

ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАНТОВ РАПСА ЯРОВОГО
НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ТЛЯМ

Т.А. ПОПОВА, Н.Ф. ЕГОРОВА, В.В. МАЗИН*, М.А. ПРОЦЕНКО*

(Лаборатория защиты растений,
кафедра химических средств защиты растений)

Разработан регламент отбора регенерантов рапса ярового на селективных питательных средах, содержащих нистатин. Установлено, что исследуемые клоны рапса ярового отличались от контроля как в сторону снижения, так и в сторону повышения устойчивости к персиковой (*Myzodes persicae* Sulz.) и капустной (*Brevicoryne brassicae* L.) тлям, что дает возможность проводить отбор на устойчивость. Высказано предположение, что устойчивость контролируется изменением метаболизма на уровне клеток и недифференцированной ткани, что может быть связано с нарушением обмена стериннов. В целях ускорения процесса оценки полученного на селективных питательных средах с нистатином регенерантов рапса ярового разработана оригинальная методика оценки устойчивости биоматериала к тлям непосредственно *in vitro*. Приведены результаты оценки отобранных на селективных питательных средах клонов рапса к комплексу вредителей. Обнаружено, что биохимические изменения в растениях в результате трансформации приводят к изменению микробиоты питающихся на них тлей.

Рапс является одной из основных масличных культур. Мировое производство рапсового масла в последние годы (свыше 320 млн т) постоянно растет. В России производство рапса еще недостаточно, однако намечаются тенденции к увеличению объема валового производства семян рапса. Происходит увеличение посевных площадей данной культуры. В 2004 г. посевы рапса в России занимали 260,2 тыс. га, в т. ч. площади ярового рапса достигли 172,4 тыс. га [4]. Однако расширение площадей не всегда в полной мере ведет к увеличению количества и качества продукции. Существенное снижение урожая происходит в результате деятельности вредителей, болезней и сорняков. Число вредителей, встречающихся на рапсе, достаточно велико. Основными из них являются крестоцветные блошки, рапсовый листоед,

рапсовый пилильщик, капустная и персиковая тли, рапсовый цветоед, белянки и многие другие. Защита с.-х. культур от вредных организмов имеет большое экономическое значение. При этом в условиях возрастающей вредоносности многих фитофагов необходимо решение проблем фитосанитарного оздоровления агроценозов. Немаловажная роль в данном процессе отводится устойчивым сортам и гибридам. Фитосанитарное и управляющее значение устойчивых к вредным организмам генотипов растений определяется их двоякой ролью в агробиоценозах — средообразующего фактора для всех населяющих конкретный агробиоценоз гетеротрофных и автотрофных видов и источника пищи для гетеротрофов всех уровней [1]. При этом возделывание сортов интенсивного типа, устойчивых к основным вредителям и

* Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии.

болезням, позволяет существенно снизить численность вредителей, потери урожая, пестицидный пресс на окружающую среду и увеличить выход стандартной продукции. Анализ экологических, эволюционных и физиологических взаимодействий вредных членистоногих с видами и сортами кормовых растений в агробиоценозах показал, что питание на устойчивых генотипах с.-х. растений вызывает различные формы дезинтеграции жизненных функций у членистоногих, приводящих к снижению жизнеспособности, подавлению численности и ухудшению демографической структуры популяции вредителей [2].

Использование методов биотехнологии и генной инженерии открывает новые перспективы в селекции растений на устойчивость к вредителям и болезням. Возрастает число исследований, направленных на создание трансгенных растений, обладающих устойчивостью к вредителям на основе ингибиторов гидролитических ферментов (конституциональный барьер растений). Такие исследования ведутся и на рапсе по разным направлениям. В.В. Никоноренковым дан обзор исходного материала рапса для селекции на устойчивость к болезням [5]. Интерес представляет изучение устойчивости к вредителям растений рапса, содержащих конструкции с геном *Vt* из *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* [9]. Еще одним перспективным направлением селекционной стратегии является создание растений рапса с измененным метаболизмом стероидных соединений, в результате чего возможно нарушение цепочки превращения насекомых и, как следствие этого, снижение численности популяции [10]. Это направление базируется на неспособности насекомых самим синтезировать стероиды, необходимые для преобразования их в гормон линьки экдизон. В результате отбора растений с измененным стероидным профилем возможно получение устойчивых к насекомым сортов, ко-

торые будут в значительной степени ограничивать размножение вредителей. Важным аспектом в селекционной работе является энтомологическая оценка устойчивости полученных образцов к вредителям.

Учитывая особенности получаемых регенерантов рапса, а именно наличие в них фитостероидов, препятствующих образованию гормона линьки экдизона, мы исключили из списка предполагаемых тест-объектов такие виды, как крестоцветные блошки, поскольку основной вред у данного вида причиняют имаго. Ранее проведенные нами исследования [7] показали, что полученные клоны рапса ярового, отобранные на среде с нистатином, отличались от контроля по устойчивости к капустной белянке, капустной и персиковой тлям как в сторону снижения выживаемости, так и в сторону повышения [7]. Поэтому очень важно, чтобы тестирования клонов проводилось в максимально сжатые сроки, что позволило бы уже на начальных этапах работы отсекал неперспективные клоны. В связи с этим, проводя оценку различных тест-объектов, мы остановились на тлях и начали разрабатывать новый метод оценки устойчивости клонов непосредственно *in vitro*. Для сравнения часть растений адаптировали к почвенной культуре и тестировали на устойчивость к тлям.

В данной статье приведены результаты исследований по получению *in vitro* на селективных питательных средах, содержащих нистатин, селекционного материала рапса ярового и оценке его на устойчивость к персиковой и капустной тлям.

Методика

Исследования проводили с 2000 г. Исходным материалом служили 5-дневные проростки семян ярового рапса сорта Ратник. Семена замачивали в воде на 3 ч и стерилизовали в 0,1%-м растворе сулемы в течение 12 мин. После этого их высевали в чашки Петри

на агаризированную питательную среду В₅ по Гамборгу, содержащую сахарозу (1%) и кинетин (0,5 мг/л). У проростков отсекали семядольные листочки и использовали их как первичные экспланты для получения регенерантов на среде с нистатином. Регенерацию побегов *de novo* получали из первичных эксплантов на модифицированной среде В₅, содержащей NaH₂PO₄ — 300 мг/л, глутамин — 100 мг/л, БАП — 3 мг/л, НУК — 1 мг/л, сахарозу — 3%, агар-агар — 0,7% [3]. Для проведения селекции в питательную среду названного выше состава вводили нистатин разной концентрации. Маточный раствор нистатина готовили, растворяя в 50 мл 2%-го водного раствора ДМСО или 50 мл 96° эталона 2500 тыс. ед. антибиотика. Для приготовления растворов с разной концентрацией нистатина в теплую агаризированную питательную среду для регенерации вводили соответствующее количество нистатина.

Отобранные клоны вместе с исходной формой сорта Ратник поддерживали в пробирочной культуре на питательной среде с 1/2 компонентов по Мурасиге и Скугу, содержавшей сахарозу (1%) и агар-агар (0,7%), рН 5,6-5,9.

Для оценки регенерантов рапса на устойчивость (восприимчивость) к вредным насекомым клоны рапса из пробирок высаживали в стаканчики с торфяным субстратом для адаптации. В качестве одного из тест-объектов использовали персиковую тлю (*Myzodes persicae Sulz.*). В ряде опытов наряду с персиковой тлей использовали также и капустную тлю (*Brevicoryne brassicae L.*).

Колонии персиковой и капустной тлей воспитывались на растениях цветной капусты. Первоначально тестирование проводили на адаптированных к почвенной культуре растениях рапса и отделенных листьях рапса. Изучали динамику численности популяции персиковой тли в теплице и на опытном участке лаборатории защиты растений. В дальнейшем для ускорения процесса оценки нами было предложено про-

водить тестирование растений непосредственно в пробирках с регенерантами рапса. Для этого брали по 1 или 3 самки определенного вида тли и подсаживали в пробирки с изучаемыми клонами. Проводили наблюдения за развитием растений и насекомых. Фиксировали продолжительность развития насекомых, выживаемость на разных стадиях онтогенеза, смертность в период линьки. Для сравнения результатов часть изучаемых регенерантов рапса была адаптирована к почвенной среде и также протестирована на устойчивость к тлям. Для этого укорененные растения рапса были помещены между растениями цветной капусты гибрида Фарго, сильно заселенных персиковой тлей. Через 1 сут растения цветной капусты были удалены, а на растениях рапса учитывали динамику численности вредителя. Повторность опытов 5-12-кратная, статистическая обработка данных осуществлялась методом дисперсионного анализа с помощью программ EXCEL и STRAZ.

Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что при получении регенерантов рапса из первичных эксплантов (первичный или пассируемый каллус, семядольные листочки, фрагменты листьев и стеблей) лучшие результаты были получены на семядольных листьях проростков рапса. В результате опытов установлено, что процент образовавшихся регенерантов уменьшается с увеличением концентрации нистатина. При концентрации антибиотика 200 и 350 тыс. ед. выход регенерантов имел близкие значения (41,5 и 37,0% соответственно). Исходя из этого, эти концентрации были использованы в составе питательных сред как селективные. После отбора на питательной среде, содержащей селективный фактор, регенеранты переносили на среду без антибиотика для укоренения. Далее проводили микрочеренкование, создавая клоновую популяцию генотипов с

предположительно измененным метаболизмом стеринов. Эти растения вновь помещали на питательную среду, содержащую 200 тыс. ед. нистатина для повторного отбора устойчивых растений. В дальнейшем полученные клоны проверяли на каллусогенез: определяли влияние антибиотика на образование каллусных культур при концентрации нистатина 200 и 500 тыс. ед. В ходе опытов установлено, что у контрольных растений, не прошедших отбор на среде с нистатином, под влиянием возрастающих концентраций нистатина наблюдалось значительное снижение каллусогенеза с 97 до 38% (при 200 тыс. ед./л) и даже до 5% при более высокой (500 тыс.ед/л) концентрации нистатина. Каллусогенез клонов был значительно выше, чем у исходного генотипа. Характерно, что при 200 тыс. ед/л каллусогенез изменялся от 61 (клон 42) до 75% (клон 47). В контроле этот показатель составлял 38%. При 500 тыс.ед/л каллусогенез клонов изменялся от 25 до 60%, что в 5-12 раз превышало контроль (5%). Опыты показали, что устойчивость к нистатину у значительного числа генотипов каждого клона сохраняется на уровне недифференцированных клеток и тканей, что может быть связано с изменением етеринового профиля растений. При отборе регенерантов, полученных на селективных питательных средах, отбраковывали ослабленные, полностью

или частично альбиносные растения. Остальные проходили тестирование на устойчивость к тлям.

Выбор в качестве тест-объектов тлей (персиковой и капустной) неслучаен. Эти насекомые имеют ряд преимуществ перед другими, например, капустной совкой. Прежде всего это быстрый цикл развития, многочисленность, а также несомненно чуткое реагирование на малейшее изменение биохимического состояния растений, что было отмечено в 1938 г. Эвансом для капустной тли *Brevicoryne brassicae* L. [11]. Тли характеризуются разносторонними связями с питающим растением [6]. Таким образом, тли, вернее, характер их развития на кормовых растениях — это своего рода индикатор пригодности кормового субстрата, своеобразная «лакмусовая бумажка».

При оценке устойчивости (восприимчивости) адаптированных к почвенной культуре опытных растений рапса было установлено, что в условиях теплицы скорость заселения и динамика численности персиковой тли на различных растениях-регенерантах, прошедших отбор на селективной среде с нистатином, в ряде случаев существенно отличаются от контроля [8]. Как видно из табл. 1, заселенность рапса, прошедшего отбор на селективных питательных средах, через неделю с начала наблюдений существенно не от-

Таблица 1

Численность персиковой тли на растениях рапса в теплице

Вариант	Время учета, сут					
	7		14		26	
	особей на 1 растение	% от контроля	особей на 1 растение	% от контроля	особей на 1 растение	% от контроля
Контроль	273,0	100	456,3	100	202,6	100
23	0,0*	0	114,3*	25,0	100,7*	49,7
25	104,0	38,1	189,3*	41,5	85,7*	42,3
29	302,3	110,7	546,0	119,7	152,3	75,1
48	131,7	48,2	212,7*	46,6	126,0*	62,2
НСР ₀₅	182,9		162,98		75,91	

* Достоверность различий при НСР₀₅.

личалась от контроля за исключением варианта 23, растения которого были свободны от насекомых на данную дату учета.

В варианте 29 отмечена тенденция к увеличению численности вредителя по отношению к контролю. Таким образом, можно констатировать, что отобранные на селективных питательных средах регенеранты отличаются от контроля как в сторону небольшого снижения, так и достоверного повышения устойчивости к персиковой тле, что дает основание для проведения отбора генотипов, отличающихся повышенной устойчивостью к вредным насекомым.

При посадке адаптированных к почвенной культуре регенерантов рапса в открытый грунт (опытный участок лаборатории защиты растений) происходило также заселение этих растений тлями. В данном случае в качестве контроля использовали капусту брокколи и яровой рапс сорта Ратник, не проходивший отбора на селективных питательных средах с нистатином. В первый период вегетации численность тли по данным на 14 июня была незначительной и составляла на капусте брокколи $0,4 \pm 0,31$ особей на 1 растение, на рапсе-контроле — $0,33 \pm 0,211$ на 1 растение, в варианте 31 — 1,5 особи на 1 растение, в варианте 23 тлей вообще не зафиксировано. Пик численности персиковой тли был отмечен 12-30 июля. Максимальное ее количество (колонии, состоящие из более чем 1000 особей) зафиксировано 30 июля на капусте брокколи и рапсе-контроле, в то время как на изучаемых регенерантах рапса (варианты 23, 31, 37) тли практически не было.

Отбор растений на селективных питательных средах — длительный и трудоемкий процесс. Поэтому дальнейшая адаптация полученных клонов к почве, а затем тестирование на целых растениях и тем более в открытом грунте еще больше увеличивает сроки создания устойчивых образцов. Оценка на отделенных листьях рапса не-

много ускоряет процесс, но не существенно. Для нее все равно требуется большое количество биомассы рапса и, следовательно, время, место и трудовые затраты для наработки. Исходя из выше сказанного, мы решили проводить предварительное тестирование непосредственно в пробирках, чтобы уже на первом этапе работы отсекал клоны, отличающиеся в сторону повышения выживаемости вредителя. Нами было установлено, что и персиковая, и капустная тли хорошо развивались на пробирочных растениях. Сами же растения выдерживали такое тестирование на протяжении 14 дней, редко более. Затем могло наблюдаться загрязнение среды. Этого срока вполне достаточно, чтобы сделать предварительную оценку.

Результаты оценки устойчивости клонов рапса ярового к персиковой и капустной тлям *in vitro* представлены в табл. 2, 3.

При анализе динамики численности персиковой тли на изучаемых клонах рапса была отмечена тенденция к увеличению численности насекомых в большинстве вариантов. Достоверное превышение численности персиковой тли зафиксировано в варианте 31. Также высокую степень пригодности показал регенерант 48, что совпадает с данными оценки этого клона в условиях теплицы на адаптированных к почве растениях (табл. 1, 4).

Изменение метаболизма стеринов растений, связанного с действием нистатина, на насекомых сказывается не сразу, а при достижении ими последующих возрастов. Таким образом, различия, если они есть, обычно проявляются через 7-10 дней. В этот период отмечается гибель особей при линьке.

Данные табл. 3 свидетельствуют, что, как и у персиковой тли, большинство изучаемых клонов характеризовались более высокой, чем в контроле, скоростью нарастания численности капустной тли. В вариантах 39 и

Динамика численности персиковой тли на рапсе *in vitro*

Вариант	Время учета, сут							
	4		7		10		12	
	особей на 1 растение	% от контроля	особей на 1 растение	% от контроля	особей на 1 растение	% от контроля	особей на 1 растение	% от контроля
Контроль	14,7	—	12	—	26,2	—	28,5	—
31	22,0	149,7	23,0*	191,7	29,7	113,4	38,7*	135,8
32	7,7	52,4	9,7	80,8	17,5	66,8	26,8	94,0
39	18,0	122,4	13,8	115,0	23,3	88,9	30,5	107,0
41	20,0	136,1	17	141,7	35,5	135,5	27,7	97,2
42	15,3	104,1	13,5	112,5	34,0	129,8	34,5	121,1
48	13,5	91,8	12	100	30,3	115,6	25,2	89,5
НСР ₀₅	10,1		6,18		11,27		9,01	

Таблица 3

Динамика численности капустной тли на различных клонах рапса *in vitro*

Вариант	Время учета, сут													
	3		4		5		6		7		10		11	
	особей на 1 растение	% от контроля	особей на 1 растение	% от контроля	особей на 1 растение	% от контроля	особей на 1 растение	% от контроля	особей на 1 растение	% от контроля	особей на 1 растение	% от контроля	особей на 1 растение	% от контроля
Контроль	5,2	100	8,1	100	9,9	100	9,5	100	9,5	100	9,5	100	7,5	100
31	3,7	71,2	5,8	71,6	8,4	84,8	11,1	116,8	12,5	131,6	12,5	131,6	10	133,3
32	5,4	103,8	7,7	95,1	13,2	133,3	15,2	160	18,4	191,7	17,1	180	17,1	228
39	8,1	155,8	10,3	127,2	10,6	107,1	12,6	132,6	12	125	6,0	63,2	6,4	85,3
41	7,7	148,1	12,3	151,9	14,5	146,5	14	147,4	18,7	194,8	17,2	181	16	213,3
42	5,2	100	7,3	90,1	9,4	94,9	7,4	77,9	9,9	103,1	7,7	81	9,6	128
48	5,8	111,5	8,5	104,9	9,0	90,9	9,8	103,11	11,1	115,6	8,7	91,6	8,0	106,7

42 на 10-е сут учетов была зафиксирована смертность особей при линьке. При этом в контроле численность капустной тли на данную дату учета не изменилась. По отношению к контролю в процентном отношении снижение численности зафиксировано только у клона 39 и 42 (63,2% и 81,0% на 10-е сут учетов соответственно). Таким образом, вероятно, что именно у клона 39 произошло частичное изменение стеринового профиля. Для сравнения заметим, что персиковая тля в этом варианте в ряде испытаний также характеризовалась снижением численности по отношению к контролю (табл. 4).

Проводя энтомологическую оценку клонов рапса, прошедших отбор на нистатине, мы предположили, что из-

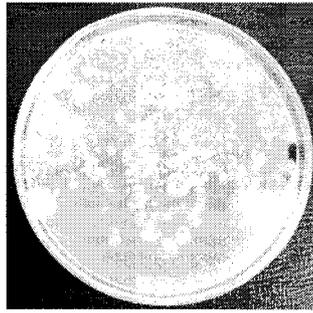
менение метаболизма стеринов растений может привести к изменению микробиоты насекомых. Для проверки этой гипотезы тлей помещали в чашки Петри на поверхность агаризованной картофельно-сахарозной среды. После некоторого периода движения тлей по поверхности среды (около 10 мин) чашки инкубировали в термостате (23°C) в течение 3 сут. Пребывание на поверхности среды капустных тлей с контрольных растений привело к появлению большого числа колоний бактерий и нескольких колоний грибов (рисунок). Присутствие капустных тлей со среднеустойчивого регенеранта 32 вызвало менее интенсивный рост бактерий и появление нескольких колоний грибов. Тли с неустойчивого регенеранта 48

Численность персиковой тли на регенерантах рапса, адаптированных к почвенной культуре (в % от контроля), особей на 1 растение

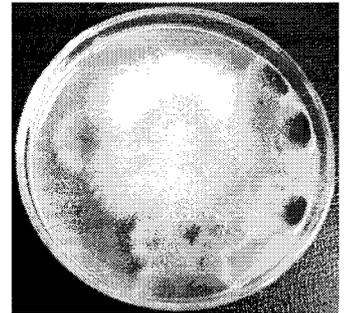
Вариант	Время учета, сут							
	1	2	5	7	9	12	15	16
Контроль	199,3	202,2	395,6	528,0	493,4	378,2	504,8	632,8
31	73,4	83,4	64,1	30,6	41,8	56,7	34,9	63,4
32	30,3	62,5	43,0	50,9	42,0	59,5	47,3	58,5
39	56,8	44,9	44,5	30,4	34,7	38,3	35,2	37,2
41	78,0	116,7	95,3	55,9	67,8	133,0	93,4	172,2
42	92,2	104,1	87,5	68,3	64,7	63,6	41,0	69,1
48	142,0	147,0	123,0	91,6	103,1	130,0	92,7	130,8



1



2



3

Колонии бактерий и грибов, выделенные с тлей после питания на различных регенерантах рапса: 1 — контроль; 2 — среднеустойчивый; 3 — высокоустойчивый

способствовали росту значительного числа колоний грибов и незначительного числа колоний бактерий (рисунок). Вероятно, биохимические изменения в растениях в результате трансформации приводят к изменению микрофиты питающихся на них тлей. Возможно, что изменения в трансформированных растениях отражаются также на поверхностной микрофите листа растения. При дальнейшем изучении выделенных бактерий было зафиксировано, что они ограничивали рост некоторых фитопатогенных грибов.

Выводы

1. Разработан регламент отбора регенерантов рапса ярового на селективных питательных средах, содержащих нистатин.

2. Выделены наиболее перспективные в плане устойчивости к тлям регенеранты рапса.

3. Установлено, что регенеранты, отобранные на селективных средах с нистатином, отличались от контроля по устойчивости к тлям как в сторону повышения, так и в сторону снижения, что дает возможность вести селекцию на устойчивость.

4. Разработан экспресс-метод оценки регенерантов рапса ярового *in vitro* на устойчивость к персиковой и капустной тлям, дающий возможность проводить отбор растений-регенерантов на этапе пробирочной культуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Вилкова Н.А.* Иммуитет растений и его биоценологическое значение в агро-экосистемах // В сб.: Защита растений в условиях реформирования агропромышленного комплекса: экономика, эффективность, экологичность. С.-П., 1995. С. 169-170. — 2. *Вилкова Н.А.* Иммуитет растений к вредным организмам и его биоценологическое значение в стаби-

- лизации агроэкосистем и повышении устойчивости растениеводства // Вестник защиты растений, 2000. № 2. С. 3—15. — 3. *Ивашута С.И., Мазин В.В.* Регенерация озимого рапса *in vitro* для проведения генетической трансформации // Физиология растений, 1994. Т. 41. № 3. С. 440~442. — 4. *Карпачев В.В.* Научное обеспечение отрасли рапсосошения: итоги и задачи на 2006 — 2010 годы // В сб.: Рапс — культура XXI века: аспекты использования на продовольственные, кормовые и энергетические цели. Липецк, 2005. С. 4—11. — 5. *Никоноренков В.А.* Исходный материал для селекции рапса на устойчивость к болезням (обзор) // Сельскохозяйственная биология, 2002. № 1. С. 27-31. — 6. *Попова А.А.* Типы приспособлений тлей к питанию на кормовых растениях. Л.: Наука, 1967. — 7. *Попова Т.А., Мазин В.В., Егорова Н.Ф.* Методы оценки селекционного материала рапса ярового, полученного *in vitro*, на устойчивость к вредным насекомым // В сб. Фитосанитарное оздоровление экосистем. СПб., 2005. С. 544-547. — 8. *Попова Т.А., Мазин В.В., Хадеева Н.В., Бургутин А.Б., Майсурян А.Н., Харченко П.Н., Яковлева Е.Ю., Егорова Н.Ф.* Использование методов биотехнологии для получения генотипов рапса с повышенной устойчивостью к вредным насекомым. // В сб.: Рапс — культура XXI века: аспекты использования на продовольственные, кормовые и энергетические цели. Липецк, 2005. С. 101-104. — 9. *Радугина Г.Н., Горелова С.В., Кожемякин А.В.* Стабильность и наследование трансгенов в растениях рапса // Физиология растений, 2000. Т. 47. № 3. С. 437-445. — 10. *Харченко П.П., Мазин В.В., Попова Т.А. и др.* Селекция *in vitro* рапса ярового на устойчивость к вредным насекомым // В сб.: Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. М., 2004. С. 140-143. — 11. *Ewans A.* // Ann. Appl. Biol., 1938. Vol. 25. P. 558-572.

SUMMARY

The order of spring rape regenerants selection has been worked out in selective nutritious media containing nystatin. It was established that analysed clones of spring rape differed from control both to lowering and rising resistance to *Myzodes persicae* Sulz.) and to *Brevicoryne brassicae* L. plant lice which makes it possible to hold selection of plant resistance. The opinion was that resistance is controlled by metabolism change at cells and undifferentiated tissue level which may be connected with abnormality of sterols' metabolism. To hasten evaluation process new original technique has been offered *in vitro*. Some results of the research were shown in the article.