

АВКСЕНТЬЄВА О.О.^{1,2}✉, ТЕРЕНТЬЄВА Н.В.¹¹ Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,
Україна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, e-mail: avksentyeva@karazin.ua² Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
Україна, 01601 м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, e-mail: avksentyeva@karazin.ua
✉ avksentyeva@karazin.ua, (066) 281-98-25**ГЕНИ КОНТРОЛЮ ТЕМПІВ РОЗВИТКУ ЯК КОМПОНЕНТИ СИСТЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ
СТІЙКОСТІ *TRITICUM AESTIVUM* L. ДО БІОТИЧНОГО СТРЕСУ ЗА УМОВ *IN VITRO***

Підвищення стійкості рослин до хвороб – одне з найважливіших завдань фітофізіології, яке можна вирішити біотехнологічними методами. Культура *in vitro* є сучасною модельною системою в фітобіологічних дослідженнях і широко використовується в клітинній селекції для отримання стійких до хвороб сортів рослин [1]. Пшениця м'яка – найцінніша продовольча культура, яка займає провідне місце в зерновому балансі України. Її продуктивність залежить від реалізації генетично закладених властивостей, а також впливу умов навколишнього середовища, що діють на певному етапі онтогенезу рослини. Головною причиною зниження врожайності озимої пшениці м'якої є ураження хворобами. Серед комплексу найбільш розповсюджених та шкідливих хвороб вагоме місце займають фузаріози (фузаріоз колосу, фузаріозна коренева гниль та ін.), викликані різними видами мікроміцетів роду *Fusarium* [2]. Відомо, що в процесі еволюції та селекції у пшениці м'якої сформувалися дві основні генетичні системи, які детермінують її ріст і розвиток у різних температурних і фотоперіодичних умовах – система генів *PPD* (чутливість до фотоперіоду) і система генів *VRN* (потреби в яровизації, тип розвитку ярий/озимий) [3]. Реакція рослин пшениці на фотоперіод контролюється генами *PPD*, локалізованими в хромосомах 2D, 2B і 2A. Ген *PPD-D1a* розглядають як ключовий серед генів, що визначають фотоперіодичну чутливість гексаплоїдних пшениць. Він відноситься до сімейства PRR (Pseudo Response Regulator), відомих регуляторів добових ритмів у *Arabidopsis* [4]. Зараз гени цієї системи картовані, ведуться дослідження з ідентифікації їхніх білкових продуктів [3], їх впливу на розвиток пшениці [5], адаптацію до екологічних факторів [6], агрономічні ознаки [7] та ін. Оскільки у формуванні стійкості

до фітопатогенів істотну роль грає вік та фаза онтогенезу рослини, яка зазнала біотичного стресу, можна припустити, що генетичні системи контролю темпів розвитку пшениці м'якої відіграють певну роль у формуванні біологічних механізмів стійкості до біотичних стресів.

Метою нашої роботи було дослідити вплив екзометаболітів фітопатогенів роду *Fusarium* на ріст та цито-морфологічну характеристику калусної культури ізогенних за генами *PPD* ліній озимої м'якої пшениці.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження служили майже ізогенні за генами *PPD* лінії (NILs) м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. сорту Миронівська 808, а також фітопатогенні мікроміцети *Fusarium oxysporum* і *Fusarium moniliforme* (колекція культур мікроміцетів кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна). В роботі використовували загальноприйняті біотехнологічні методи [8]. Введення в культуру *in vitro* та первинні калусні культури ізогенних ліній NILs отримували, використовуючи в якості експлантів зрілі зародки. Культивування проводили на живильному середовищі Мурасіге і Скуга (МС), з додаванням стимулятора росту – 2,4-Д (2 мг/л), в термостаті при 26°C. Для отримання культурального фільтрату (КФ) мікроміцетів штами *Fusarium oxysporum* та *Fusarium moniliforme* культивували протягом 14 діб на неагаризованому живильному середовищі Чапека [9] за температури 22°C, після чого проводили фільтрацію через бактеріальний фільтр МСЕ-22. Вплив екзометаболітів фітопатогенів р. *Fusarium* досліджували, додаючи КФ мікроміцетів в живильне середовище МС в співвідношенні 1:20, використовуючи пересадкові ка-

лусні культури ізогенних ліній 2–3 пасажу. Контрольні варіанти пасивували на середовище МС + 2 мг/л 2,4 Д без додавання КФ мікроміцетів. Культивували пересадкові калусні культури ізогенних ліній протягом 4-х тижнів, проводячи цито- і морфологічну характеристику калусних тканин та аналізуючи ростову реакцію (ростовий індекс (PI), кількість та довжину калусних клітин). Цитологічні дослідження проводили на тимчасових мікропрепаратах, за допомогою світлового мікроскопа БЮЛАМ (Росія), проводячи попередню мацерацію калусних тканин 10 % розчином хромової кислоти. Кількість клітин в 1 г калусу розраховували за методом Брауна [10], використовуючи камеру Фукса-Розенталя. Проведено дві біологічні серії експериментів *in vitro*, кожна ізолінія представлена 2–3 чашками Петрі по 5–7 калусів. Статистична обробка експериментальних даних проведена з використанням t-критерію Стьюдента [11] за допомогою пакету програм Excel 2010.

Результати та обговорення

За результатами проведеного дослідження впливу екзометаболітів фітопатогенів р. *Fusarium* в умовах культури *in vitro* встановлено, що внесення КФ в середовище культивування калусів пшениці є селективним фактором для росту калусної культури NILs сорту Миронівська 808 (табл. 1). Вплив КФ досліджуваних мікроміцетів на ростову реакцію калусів проявлявся протилежним чином. Екзометаболіти *F. oxysporum* пригнічують ріст калусної культури у всіх досліджуваних ізоліній та сорту Миронівська 808. Максимальне гальмування ростової реакції спостерігалось в ізолінії *PPD B1a* – на 39 % порівняно до контролю, ізолінія *PPD A1a*, навпаки, проявила мінімальну реакцію – пригнічення росту становило 11 % до контролю. Екзометаболіти *F. moniliforme* в поживному середовищі стимулювали ростову реакцію калусів у ізолінії *PPD B1a* і сорту та неістотно пригнічували ріст калусів ізоліній *PPD D1a* та *PPD A1a*. Екзометаболіти за своїм складом представляють суміш різноманітних сполук – вітоксини, ферменти, імуномодулятори, органічні кислоти, пептиди та ін., а також рістстимулюючі речовини фітогормональної природи [9]. Відомо, що мікроміцети *F. moniliforme* здатні продукувати у культуральне середовище різноманітні ІОК-побідні рістстимулюючі речовини. Саме завдяки цим компонентам екзометаболітів, можливо, відбувається стимулювання ростової реакції калусної куль-

тури у деяких досліджуваних ізоліній. Загалом треба зазначити, що ізолінія *PPD A1a* проявила мінімальну чутливість, тобто максимальну стійкість до дії екзометаболітів обох мікроміцетів – *F. oxysporum* та *F. moniliforme*. В наших попередніх дослідженнях також було показано, що ізолінія з генотипом *PPD A1a* проявила максимальну стійкість до дії абіотичних факторів – посухи [12] та високотемпературного стресу [13] за умов *in vivo*.

Дія екзометаболітів фітопатогенів р. *Fusarium* за культивування протягом 4-х тижнів проявлялася у змінах морфологічної структури калусів (табл. 1). За результатами дослідження показано, що у контрольних варіантах формувалися типові калусні маси – невеликі, пухкі, прозорі з елементами диференціювання – ризогенезу. Калуси ізоліній розрізнялися тільки забарвленням: білий, жовтуватий та жовтий. Найбільші зміни калусів за морфологічними ознаками спостерігалось за впливу екзометаболітів *F. oxysporum*. У всіх ізоліній відбувалися такі зміни: калуси зменшувалися у розмірах, підсихали, ставали щільними, непрозорими, змінювали колір на коричневий, іноді спостерігалися некрози. За впливу КФ *F. moniliforme* калуси ізоліній змінювали колір на жовтуватий та жовтий, ставали менш структурованими, але залишалися прозорими. Ізолінія *PPD A1a*, за результатами наших досліджень, зазнала найменших змін за морфологічною структурою калусу під впливом КФ *F. oxysporum* та *F. moniliforme*, відбувалися тільки зміни кольору калусних тканин.

Внесення культурального фільтрату мікроміцетів р. *Fusarium* у середовище культивування калусів ізоліній пшениці впливає на їх цитологічні характеристики. Ріст калусної тканини забезпечується одночасним протіканням двох процесів – інтенсивною проліферацією калусних клітин та їх ростом – «розтягненням». Зростання клітин «розтягуванням» у рослинах здійснюється сімпластним шляхом, супроводжується посиленням синтетичних процесів і накопиченням у клітині осмолітиків, що призводить до різкого зростання об'єму клітини. Як здійснюється регуляція переходу від проліферації до швидкого розтягування, які механізми викликають цей стрибок – поки незрозуміло [14]. Відомо, що в калусній тканині ці процеси протікають одночасно та не розподілені у просторі. Оскільки ростова реакція калусів може забезпечуватися як проліферацією, так і вакуо-

лізацією клітин, ми визначали щільність калусів – кількість клітин в 1 г сирової маси калусів та максимальну довжину калусних клітин (табл. 2).

Результати наших дослідів показали, що ізоляції, які розрізняються за темпами розвитку за умов *in vivo*, по-різному реагують на дію екзометаболітів фітопатогенів. У швидкозростаючих в умовах *in vivo* ізоляції *PPD D1a* і *PPD A1a* в калусній культурі під дією КФ фітопатогенів показник кількість клітин в 1 г калусу знижується, але зростає довжина калусних клітин. В ізоляції *PPD B1a*, яка розвивається повільно, та сорту Миронівська 808 – навпаки – за дії екзометаболітів зростає число клітин в 1 г калусної маси, але зменшуються їх розміри. Таким чином, у калусах ізоляції *PPD D1a* і *PPD A1a* за впливу екзометаболітів гальмуються процеси

проліферації клітин, а в ізоляції *PPD B1a* та сорту Миронівська 808 – інгибується ріст «розтягненням», що все одно призводить до гальмування ростової реакції калусів. За результатами дослідження цитологічних характеристик калусів, серед ізоляції максимальну стійкість проявляє ізоляція *PPD A1a*. В наших попередніх дослідженнях також було показано опосередковану предетермінацію генами контролю потреби в яровизації пшениці *VRN* формування різного ступеня стійкості до екзометаболітів р. *Fusarium* в ізогених лініях [15]. Необхідно зазначити, що екзометаболіти *F. oxysporum* є більш фітотоксичними, що проявляється в зміні всіх досліджуваних морфологічних показників калусних культур у порівнянні з дією екзометаболітів *F. moniliforme*.

Таблиця 1. Вплив КФ мікроміцетів р. *Fusarium* на ростовий індекс (PI) та морфологічну характеристику калусів ізогених за генами *PPD* ліній пшениці сорту Миронівська 808

Варіант	<i>PPD D1a</i>	<i>PPD B1a</i>	<i>PPD A1a</i>	<i>Сорт М 808</i>
Ростовий індекс (PI)				
Контроль	1,24 ± 0,06	1,02 ± 0,04	1,10 ± 0,05	1,01 ± 0,05
<i>F. oxysporum</i>	0,85 ± 0,04*	0,76 ± 0,03*	0,98 ± 0,04*	0,89 ± 0,03*
<i>F. moniliforme</i>	1,18 ± 0,05	1,27 ± 0,05*	1,06 ± 0,04	1,16 ± 0,06*
Структура калусів				
Контроль	жовтуватий, оводнений, прозорий	білий, оводнений, прозорий	білий, оводнений, прозорий	жовтий прозорий, оводнений,
<i>F. oxysporum</i>	коричневий, щільний, підсохлий	світло-коричневий, оводнений	коричневий, оводнений, прозорий	коричневий, підсохлий, щільний
<i>F. moniliforme</i>	жовтий, підсохлий щільний	жовтуватий, оводнений, прозорий	жовтуватий, оводнений, прозорий	жовтий, підсохлий, щільний

Примітка. * Відмінності між варіантами та контролем істотні при $P \leq 0,05$.

Таблиця 2. Вплив КФ мікроміцетів р. *Fusarium* на цитологічні зміни в калусах ізогених ліній пшениці сорту Миронівська 808

Варіант	<i>PPD D1a</i>	<i>PPD B1a</i>	<i>PPD A1a</i>	<i>сорт М 808</i>
Кількість клітин $N \times 10^6$ /г сирової маси				
Контроль	11,5 ± 0,4	6,9 ± 0,2	7,0 ± 0,3	6,6 ± 0,3
<i>F. oxysporum</i>	8,9 ± 0,3*	8,7 ± 0,3*	6,2 ± 0,3*	8,2 ± 0,4*
<i>F. moniliforme</i>	8,1 ± 0,3*	13,7 ± 0,5*	6,9 ± 0,4	9,1 ± 0,5*
Довжина калусних клітин, мкм				
Контроль	7,0 ± 0,3	12,3 ± 0,6	7,1 ± 0,4	10,3 ± 0,6
<i>F. oxysporum</i>	11,2 ± 0,6*	8,3 ± 0,4*	7,7 ± 0,4	7,4 ± 0,3*
<i>F. moniliforme</i>	10,5 ± 0,5*	11,5 ± 0,5*	9,4 ± 0,5*	8,5 ± 0,5*

Примітка. * Відмінності між варіантами та контролем істотні при $P \leq 0,05$.

Серед досліджуваних ізогенних ліній пшениці максимальну стійкість до фітопатогенів р. *Fusarium* за всіма показниками проявляє ізолінія *PPD A1a*, яка характеризується швидкими темпами розвитку в умовах *in vivo*, а мінімальну стійкість – ізолінія *PPD B1a*, що розвивається повільними темпами. Отримані результати дозволяють припустити, що гени *PPD*, які детермінують темпи розвитку *in vivo*, опосередковано беруть участь у формуванні стійкості до екзометаболітів фітопатогенів р. *Fusarium* в умовах культури *in vitro*.

Висновки

Культуральний фільтрат *F. oxysporum* інгібує ріст калусів усіх ліній, але найменшою мірою ізолінії *PPD A1a*, в той час як культуральний фільтрат *F. moniliforme* активує або не змінює ріст калусів залежно від генотипу ліній за генами *PPD*. Отже, досліджувані штами відрізняються за токсичністю на рівні калусних культур досліджуваних ізогенних ліній пшениці. Культуральний фільтрат *F. oxysporum* та *F. moniliforme* викликає цитологічні зміни у калусах, рівень яких залежить від генотипу ізоліній за генами *PPD*. Отже, стійкість досліджу-

ваних ізогенних ліній залежить від їх генотипу. Найбільш стійкою до фітопатогенів виявилася ізолінія *PPD A1a*, бо її калусна культура найменшою мірою реагувала на вплив культуральних фільтратів досліджуваних штамів мікроміцетів. Вірогідно, що гени *PPD* опосередковано задіяні у формуванні стійкості пшениці до екзометаболітів фітопатогенів р. *Fusarium* в умовах культури *in vitro*. Можливо, є доцільним використання генотипів, які несуть домінуючий ген *PPD A1a* у якості вихідного матеріалу в селекції пшениці озимої на стійкість до фузаріозу.

Автори вдячні д. б. н. В. І. Файту завідувачу відділу генетики Селекційно-генетичного інституту Національного центру насіннєзнавства та сортовицтва НААН України за надані для дослідження ізогенні за генами *PPD* лінії пшениці м'якої сорту Миронівська 808.

Робота виконана в рамках держбюджетної теми «Дослідження фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних механізмів генетичного контролю розвитку і продукційного процесу сільськогосподарських культур» (номер держреєстрації № 0112U000101) за пріоритетним тематичним напрямком «Фундаментальні проблеми наук про життя та розвиток біотехнологій» згідно з постановою КМУ № 942 від 7.09.2011.

Література

1. Бавол А.В., Дубровная О.В., Лялько И.И. Селекция *in vitro* мягкой пшеницы на устойчивость к *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 4. – С. 314–321.
2. Грицюк Н.В. Устойчивость сортов озимой пшеницы к фузариозным инфекциям при разных сроках поражения // Карантин и защита растений. – 2013. – № 10. – С. 1–3.
3. Cockram J., Jones H., Leigh F., O'Sullivan D., Powell W., Laurie D., Greenland A. Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication and sustainable productivity // J. Exp. Botany. – 2007. – 58, № 6. – р. 1231–1244. doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/erm042>.
4. Beales J., Turner A., Griffiths S., Snape J.W., Laurie D.A. A Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. – 2007. – V. 115. – P. 721–733. doi: [10.1007/s00122-007-0603-4](https://doi.org/10.1007/s00122-007-0603-4).
5. Kitagawa S., Shimada S., Murai K. Effect of Ppd-1 on the expression of flowering-time genes in vegetative and reproductive growth stages of wheat // Genes Genet. Syst. – 2012. – V. 87. – P. 161–168. doi: [10.1266/ggs.87.161](https://doi.org/10.1266/ggs.87.161).
6. Khotyljova L., Kaminskaya L., Koren L. Influence of genetic systems of *Vrn*- and *Ppd* genes on the ecological adaptation of wheat and triticale // Biologija. – 2002. – № 4. – P. 45–48.
7. Файт В.И., Федорова В.Р. Влияние различий генов *Ppd* на агрономические признаки пшеницы // Цитология и генетика. – 2007. – № 6. – С. 26–33.
8. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 487 с.
9. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. – К.: Наукова думка, 1982. – 560 с.
10. Барыкина р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. – М.: Изд-во МГУ, 2004. – 312 с.
11. Атраментова Л.А., Утевская О.М. Статистические методы в биологии. – Горловка, 2008. – 247 с.
12. Avksentiieva O., Taran N. Drought resistance and productivity of wheat and soybean isogenic lines with different photoperiodic sensitivity // Eureka: Life sciences. – 2016. – V. 5 (5). – P. 8–17. doi: <http://dx.doi.org/10.21303/2504-5695.2016.00226>.
13. Avksentyeva O.A., Zhmurko V.V. Genes *Ppd* and *Vrn* as components of molecular genetic system of wheat regulation resistance (*Triticum aestivum* L.) to abiotic stress // Molecular Approaches in Plant Abiotic Stress / Editors R.K. Gaur and Pradeep Sharma. – CRC Press, 2014. – P. 1–20. doi: [10.1201/b15538-2](https://doi.org/10.1201/b15538-2).
14. Иванов В.Б. Клеточные механизмы роста растений. – М.: Наука, 2011. – 104 с.

15. Avksentyeva O.A., Terentyeva N.V. Influence of exometabolites phytopathogens g. *Fusarium* on morpho-physiological characteristics of callus cultures of isogenic by genes *VRN* wheat lines // Plant Protection News. – 2016. – 3 (89). – P. 16–17.

AKSENTIEVA O.A.^{1,2}, TERENCEVA N.V.¹

¹ V.N Karazin Kharkiv National University,

Ukraine, 61022, Kharkiv, Svoboda sq., 4, e-mail: avksentyeva@rkarazin.ua

² Taras Shevchenko National University of Kyiv,

Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64/13, e-mail: avksentyeva@karazin.ua

GENES CONTROL OF RATES DEVELOPMENT AS COMPONENTS OF REGULATION STABILITY OF *TRITICUM AESTIVUM* L. TO BIOTIC STRESS UNDER CONDITIONS *IN VITRO*

Aim. The aim of our work is to research the influence of exometabolites phytopathogens of genus *Fusarium* on callus culture isogenic lines for genes PPD (NILs) of winter soft wheat. **Methods.** In the work used standard biotechnological and mycological methods. The influence of exometabolites phytopathogens g. *Fusarium* investigated, adding CF microfungi to MS culture medium in a ratio of 1:20, using transplants callus culture of isogenic lines of wheat. Growth index analyzed density of callus tissue and size of callus cells determined. **Results.** Established that the CF of *Fusarium oxysporum* significantly slows grows reaction of callus cultures and morphological structure callus NILs is changes. It is shown that the impact exometabolites phytopathogens has the opposite effect on cytological parameters (number and length callus cells) in the isolines differing pace of development in conditions *in vivo*. The culture filtrate *F. oxysporum* has more toxicity compared to exometabolites *F. moniliforme*. **Conclusions.** It is supposed that the genetic system controlling the pace of development and photoperiodic sensitivity *Triticum aestivum* L. in conditions *in vivo* indirectly determines the formation of resistance to biotic stress conditions *in vitro*.

Keywords: *Triticum aestivum* L., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, PPD genes, NILs, callus culture, growth index, resistance to phytopathogens.