

образцов овсяницы луговой из отдаленных эколого-географических зон к условиям северо-восточной Лесостепи Украины. Выделены типы характеристик, которые обеспечивают достаточный уровень адаптивности образцов к условиям зоны исследований. Обоснована необходимость ведения отдельных селекционных программ по созданию сортов сенокосного и пастбищного использования.

Ключевые слова: коллекция, овсяница луговая, сорт, зеленая масса, сухое вещество, семена, высота растений, адаптация.

ESTIMATION OF ORIGINAL MATERIAL IN FESTUCA PRATENSIS HUDS. (FESCUE) BREEDING

V. I. Trotsenko, V. M. Kabanets, Ya. U.Semenenko

The results of environmental testing for adaptability of fescue collection samples from distant ecological-geographical zones in terms of the north-eastern forest-steppe of Ukraine were presented in article. The types of characteristics provided the sufficient level of adaptation of the samples to the conditions of the area have been selected. The necessity of maintaining of separate breeding programs for creation varieties of hay and pasture use has been proved.

Надійшла до редакції: 4.03.2015 р.

Рецензент: Жатов О.Г.

УДК 633.11:631.523.085:581.143.6:631.524.86.01

ОТРИМАННЯ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* ВАРІАНТІВ ПШЕНИЦІ З ПІДВИЩЕНОЮ СИСТЕМНОЮ ІНДУКОВАНОЮ СТІЙКІСТЮ

С. І. Волощук, к.с.-г.н., Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла НААН

Виявлено специфічність соматоклональних варіантів у накопиченні фенольних сполук, зміні активності ферментів поліфенолоксидази та L-фенілаланін-амоній-ліази за реакцією чутливих та толерантних клонів на індуктори системної індукованої стійкості і заспорювання *Fusarium culmorum* у проростках, отриманих з насіння R₂. Толерантні клони можуть бути мутантами за генами системної індукованої стійкості.

Ключові слова: пшениця, калюс, *Septoria tritici*, *Fusarium culmorum*, індукована стійкість

Постановка проблеми. Існує лише незначна кількість сортів, імунних проти багатьох хвороб рослин. Зокрема, до фузаріозу колосу переважна більшість сортів пшениці є високосприйнятливими. Стійкі форми виявлені переважно серед сортів Японії і Китаю [1]. Серед британських сортів тільки три з 50 (Soissons, Spark та Vector) мали вищу стійкість порівняно із сприйнятливим сортом Wizard [2]. Тому дослідження неспецифічних механізмів стійкості для створення толерантних до патогенів сортів є актуальним.

Аналіз останніх досліджень і публікацій.

Концепція індукованого імунітету пояснює такі явища, як вакцинація, імунізація, дія еліситорів (активаторів хворобостійкості), набута (локальна і системна) стійкість проти хвороб. Сигнал, який генерується в рослинах у відповідь на дію патогена, визначає напрям метаболізму [3].

Попередня обробка рослин невірулентним патогеном (біотичний індуктор) або хімічними речовинами (абіотичні індуктори) може збільшити опір до патогена. Зазвичай, така індукована система стійкості відома як системна індукована стійкість (СІС). Вона ефективна проти різноманітних патогенів (віруси, бактерії, гриби) [4] і пов'язана з генами, які кодують білки і ферменти, що контролюють вторинний обмін речовин, та патоген-залежні (PR) і регуляторні білки [5]. Продуктами цих генів є поліфенолоксидази (ПФО) та пероксидази (ПР), що каталізують утворення лігніну, і L-фенілаланін-амонійліази (ФАЛ), залу-

чені у синтез фітоалексинів та фенолів. PR-білки, наприклад β-1,3-глюканази та хітинази, послаблюють клітинні оболонки гриба, а хітин і глюканові олігомери, що утворюються в результаті їх деградації, є еліситорами, які індукують різні механізми захисту в рослинах [6].

ПФО каталізують окислення одигідроксифенолів до о-хінонів, що є більш токсичними для патогенів. ПФО індукується у відповідь на механічне поранення, грибе чи бактеріальне зараження і обробку речовинами, пов'язаними з передачею сигналів, зокрема саліциловою кислотою (СК) [7]. Саліцилова кислота є важливим компонентом передачі сигналу, залученим у системну стійкість проти патогенів. При екзогенному застосуванні СК виявлено експресію генів СІС [8]. Показано, що застосування СК збільшувало стійкість проти некротрофних грибних патогенів у тютюну [9]. Крім того, застосування СК, хлориду кальцію і щавлевої кислоти зменшувало розвиток альтернаріозу завдяки стимулюванню активності β-1,3-глюканази, ФАЛ, ПФО, ПР [10]. Поліаміни (ПА) спермін, путресцин, спермідин виявлені в широкого кола організмів – від бактерій до рослин і тварин. Вважають, що вони сприяють росту і розвитку рослин, регулюючи синтез нуклеїнових кислот, і відіграють важливу роль у взаємодії мікробів і рослин [11]. У стійких сортів грибні і бактерійні патогени індукують утворення амідів фенолової кислоти і ПА, що, можливо, діють як фітоалексинні протигрибні речовини [12].

Відомо три способи індукції стійкості: преінокуляція рослини непатогенами, слабкими чи інактивованими патогенами, несумісними расами патогенів, сапрофітами або симбіонтами [13]; дія природними метаболітами мікроорганізмів, рослин або синтетичними хімічними речовинами [14]; метод генної інженерії – перенесення генів авірulentності патогенів у рослини, що забезпечує в них постійний синтез елісатора і стійкість проти широкого кола хвороб.

У наших попередніх дослідженнях [15] та роботах інших дослідників [16] показано, що присутність мікроорганізмів викликала некроз калюсних тканин, тоді як кокультивування калюсів одночасно з грибами і бактеріями виявило їх антагонізм.

Мета досліджень – виявити соматональні варіанти та мутанти пшениці з підвищеним рівнем системної індукованої стійкості після обробки калюсів індукторами та мутагенними і модифікуючими чинниками в культурі *in vitro*.

Матеріал і методи досліджень. Матеріалом для дослідження було насіння з регенерантів R₁ сортів озимої пшениці Даха та Миронівська 33, отриманих після обробки індукторами разом з мутагенними і модифікуючими чинниками в культурі *in vitro*, та ізоляти *Fusarium culmorum* і *Septoria tritici*, виділені у відділі захисту рослин Миронівського інституту пшениці.

Насіння поверхнево стерилізували 0,01% водним HgCl₂ 1–2 хвилини, а потім двічі промивали дистильованою водою. У чашки Петрі, застелені подвійним шаром фільтрувального паперу, розкладали по 25 насінин для кожного варіанту у 3 повтореннях. Варіант 1 – дистильована вода (контроль), варіант 2 – 0,8 мМ саліцилова кислота (СК), варіант 3 – 0,01 мМ спермін (СП) і варіант 4 – 0,8 мМ СК + 0,01 мМ СП (СК+СП). Чашки до 10 днів витримували у вологій камері за температури 26°C для отримання проростків, які використовували для аналізів. Інокулюм патогенів отримували на картопляно-глюкозному агарі. Суспензію конідій в концентрації до 10⁹/мл використовували для обробки 10-денних проростків. Активність ПФО, ФАЛ та вміст фенольних сполук визначили у корінцях та проростках упродовж 1–5 діб. Уміст фенольних сполук визначали в корінцях і проростках

згідно з [17]. Активність ферментів визначали після визначення вмісту білка методом Лоурі [18], ПФО – за методикою Mauger та ін. [19], активність ФАЛ – за Burrell і Rees [20].

Результати досліджень. Для обробки калюсних культур використовували мутагенний чинник нітрозоетилсечовину (НЕС). Виявлено, що прийнятний рівень регенерації з калюсів (до 50%) при обробках мутагеном отриманий за концентрації 0,01% при додаванні до середовища та 0,05% – за обробки калюсів у момент пересадки. За комбінованої обробки калюсів, отриманих зі зрілих зародків двох сортів озимої пшениці (Даха та Миронівська 33), мутагенами та індукторами СІС (0,01% НЕС, 8 мМ саліцилова кислота та 0,01 мМ спермін) було отримано 217 життєздатних калюсних культур, 164 з яких дали регенеранти. Нащадки цих регенерантів були використані для подальших досліджень.

Раніше нами було виявлено [21], що при прижиттєвому забарвленні калюсів гваяколом стійкі генотипи забарвлювались у 80–90% випадків, тоді як нестійкі – тільки у 10–20%.

Толерантні до патогенів клони відбирали, інокуючи їх конідіями *Septoria tritici*, при цьому нестійкі клони загинули. У толерантних клонів пероксидазна активність значно зростала, тоді як у нестійких вихідних генотипів їхнього гібриду вона або зменшувалась, або ж майже не змінювалась. Толерантні клони можуть нести в собі гени СІС, і оскільки обидва вихідні сорти є сприйнятливими до септоріозу, можна було припустити, що вони є мутантами за генами СІС.

У подальших дослідженнях було використано клони сорту Миронівська 33, згруповані за стійкістю проти септоріозу, але перевірку проводили при інокуляції *Fusarium culmorum*. Передбачалось, що неспецифічна системна індукована стійкість повинна проявлятися при дії будь-якого патогена.

Було досліджено активність ферментів, що пов'язують з СІС, та вміст фенолів після заспорювання патогеном упродовж 5 діб. Виявлено, що вміст фенольних сполук зростає як у чутливих, так і толерантних генотипів (клональних варіантів), проте значно сильніше – у толерантних клонів, причому вони мають більший уміст цих сполук і в контролі (табл. 1).

Таблиця 1

Уміст фенолів у корінцях і проростках клональних варіантів пшениці сорту Миронівська 33 після заспорювання *F. culmorum*, мкг/г сирової маси

Час, діб	Сприйнятливі клони						Толерантні клони					
	корінці			проростки			корінці			проростки		
	контроль	патоген		контроль	патоген		контроль	патоген		контроль	патоген	
1	129,2	138,7		34,5	41,5	**	169,3	175,4		55,2	75,5	**
2	137,3	154,8		39,6	47,2	**	179,8	224,6	**	62,1	88,6	*
3	145,5	168,6		45,3	58,6	**	188,8	243,2	***	69,4	97,2	*
4	152,2	182,3	*	51,3	66,1	*	196,2	291,2	**	78,3	110,5	**
5	157,9	209,1	**	57,4	81,4	**	214,2	345,2	**	83,1	142,8	***

Тут і далі різниця від контролю вірогідна при: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001

Виявлено, що у толерантних до *S. tritici* соматональних варіантів за інокуляції *Fusarium*

culmorum активність поліфенолоксидази зростає більшою мірою як у коренях, так і в проростках за

абсолютною величиною порівняно з чутливими клонами, причому у контролі активність ферменту

також дещо вища у толерантних клонів (табл. 2).

Таблиця 2

Активність поліфенолоксидази в корінцях і проростках клональних варіантів пшениці сорту Миронівська 33 після заспорювання *F. culmorum*

Час, діб	Сприйнятливі клони						Толерантні клони					
	корінці			проростки			корінці			проростки		
	контроль	патоген		контроль	патоген		контроль	патоген		контроль	патоген	
1	19,5	11,2		14,2	18,4		28,2	38,1		23,1	26,3	
2	21,5	22,4		12,3	19,3	*	32,3	47,3	*	26,4	30,4	*
3	26,4	28,4	*	17,4	23,4	*	38,3	53,2	*	22,4	35,5	**
4	31,2	39,2	**	22,2	29,4	**	35,4	65,4	**	31,4	62,4	***
5	25,3	49,2	**	18,2	43,4	*	32,2	89,3	**	35,4	105,4	***

Активність в од. за хв./мг білка.

Аналогічно було виявлено, що у толерантних до *S. tritici* генотипів за інокуляції *Fusarium culmorum* активність фенілаланін-амоній-ліази також зростає порівняно з чутливими генотипами

(клони) (табл. 3). У відносних одиницях таке зростання майже трикратне, причому у контролі активність ферменту також дещо вища у толерантних клонів.

Таблиця 3

Активність L-феніл-аланін-амонійліази в корінцях і проростках клональних варіантів пшениці сорту Миронівська 33 після заспорювання *F. culmorum*

Час, діб	Сприйнятливі клони						Толерантні клони					
	корінці			проростки			корінці			проростки		
	контроль	патоген		контроль	патоген		контроль	патоген		контроль	патоген	
1	95,2	98,6		14,1	21,8	*	122,1	149,1	**	31,2	46,2	*
2	91,8	109,2	*	19,2	33,9	*	125,1	168,2	**	38,2	69,4	*
3	98,2	119,2	**	16,3	38,4	*	128,1	182,1	*	39,1	71,7	**
4	100,1	125,8	**	20,5	41,1	*	136,1	225,5	**	31,8	88,4	**
5	108,1	159,5	**	22,1	65,1	*	135,1	288,8	**	36,2	119,7	***

Активність у мкг транс-цінамікової кислоти за год/мг білка

Для перевірки того, як реагують чутливі та толерантні клони на індуктори СІС, проростки були оброблені саліциловою кислотою (СК), сперміном (СП) та їх комбінацією, і впродовж 10 діб визначали активність ПФО, ФАЛ та вміст поліфенолів (табл. 4–6).

Видно, що обидві групи клонів прореагува-

ли на індуктори однотипно, проте толерантні вірогідно перевищували сприйнятливі за всіма параметрами. При цьому у толерантних клонів показники активності ферментів та вміст фенольних сполук були набагато вищими, ніж у контролі під дією як патогена, так і індукторів.

Таблиця 4

Активність ПФО в корінцях і проростках сприйнятливих і стійких клональних варіантів пшениці сорту Миронівська 33 в контролі (К), після обробки саліциловою кислотою (СК) та сперміном (СП)

Час після обробки, год.	Сприйнятливі клони							Толерантні клони						
	К	СК		СП		СК+СП		К	СК		СП		СК+СП	
48	6,3	8,3		7,1		10,2		11,2	19,2		16,2		25,6	*
96	7,4	10,6		8,5		11,3		12,3	24,4	*	22,4	**	36,2	**
144	8,2	15,4	*	13,1	*	19,3	*	13,4	31,3	**	27,2	**	48,2	**
192	8,3	21,5	**	19,2	*	24,6	**	12,2	42,3	**	38,2	**	59,2	**
240	9,9	29,5	*	27,4	*	31,4	**	13,2	72,4	***	66,2	***	98,2	***
240 (проростки)	15,3	24,4	*	21,4	*	27,4	***	31,3	68,4	**	58,2	**	83,2	**

Активність в од. за хв./мг білка

Таблиця 5

Активність ФАЛ у корінцях і проростках, сприйнятливих і стійких клональних варіантів пшениці сорту Миронівська 33 в контролі (К), після обробки саліциловою кислотою (СК) та сперміном (СП)

Час після обробки, год.	Сприйнятливі клони							Толерантні клони						
	К	СК		СП		СК+СП		К	СК		СП		СК+СП	
48	44,8	48,7		45,6		51,2		69,4	79,1	*	70,4		84,7	*
96	45,3	83,8	*	69,2		88,9	*	66,1	112,1	*	99,1	*	122,6	*
144	49,4	99,1	*	87,1	*	125,2	**	70,4	144,5	**	126,1	*	168,1	**
192	53,1	114,6	*	105		133,6	**	73,2	196,6	**	174,1	**	213,1	**
240	48,5	135,6	**	126	*	168,4	**	72,2	248,1	**	238,1	**	299,6	**
240 (проростки)	17,2	29,6	*	26,7	*	33,7	**	37,2	86,7	**	76,2	**	125,7	**

Активність в мкг транс-цінамікової кислоти за год. на мг білка

Вміст фенолів у корінцях і проростках, сприйнятливих і стійких клональних варіантів пшениці сорту Миронівська 33 в контролі (К), після обробки саліциловою кислотою (СК) та сперміном (СП), мкг/г сирової маси

Час після обробки, год.	Сприйнятливі клони						Толерантні клони								
	К		СК		СП		СК+СП		К		СК		СП		СК+СП
48	64,6	74,3			70,2		82,2	*	90,2	120,1	*	102,3	*	164,7	**
96	78,1	112,2	**		102,8	**	211,1	*	96,3	142,3	*	128,2	*	216,2	***
144	78,3	149,3	**		143,4	**	153,1	**	91,8	218,8	**	210,8	**	270,4	**
192	72,4	161,1	**		152,3	*	182,4	**	96,4	243,2	**	235,1	**	322,2	***
240	73,9	188,4	**		172,2	**	197,2	**	97,4	286,4	**	263,1	**	354,3	***
240 (проростки)	40,8	58,2	***		55,4	**	64,3	**	53,1	87,2	***	84,2	**	106,3	***

Поєднання індукторів (СП + СК) значно підсилювало активність досліджуваних ферментів, які відповідають за синтез лігніну та фітоалексинів.

Таким чином, можна припустити, що отримані через культуру *in vitro* після дії мутагенів та індукторів СІС клони можуть нести мутантні гени, які пов'язані з більш інтенсивною захисною відповіддю на ураження некротрофними патогенами.

Висновки. 1. Виявлено значну різницю між стійкими та нестійкими генотипами за показника-

ми активності пероксидази при зараженні рослин-регенерантів R₁ збудником *Septoria tritici*.

2. Доведена специфічність у накопиченні фенольних сполук, зміні активності ферментів поліфенолоксидази та L-феніл-аланін-амонійліази при відповіді чутливих та толерантних генотипів на індуктори СІС і патоген *Fusarium culmorum* у проростках, отриманих з насіння R₂.

3. Виявлена толерантність до патогенів може бути обумовлена системною індукованою стійкістю.

Список використаної літератури:

1. Калантаевская О. Г. Исходный материал яровой пшеницы для селекции на устойчивость к фузариозу колоса в Приморском крае / О. Г. Калантаевская // Сиб. вестник с.-х. науки. – 2004. – № 1. – С. 52–55.
2. Evaluation and characterization of resistance to fusarium head blight caused by *Fusarium culmorum* in UK winter wheat cultivars / N. Gosman, R. Bayles, P. Jennings [et al.] // Plant Pathology. – 2007. – Vol. 56. – P. 264–276.
3. Schaffrath U. Characterization of RCI-1, a chloroplastic rice lipoxygenase whose synthesis is induced by chemical plant resistance activators / U. Schaffrath, F. Zabbai, R. Dudler // Eur. J. Biochemistry. – 2000. – Vol. 267. – P. 5935–5942.
4. Systemic acquired resistance / J. A. Ryals, U. H. Neuenschwander, M. G. Willits [et al.] // Plant Cell. – 1996. – Vol. 8. – P. 1809–1819.
5. Dixon R. A. Early events in the activation of plant defense responses / R. A. Dixon, M. J. Harrison, C. J. Lamb // Annu. Rev. Phytopathol. – 1994. – Vol. 32. – P. 479–501.
6. Induction of resistance in chickpea by cell wall protein of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* and *Macrophomina phaseolina* / S. Ratul, Y. Mukesh, B. P. Singh [et al.] // Curr. Sci. – 2006. – Vol. 9, No 11. – P. 1543–1546.
7. Polyphenol oxidase is induced by chilling and wounding in pineapple / R. J. Stewart, B. J. B. Sawyeer, C. S. Bucheli, S. P. Robinson // Aust. J. Plant. Physiol. – 2001. – Vol. 28. – P. 181–191.
8. 2,6-Dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid / B. L. Vernooij, P. Friedrich, G. T. Ahl [et al.] // Mol. Plant. Microbe Interact. – 1995. – Vol. 8. – P. 228–234.
9. Murphy A. M. Characteristics of salicylic acid induced delay in disease caused by a necrotrophic fungal pathogen in tobacco / A. M. Murphy, L. J. Holcombe, J. P. Carr // Physiol. Mol. Plant. Pathol. – 2000. – Vol. 57. – P. 45–54.
10. Induction of defense responses against Alternaria rot by different elicitors in harvested pear fruit / S. Tian, W. Yakun, G. Qin, Y. Xu // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – Vol. 70. – P. 729–734.
11. Walters D. R. Polyamines and plant disease / D. R. Walters // Phytochem. – 2003. – Vol. 62. – P. 97–107.
12. Induction of systemic acquired resistance in susceptible and resistant cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes: A comparative study in response to salicylic acid and spermine / S. Raju, S. K. Jayalakshmi, S. Usharani, K. Sreeramulu // Physiol. Mol. Biol. Plants. – 2007. – Vol. 13. – P. 27–36.
13. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum* / C. Chen, R.R. Belanger, N. Benhamou, T. Paulitz // Physiol. Mol. Plant. Pathol. – 2000. – Vol. 56. – P. 13–23.
14. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* / A. Arfaoui, A. El Hadrami, Y. Mabrouk [et al.] // Plant Physiol. Biochem. – 2007. – Vol. 45. – P. 470–479.

15. Взаимодействие патогенной и ассоциативной почвенной микрофлоры в условиях *in vitro* / С. И. Волощук, Р. Н. Капля, Н. Г. Бойко [и др.] // Докл. Россельхозакадемии. – 2006. – № 1. – С. 22–25.
16. Антагонистическая активность фосфатмобилизирующих бацилл к фитопатогенным грибам и бактериям / А. А. Рой, О. В. Залоило, Л. С. Чернова, И. К. Курдиш // Агроекологічний журнал. – 2005. – № 1. – С. 50–55.
17. Singleton V. L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent / V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventos // Meth. Enzymol. – 1999. – Vol. 299. – P. 152-178.
18. Protein measurement with folin-phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
19. Mayer A. M. Assay of catechol oxidase: a critical comparison of methods / A. M. Mayer, E. Harel, R. B. Shaul // Phytochem. – 1965. – Vol. 5. – P. 783–789.
20. Burrell M. M. Metabolism of phenylalanine and tyrosine in rice leaves infected by *Pyricularia oryzae* / M. M. Burrell, T. A. Rees // Physiol. Plant. Pathol. – 1974. – Vol. 4. – P. 497–474.
21. Волощук С. И. Морфолого-биохимические характеристики каллусов пшеницы при кокультивировании с патогенными грибами / С. И. Волощук, А. Д. Волощук, В. С. Гирко // Докл. Россельхозакадемии. – 2005. – № 3. – С. 35-38.

ПОЛУЧЕНИЕ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO ВАРИАНТОВ ПШЕНИЦЫ С ПОВЫШЕННОЙ СИСТЕМНОЙ ИНДУЦИРОВАННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ

С. И. Волощук

*Установлена специфичность соматоклональных вариантов в накоплении фенольных соединений, изменении активности ферментов полифенолоксидазы и L-фенилаланин-аммоний-лиазы по реакции чувствительных и толерантных клонов на индукторы системной индуцированной устойчивости и заспоривание *Fusarium culmorum* в проростках, полученных из семян R₂. Толерантные клоны могут быть мутантами по генам системной индуцированной устойчивости.*

*Ключевые слова: пшеница, каллюс, *Septoria tritici*, *Fusarium culmorum*, индуцированная устойчивость.*

OBTAINING WHEAT SOMACLONAL VARIANTS IN VITRO WITH INCREASED SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE

S. I. Voloshchuk

*Specificity of somaclonal variants in accumulation of phenolic compounds, changes in enzyme activity for polyphenol oxidase and L-phenylalanine ammonia lyase by reaction of sensitive and tolerant clones on inducers of systemic acquired resistance and inoculation with *Fusarium culmorum* in seedlings derived from R₂ seeds is ascertained. Tolerant clones can be mutants for the genes of systemic acquired resistance.*

*Key words: wheat, callus, *Septoria tritici*, *Fusarium culmorum*, acquired resistance.*

Надійшла до редакції: 5.03.2015 р.

Рецензент: Власенко В. А.