

Т.М. Корня, С.О. Ігнатова

Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААН України,
Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна,
тел.: +38 (0482) 39 55 57, e-mail: odonata@mail.ru

СЕЛЕКЦІЯ *IN VITRO* ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ВПЛИВУ ФУЗАРІЄВОЇ КИСЛОТИ

Виявлено, що у форм пшениці із середньою стійкістю до Fusarium graminearum в культурі in vitro толерантність до фузарієвої кислоти на рівні зрілого пилку проявляється в його здатності до проростання, та на рівні мікроспор в культурі пиляків у збільшенні кількості морфогенного калусу та регенерації з нього рослин за впливу низьких концентрацій токсину. Встановлено, що за використання фузарієвої кислоти як селективного чинника в культурі пиляків пшениці можливо створювати форми подвоєних гаплоїдів із середньою стійкістю (6 балів) до захворювання пшениці, викликаного F. graminearum.

Ключові слова: Fusarium graminearum, селекція in vitro, андрогенез in vitro, озима м'яка пшениця.

В боротьбі із захворюванням фузаріозом колосу озимої м'якої пшениці створення методами селекції стійких сортів є найефективнішою, екологічно безпечною та економічно вигідною стратегією [1–4]. Одним з головних питань залишається скорочення строків селекції стійких форм пшениці, оскільки стійкість нівелюється через декілька поколінь по ряду причин, одна з яких — високий рівень мінливості та адаптації патогенів [5]. Тому, актуальним є залучення до традиційної селекції біотехнологічних методів гаплоїдії в поєднанні із селекцією *in vitro* [6, 7]. У цьому зв'язку метою даної роботи стало дослідження питання щодо морфогенезу гаметофіту пшениці на різних фазах його розвитку за впливу селективного фактору в умовах *in vitro*, а також визначення ефективності використання фузарієвого мікотоксину в селективній системі *in vitro* для добору форм із стійкістю до *F. graminearum*.

Матеріал та методи досліджень

За матеріал використовували набір гомозиготних ліній подвоєних гаплоїдів пшениці, отриманих шляхом андрогенезу *in vitro* від однієї гібридної комбінації озимої м'якої пшениці: Chinese Spring ph. 1b × [*Aegilops taushii* (1691) × Одеська напівкарликова]. Дані подвоєні гаплоїди пшениці попередньо були оцінені на стійкість до фузаріозу



колосу на штучному інфекційному фоні. Результати оцінки люб'язно надані відділом фітопатології та ентомології СГІ-НЦНС, к.с-г.н. Л. Т. Бабаянц та представлені в табл. 1.

Для дослідження морфогенезу гаметофіту на стадії сильновакуолізованої мікроспори за впливу фузарієвої кислоти застосовували метод культури пиляків [8, 9, 10], на стадії зрілого пилку – метод пророщування пилку в присутності токсину [11, 12]. Пиляки пшениці культивували на середовищі 190-2 [13], зрілий пилкок пророщували на середовищі за прописом В. А. Ляха та ін. [12].

В якості селективного фактору було обрано мікотоксин фузарієву кислоту, що додавали до складу поживних середовищ у концентраціях 50, 100 та 500 мкг/л для створення селективних фонів. Як контроль використовували поживні середовища без токсину.

Результати досліджень та їх обговорення

На пилкок ліній подвоєних гаплоїдів пшениці з відомою оцінкою польової стійкості до фузаріозу колосу подіяли різними концентраціями фузарієвої кислоти: 50, 100 та 500 мкг/л (табл. 1).

Таблиця 1

Проростання пилку ліній подвоєних гаплоїдів пшениці під впливом фузарієвої кислоти

Table 1

Germination of the pollen of wheat doubled haploid lines under the influence of fusaric acid

№ лінії	Оцінка польової стійкості за 10-бальною шкалою	Контроль	Фузарієва кислота, мкг/л		
			50	100	500
11	4	86,80 ± 3,81	75,39 ± 4,71*	14,64 ± 3,45*	2,99 ± 1,87*
12	3	94,94 ± 2,41	72,82 ± 4,96*	93,36 ± 2,96	59,50 ± 4,81*
14	4	78,68 ± 6,88	22,64 ± 4,09*	58,64 ± 5,62*	12,06 ± 3,60*
16	5	99,01 ± 1,11	61,24 ± 5,95*	75,39 ± 4,71*	76,43 ± 4,83*
18	6	85,21 ± 5,84	78,69 ± 10,27	84,72 ± 4,04	97,62 ± 4,61

Примітка: * – зменшення частки пророслого пилку в порівнянні з контролем при $p < 0,05$ за методом довірчих інтервалів для частки



В результаті за показником проростання пилку була виявлена найбільш толерантна *in vitro* гомозиготна лінія пшениці за номером № 18 із стійкістю до фузаріозу колосу — шість балів за десятибальною шкалою, що відповідає середній стійкості (або толерантності) до захворювання фузаріозом колосу. Пилок цієї лінії на досліджених концентраціях фузарієвої кислоти зберігав здатність до проростання. У цієї ж лінії в культурі пиляків під впливом тих самих концентрацій фузарієвої кислоти спостерігали достовірне збільшення відсотка морфогенного калусу в порівнянні з контролем ($p < 0,05$), і відповідно більшої кількості сформованих зелених рослин-регенерантів (табл. 2). Причому, максимальний відсоток сформованого толерантного морфогенного калусу спостерігали на варіантах середовищ з низьким вмістом токсину.

У сприйнятливих до *F. graminearum* форм пшениці, які мали 3–4 бали стійкості за десятибальною шкалою, за впливу фузарієвої кислоти спостерігали зменшення в порівнянні з контролем кількості морфогенних новоутворень та регенерації зелених рослин — це форми № 11 та № 12. У форм № 14 та № 16 (4–5 балів) — частка сформованого морфогенного калусу на селективних середовищах залишалась на рівні з контрольним варіантом.

Отже, у форм пшениці із стійкістю до *F. graminearum* від шести балів в культурі *in vitro* толерантність до токсину фузарієвої кислоти проявляється на рівні зрілого пилку в його здатності до проростання, та на рівні мікроспор в культурі пиляків у збільшенні кількості морфогенного калусу. Тому, оскільки показником стійкості до селективного фактору в культурі пиляків є формування із мікроспор саме морфогенного калусу, то селекцію необхідно проводити з вибракуванням неморфогенного калусу. На нашу думку, доцільним в отриманні толерантних ліній подвоєних гаплоїдів є використання низьких доз селективного фактору в поживному середовищі для сприяння формування морфогенних новоутворень та більшого виходу зелених рослин-регенерантів.

За літературними даними відомо, що за використання фузарієвої кислоти методом селекції *in vitro* можливо створювати генотипи огірка, стійкі до фузаріозного кореневого в'янення, викликаного грибом *F. oxysporum* [14]. Використання фузарієвої кислоти в гаплоїдній селекції стійких до фузаріозних гнилей пшениці, викликаних *F. oxysporum*, *F. moniliforme* та *F. solani* було продемонстровано в роботах Н. В. Лаврової [11], де показано, що культивуванням пиляків в присутності фузарієвої кислоти можливо створювати господарсько-цінні сорти пшениці стійкі до фузаріозного в'янення.

За нашими даними, за допомогою фузарієвої кислоти на рівні 50–500 мкг/л в поживному середовищі в культурі зрілого ізольованого пилку можливо оцінювати генотипи пшениці за їх сприйнятливістю або толерантністю до *F. graminearum*. В культурі пиляків з використанням фузарієвої кислоти можливо створювати умови для добору гомозиготних форм пшениці із середньою стійкістю до захворювання фузаріозом колосу.



Морфогенез в культурі пиляків ліній подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці від гібридної форми: Chinese Spring ph. 1b × [Ae. taushii (1691) × Одеська напівкарликова] за впливу фузарієвої кислоти

Morphogenesis in the anther culture of doubled haploid lines of wheat hybrid form: Chinese Spring ph. 1b × [Ae. taushii (1691) × Odessa napivkarlykova] under the influence of fusaric acid

Номер ЛПГ	Концентрація токсину, мкг/л		Кількість пиляків, шт.	Кількість новоутворень, %		Частота регенерації зелених рослин, %				
				Морфогенних	Достовірний інтервал Уїлсона Верхня межа	Нижня межа	шт.	% від висаджених пиляків	Достовірний інтервал Уїлсона Верхня межа	Нижня межа
11	Контроль		428	4,44	6,83	2,86	2	0,47	1,69	0,13
	Фузарієва кислота	50	303	3,30	5,97	1,80	2	0,66	2,37	0,18
		100	324	0,93**	2,69	0,32	0	0,00	1,17	0,00
12	Контроль		730	5,75	7,69	4,28	5	0,68	1,59	0,29
	Фузарієва кислота	100	346	2,60**	4,87	1,37	1	0,29	1,62	0,05
		500	314	8,28	11,86	5,71	2	0,64	2,29	0,17
14	Контроль		809	3,46	4,96	2,41	8	0,99	1,94	0,50
	Фузарієва кислота	50	320	1,25	3,17	0,49	1	0,31	1,75	0,06
		100	354	5,08	7,89	3,24	2	0,56	2,04	0,16
16	Контроль		306	3,59	6,32	2,02	0	0,00	1,24	0,00
	Фузарієва кислота	500	530	4,15	6,20	2,76	2	0,38	1,37	0,10
		50	307	1,63	3,76	0,70	1	0,33	1,82	0,06
18	Контроль		1081	2,68	3,83	1,87	2	0,19	0,67	0,05
	Фузарієва кислота	500	280	0,36	1,99	0,06	0	0,00	1,35	0,00
		50	325	7,69*	11,11	5,26	6	1,85*	3,97	0,85
	Фузарієва кислота	100	260	2,31	4,94	1,06	0	0,00	1,46	0,00
		500	323	4,95*	7,89	3,07	2	0,62	2,23	0,17

Примітка: * — достовірний позитивний вплив фактору в порівнянні з контролем при $p < 0,05$

** — достовірний негативний вплив фактору в порівнянні з контролем при $p < 0,05$

Таким чином, толерантність експлантів пшениці до фузарієвої кислоти в культурі *in vitro* відповідає середній стійкості (6 балів) *in vivo*, але не високій стійкості до захворювання пшениці фузаріозом колосу. Можна зробити припущення, що токсин фузарієва кислота не є специфічним для захворювання, викликаного патогеном *F. graminearum*. На нашу думку, використання фузарієвої кислоти як селективного фактору в доборі на стійкість пшениці до фузаріозу колосу, викликаного *F. graminearum* дає можливість добирати лише середньостійкі/толерантні до *F. graminearum* генотипи.

В цілому, результати роботи показали, що шляхом поєднання методів гаплоїдії та селекції *in vitro* з використанням фузарієвої кислоти можливо створювати гомозиготні форми подвоєних гаплоїдів пшениці із толерантністю до захворювання, викликаного *F. graminearum*. Для проведення лабораторної експрес-оцінки сприйнятливості/толерантності до патогена створеного шляхом андрогенезу *in vitro* гомозиготного матеріалу пшениці оптимальним є використання методу пророщування зрілого пилку в присутності фузарієвої кислоти, що може бути використано на ранніх етапах розвитку регенерантів до зав'язування насіння.

ЛІТЕРАТУРА

1. Foroud N. *Fusarium graminearum*- and trichothecene-induced differential transcriptomics and proteomics in resistant and susceptible wheat genotypes / N. Foroud, A. Laroche, M. Jordan, B. Ellis, F. Eudes // 3 Int. FHB Symposium : Cereal Research Communications. — Szeged, Hungary, 2008. — Vol. 36, Suppl. B. — P. 239–243.

2. Zhuping Yang. Genetic diversity of resistance genes controlling fusarium head blight with simple sequence repeat markers in thirty-six wheat accessions from east asian origin / Zhuping Yang, Jeannie Gilbert and J. Douglas Procunier // Euphytica. — 2006. — V. 148, № 3. — P. 345–352.

3. Kawanishi Y. Development of highly resistant wheat lines to *Fusarium* head blight derived from Chinese source 'Fujian5114' / Yuki Kawanishi, Ichiro Tsutsui, Atsushi Torada, Haruka Ohta, Minako Ogasawara, Masaya Hayashi, Eriko Nishii // 8th International wheat conference, 1–4 June 2010 : abstracts. — St. Petersburg, Russia, 2010. — P. 271.

4. Бабаянц Л.Т. Исходный материал для селекции озимой мягкой пшеницы на групповую устойчивость к фитопатогенам / Л.Т. Бабаянц, О.В. Бабаянц, А.А. Васильев, В.А. Палясный // 36. наукових праць СГП-НЦНС. — Одеса, 2007. — вип. 9(49). — С. 224–237.

5. Билай В.И. Фузарии / В.И. Фузариини. — Киев: Наукова думка, 1977. — 441 с.

6. Bruins M.B.M. Phytotoxicity of deoxynivalenol to wheat tissue with regard to *in vitro* selection for fusarium head blight resistance /



М.В.М. Bruins, I. Karsan, J. Schepers and C.H.A. Snijders // Plant Science. — 1993. — V. 94, I. 1-2. — P. 195–206.

7. Eudes F. Trichothecene-mediated *in vitro* selection in wheat for reduced mycotoxin accumulation caused by *Fusarium graminearum* / Eudes F., Comeau A., Rioux S., Collin J. // Canadian Journal of Plant Science. — 2008. — V. 88, I. 6. — P. 1115–1125.

8. Круглова Н.Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза : автореф. дис. на соиск. учёной степ. докт. биол. наук : спец. 03.00.05 «Ботаника» / Н.Н. Круглова — Уфа, 2002. — 48 с.

9. Лобанова К.І. Шляхи реалізації регенераційного потенціалу в культурі пиляків у різних генотипів озимої м'якої пшениці / Лобанова К.І., Жосонар М.В., Ігнатова С.О. // Вісник Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2006. — Т. 4, № 1. — С. 52–57.

10. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений : учебник [для студ. высших учеб. заведений] / З. П. Паушева. — М.: Агропромиздат, 1988. — 270 с.

11. Лаврова Н.В. Разработка и применение биотехнологий для получения устойчивых к фузариозу растений озимой пшеницы (гаплоидная) и огурца (меристемная, каллусная и микроспорогенная): автореферат дисс. на соискание науч. степени докт. биол. наук : спец. 03.00.23 «Биотехнология» / Н.В. Лаврова. — М., — 2006. — 46 с.

12. Методи отбора ценных генотипов на уровне пыльцы : [методические рекомендации] / В.А. Лях, А.И. Сорока, Л.Ю. Мищенко, М.Г. Калинова, Е. Н. Мирошниченко. — Запорожье, 2000. — 48 с.

13. Wang X. The effect of potato II medium for triticales anther culture / X. Wang, H. Hu // Plant Sci. Lett. — 1984. — Vol. 36. — P. 237–239.

14. Ткачева А.А. Получение растений огурца с повышенной устойчивостью к фузариозному увяданию методами *in vitro*: методические рекомендации / А.В. Поляков, А.А. Ткачева, И.И. Тарасенков, Н.К. Бирюкова. — М.: ГНУ ВНИИО, 2006. — 28 с.



Т.М. Корня, С.А. Игнатова

Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААН Украины,
Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина, тел.: +38 (0482) 39 55 57,
e-mail: odonata@mail.ru

СЕЛЕКЦІЯ *IN VITRO* ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ПОД ВЛІЯННЯМ ФУЗАРІЄВОЇ КИСЛОТИ

Реферат

Выявлено, что у форм пшеницы со средней устойчивостью к *Fusarium graminearum* в культуре *in vitro* толерантность к фузариевой кислоте на уровне зрелой пыльцы проявляется в её способности прорасти, и на уровне микроспор в культуре пыльников в увеличении количества морфогенного каллуса и регенерации из него растений под влиянием низких концентраций токсина. Установлено, что с использованием фузариевой кислоты в качестве селективного фактора в культуре пыльников пшеницы возможно создавать формы удвоенных гаплоидов со средней устойчивостью (6 баллов) к *F. graminearum*.

Ключевые слова: *Fusarium graminearum*, селекция *in vitro*, андрогенез *in vitro*, озимая мягкая пшеница.

T.M. Kornya, S.O. Ignatova

South Plant Biotechnology Center,
3, Ovidiopolska Str., Odesa, 65036, Ukraine, e-mail: odonata@mail.ru

SELECTION *IN VITRO* OF THE WINTER COMMON WHEAT UNDER THE INFLUENCE OF FUSARIC ACID

Summary

There were revealed that the forms of wheat with an average resistance to *Fusarium graminearum in vitro* culture had the tolerance to fusarium acid at the level of mature pollen, that was displayed in its ability to germinate and at the level of microspores in anther culture – there were displayed the increasing of of morphogenic callus number and plants regeneration under the influence of low toxin concentrations. It was established that using of the fusarium acid as a selective factor in anther culture of wheat gave the possibility to create the forms of double haploids with average resistance (6 points) to *F. graminearum*.

Key words: *Fusarium graminearum*, selection *in vitro*, androgenesis *in vitro*, winter common wheat.

