

методов биотехнологии для размножения генетически ценных форм лесных древесных видов // Хвойные бореальной зоны.-2007. - Т. 24, №2-3. - С.309-318.

5. *Klimaszewska K., Cyr D. R.* Conifer somatic embryogenesis: I. Development // *Dendrobiology*. – 2002. – Vol. 48. – P. 31-39.

6. *Lelu M. A., Bastien C., Klimaszewska K., Charest P.J.* An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): Part 2. Control for germination and plantlet development // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 1994. – Vol. 36. – P. 117-127.

7. *Lelu-Walter M-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K.* Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis // *Plant Cell Tiss Organ Cult* – 2008 – Vol. 92 – P. 31–45

8. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, №4. – P. 473-497.

9. *Park Y-S.* Implementation in conifers somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirement and development considerations // *Ann. For. Sci.* – 2002. – Vol. 59. – P. 651-656.

10. *Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods / Eds. O.L. Gamborg, G.C. Phillips.* – Berlin: Springer-Verlag, 1995. – 358 pp.

11. *Singh H.* Embryology of gymnosperms / Berlin-Stuttgart: Gebrüder Borntraeger, 1978. – 304 p.

Резюме

Инициация соматического эмбриогенеза у лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и сосны сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) проводилась с использованием зиготических зародышей на разных стадиях их развития. Культивирование велось на среде $\frac{1}{2}$ MS, MS, $\frac{1}{2}$ LV, LV и MSG, и MA с гормонами 2,4-Д, 6-БАП, ИМК и АБК в разных концентрациях. Успешность соматического эмбриогенеза обусловлена гормональной регуляцией и связана с генотипом дерева.

Induction of somatic embryogenesis in Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) and Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) has been conducted from zygotic embryos. Culturing was made on $\frac{1}{2}$ MS, MS, $\frac{1}{2}$ LV, LV, MSG and MA nutrition media with hormones 2.4-D, 6-BAP, IBA and ABK in different concentrations. The success of somatic embryogenesis is due to hormonal regulation and tree genotypes.

ЯРУЛЛИНА Л.Г., ТРОШИНА Н.Б., СУРИНА О.Б.

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН

Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 71, e-mail: phyto@anrb.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОВМЕСТНЫХ КУЛЬТУР РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК С ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ГРИБНЫХ БОЛЕЗНЕЙ В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ

Одной из первоочередных проблем современной биологии является выявление путей формирования устойчивости растений к фитопатогенам. Важный этап в формировании защитного эффекта – резкая и многократная активация локализованных в клеточной стенке и плазмалемме оксидоредуктаз, регулирующих уровень активных форм кислорода [Kawano, 2003]. В последнее время появились данные о влиянии фитогормонов на экспрессию генов оксидоредуктаз. Так экспрессия гена оксалатоксидазы находится под контролем ауксина [Berna, Bernier, 1999], НАДФН-оксидаза активируется АБК [Guan et al., 1997], цитокинины участвуют в регуляции

экспрессии гена пероксидазы [Dong, 1998].

Удобной моделью для изучения механизмов формирования защитных реакций растений к фитопатогенам могут служить совместные культуры растительных клеток с возбудителями болезней. Такая культура у нас была получена с использованием каллусов пшеницы и спор гриба *Tilletia caries*, причем обнаружены различия в степени инфицируемости грибом различных участков каллуса. В задачу данной работы входило изучение влияния экзогенных гормонов на морфологию и устойчивость к возбудителю твердой головки каллусов пшеницы различной устойчивости, 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. Зародыши пшеницы изолировали через 12–15 сут после начала цветения растений из сформировавшихся зерновок. Изолированные зародыши высаживали на среду Мурасиге и Скуга (МС) и культивировали при 26 °С в темноте. В опытных вариантах каллусы культивировали в присутствии ИУК и АБК в концентрации 2 мг/л, кинетина в концентрации 0.2 мг/л. На 3 сут от начала 2-ого пассажа часть каллусов инфицировали телиоспорами возбудителя твердой головки *T. caries* (DC.) Tul. О степени устойчивости каллусов к грибу судили по скорости прорастания телиоспор и площади поверхности каллусов, покрытой его мицелием, через 20 сут после инокуляции каллусов.

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) (рис. 1-*а*). 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 (рис. 1-*б*, *в*). 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 (рис. 1-*г*). Инфицирование каллусов пшеницы сорта Жница инициировало ризогенез (рис. 1-*а*), что, вероятно, связано со способностью патогена секретировать в растительные ткани ауксины.

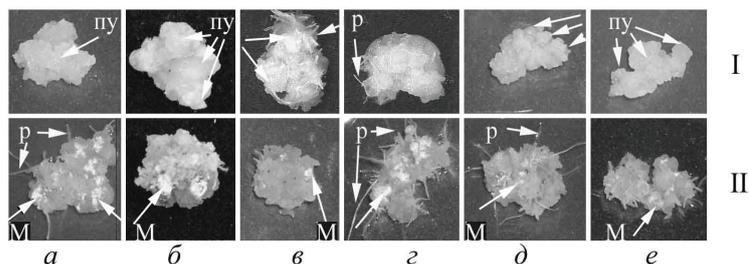


Рис. 1. Влияние фитогормонов на морфологию и устойчивость к возбудителю твердой головки каллусов пшеницы сорта Жница (а-г), Заря (д) и *T. timopheevii* (е) через 20 сут после нанесения спор: I – неинфицированные каллусы; II- инфицированные каллусы; а – контрольная среда; б-г – питательная среда, содержащая фитогормоны АБК (б), кинетин (в) и ИУК (г). Стрелками указаны: М – мицелий гриба; пу – плотные участки; р - ризоиды.

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 (рис. 1-Па, з). Введение в питательную среду АБК и кинетина замедляло распространение мицелия в каллусе и к указанному сроку мицелий покрывал только около 20 % поверхности каллусов (рис. 1-Пб, в). 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.

Наши наблюдения показали, что контрольные каллусы устойчивых форм мягкой пшеницы сорта Заря и образца к-58666 пшеницы Тимофеева представляли собой плотные, глобулярные образования (рис. 1-Пд, е). Инфицирование инициировало в них единичный ризогенез. Обнаружено, что на каллусах пшеницы сорта Заря споры гриба прорастали через 9 сут, на 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 (рис. 1-Пд, е). 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. В интактных каллусах высоко устойчивого образца пшеницы *T. timopheevii* содержание перекиси водорода было самым высоким и составляло 32.1 ± 1.8 мкМ/г по сравнению с $15,0 \pm 0.9$ мкМ/г в каллусах пшеницы восприимчивого сорта Жница (рис. 2). 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 в каллусах пшеницы сорта Жница только на 26% относительно контроля (рис. 2). Добавление ИУК в среду культивирования каллусов пшеницы сорта Жница приводило к повышению уровня перекиси водорода на 35% (рис. 2). В то же время в варианте с АБК содержание H_2O_2 превышало контрольный вариант на 45%, а с кинетином – на 57% (рис. 2). Таким образом, ограничение роста патогена могло быть обусловлено повышением содержания перекиси водорода в каллусах пшеницы сорта Жница под воздействием фитогормонов.

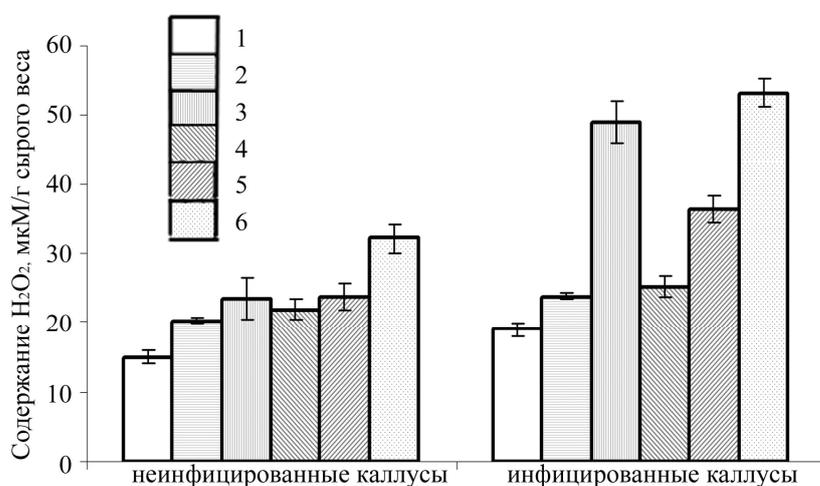


Рис. 2. Содержание H_2O_2 (мкМ/г сырого веса) в каллусах пшеницы при культивировании в присутствии фитогормонов и при инфицировании возбудителем

твердой головни (12 сут после инфицирования). Сорт Жница: 1- контроль, 2- ИУК, 3 – кинетин, 4 – АБК, 5 – сорт Заря, 6 - *T. timopheevii*.

Наблюдаемые изменения в уровне перекиси водорода могли быть связаны с активностью ферментов, локализованных в клеточной стенке, в том числе оксалатоксидазы. Контрольные каллусы устойчивых форм характеризовались более высокой активностью оксалатоксидазы в ионно-связанной с клеточной стенкой фракции фермента по сравнению с каллусами восприимчивой пшеницы (табл. 1).

Таблица 1.

Влияние фитогормонов на активность оксалатоксидазы в ионно-связанной фракции (ед/г сырой массы) в каллусах пшеницы при инфицировании возбудителем твердой головни *T. caries* (12 сут после инфицирования)

1. Варианты	2. Контроль	3. Инфицирование
4. сорт Жница		
5. контроль	6. 0.98±0.06	7. 0.63±0.04
8. ИУК	9. 0.79±0.04	10. 0.58±0.03
11. Кинетин	12. 1.32±0.08	13. 1.21±0.07
14. АБК	15. 1.14±0.05	16. 0.93±0.05
17. сорт Заря		
18. контроль	19. 1.09±0.05	20. 1.64±0.09
21. <i>T. timopheevii</i>		
22. контроль	23. 1.36±0.09	24. 2.34±1.8

Любопытно, что при инфицировании в каллусах восприимчивой пшеницы наблюдалось снижение активности оксалатоксидазы в области клеточной стенки, в то время как, в каллусах устойчивых формах этот показатель значительно возрастал (табл. 1). Введение АБК и кинетина в среду культивирования каллусов восприимчивой пшеницы сорта Жница приводило к индукции активности оксалатоксидазы (табл. 1). Так, в каллусах пшеницы под воздействием кинетина активность оксалатоксидазы повышалась в 2 раза относительно контроля. Стимулирующий эффект АБК на активность оксалатоксидазы был ниже (табл. 1).

Выводы

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 оксалатоксидазы 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 на совместной культуре результаты дают основание считать, что фитогормоны участвуют в формировании устойчивости растительных клеток к возбудителю твердой головни за счет регулирующего воздействия на активность ферментов про/антиоксидантной системы.

Литература

1. 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.
2. Berna A., Bernier F. Regulated expression of a wheat germin gene in tobacco: oxalate oxidase activity and apoplastic localization of the heterologous protein // Plant Mol. Biol. – 1997. - vol. 33. - P. 417–429.
3. 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.
3. Dong X. Finding the missing pieces in the puzzle of plant disease resistance // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1998. - vol. - 92. - P. 7137- 7186.

Резюме

На совместных культурах каллусов пшеницы *Triticum aestivum* L. и *T. timopheevii* с возбудителем твердой головни *Tilletia caries* Tul. исследовано влияние фитогормонов на содержание перекиси водорода, активность оксалатоксидазы и устойчивость клеток к инфицированию. Обнаружено, что АБК и кинетин подавляли развитие патогена, повышали активность оксалатоксидазы и уровень перекиси водорода в каллусах.

The influence of phytohormones on resistance of wheat (*Triticum aestivum* L, *T. timopheevii*) calluses to bunt agent *Tilletia caries* Tul. was studied. It revealed that ABA and kinetin on calluses induced of oxalateoxidase activity, increased of hydrogen peroxide level, decreased of fungi teliospores germination, induced occurrence of not infected with pathogen dense sites.