластного генома и структурных белков фотосинтетического аппарата альбиносных растений, полученных методом культуры пыльников пшеницы // Сборник трудов молодых ученых НАН Беларуси. –2004. – Т. 2. – С. 40–45.

6. *Larsen E. T., Tuveesson I. K. D., Andersen S. B.* Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley anther culture// *Theor. Appl. Genet.* – 1991. – Vol. 82. – P. 417–420.

7. Атлас ультраструктуры растительных тканей. / Под ред. М. Ф. Даниловой и Г. М. Козубова. Петрозаводск, 1980. 456 с.

8. *Sunderland N., Huang B.* Barley anther culture: the switch of program and albinism// *Hereditas Suppl.* – 1985. –Vol. 3. – P. 27–40.

#### **Резюме**

Ультраструктурный анализ клеток альбиносных растений-регенерантов на разных стадиях развития указывает на то, что в их клетках развитие пластид блокируется на ранних этапах, в них не происходит формирование гранально-ламеллярной мембранной системы, а затем идет постепенная деградация пластид и ускоренное старение клеток.

An ultrastucture analysis of albino regenerant plant cells at various developmental stages indicates that plastid development in their cells is blocked at early stages. Granal-lamellar membrane system is not formed and then gradual plastid degradation and rapid cell senescence proceed.

**ЯРУЛЛИНА Л.Г., СУРИНА О.Б., МАКСИМОВ И.В.**

*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,  
Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 71; тел. (347)2356088; e-mail: phyto@anrb.ru*

### **ТЕХНОЛОГИЯ *IN VITRO* В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ПАТОГЕНАМ**

Метод культуры *in vitro* открывает широкие возможности для изучения молекулярных и клеточных механизмов иммунитета растений, таких как первичные

этапы узнавания, трансдукции сигнала, индукции и экспрессии защитных реакций, механизмов действия индукторов устойчивости, а также других вопросов, выяснение которых затруднено или невозможно на уровне целого растения.

В настоящее время широко обсуждается участие активных форм кислорода в формировании и проявлении многообразия защитных реакций растений к фитопатогенам. Благодаря работам ряда специалистов в значительной мере стала понятна последовательность событий, развивающихся при контакте растения с патогеном [1; 5]. Важный этап в формировании защитного эффекта – резкая и многократная активация локализованных в клеточной стенке и плазмалемме оксидоредуктаз, регулирующих уровень активных форм кислорода (АФК) [6]. Необходимость такой регуляции диктуется тем, что АФК, являясь вторичными мессенджерами, запускают каскад защитных реакций растений, опосредуют лигнификацию клеточной стенки, и, проявляя биоцидные свойства, подавляют рост микроорганизмов, индуцируют гиперчувствительную гибель клеток хозяина в зоне инфицирования.

В последнее время появились данные о влиянии фитогормонов на экспрессию генов оксидоредуктаз. Так, показано, что транскрипция гена оксалактоксидазы пшеницы находится под контролем ауксина [2], АБК активирует один из ключевых ферментов образования АФК – НАДФН-оксидазу [4], а цитокинины участвуют в регуляции экспрессии гена пероксидазы [3].

В задачу данной работы входило изучение влияния экзогенных гормонов на морфологию и устойчивость к возбудителю твердой головки каллусов восприимчивой пшеницы, в сравнении с каллусами устойчивых образцов, обусловленную накоплением перекиси водорода с участием оксалактоксидазы.

#### **Материалы и методы**

В качестве эксплантов для получения каллусов использовали незрелые зародыши пшеницы *Triticum aestivum* L. сортов Жница и Заря и пшеницы *T. timopheevii* Zhuk. (образец к-58666 из коллекции Всесоюзного НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова, С.-Петербург). На 3 сут от начала 2-ого пассажа часть каллусов инфицировали телиоспорами возбудителя твердой головки *Tilletia caries* (DC.) Tul. В опытных вариантах каллусы культивировали в присутствии ИУК и АБК в концентрации 2 мг/л, кинетина в концентрации 0.2 мг/л.

Оксалактоксидазу выделяли с использованием 0.05 М сукцинатного буфера, pH 3.8 по методике [7]. Активность фермента оценивали спектрофотометрически на 10 сут после инокуляции. Единица активности фермента соответствовала количеству окисленного субстрата, дающего прирост оптической плотности  $\Delta A$  за 1 мин. Содержание перекиси водорода в каллусах определяли с использованием ксиленолового оранжевого на приборе для иммуноферментного анализа АИФ – 340/620-01 (С.-Петербург) при длине световой волны 560 нм. В каждом варианте фиксировали по 5 - 10 каллусов. В таблице и на рисунках представлены средние значения из 3-х биологических повторов и ошибка средней.

#### **Результаты и обсуждение**

Контрольные каллусы восприимчивого к возбудителю твердой головки сорта Жница характеризовались как слабо обводненные, рыхлые, крупно глобулярные образования, имеющие небольшое количество плотных участков (в среднем 2-3 на каллус). Присутствие в среде культивирования фитогормонов по-разному влияло на морфологию каллусов. Так, введение АБК или кинетина в среду культивирования приводило к 2-х кратному увеличению количества плотных участков на фоне сокращения площади рыхлого каллуса. Кроме того, присутствие кинетина в среде культивирования в этот срок опыта инициировало появление в каллусах единичных ризоидов. Введение ИУК в среду культивирования приводило к разрыхлению каллусов и инициировало в них ризогенез. Инфицирование каллусов пшеницы сорта Жница

возбудителем твердой головни инициировало ризогенез, что, вероятно, связано со способностью патогена секретировать в растительные ткани ауксины.

Присутствие фитогормонов в среде культивирования изменяло защитные свойства каллусов. Так, если в контроле споры гриба начинали прорастать через 7 сут после инокуляции, то в варианте опыта с ИУК это происходило уже через 5 сут, а с АБК и кинетином только через 8 сут. В ходе инфицирования мицелий гриба рос на контрольных каллусах и на каллусах, культивируемых с ИУК, довольно быстро и через 20 сут после инфицирования покрывал примерно 40-50 % поверхности каллусов. Введение в питательную среду АБК и кинетина замедляло распространение мицелия в каллусе и к указанному сроку мицелий покрывал только около 20 % поверхности каллусов. Таким образом, внесение ИУК в среду культивирования каллусов пшеницы сорта Жница способствовало росту возбудителя твердой головни, в то время как введение АБК и кинетина, напротив, существенно ограничивало распространение мицелия. Вероятно, повышение устойчивости было обусловлено появлением в каллусах плотных участков, а снижение устойчивости - разрыхлением каллусов. Для проверки этого предположения нами были исследованы морфология и развитие защитного ответа каллусов устойчивых образцов пшеницы.

Наши наблюдения показали, что контрольные каллусы устойчивых форм мягкой пшеницы сорта Заря и образца к-58666 пшеницы Тимофеева представляли собой плотные, глобулярные образования. В каллусах пшеницы сорта Заря споры гриба проросли через 9 сут, в каллусах пшеницы Тимофеева только через 10 сут. Более того, спустя 3 недели после инокуляции мицелий возбудителя твердой головни покрывал только 10 % площади поверхности каллусов устойчивых образцов пшеницы. Совокупность полученных данных показывает, что одним из факторов устойчивости каллусов является их высокая структурированность.

Как известно,  $H_2O_2$  является сигнальной молекулой и участвует в запуске защитных реакций в растениях, в то же время, в нормальных условиях она участвует в процессах морфогенеза. Нашей задачей было выявление связи между уровнем  $H_2O_2$ , структурированностью каллусов пшеницы и их устойчивостью к грибу. В интактных каллусах высоко устойчивого образца пшеницы *T. timopheevii* содержание перекиси водорода было самым высоким и составляло  $32.1 \pm 1.8$  мкМ/г по сравнению с  $15.0 \pm 0.9$  мкМ/г в каллусах пшеницы восприимчивого сорта Жница (табл. 1).

При инфицировании в каллусах всех исследуемых видов пшеницы концентрация  $H_2O_2$  повышалась в различной степени. Так, если в инфицированных каллусах пшеницы *T. timopheevii* содержание  $H_2O_2$  увеличивалось на 66%, пшеницы сорта Заря – на 53%, то у каллусах пшеницы сорта Жница только на 26% относительно контроля. Добавление ИУК в среду культивирования каллусов пшеницы сорта Жница приводило к повышению уровня перекиси водорода на 35%. В то же время в варианте с АБК содержание  $H_2O_2$  превышало контрольный вариант на 45%, а с кинетином – на 57%.

Таблица 1

**Содержание  $H_2O_2$  (мкМ/г сырого веса) в каллусах пшеницы при культивировании в присутствии фитогормонов и при инфицировании возбудителем твердой головни (12 сут после инфицирования)**

Вариант опыта	Контроль	Инфицирование
сорт Жница		
контроль	15.0±0.9	18.9±0.4
ИУК, 2.0 мг/л	20.2±0.3	23.8±0.5
Кинетин, 0.2 мг/л	23.5±2.7	48.9±3.7
АБК, 2.0 мг/л	21.8±1.2	25.1±1.5
сорт Заря		
контроль	23.7±1.9	36.3±2.1

<i>T. timopheevii</i>		
контроль	32.1±1.8	53.2±2.6

Таким образом, в присутствии АБК и кинетина накопление перекиси водорода в каллусах было намного сильнее, чем на среде, содержащей ИУК. Таким образом, ограничение роста патогена могло быть обусловлено повышением содержания перекиси водорода в каллусах пшеницы сорта Жница под воздействием фитогормонов.

Наблюдаемые изменения в уровне  $H_2O_2$  могли быть связаны с активностью ферментов, локализованных в клеточной стенке и изменениями в биохимической составляющей апопласта, в том числе оксалаксоксидазе. Контрольные каллусы устойчивых форм пшеницы характеризовались более высокой активностью оксалаксоксидазы как в цитоплазматической, так и ионно-связанной с клеточной стенкой фракциях фермента по сравнению с каллусами восприимчивой (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние фитогормонов на активность оксалаксоксидазы (ед. на 1 г сырой массы) в каллусах пшеницы при инфицировании возбудителем твердой головни *T. caries* (10 сут после инокуляции)**

Варианты	контроль		инфицирование	
	во фракции фермента			
	цитоплазматической	ионно-связанной	цитоплазматической	ионно-связанной
сорт Жница				
контроль	15.9±0.8	0.98±0.06	21.3±1.9	0.63±0.04
ИУК	11.3±0.5	0.79±0.04	14.5±0.8	0.58±0.03
Кинетин	26.2±1.7	1.32±0.08	30.9±2.7	1.21±0.07
АБК	20.1±1.4	1.14±0.05	27.8±1.6	0.93±0.05
сорт Заря				
контроль	18.9±1.2	1.09±0.05	29.6±1.9	1.64±0.09
<i>T. timopheevii</i>				
контроль	31.4±2.1	1.36±0.09	50.1±3.5	2.34±1.8

При инфицировании повышение активности оксалаксоксидазы в каллусах восприимчивой пшеницы наблюдалось только в цитоплазматической фракции фермента. В то время как, в устойчивых формах она повышалась как в цитоплазматической, так и в ионно-связанной с клеточными стенками фракциях белка. Введение АБК и кинетина в среду культивирования каллусов восприимчивой пшеницы сорта Жница приводило к индукции оксалаксоксидазы в обеих фракциях фермента, но особо высокое индуцирующее действие эти гормоны оказывали на ионно-связанную фракцию. Стимулирующий эффект АБК был ниже: активность оксалаксоксидазы в цитоплазматической фракции белка повышалась только в 1.3 раза, а в ионно-связанной с клеточной стенкой – в 1.5 раза (табл. 2).

Таким образом, результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что введение в среду культивирования каллусов пшеницы АБК и кинетина инициировало в них образование плотных непоражаемых грибом участков, введение ИУК – к разрыхлению каллусов и увеличивало число ризоидов. Появление плотных участков, усиление ризогенеза под влиянием гормонов было сопряжено с повышением уровня перекиси водорода в каллусах. Можно предположить, что метаболические пути, приводящие к накоплению этого соединения, различаются. Так, если в случае с АБК и кинетина повышение концентрации перекиси водорода было обусловлено индукцией активности оксалаксоксидазы в области клеточной стенки, то при воздействии ИУК более высокий уровень  $H_2O_2$ , вероятно, связан с ингибированием под ее воздействием пероксидазы. В первом случае это способствовало повышению устойчивости каллусов

пшеницы к возбудителю твердой головни, а во втором, приводило к снижению их защитных свойств. Полученные результаты дают основание считать, что фитогормоны участвуют в формировании устойчивости растительных клеток к возбудителю твердой головни за счет регуляции активности ферментов про/антиоксидантной системы, способствующих не только накоплению перекиси водорода в зоне инфицирования, но и ее утилизации в ходе последующих защитных реакций.

Работа выполнялась при финансовой поддержке РФФИ №05-04-48310

#### **Литература**

1. *Аверьянов А.А.* Активные формы кислорода и иммунитет растений // Успехи современной биологии. - 1991. - Т. 111. - С. 722-738.
2. *Berna A., Bernier F.* Regulated expression of a wheat germin gene in tobacco: oxalate oxidase activity and apoplasmic localization of the heterologous protein // Plant Mol. Biol. - 1997. - vol. - 33. P. 417-429.
3. *Dong X.* Finding the missing pieces in the puzzle of plant disease resistance // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1995. - vol. - 92. P. 7137-7139.
4. *Guan L., Scandalios J.C.* Developmentally related responses of maize catalase gene to salicylic acid // Proc Natl. Acad. Sci. USA. - 1995. - vol. - 92. - P. 5930-5954.
5. *Kawano T.* Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. // Plant Cell Rep. - 2003. - vol. 21. - P. 829-837
6. *Mittler R.* 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science. 7: P. 405-410
7. *Vuletić M., Sukalovich V.H.* Characterization of cell wall oxalate oxidase from maize roots // Plant Sci. 2000. - vol. - 157. - P. 257-263.

#### **Резюме**

Исследовано влияние фитогормонов на морфологию и устойчивость каллусов мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. к инфицированию возбудителем твердой головни *Tilletia caries* Tul. Выдвинуто предположение, что накопление перекиси водорода в результате индуцирующего воздействия кинетина и АБК на активность оксалаксоксидазы является одним из факторов, повышающих устойчивость каллусов пшеницы к патогену.

The influence of phytohormones on resistance of wheat (*Triticum aestivum* L) calluses to bunt agent *Tilletia caries* Tul. was studied. Probably, the accumulation of hydrogen peroxide in wheat calluses under influence of kinetin and ABA on oxalateoxidase activity is one of the factors increasing wheat resistance to bunt agent.