

УДК 561.143.6

СЕЛЕКЦІЯ IN VITRO М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ НА СТІЙКІСТЬ ДО *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS* VAR. *TRITICI*

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

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

Методом прямої клітинної селекції отримано стійкі до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* калюсні лінії пшениці сорту Зимоярка та індуковано рослини-регенеранти. Вирощено насіннєве покоління R₁, лабораторним способом оцінено його стійкість до метаболітів патогену. Виділено форми з підвищеною толерантністю.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., селекція in vitro, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, рослини-регенеранти, стійкість.

Сучасні методи культивування клітин, тканин та окремих органів придатні для практичного їх використання в різних напрямках вдосконалення економічно важливих видів сільськогосподарських культур. У рослинництві інтенсивно впроваджують клітинні технології, спрямовані на поліпшення зернових злаків, зокрема пшениці [11]. Одним із таких методів є клітинна селекція, тобто добір бажаних генотипів із новими спадковими ознаками на рівні культивованих in vitro клітин у специфічних умовах.

Підвищення стійкості до хвороб — одне з найважливіших завдань селекції пшениці, яке також намагаються вирішити біотехнологічними методами [1, 4—8, 12, 14, 19, 20, 22, 27]. Для цієї культури на основі клітинної селекції вже отримано форми, стійкі до фузаріозу [8, 14, 19, 20], септоріозу [6] та гельмінтоспоріозу [16, 17].

Офіобольозна коренева гниль, збудником якої є *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, належить до захворювань, які найбільш уражують пшеницю [9]. Хвороба поширена в зонах помірного клімату як Північної, так і Південної півкуль, у тім числі й в Україні. Одним із екологічно безпечних і дешевих засобів боротьби є вирощування стійких сортів, однак генетичні джерела стійкості до патогену досі не знайдені [18]. Гени стійкості до цього збудника є у вівса, проте згадані види культур надто віддалені, щоб здійснити перенесення генів класичними методами. У зв'язку з цим для селекційного процесу значні перспективи може мати технологія клітинної селекції, головна перевага якої полягає в можливості ведення добору нових генотипів у контрольованих умовах, зокрема на селективному фоні, створеному за участю токсичних продуктів життєдіяльності патогенних мікроорганізмів. Експериментально доведено, що стійкі до біотичних чинників довкілля форми пшениці можна добирати в культурі in vitro і залучати їх до селекційного процесу [1, 8, 19].

Метою роботи було дослідження використання культурального фільтрату *G. graminis* var. *tritici* як селективного чинника для добору стійких до офіобольозу форм пшениці, а також оцінювання стійкості отриманого насінневого покоління R₁ до метаболітів патогену.

Методика

Роботи з клітинної селекції проведені на сорті-дворучці Зимоярка селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Селективним чинником слугував культуральний фільтрат (КФ) *G. graminis* var. *tritici*, отриманий при вирощуванні високовірulentного штаму гриба на рідкому поживному середовищі Чапека. Його стерилізували пропусканням крізь бактеріальний фільтр із діаметром пор 0,22 мкм і додавали до модифікованого середовища МС [3] у різних концентраціях. Культуру калюсної тканини отримували з експлантатів верхівки пагона 3-добових проростків на модифікованому нами середовищі МС [2]. Експлантати культивували при 26 °С у темряві протягом двох тижнів. Після цього їх переносили на світло і далі вирощували за освітлення 3—4 клк, відносної вологості повітря 70 % і 16-годинного фотоперіоду ще протягом трьох тижнів.

Для проведення клітинної селекції калюси масою 3—5 мг висаджували в чашки Петрі (по 40 у кожну) в 10 повторностях. Життєздатність клітин визначали за загально визнаним показником відносного приросту маси (Δm):

$$\Delta m = (m_k - m_n) / m_n,$$

де m_n , m_k — маси калюсу відповідно на початку і в кінці пасажу.

Для індукції морфогенезу стійкі калюсні лінії переносили на регенераційне середовище МС, доповнене 1 мг/л БАП, 0,5 мг/л ІОК та КФ (50 %). Після 3 тижнів культивування морфогенний калюс висаджували на свіже середовище без КФ. Калюс, що утворював пагони, переносили для укорінення на середовище, яке містило 0,2 мг/л НОК. Укорінені пагони пересаджували в стерильний пісок і вміщували у вологу камеру на 7—14 діб. По мірі розвитку їх пересаджували в ґрунт.

Для вивчення рівня стійкості рослин R₁ насіння, отримане з рослин-регенерантів, після поверхневої стерилізації пророщували на середовищі МС з КФ *G. graminis* var. *tritici* (50 %). У кожному варіанті досліду аналізували 30 насінин (по 10 насінин у трьох повторностях). Дослід повторювали тричі. В контрольному варіанті насіння пророщували на середовищі без КФ (позитивний контроль) і з додаванням КФ (негативний контроль). На 5-ту добу пророщування вимірювали довжину головного кореня і пагона. Вірогідність відмінностей показників оцінювали за критерієм Стьюдента.

Результати та обговорення

Можливість отримання стійких до КФ *G. graminis* var. *tritici* клітинних варіантів визначається соматональною мінливістю, мутагенною дією рідстимулювальних речовин поживного середовища, інших речовин, що входять до складу селективного середовища, та дією власне селективного чинника, яка спрямована проти виживання нестійких форм. У злаків, як правило, клітинну селекцію проводять на калюсах, оскільки інші тех-

нології, зокрема протопластів, ембріокультури, культури пиляків ще недостатньо розроблені [7]. Перевагами калюсних культур порівняно з клітинними є коротший період культивування і, як наслідок, менша генетична нестабільність. Крім того, для експресії ознаки потрібен інокуюлюм певного розміру [14, 17].

Відомо, що процеси калюсогенезу й утворення пагонів у культурі *in vitro* пшениці великою мірою визначаються типом експлантата [11, 15]. Незрілі зародки є традиційним експлантатом пшениці. На основі їх використання розроблено ефективні клітинні технології отримання регенерантів [11]. Однак цей тип експлантата має свої недоліки: короткий період застосування в культурі та значні затрати часу і коштів для отримання донорних рослин. У зв'язку з цим дослідники останнім часом значну увагу приділяють експлантатам з вегетативних органів рослин, попередньо введених у культуру *in vitro*, як можливій альтернативі незрілому зародку [2, 13, 21, 25, 26]. Очевидною їх перевагою є можливість подолання генотипних особливостей культивованих рослин, що характеризуються низьким регенераційним потенціалом [13, 15, 25], а також можливість отримання значної кількості вихідного матеріалу за короткий час у будь-який період року [15, 25, 26]. З урахуванням цього у роботі ми використовували калюс, отриманий із верхівки пагона 3-добових проростків. Цей тип експлантата і модифіковане середовище давали змогу підтримувати регенераційний потенціал калюсів протягом 10–12 пасажів вирощування.

На першому етапі досліджень визначено токсичність КФ залежно від тривалості культивування гриба *G. graminis* var. *tritici*. Найбільша токсичність КФ спостерігалась на 55–60-ту добу вирощування [3], тому в подальшій роботі ми використовували КФ саме цього строку культивування. Визначено також чутливість калюсної тканини пшениці до різних концентрацій селективного агента в поживному середовищі [3]. Виявлено, що за наявності навіть мінімальної (10 %) концентрації КФ у культуральному середовищі пригнічувався ріст калюсів, зменшувався приріст їх маси, з'являлися некротичні плями брунатного або чорного кольору. Концентрація 70 % КФ виявилась летальною. Оптимальною в наших дослідженнях була доза 50 % КФ, за дії якої залишались життєздатними 15 % калюсів. Для отримання стійких до метаболітів *G. graminis* var. *tritici* калюсних ліній пшениці використовували пряму і ступінчасту клітинну селекцію.

Недоліками калюсних культур є те, що у частини клітин токсичні рівні селективного чинника згладжуються сусідніми клітинами і вони тим самим уникають селективного тиску. Крім того, можливе фенотипне маскування, якщо стійкість клітини пов'язана з продукуванням певної речовини, остання може передаватися через плазмодесми до сусідніх чутливих клітин і забезпечувати їхню стійкість. Оскільки багато клітин калюсу безпосередньо не контактують із селективним агентом, відібрані калюси можуть бути сумішшю змінених клітин і клітин дикого типу. Тому в роботі ми використовували кілька циклів добору за прямої клітинної селекції, яку здійснювали за такою схемою: 1 пасаж на селективному середовищі з КФ (50 %), 1 пасаж на контрольному середовищі (без КФ). Так проведено чотири цикли добору і відібрано штами, які зберігали здатність рости на селективному середовищі. З них отримано 4 стійкі лінії (№ 2, 7, 19, 24), які не тільки нарощували масу на селективному середовищі (табл. 1), а й зберігали морфогенетичний потенціал.

СЕЛЕКЦИЯ IN VITRO МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ

ТАБЛИЦЯ 1. Відносний приріст маси сирої речовини стійких до культурального фільтрату *G. graminis* var. *tritici* калюсних ліній пшениці

Лінія	Приріст маси, г ($M \pm m$) після доби пасажу		
	7-ї	14-ї	21-ї
Контроль	0,061 ± 0,01	—	—
2	0,212 ± 0,03	0,368 ± 0,06	0,473 ± 0,07
7	0,107 ± 0,03	0,224 ± 0,05	0,296 ± 0,05
19	0,234 ± 0,04	0,311 ± 0,04	0,401 ± 0,04
24	0,185 ± 0,04	0,247 ± 0,05	0,329 ± 0,05

Разом з експериментами із прямого перенесення на селективні середовища проводили ступінчасту селекцію за схемою: 1 пасаж на селективному середовищі з КФ (30 %) → 1 пасаж на контрольному середовищі (без КФ) → 1 пасаж на селективному середовищі з КФ (40 %) → 1 пасаж на контрольному середовищі (без КФ) → 1 пасаж на селективному середовищі з КФ (50 %) → 1 пасаж на контрольному середовищі (без КФ) → 1 пасаж на селективному середовищі з КФ (50 %) → 1 пасаж на контрольному середовищі (без КФ). У результаті послідовних доборів виділено варіанти, здатні рости на селективному середовищі з КФ (50 %) і стабільно зберігати ознаку стійкості протягом 4 пасажів. Методом ступінчастої селекції відібрано 32 калюсні варіанти. Прямий добір виявився менш ефективним, бо в результаті його застосування виділено тільки 19 резистентних калюсних форм.

Проблема отримання рослин зі стійких клітинних ліній є однією з найважливіших і найскладніших у клітинній селекції. Регенерація з таких форм значно ускладнена, частота індукції рослин дуже низька, що може бути пов'язано з мутаційними змінами, які виникають спонтанно в культурі *in vitro* [6, 7]. Слід зазначити, що зі стійких калюсів ступінчастої селекції не отримано повноцінних рослин-регенерантів. У таких форм або спостерігався ризогенез, або утворювалися пагони, які поступово припиняли свій ріст, або не утворювались повноцінні корені. У наших дослідженнях частота регенерації зі стійких до КФ клітинних ліній, отриманих прямим добром, була на рівні 5—13 %, що вірогідно нижче, ніж у контролі (табл. 2). Індуковані рослини-регенеранти переводили в умови ґрунту і вирощували до фази повної стиглості зерна.

Певна частина отриманих рослин мала морфологічні зміни, зокрема відміни у формі й забарвленні листків. Цитологічним дослідженням регенерантів виявлено рослини різного рівня плідності — 7 із 33 мали відмінний від гексаплоїдного набір хромосом [3]. Швидше за все це по-

ТАБЛИЦЯ 2. Частота регенерації пагонів зі стійких калюсних ліній пшениці

Лінія	Частота регенерації, %	Всього рослин-регенерантів, шт.
Контроль	28 ± 4,5	32
2	13 ± 3,1	17
7	5 ± 2,4	7
19	9 ± 2,9	12
24	6 ± 2,4	8

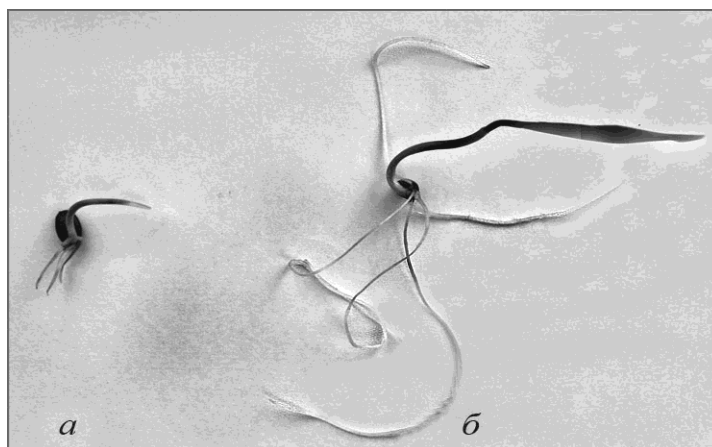


Рис. 1. Проростання насіння нестійких (а) і стійких (б) до метаболітів *G. graminis* var. *tritici* форм пшениці на субстраті з КФ

в'язано з впливом умов культури тканин і соматональною мінливістю, оскільки відомо, що дія підвищених концентрацій фітогормонів, як і невласливе нормальному організму їх співвідношення, може істотно впливати на процес рекомбінації генів у мітозі та мейозі й тим самим спричинювати вищеплення рослин із сукупністю ознак, які рідко трапляються у природі, особливо рецесивних [10]. Показано також регуляторну роль фенольних сполук і фітогормонів у процесі селекції клітин на стійкість до патогенних грибів, що є важливим аспектом з'ясування механізмів адаптації рослин до стресів [7].

Зі стійких клітинних ліній разом було отримано 44 рослини-регенеранти, проте насіння зібрано тільки з 35. При визначенні рівня стійкості рослин R_1 до метаболітів *G. graminis* var. *tritici* встановлено, що КФ фітопатогену значно інгібує проростання насіння контрольного варіанта (рис. 1, а). Із 35 проаналізованих форм підвищений рівень стійкості до КФ виявлено тільки у 9 гексаплоїдних форм (рис. 2): довжини головних коренів і пагонів цих рослин були значно більші, ніж у контрольних проростків (див. рис. 1, б), що свідчить про їхню підвищену толерант-

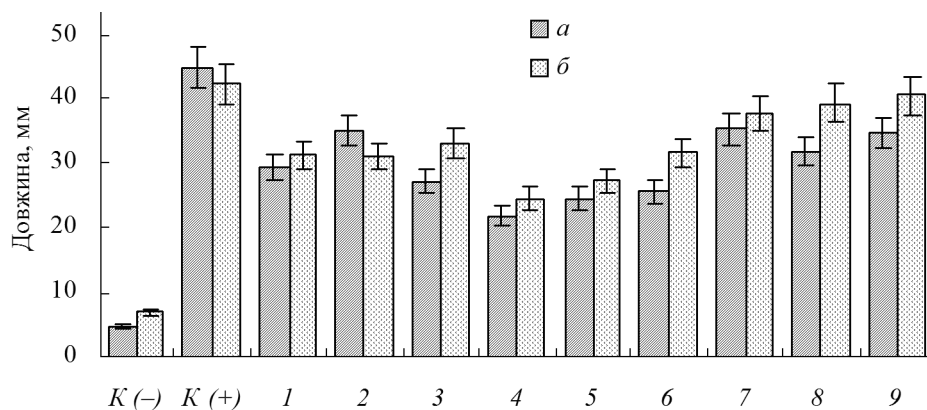


Рис. 2. Вплив метаболітів *G. graminis* var. *tritici* на морфометричні показники 5-добових проростків: а — довжина головного кореня; б — довжина пагона; К (-), К (+) — вихідний сорт на субстраті з КФ (негативний контроль) і без КФ (позитивний контроль); 1–9 — форми (R_1), отримані клітинною селекцією на субстраті з КФ

ність до метаболітів *G. graminis* var. *tritici* порівняно з рослинами вихідного сорту.

Відомо, що за стійкістю до фузаріозу серед соматоклональних ліній тритикале [20] виявлено стійкіші за вихідні генотипи лінії, причому з ліній, отриманих від стійких генотипів, частина була менш стійкою за вихідні форми, а серед ліній, отриманих із нестійких генотипів — лінії з більшою стійкістю. Із ліній пшениці, відібраних на селективних середовищах із дезоксиніваленолом, отримано форми, стійкіші до фузаріозу у 5—7 разів за вихідні форми, причому частину таких ліній отримано від сприйнятливих донорів [22]. Це може бути пов'язано з тим, що до генетичних змін рослин здатні призводити не тільки стресові чинники [23], а й фітотоксичні метаболіти грибів у сублетальних концентраціях [22]. При цьому полігени, які забезпечують горизонтальну стійкість, можуть ставати олігогенами, оскільки не виключено, що вертикальна і горизонтальна стійкість визначається одними й тими самими генами, але модифікованими різними генетичними середовищами [24].

Отже, методами клітинної селекції здійснено добір калюсних ліній пшениці сорту Зимоярка, стійких до культурального фільтрату *G. graminis* var. *tritici*. Виділено 4 стійкі лінії, які не тільки нарощували масу на селективному середовищі, а й зберігали морфогенетичний потенціал. Із цих ліній індуковано рослини-регенеранти й отримано насіннєве покоління R₁. Лабораторним оцінюванням рослин на стійкість до метаболітів патогену виявлено різні рівні стійкості. Виділено форми з підвищеною толерантністю.

1. 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. Рос. акад. с.-х. наук. — 2002. — № 4. — С. 15—17.
2. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2007. — 5, № 1—2. — С. 3—10.
3. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Добір та цитологічний аналіз стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* клітинних ліній пшениці та регенерантів з них // Там само. — 2008. — 6, № 2. — С. 191—200.
4. Веденева А.М., Маркелова Т.С., Кириллова Т.В., Анисеева Н.В. Биотехнологические методы в селекции болезнестойчивых сортов пшеницы // Материалы I Всерос. конф. по иммунитету пшеницы к болезням и вредителям (Санкт-Петербург, 2002). — СПб., Пушкин, 2002. — С. 157—158.
5. Внучкова В.А., Аш О.А. Об использовании селективных сред для создания in vitro форм пшеницы, устойчивых к корневой гнили // С.-х. биология. Сер. Биология растений. — 1992. — № 3. — С. 52—56.
6. Джос Л., Калашникова Е.А. Клеточная селекция пшеницы на устойчивость к септориозу // С.-х. биотехнология. — Избранные работы / Под ред. В.С. Шевелухи. — М.: Евразия+, 2000. — С. 61—71.
7. Калашникова Е.А. Биологические основы клеточной селекции растений // Докл. ТСХА. — 2003. — № 275. — С. 110—112.
8. Ключковская Е., Игнатова С., Слепченко А. Селекция in vitro генотипов пшеницы с комплексной устойчивостью к фузаріозу злаков // Тез. докл. VII междунар. конф. «Биология клеток растений in vitro, биотехнология и сохранение генофонда» (Москва, 25—28 нояб. 1997). — М., 1997. — С. 372.
9. Крючкова Л.О. Особливості діагностики та шкідливість офіобольозної кореневої гнилі озимої пшениці // Захист і карантин рослин. — 2005. — 51. — С. 132—138.
10. Привалов Г.Ф., Яковлева И.А. Скрытая мутационная изменчивость растений и ее проявление под действием фитогормонов // Генетика. — 1991. — 27, № 3. — С. 450—456.
11. Рахимбаев И.Р., Тивари Ш., Бишимбаева Н.К. Биотехнология зерновых культур. — Алма-Ата: Гылым, 1992. — 239 с.
12. Тарышкин Л.Г. Генетика устойчивости соматоклональных вариантов пшеницы и ячменя к болезням // Тез. докл. 2 съезд ВОГиС (Санкт-Петербург, 1—5 февр. 2000). — СПб, 2000. — Т. 1. — С. 325.

13. Ahmad A., Zhong H., Wang W., Sticklen M. Shoot apical meristem: In vitro regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) // In vitro cellular and development biology. — 2002. — **38**, N 2. — P. 163–167.
14. Ahmed K.Z., Mesterhazy A., Bartok T., Sagi 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. — **91**, N 3. — P. 341–349.
15. Amirova A.K., Bishimbaeva N.K., Rakhimbayev I.R. Overcoming genotype limitation and long-term regeneration maintenance in wheat (*Triticum aestivum* L.) tissue culture // Бюл. Никит. бот сада. — 2002. — № 86. — С. 26–27.
16. Chawla H.S., Wenzel G. Resistant wheat plants against *Helminthosporium sativum* from embryo derived callus culture // Wheat Inf. Serv. — 1989. — **69**, N 1. — P. 8–12.
17. De Cristaldo R., De Carvalho F., Barbieri R. et al. Response of different subcultures of wheat callus to toxic filtrates of *Helminthosporium sativum* // J. Genet. Breed. — 1997. — **51**, N 1. — P. 39–43.
18. Eastwood R., Kollmorgen J., Hannan M., Williams W. Reaction of somaclonal variants of wheat to the take-all fungus (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) // Plant Pathol. — 1994. — **43**. — P. 644–650.
19. Fadel F., Wenzel G. In vitro selection for tolerance to fusarium in F₁ microspore populations of wheat // Plant Breeding. — 1993. — **110**, N 2. — P. 89–95.
20. Goral T., Arseniuk E. Somaclonal variation in winter triticale for resistance to *Fusarium* head blight // Proc. 5-th Europ. Fusarium Semin. — Szeged, Hungary, 1997. — Part. 2. — P. 741–742.
21. Haliloglu K. Efficient regeneration system from wheat leaf base segments // Biol. Plant. — 2006. — **50**, N 3. — P. 326–330.
22. Lu W., Zhou M., Zhang X. Studies and improvement of wheat breeding for scab resistance using biotechnology // Wheat improvement for Scab resistance: Proc. Int. Symp. (5–11 May, 2000). — Sunghou and Nanjing, China, 2000. — P. 151–156.
23. Nagi W. Genome changes induced by auxin-herbicide in seedlings and calli of *Zea mays* L. // Environ Exp. Bot. — 1988. — **28**, N 2. — P. 197–206.
24. Nelson L.R. Genetics of horizontal resistance to plant disease // Ann. Rev. Phytopathol. — 1978. — **16**, N 3. — P. 359–378.
25. Sharma V., Hansch R., Mendel J. Influence of picloram and thidiazuron on high frequency plant regeneration in elite cultivars of wheat with long-term retention of morphogenicity using meristematic shoot segments // Plant Breeding. — 2005. — **124**, N 3. — P. 242–246.
26. Wang C., Wei Z. Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum*) leaf base // Plant Cell, Tissue, Organ Cult. — 2004. — **77**, N 2. — P. 149–156.
27. 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. — **101**, N 2. — P. 213–219.

Отримано 05.02.2009

СЕЛЕКЦИЯ IN VITRO МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS* VAR. *TRITICI*

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

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Методом прямой клеточной селекции получены резистентные к культуральному фильтрату *G. graminis* var. *tritici* каллюсные линии пшеницы сорта Зимоярка и индуцированы растения-регенеранты. Получено семенное поколение R₁ и проведена его лабораторная оценка на устойчивость к метаболитам патогена. Выделены формы с повышенной толерантностью.

IN VITRO SELECTION OF BREAD WHEAT FOR RESISTANCE TO *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS* VAR. *TRITICI*

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

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

By method of direct cellular selection resistant to culture filtrate of *G. graminis* var. *tritici* calli lines of bread wheat cultivar Zimoyarka were received, and plants-regenerants were induced. Seed generation R₁ was received and its laboratory estimation for resistance to metabolites of pathogen was provided. Forms with the raised tolerance were allocated.

Key words: *Triticum aestivum* L., in vitro selection, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, plants-regenerants, resistance.