

УДК 561.143.6

ДОБІР ТА ЦИТОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ СТІЙКИХ ДО КУЛЬТУРАЛЬНОГО ФІЛЬТРАТУ *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS* VAR. *TRITICI* КЛІТИННИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ ТА РЕГЕНЕРАНТІВ ІЗ НИХ

А.В. БАВОЛ, О.В. ДУБРОВНА, І.І. ЛЯЛЬКО

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська 31/17
e-mail: dubrovny@ukr.net

Методом прямої клітинної селекції одержано резистентні до культурального фільтрату *G. graminis* var. *tritici* калюсні лінії пшениці та індуковано рослини-регенеранти. Досліджено цитогенетичні особливості калюсних культур у процесі культивування на селективному середовищі. Цитологічний та цитометричний аналіз регенерантів, отриманих з резистентних калюсних культур, виявив рослини різного рівня плоідності.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., клітинна селекція, культуральний фільтрат *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, цитогенетичний аналіз.

Вступ. Поряд із застосуванням традиційних генетико-селекційних методів отримання високопродуктивних сортів та гібридів сільськогосподарських культур все більшого поширення набувають біотехнологічні прийоми при створенні вихідного матеріалу, стійкого до різних стресових чинників. Одним із таких прийомів є метод клітинної селекції, який дозволяє в умовах *in vitro* отримувати форми рослин, резистентні до несприятливих умов довкілля [1]. Найефективнішим є застосування даного методу у тих сільськогосподарських культур, для яких розроблено прийоми масової регенерації рослин із клітин та протопластів.

У пшениці метод клітинної селекції досить широко використовується для створення форм, стійких як до абіотичних, так і біотичних стресів [2–6]. Стійкість до хвороб — одне з найважливіших завдань селекції, яке, також, намагаються вирішити за допомогою культури *in vitro* [7]. У пшениці, на основі використання клітинної селекції, вже одержано резистентні форми, стійкі до фузаріозу [8–10], септоріозу [11] та гельмінтоспоріозу [12–14].

Офіобольозна коренева гниль, збудником якої є *Gaeumannomyces graminis var. tritici* – одне з найбільш шкочинних захворювань пшениці [15]. Хвороба поширена в зонах помірного клімату як північної, так і південної півкулі і, зокрема, в Україні. Одним з найбільш екологічно безпечних та дешевих способів боротьби є вирощування стійких сортів. Проте джерел стійкості до патогена до цього часу не знайдено [16]. Гени стійкості проти цього збудника є у вівса, проте ці види надто віддалені, щоб здійснити їх перенесення класичними методами. Враховуючи це, значні перспективи для селекційного процесу може мати технологія клітинної селекції, за якої добір стійких клітинних ліній відбувається на рівні культивованих *in vitro* клітин.

Метою роботи було використання культурального фільтрату *G. graminis var. tritici*, як селективного чинника для добору стійких до офіобольозу форм пшениці, а також цитологічний та цитометричний скринінг отриманих в результаті калюсних ліній та рослин-регенерантів.

Матеріали та методи

Роботи з клітинної селекції були проведені на сорті-дворучці Зимоярка, отриманому в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України. Культуральний фільтрат (КФ) *G. graminis var. tritici* отримували при вирощуванні високовірulentного штаму гриба на рідкому поживному середовищі Чапека і стерилізували шляхом пропускання через бактеріальний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм та додавали до модифікованого середовища МС [17] у різних концентраціях. Культуру калюсної тканини отримували з експлантів верхівки пагона 3-добових про-

ростків на середовищі МС, яке додатково містило L-аспарагін -150 мг/л, AgNO_3 — 10 мг/л та піклорам (4-аміно-3,5,6-трихлорпіколінова кислота) — 2 мг/л [18]. Для проведення клітинної селекції калюси масою 2-3мг висаджували в чашки Петрі (по 40 в кожній) у 3 повторностях. Достовірність відмінностей між показниками оцінювали за критерієм Стьюдента.

Для встановлення генетичної структури клітинних популяцій калюсних культур протягом культивування на контрольному та селективному середовищі, досліджувалися клітини на стадіях метафази й анафази. Аналізували по 70–100 метафазних та анафазних пластинок у кожному варіанті дослідження. Цитогенетичний аналіз калюсних культур проводили в період найбільшої мітотичної активності на 5–7 добу культивування в 1,3,5 та 7 пасажах. Цитологічне вивчення здійснювали, виключаючи передфіксаційний вплив на мітоз. Частоту та типи хромосомних аберацій визначали паралельно з підрахунком числа хромосом у клітинах. Цитогенетичний аналіз рослин-регенерантів проводили в клітинах кореневої меристеми за стандартною методикою давлених препаратів [19]. У кожній рослині аналізували 15–20 метафаз. Для підтвердження даних цитологічного аналізу використовували метод проточної цитометрії. Дослідження проводили на автоматичному аналізаторі “Partec” (Німеччина), який дозволяє визначити вміст ядерної ДНК декількох десятків тисяч ядер за 2-3 хвилини.

Результати та обговорення

На першому етапі досліджень було визначено токсичність КФ залежно від часу культивування гриба *G. graminis var. tritici*. Найбільшу токсичність КФ

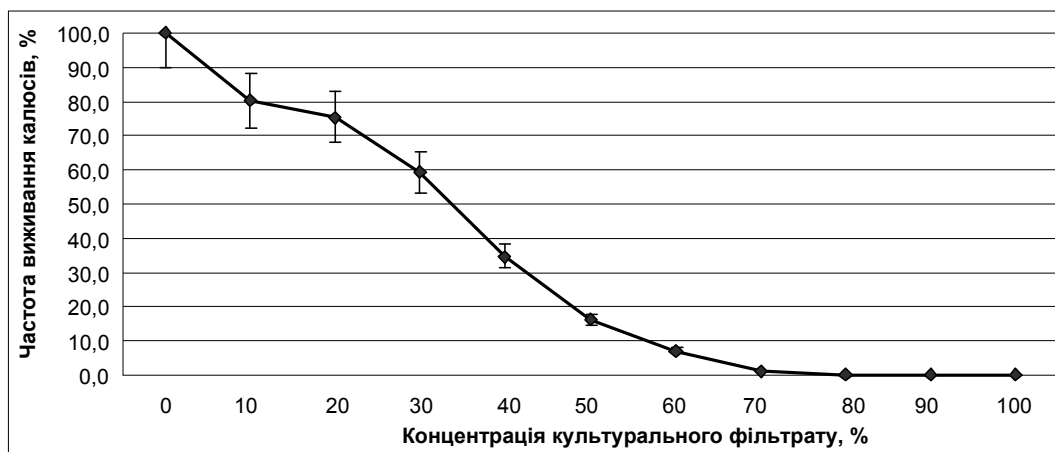


Рис. 1. Чутливість до культурального фільтрату *G. graminis var. tritici* калюсних культур пшениці

спостерігали на 55–60 добу культивування [20], тому у подальшій роботі використовували КФ саме цього строку вирощування. Також було визначено чутливість калюсної тканини пшениці до різних концентрацій селективного агента в поживному середовищі. На рис. 1 наведено дані, які відображують життєздатність калюсної тканини пшениці на поживних середовищах з різною концентрацією КФ.

Дози культурального фільтрату 10–30 % сприяли виживанню понад 50 % калюсів, що не дозволяє проводити клітинну селекцію. Виявлено, що наявність навіть мінімальної концентрації 10 % КФ у поживному середовищі пригнічувало ріст калюсів, зменшувало приріст їхньої маси, спричиняло появу некротичних плям брунатного або чорного забарвлення. Концентрація 70% КФ виявилася летальною. Найбільш оптимальною для наших досліджень була доза 50 % КФ, за дії якої залишались життєздатними 15% калюсів.

Для отримання резистентних до метаболітів *G. graminis var. tritici* калюсних ліній пшениці використовували пряму клітинну селекцію. Її проводили

за такою схемою: 1 пасаж на селективному середовищі з КФ (50%) – 1 пасаж на контрольному середовищі (без КФ). Таким чином провели чотири цикли добору і відібрано штами, які зберігали здатність рости на селективному середовищі. З цих штамів було отримано 4 стійкі лінії, (№ 2, 7, 19 та 24) які не тільки мали приріст біомаси на селективному середовищі, а й зберігали морфогенетичний потенціал.

Цитогенетичний аналіз калюсних культур показав високий ступінь гетерогенності і наявність значних розходжень у характері протікання цитологічних процесів між калюсами, що вирощувалися на контрольному та селективному середовищах. При перенесенні клітинних культур на середовище з КФ вже у першому пасажі виявляються значні цитологічні зміни порівняно з контрольним калюсом. Якщо у контрольному калюсі перші поліплоїдні метафази з 84 хромосомами (рис. 2, а) були виявлені на 5-ту добу вирощування, то після перенесення на селективне середовище такі метафази спостерігали починаючи вже з 2 доби культивування. Аналіз числа хромосом у

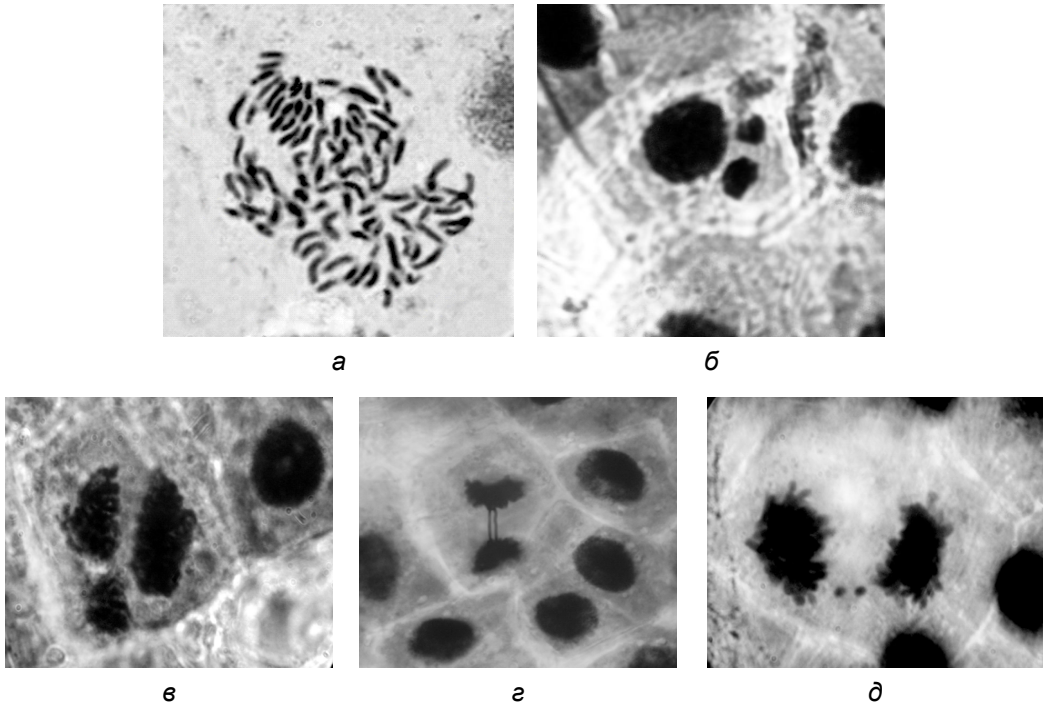


Рис. 2. Цитологічні особливості калюсних культур пшениці, які культивувалися на селективному середовищі: а — поліплоїдна клітина ($2n=12x=84$); б — клітина з мікроядрами; в — триполюсний мітоз; г — подвійний міст; д — парні фрагменти

клітинах калюсів, досліджених протягом семи пасажів, свідчив про подібність цитогенетичних процесів, які відбувалися в них. У зв'язку з цим у даній роботі основні закономірності розглядаються на прикладі лінії № 2. Так, у калюсів першого пасажу спостерігали достовірне збільшення числа поліплоїдних клітин до $26,1 \pm 4,1$ %, в той час як у контролі цей показник складав $12,6 \pm 3,3$ % (рис. 3). Нами простежено механізм виникнення поліплоїдів, які є результатом утворення реституційних ядер із ранньої анафази за рахунок порушення роботи веретена поділу й, як наслідок цього процесу, нерозходження хромосом до полюсів. Виявлено клітини, що мають більше число хромосом, проте у поділ такі клітини не вступають.

Поряд із поліплоїдизацією спостерігали достовірне збільшення кількості анеуплоїдних клітин до $15,2 \pm 3,9$ % порівняно з $5,8 \pm 2,4$ % у контролі. Це явище пов'язане із втратою хромосом у мітозі й часто супроводжувалося наявністю мікроядер поблизу інтерфазних ядер (рис. 2, б). У цілому, популяції клітин калюсу, як контрольного, так і того, що вирощувався на селективному середовищі, є досить гетерогенними за числом хромосом, кількість яких у клітинах складала від 7 до понад 84.

У калюсних культурах, також, виявляли значну кількість клітин із відхиленнями від нормального процесу мітозу. Виявлено як хромосомні аберації, так і порушення веретена поділу у вигляді багатополюсних мітозів (рис. 2, в). Спостерігали дво- та триядерні кліти-

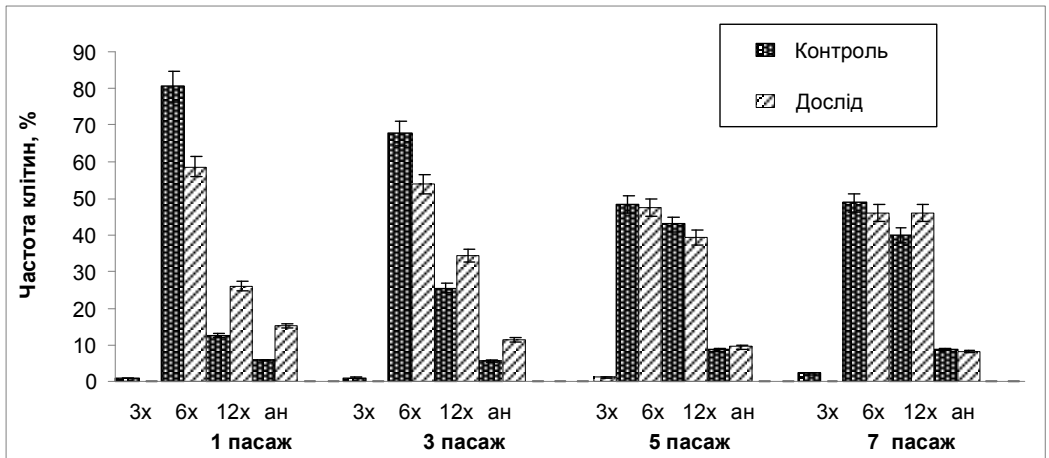


Рис. 3. Розподіл за числом наборів хромосом у клітинах калюсних культур пшениці в процесі культивування на контрольному та селективному середовищах: по горизонталі – число наборів хромосом; по вертикалі – частота клітин, % (ан – анеуплоїдні клітини)

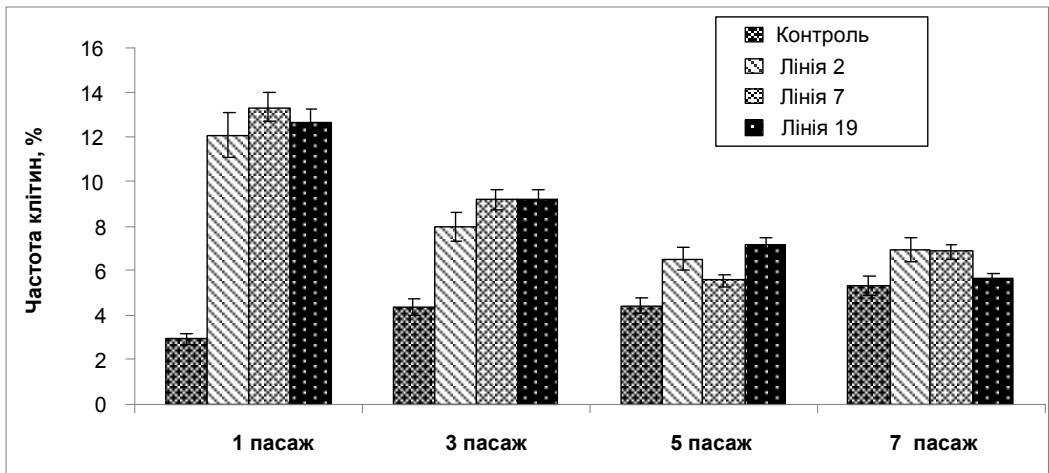


Рис. 4. Частота аберацій хромосом в калюсних культурах пшениці, що вирощувалися на селективному середовищі

ни, а також клітини з фрагментованими ядрами. В анафазах виявлено хромосомні й хроматидні мости (рис. 2, г) одиничні та парні фрагменти (рис. 2, д), що свідчить про наявність мутаційного процесу, який викликає порушення цілісності хромосом.

У першому пасажі кількість клітин з абераціями у контрольному калюсі була на рівні $2,9 \pm 1,7$ %, в той час як у калюсах, що культивувалися на селек-

тивному середовищі, спостерігали достовірно збільшення їхнього числа до $13,3 \pm 3,4$ % (рис. 4).

Слід зазначити, що в калюсах першого пасажу, що культивувалися на середовищі з КФ значну частину аберацій складали мости з фрагментами – 36,4 % від загального числа аномалій. Клітин із хромосомними та хроматидними мостами нараховувалося 36,4 %, а кількість клітин із фрагментами не

перевищувала 27,3 %. У контрольних калюсів у спектрі аберацій були присутні лише мости (66,7 %) та фрагменти (33,3 %). Відомо, що реалізовані пошкодження хромосом виявляються у вигляді фрагментів та мостів, як правило, в анафазі цього ж клітинного циклу [21,22]. Показником “свіжого” розриву хромосоми є присутність в анафазі фрагментів. Оскільки сумарна кількість аберантних анафаз, становить понад 60 %, у спектрі хромосомних пошкоджень переважають “свіжі” розриви. Достовірне збільшення їхньої кількості свідчить про значний генотоксичний вплив стресового чинника на хромосомний апарат клітин і його кластогенний ефект у сублетальній концентрації.

У третьому пасажі у калюсів, що культивувалися на селективному середовищі, спостерігали подальше підвищення числа поліплоїдних клітин до 34,5 %, в той же час, кількість анеуплоїдних клітин сягала 11,5 %, що достовірно не відрізнялося від контролю. Кількість клітин з абераціями знизилася до 7,9 %, що може бути пов’язано з адаптацією до умов культивування або/та з елімінацією пошкоджених клітин. Слід зазначити, що у калюсів данного віку спостерігалось зменшення кількості анафаз з множинними порушеннями. Клітин тільки з фрагментами налічувалося близько 28,6 %, що достовірно не відрізняється від частоти таких порушень у контрольних калюсів (25,0 %).

У п’ятому пасажі кількість поліплоїдних клітин у калюсах, що вирощувалися на контрольному та селективному середовищах достовірно не відрізнялась і складала 40–45 %, частота хромосомних аберацій практично не змінювалася. Ні у контрольних, ні у резистентних калюсів більше не виявля-

ли клітин, які несуть одночасно мости та фрагменти. Переважну більшість аберацій виявляли в клітинах у вигляді хроматидних мостів, що свідчить про збереження в клітинних поколіннях дицентричних хромосом в результаті циклу “розрив–злиття–міст” [22]. Певна стабілізація калюсних культур за рівнем хромосомних перебудов може свідчити про те, що пройшов добір клітинної популяції, пристосованої до росту на селективному середовищі. В ізольованих клітинах сьомого пасажу частота та спектр хромосомних перебудов практично не змінювалися. Не виявлено достовірних змін і за рівнем плоідності клітин.

Оскільки через відсутність клітин, що діляться, у багатьох випадках визначення рівнів плоідності клітин взагалі неможливе, тому не тільки підрахунок числа хромосом, але й пошук якісних метафазних пластинок займає багато часу. Крім того, наявність анеуплоїдних клітин може бути викликана артефактами приготування цитологічних препаратів. У зв’язку з цим нами для підтвердження даних цитологічного аналізу було використано метод точної цитометрії, який також виявив наявність клітин різного рівня плоідності (рис. 5, а–г).

Проблема отримання рослин із стійких клітинних ліній є однією із найбільш важливих та складних у клітинній селекції. Регенерація з таких форм значно ускладнена, і частота індукції рослин дуже низька, що може бути пов’язано з мутаційними змінами, що виникають спонтанно в культурі *in vitro* [1]. Так, в наших дослідженнях частота регенерації стійких до КФ клітинних ліній була на рівні 5–13 %, що достовірно нижче ніж у контролі (28 %). Індуковані рослини-регенеранти були переведені в умови ґрунту та вирощу-

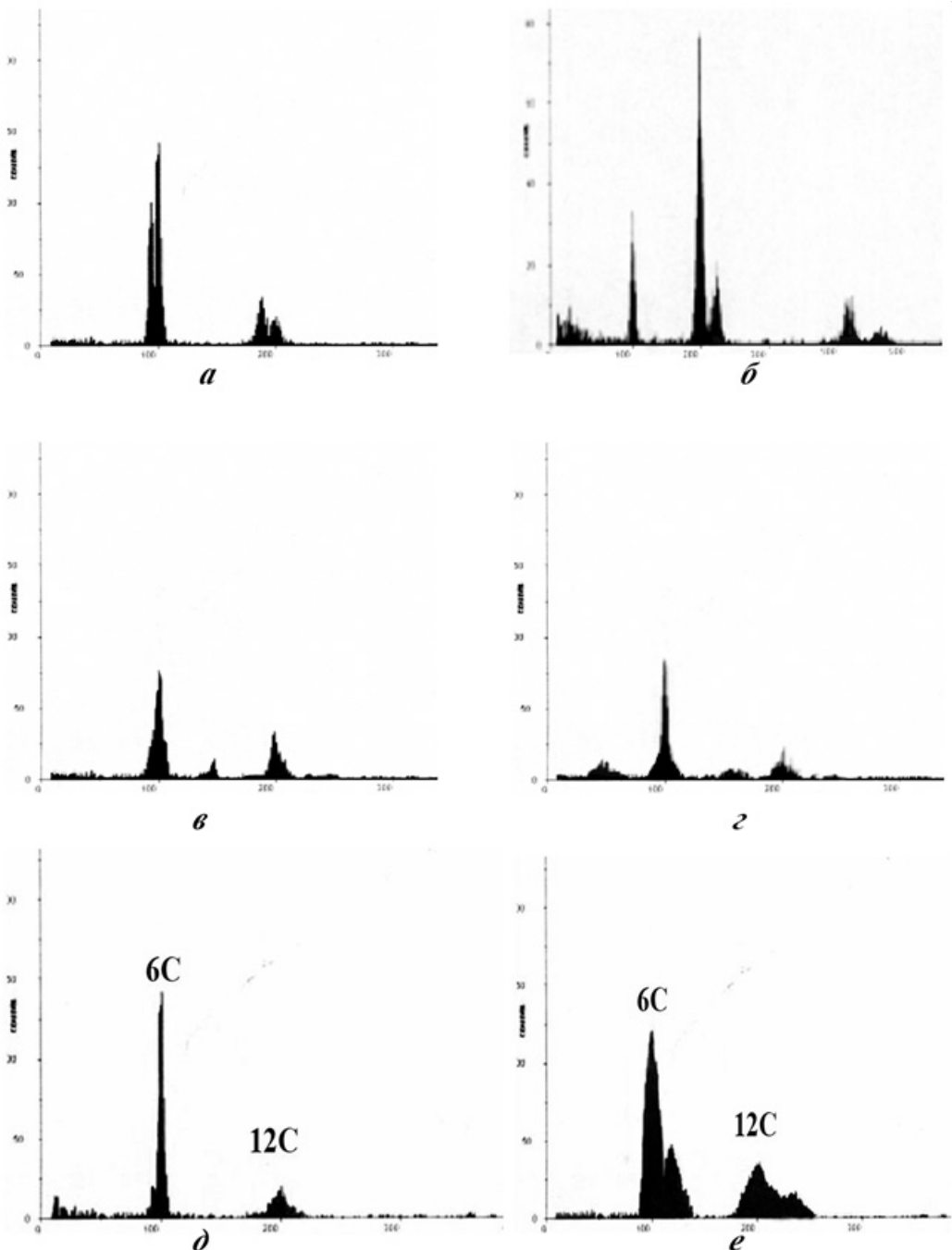


Рис. 5. Гістограми розподілу інтерфазних ядер за вмістом ДНК калюсних культур (*a–г*) та рослин-регенерантів (*д, е*) пшениці: *a* – перший пасаж; *б–г* – 5 пасаж; *д* – гексаплоїдна рослина; *е* – міксоплоїдна рослина

валися до фази повної стиглості зерна. Отримані рослини R₁ досліджуються за ознакою стійкості до офіобольозу.

При цитологічному дослідженні регенерантів, отриманих із калюсних культур, виявлені рослини різного рівня плоідності (табл.). За нашими спостереженнями 7 з 33 отриманих рослин-регенерантів, мали відмінний від гексаплоїдного, набір хромосом.

Таблиця. Плоідність рослин-регенерантів R₀, отриманих з резистентних калюсних ліній пшениці

Клітинна лінія	Кількість вивчених рослин, шт.	6х	Міксоплоїди	Анеуплоїди
2	13	10	2	1
7	5	4	1	—
19	9	7	1	1
24	6	5	1	—

Треба зазначити, що рослини різного рівня плоідності було отримано за регенерації з резистентних до токсинів патогенів калюсних культур деяких видів рослин, зокрема, конюшини, люцерни та рису [23–26]. Відомо, що з міксоплоїдних калюсів часто регенерують рослини з широкою варіабельністю за числом хромосом [27]. У нашому випадку плоідність рослин-регенерантів відбиває високу гетерогенність клітинної популяції резистентних калюсів. Методом проточної цитометрії підтверджено, що більшість рослин-регенерантів, індукованих з резистентних до КФ калюсних ліній є гексаплоїдними (рис. 5, д), однак виявлено і міксоплоїдні рослини (рис. 5, е).

Висновки

Методом клітинної селекції вперше отримано форми пшениці, стійкі до культурального фільтрату *G. graminis*

var. tritici. Показано, що відібрані лінії, характеризуються постійним рівнем (5–7 %) та схожим типом структурних перебудов. Цитологічний та цитометричний аналіз регенерантів, отриманих із резистентних ліній, виявив рослини різного рівня плоідності.

Перелік літератури

1. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция – К.: Наук. думка, 1990. – 280 с.
2. Bozorgipour R., Snape, J. An assessment of somaclonal variation as a breeding tool for generating herbicide tolerant genotypes in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Euphytica*. – 1997. – v.94, № 3. – P. 335–340.
3. Yang, Z., Yang, X., Huang, D. Studies on somaclonal variants for resistance to scab in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) through in vitro selection for tolerance to deoxynivalenol // *Euphytica* . – 2006. – v.101, № 2. – P. – 213–219.
4. Wang W., Shang X., Yucel M., Nguyen H. Selection of cultured wheat cells for tolerance to high temperature stress // *Crop Sci.* – 1993. – v.33. – P.315–320 .
5. Abdel-Ghany H., Nawar A, Ibrahim M., El-Shamarka S., Selim M., Fahmi A. Using tissue culture to select for drought tolerance in bread wheat // *New directions for a diverse planet: Proceedings of the 4th International Crop Science Congress.* – Brisbane, Australia, 26 Sep – 1 Oct. 2004. – P. 345.
6. Barakat M., Abdel-Latif T. In vitro selection of wheat callus tolerant to high levels of salt and plant regeneration // *Euphytica*. – 1996. – v. 91, N 2, – P. 127–140.
7. Анапиев Б. Б., Рсалиев Ш. Т., Сарбаев А. Т. и др. Ускоренная селекция на устойчивость к биотическим факторам окружающей среды *Triticum aestivum* L. методом гаплоидной биотехнологии // Докл. Россельхозакадемии. – 2002. – №4. – С. 15–17.
8. Ahmed, K.Z., Mesterházy, Á., Bartók, T., Sági, F. In vitro techniques for selecting

- wheat (*Triticum aestivum* L.) for *Fusarium*-resistance. II. Culture filtrate technique and inheritance of *Fusarium*-resistance in the somaclones // *Euphytica*. – 1996. – v.91, №3. – P. 341–349.
9. Клечковская Е., Игнатова С., Слепченко А. Селекция *in vitro* генотипов пшеницы с комплексной устойчивостью к фузариозу злаков // *Биология клеток растений in vitro, биотехнология и сохранение генофонда: Тез. Докл. VII междунар. Конф. 25–28 ноября 1997 г. Москва, Россия.* – Москва, 1997. – С. 372.
10. Fadel F., Wenzel G. In vitro selection for tolerance to fusarium in F₁ microspore populations of wheat // *Plant Pathology*. – 1994. – v. 43. – P. 644–650.
11. Keller B, Winzeler H, Winzeler M, Fried P. Differential sensitivity of wheat embryos against extracts containing toxins of *Septoria nodorum*: first steps towards in vitro selections // *J. Phytopathol* – 1994. V. 14. – P. 233–240.
12. De Cristaldo R., De Carvalho F., Barbieri R., Kohli M., Dornelles C., Handel C., Bered, F. Response of different subcultures of wheat callus to toxic filtrates of *Helminthosporium sativum* // *J. of Genetics and Breeding*. – 1997. – v. 51, N1. – P. 39–43.
13. Shawla H., Wenzel G. In vitro selection of barley and wheat for resistance against *Helminthosporium sativum* // *Theor. and Appl. Genet.* – 1987. – V. 74. – P. 841–845.
14. Shawla H. S., Wenzel G. Resistant wheat plants against *Helminthosporium sativum* from embryo derived callus cultures // *Wheat Inf. Serv.* – 1989. – V. 69, N1. – P. 8–12.
15. Крючкова Л. О. Особливості діагностики та шкідливості офіобольозної кореневої гнилі озимої пшениці // *Захист і карантин рослин.* – 2005. – вип. 51. – С. 132–138.
16. Eastwood R., Kollmorgen J., Hannan M., Williams W. Reaction of somaclonal variants of wheat to the take-all fungus (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) // *Plant Pathology*. – 1994. – v. 43. – P. 644–650.
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Planta*. – 1962. – 15. – P.473–497.
18. Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І. І. Регенерація рослин із різних типів експлантатів м'якої пшениці // *Физиология и биохимия культурных растений.* – 2008. – 40, №2. – С. 150–156.
19. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1988. – 280 с.
20. Baval A., Dubrovna O., Lyalko I. In vitro selection for improved plant resistance to take-all of wheat // *The Biology of plant cells in vitro and biotechnology: The abstracts of IX International Conference (September 8–12, 2008) – Zvenigorod: K.A. Timiryazev institute of plant physiology RAS, 2008.* – P. 27.
21. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 6. Изменчивость и отбор в процессе адаптации к условиям выращивания *in vitro* // *Биополимеры и клетка.* – 2000. – Т.16, №3. – С. 159–185.
22. Кунах В.А. Особенности структурного мутагенеза в популяциях культивируемых клеток растений // *Успехи соврем. генетики.* – М.: Наука, 1984. – Вып.12. – С.30–62.
23. Marnett L.J., Plastaras J.P. Endogenous DNA damage and mutation // *Trends in Genetics.* – 2001. – v. 17, № 4. – P. 214–221.
24. Hartman C., McCoy T., Knous T. Selection of plants resistant to the toxin produced by *Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis* // *Plant Sci. Lett.* – 1984. – vol.24, N 1–2. – P. 183–194.
25. Масленников С.Е., Посыпанов Г.С., Мезенцева А.В. Разработка методических подходов для получения форм люцерны, устойчивых к фузариозу, с использованием культуры каллусов и клеток // *Извест. ТСХА.* – 1994, вып.5. – С.177–185.
26. De Enrech N., Mendndez–Yuffa A. , Huerfano A. Estabilidad en el numero cromosomico en cultivares y embriones somaticos de cafe (*Coffea* sp.) // *Acta*

Botanica Venezuelana. – 1996. – vol. 19. – P. 5–15.

27. *Lavana U.C.* Chromosomal instability in *Lathyrus sativus L.* // Theor. and Appl. Genet. – 1982. vol.62, № 2. – P. 135–168.

Представлено В.А. Кунахом
Надійшла 19.10.2008

**ОТБОР И ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
УСТОЙЧИВЫХ К КУЛЬТУРАЛЬНОМУ
ФИЛЬТРАТУ *GAEUMANNOMYCES
GRAMINIS VAR. TRITICI* КЛЕТОЧНЫХ
ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ
И РЕГЕНЕРАНТОВ ИЗ НИХ**

А.В. Бавол, О.В. Дубровная, И.И. Лялько

Институт физиологии растений и генетики
Национальной академии наук Украины,
Украина, 03022 Киев,
ул. Васильковская, 31/17
e-mail: dubrovny@ukr.net

Методом прямой клеточной селекции получены резистентные к культуральному фильтрату *G.graminis var. tritici* каллусные линии пшеницы, из которых индуцированы растения-регенеранты. Исследованы цитогенетические особенности каллусных культур в процессе культивирования на селективной среде. Цитологический и цитофотометрический анализ регенерантов, полученных из резистентных клеточных

линий, выявил растения различного уровня ploidy.

Ключевые слова: *Triticum aestivum L.*, клеточная селекция, культуральный фильтрат *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, цитогенетический анализ.

**SELECTION AND CITOLOGICAL ANALYSIS
OF CULTURE FILTRATE
*GAEUMANNOMYCES GRAMINIS VAR.
TRITICI* RESISTANT CELLULAR LINES
OF WHEAT AND REGENERANTS FROM
THEM**

A.V.Bavol, O.V. Dubrovna, I.I. Lyalko

Institute of Plant Physiology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska St., 31/17
e-mail: dubrovny@ukr.net

The culture filtrate *G. graminis var. tritici* resistant cellular strains were selected, and regenerated plants were obtained. The cytogenetical peculiarities of callus culture in cultivation on the selective medium were studied. Cytological analysis of the regenerants, obtained from resistant cellular strain, revealed plants with different levels of ploidy.

Key words: *Triticum aestivum L.*, cellular selection, culture filtrate of *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, cytogenetical analysis.