

ВЛИЯНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ МЕТАБОЛИТОВ *FUSARIUM SPOROTRICHIOIDES* НА ПРОЦЕССЫ РЕГЕНЕРАЦИИ *AVENA SATIVA* В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

С.Ю. Луговцова, Н.А. Нешумаева, Н.В. Зобова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Красноярск, Россия, zobovnat@mail.ru

Аннотация: Токсические метаболиты *F. sporotrichioides* в концентрации 40 и 50% в среде пролиферации каллусов овса достоверно ингибируют их рост и регенерацию, как на селективной среде пролиферации, так и на среде регенерации без метаболитов, сохраняя свое последствие с предыдущего этапа отбора на селективных средах пролиферации. Применение более высокого уровня стресса, чем 50% метаболитов в культуре каллусов овса для отбора устойчивых форм не оправдано. На средах с метаболитами получены регенеранты овса.

Ключевые слова: овес, каллусная культура, регенерация, фитотоксины. *F. sporotrichioides*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1308-1312

Диапазон взаимоотношений микроорганизмов с растением очень широк – от патогенеза до симбиоза [Кононенко, Буркин, 2009; Гагкаева и др., 2012; Щеклеина, Щенникова, 2013]. Актуальность изучения и определения токсигенных грибов и продуцируемых ими микотоксинов, влияющих на развитие растений, признана во всем мире и связана с их чрезвычайно серьезной опасностью для животных и человека. В то же время эти грибы представляют практический интерес для современной биотехнологии как продуценты биологически активных веществ, которые могут быть использованы в качестве селективных факторов для отбора устойчивых форм в клеточной селекции зерновых культур [Сурин и др., 2001, 2002; Тырышкин, 2007]. Отсутствие генетических источников устойчивости к фузариозной грибной инфекции осложняет создание требуемых сортов классическими методами. Использование культуры *in vitro* в получении устойчивых к корневым гнилям растений-регенерантов овса в присутствии токсических метаболитов возбудителей, может решить проблему борьбы с распространением этой инфекции.

Целью исследований явилось изучение влияния метаболитов микромицетов р. *Fusarium* в отношении процессов регенерации в каллусной культуре овса для отбора генотипов, устойчивых к фузариозным инфекциям.

В качестве объектов исследования использовали 6 пленчатых сортов овса: Тубинский, Саян, Казыр, Сельма, Талисман, Золотой початок и 2 голозерных: Голец, Тюменский голозерный. Донорные растения для введения в культуру выращивали в полевых условиях. Культивирование тканей *in vitro* [Бутенко, 1989] проводили в три этапа: индукция, пролиферация и регенерация каллусов, используя среду Мурасиге-Скуга (МС) в качестве основы. Индукция каллусогенеза протекала в культуре незрелых зародышей овса на среде МС с добавлением 2,4-Д – 3 мг/л и ИУК – 2 мг/л. Образовавшиеся жизнеспособные каллусы пассировали на среду пролиферации (МС + 2,4-Д – 1,5 мг/л) контрольную и селективные. В качестве селективирующего агента служили токсины гриба *F. sporotrichioides*, выделенного из популяции региональных возбудителей семенных инфекций овса. Для их получения изолят *F. sporotrichioides* культивировали поверхностным способом на питательной среде Чапека в течение 14 суток при температуре 24 °С. После удаления биомассы микромицета, полученный

фильтрат метаболитов стерилизовали методом Тиндаля. Простерилизованные метаболиты *F. sporotrichioides* (*Fs*) добавляли в среду пролиферации каллусов в разных концентрациях – 30%, 40% и 50%. Регенерацию растений в каллусной культуре проводили на среде МС с кинетином – 1 мг/л и ИУК – 0,5 мг/л без применения селективирующего агента. Данные в таблицах приведены в относительных единицах (число эксплантов, претерпевших изменения/количество пассированных на соответствующие среды, %). При обработке данных использовали многомерный дисперсионный анализ [Сорокин, 2010].

Исследованные сорта отличались по отзывчивости на условия культивирования *in vitro* и формирования каллусов. Наибольшую индукцию с учетом фрагментации крупных каллусов показали голозерные сорта Голец (98,5%), Тюменский голозерный (90,4%) и пленчатые Тубинский (109,2%), Саян (96,7%) (таблица не приводится).

Образовавшиеся каллусы пересаживали на среды пролиферации: контрольную и с метаболитами *Fs*. Добавление в среду 30% и 40% *Fs*, вело к угнетению процессов пролиферации (увеличение объемов каллусов) и стеблегенеза (побегообразование) практически у всех сортов (табл. 1).

Таблица 1.

Характеристика регенерационных процессов в культуре *in vitro* незрелых зародышей овса на селективных средах, содержащих метаболиты *F. sporotrichioides*

Сорт	Пролиферация			Стеблегенез		
	контроль	Fs-30%	Fs-40%	контроль	Fs-30%	Fs-40%
Тюменский голозерный	72,5	44,7	40,7	37,5	28,9	33,3
Голец	73,9	36,0	24,6	45,7	19,1	11,5
Тубинский	80,0	44,9	23,6	37,8	26,9	16,4
Саян	79,4	29,8	22,8	44,1	17,9	14,0
Казыр	68,2	59,6	39,4	27,3	46,8	15,2
Золотой початок	100	38,3	22,5	21,2	26,7	0
Сельма	86,1	53,6	33,3	36,1	26,8	0
Талисман	54,8	36,7	23,5	16,1	20,3	9,8
Среднее по всем сортам	76,9	43,0	28,8*	33,2	26,7	12,5*
Стандартная ошибка	опыта=10.0 (пролиферация)			опыта=9.71 (стеблегенез)		
Различия средних	фактора "сорта" – недостоверны, "условия" – достоверны на уровне 1%					

Здесь и далее в таблицах * – достоверные отличия $P < 0,05$

На среде с более высоким содержанием токсических метаболитов (*Fs*-40%) наблюдалось достоверное угнетение процессов по сравнению с контролем почти в 2 раза. Из голозерных сортов наиболее устойчивым к стрессору оказался Тюменский голозерный, у которого пролиферация и стеблегенез близки на контрольной и селективных средах. Различия между сортами по опыту не значимы.

Выход полноценных растений регенерантов оценивали на двух фонах: 1 - на среде пролиферации с метаболитами *Fs* и 2 – на среде регенерации без таковых (табл. 2). На среде пролиферации (фон 1, табл. 2) образование регенерантов шло достаточно активно, достигая 42-31% в контроле, снижалось почти у всех генотипов в присутствии метаболитов *Fs*, а при их концентрации в среде 40% - достоверно. Можно отметить сорта Тюменский голозерный, Тубинский и Сельма с наиболее высокими показателями регенерации в этих условиях.

Каллусы овса, не подвергшиеся некрозу на стадии пролиферации, но не сформировавшие полноценных регенерантов, пассивировали на среду регенерации без метаболитов. Уровень регенерации в этих условиях снижался двукратно в контроле, а последствие метаболитов *Fs* отражалось в дополнительном снижении показателя регенерации, для *Fs*-40% – значимом (фон 2, табл. 2).

Таблица 2.

Характеристика образования регенерантов, пригодных для высадки в грунт после отбора на селективных средах, на двух фонах

Сорт	Фон 1 – среда пролиферации с токсинами			Фон 2 – среда регенерации без токсинов		
	контроль	<i>Fs</i> -30%	<i>Fs</i> -40%	контроль	<i>Fs</i> -30%	<i>Fs</i> -40%
Тюменский голозерный	42,5	40,8	33,3	13,3	40,0	44,4
Голец	26,1	22,5	21,3	87,5	5,6	0
Тубинский	31,1	19,2	14,5	20,8	34,6	37,5
Саян	17,6	20,2	10,5	30,8	13,3	28,6
Казыр	18,2	25,5	12,1	51,7	52,9	11,1
Золотой початок	3,0	11,7	0	33,3	34,8	50,0
Сельма	41,7	21,4	7,1	15,8	40,0	10,5
Талисман	16,1	16,5	3,9	16,7	40,0	12,5
<i>Среднее по сортам</i>	<i>24,5</i>	<i>22,2</i>	<i>12,8*</i>	<i>33,7</i>	<i>32,7</i>	<i>24,3</i>
Стандартная ошибка	опыта=6.06 (на пролиферации)			опыта=23.2 (на регенерации)		
Различия средних	фактора "сорт" достоверны на уровне 1% и "условия" достоверны на уровне 1%			фактора "сорт" недостоверны и "условия" недостоверны		

Достоверных отличий между сортами по обоим фонам не установлено. Каллусы сортов Тубинский, Сельма и Талисман после пересадки с селективных сред на регенерацию даже несколько увеличивали формирование регенерантов по сравнению с каллусами с контрольной среды. Вероятно, в составе метаболитов *Fs* присутствовали не только фитопатогены, но и фитогормоны, которые могут стимулировать процесс закладки корней и побегов, что отмечено в составе культурального фильтрата патогенных грибов *C. sativus* и *F. oxysporum*, где выявлены фитогормоны как ингибиторного, так и стимулирующего характера (абсцизовая кислота и ИУК) [Шаяхметов, 2001].

Используемые метаболиты *Fs*, даже в концентрации 40% не полностью ингибировали регенерацию каллусов, поэтому давление стрессора на этот процесс усиливали до *Fs*-50%, и сорта Тюменский голозерный и Тубинский, отличающиеся высокими показателями регенерации, испытаны на фоне 1 (табл. 3).

Таблица 3.

Характеристика образования регенерантов на контрольной и селективной средах пролиферации (фон 1)

Сорт	контроль	<i>Fs</i> -50%
Тюменский голозерный	88,90	16,67
Тубинский	68,80	4,35
Среднее по опыту	78.85	10.51*
Стандартная ошибка опыта=3.89		
Различия средних фактора "сорт" недостоверны, фактора "условия" достоверны на уровне 5%		

Если в этих условиях образование регенерантов в контроле имело высокий уровень, то на селективной среде оно резко и достоверно снижалось. Вероятно, уровень *Fs*-50% является предельно допустимым для использования метаболитов исследованного изолята в отборе устойчивых форм в каллусной культуре овса.

Таким образом, метаболиты с микотоксинами *F. sporotrichioides* в используемой нами форме в концентрации *Fs*-40% и большей (*Fs*-50%) достоверно ингибируют пролиферацию и регенерацию каллусов, как на селективной среде пролиферации, так и на среде регенерации без метаболитов, сохраняя свое последствие с предыдущего этапа отбора на селективных средах пролиферации. Это свидетельствует о корректности использования выделенных и использованных нами метаболитов с токсинами *Fs* в качестве селективирующего агента. Их присутствие в высокой концентрации (*Fs*-50%) в среде пролиферации не полностью, но очень сильно, угнетает регенерацию, по крайней мере, у некоторых сортов овса, что, во-первых свидетельствует о достаточной устойчивости овса к *F. sporotrichioides*, а, во-вторых, об отсутствии необходимости применения более высокого уровня стресса в каллусной культуре овса. Различия голозерных и пленчатых сортов по исследованным параметрам не отмечено. Полученные в каллусной культуре растения регенеранты дорощены до семенного потомства и будут проверены на устойчивость к фузариозной инфекции в лабораторных и полевых условиях.

Литература

Бутенко Р.Г. Биотехнология растений: культура клеток. – М.: Агропромиздат, 1989. – 290 с.

Гагкаева Т.Ю., Дмитриев А.П., Павлюшин В.А. Микробиота зерна – показатель его качества и безопасности // Защита и карантин растений. – 2012. – № 9. – С. 14–18.

Кононенко Г.П., Буркин А.А. О контаминации фузариотоксинами зерна злаков, используемых на кормовые цели // Сельскохозяйственная биология. – 2009. – № 4. – С. 81–88.

Макарова Р.В., Борисова Т.А. Кефели В.И. Содержание цитокининов и ИУК в регенерантах табака, носителях активных агробактериальных IPT-генов // Докл. РАН. 1995. – Т. 356, №2. – С. 280–283.

Монастырский О.А., Ярошенко В.А. Биопрепараты против развития токсигенных грибов на зерне // Защита и карантин растений. – 2000. – № 3. – С. 32–33.

Сорокин О.Д. Прикладная статистика на компьютере. – Краснообск: СО РАСХН, 2010. – 337 с.

Сурин Н.А., Громовых Т.И., Зобова Н.В. и др. Получение регенерантов ярового ячменя, устойчивых к токсинам возбудителей корневых гнилей в условиях Восточной Сибири // Микология и фитопатология. – 2002. – Т. 36, № 2. – С. 67–71.

Сурин Н.А., Сорокатая Е.И., Громовых Т.И., Зобова Н.В. Необходимость повышения устойчивости к корневым гнилям сортов ярового ячменя в Красноярском крае // Доклады РАСХН. – 2001. – № 3. – С. 16–18.

Тырышкин Л.Г. Генетическое разнообразие пшеницы и ячменя по эффективной устойчивости к болезням и возможности его расширения: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – СПб., 2007. – 40 с.

Тырышкин, Л.Г. Соматоклональная изменчивость пшеницы и ячменя по устойчивости к болезням // Идентифицированный генофонд растений и селекция. – СПб.: ВИР. – 2005. – С. 758–773.

Шаяхметов И.Ф. Биологическая активность метаболитов из культурального фильтрата *Cochliobolus sativus* и *Fusarium oxysporum* в связи с клеточной селекцией

злаковых на устойчивость к фитопатогенам // Микология и фитопатология. – 2001. – Т. 35, № 6. – С. 66–71.

Щеклеина Л.М., Щенникова Н.Н. Изменение микрофлоры семян ячменя при хранении // Защита и карантин растений. – 2013. – № 2. – С. 24–26.

Falk D.E., Reinbergs E. OAC Kippen spring barley // Can. J. Plant Sci. – 1991. – V. 71, No. 1. – P. 205-206.

Tyryshkin L.G., Tyryshkina N.A. Resistance to diseases in wheat collection samples and somaclonal variants // Czech. J. Genet. Plant Breed. – 2003. – No. 1. – P. 21–23.

INFLUENCE OF TOXIC METABOLITES FUSARIUM SPOROTRICHIOIDES ON THE PROCESSES OF REGENERATION OF AVENA SATIVA IN THE TISSUE CULTURE

S.Yu. Lugovtsova, N.A. Neshumayeva, N.V. Zobova

Krasnoyarsk Research Institute of Agriculture «Federal Research Center «Krasnoyarsk Scientific Center of the SB RAS», Krasnoyarsk, Russia, zobovnat@mail.ru

Abstract. Toxic metabolites of *F. sporotrichioides* in a concentration of 40 and 50% in the oat callus proliferation media significantly inhibit their growth and regeneration both in the selective proliferation medium and in the regeneration medium without metabolites, retaining its aftereffect from the previous selection step in selective proliferation media. The use of a higher stress level than 50% of metabolites in the oat callus culture to select stable forms is not justified. On mediums with metabolites regenerants of oats are formed.

Keywords: *oats, callus culture, regeneration, phytotoxins. F. sporotrichioides*