

УДК 573.6:635.854.78:632.958.1

## ПОЛУЧЕНИЕ IN VITRO КЛЕТОЧНЫХ И ТКАНЕВЫХ КУЛЬТУР ПОДСОЛНЕЧНИКА, УСТОЙЧИВЫХ К БЕЛОЙ ГНИЛИ (*SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*) И РОЛЬ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В АДАПТАЦИИ КЛЕТОК К ДЕЙСТВИЮ СЕЛЕКТИВНОГО ФАКТОРА

Е.А. КАЛАШНИКОВА, НГУЕН ТХАНЬ ХАЙ, Н.Б. ПРОНИНА

(Кафедра с.-х. биотехнологии)

**Оптимизирована питательная среда для получения каллусных тканей и растений-регенерантов трех генотипа подсолнечника. Получены клеточные и тканевые культур подсолнечника, устойчивых к склеротиниозу, на основе культивирования каллусных клеток на питательной среде, содержащей культуральный фильтрат гриба *Sclerotinia sclerotiorum*. Показана роль фенольных соединений в адаптации клеток к действию селективного фактора.**

*Ключевые слова:* подсолнечник, стерильные проростки, белая гниль, культуральный фильтрат, каллусная ткань, фенольные соединения, полифенолоксидаза.

В связи с возрастанием роли подсолнечника как ценной продовольственной и кормовой культуры первостепенное значение приобретает разработка защитных мероприятий от комплекса болезней. Особую опасность для культуры подсолнечника представляют эпифитотии белой гнили (*Sclerotinia sclerotiorum*), а в последние годы фомопсиса (*Phomopsis helianthi*), являющиеся одними из основных причин значительного недобора урожая и снижения товарных и посевных качеств семян [3, 14]. Так, белая гниль ежегодно поражает подсолнечник на площади 1,5-2 млн га, снижая урожай на 4-5 ц/га. В годы эпифитотии урожай погибает почти полностью, а масло в собранных семенах не пригодно для пищевых целей. Данную проблему трудно решить, используя только тра-

диционные способы защиты растений и посевов: агротехнические, химические и биологические, так как ни один из них в отдельности не обладает достаточной эффективностью.

Одним из новых, перспективных путей повышения эффективности селекционного процесса является использование современных методов биотехнологии, позволяющих расширить спектр генетического разнообразия (соматическая гибридикация, индуцированный мутагенез, генетическая инженерия) и сократить сроки проведения селекции. Значительное место в решении этих задач занимает клеточная селекция, основанная на отборе клеточных популяций, устойчивых к селективному фактору, и регенерации из них целых растений [7].

Поиск генотипов подсолнечника, устойчивых к различным патогенам, в частности, к *Sclerotinia sclerotiorum*, возможен в культуре *in vitro* при культивировании эксплантов на питательных средах, содержащих продуцирующие токсины патогенов.

Целью работы было получение клеточных и тканевых культур подсолнечника, устойчивых к склеротиниозу, и изучение механизмов адаптации клеточных культур к стресс-фактору.

### Объекты и методы исследований

Объектом исследований служили семена подсолнечника трех генотипов (ВК 580, ВК 653, Кубанский 93), обладающие различной устойчивостью к склеротинии. В опыте придерживались разработанных на кафедре с.-х. биотехнологии РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева методик по стерилизации растительного материала и работе с культурой клеток растений *in vitro* [2].

В качестве стресс-фактора изучали действие культурального фильтрата (КФ) патогена *Sclerotinia sclerotiorum*. КФ получали путем выращивания изолятора гриба в колбах 300 мл в жидкой питательной среде объемом 200 мл на качалке со скоростью вращения 100 об/мин. В каждую колбу вносили по  $10^8$  шт. конидий гриба. Культуральный фильтрат получали путем фильтрации суспензии гриба через фильтровальную бумагу с последующим его автоклавированием.

Культивирование каллусной ткани проводили на питательных средах, содержащих КФ патогена в концентрациях 5%, 15, 25, 35% от конечного объема питательной среды. КФ добавляли в питательную среду перед автоклавированием.

Прирост каллусной ткани и фитотоксичность культурального фильтрата определяли по формулам, изложенным в [2]. Суммарное содержание растворимых фенольных соединений, активность полифенолоксидазы опре-

деляли в первичном экспланте, а также в каллусной ткани, культивируемой в стандартных и стрессовых условиях по методике Н.Б. Прониной [4].

Эксперименты проводили в трех биологических и 2-3 аналитических повторностях. Все результаты обработаны статистически [1,8]. На графиках и в таблице представлены средние арифметические значения определений и их стандартные отклонения.

### Результаты и их обсуждение

При оптимизации методов клеточной и тканевой селекции *in vitro* первоочередной задачей является разработка технологий, обеспечивающих повышение морфогенеза изолированных эксплантов. Известно, что процесс морфогенеза зависит от ряда факторов (генетических, физиологических, гормональных и физических), каждый из которых необходимо учитывать для определенной таксономической группы растений. Путем изменения условий культивирования, а также минерального и гормонального состава питательной среды можно регулировать морфогенетическую реакцию изолированных клеток, тканей и органов растений при их выращивании в условиях *in vitro*, что позволяет решать различные задачи клеточной биотехнологии [11,12,13].

В наших исследованиях было показано, что наилучшим эксплантом для получения хорошо пролиферирующей каллусной ткани, способной к морфогенезу, были гипокотильные сегменты, изолированные с 5-дневных проростков и культивируемые на питательной среде Мурашига и Скуга (МС), содержащей кинетин 2 мг/л и НУ К 1 мг/л. Причем данная ответная реакция имела генотипическую зависимость, как это неоднократно отмечалось в литературе [10,11,12,13]. Из всех изучаемых генотипов выделялся сорт Кубанский 93, для которого процесс морфогенеза происходил более интенсивно по сравнению с другими сортообразцами (таблица) и составил 10,2%.

**Зависимость морфогенетического потенциала первичных эксплантов от исследуемого генотипа**

Генотип	Морфогенез, %	Среднее число побегов на 1 эксплант, шт	Каллусогенез
Кубанский 93	10,20 ± 0,21	1,80 ± 0,75	+
ВК 580	7,84 ± 0,15	1,50 ± 0,5	+
ВК 653	6,38 ± 0,15	1,67 ± 0,47	+

При культивировании гипокотильных эксплантов или каллусной ткани на среде с кинетином и НУК получены растения-регенеранты, которые были перенесены в почвенную культуру (рис. 1). Таким образом, нами были оптимизированы условия культивирования каллусной ткани, способной к регенерации.

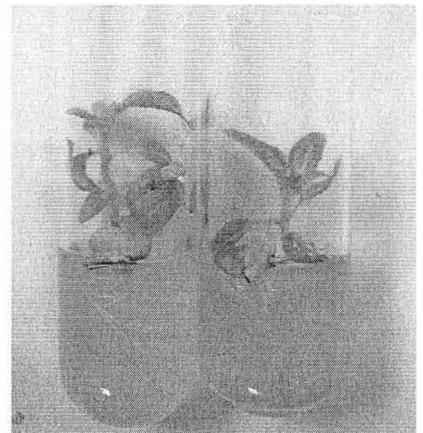
В исследованиях по клеточной селекции необходимо правильно подобрать стресс-фактор, который оказывает определенное действие на культивируемые клетки каллусной ткани. В качестве селективного фактора использовали КФ патогена *Sclerotinia sclerotiorum*. Для проведения клеточной селекции необходимо оценить фитотоксичность получаемого филтраты. Для этой цели в первую очередь определяют длительность культивирования КФ патогена в жидкой питатель-

ной среде и выявляют сроки его выращивания, при которых наблюдается максимальное накопление экзо-метаболитов гриба в культуральной среде. В результате исследований нами установлено, что при длине волны 320 нм КФ имеет максимальную оптическую плотность (рис. 2), равную 0,750 ед., поэтому данная длина волны была выбрана нами за основу и применялась в дальнейших экспериментах.

Во второй серии эксперимента определяли время выращивания патогена в жидкой питательной среде с целью получения культурального филтраты, обладающего максимальной фитотоксичностью. Измерения оптической плотности проводили каждые 5 дней. Полученные результаты, представленные на рисунке 3, показывают, что начало активного выделения экзо-метаболитов в питательную среду

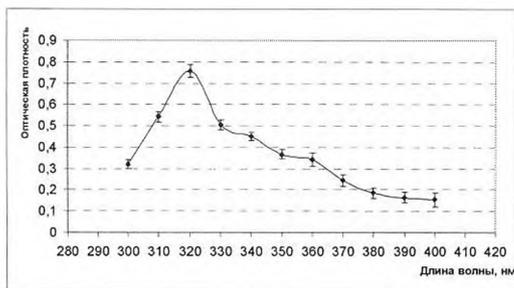


А

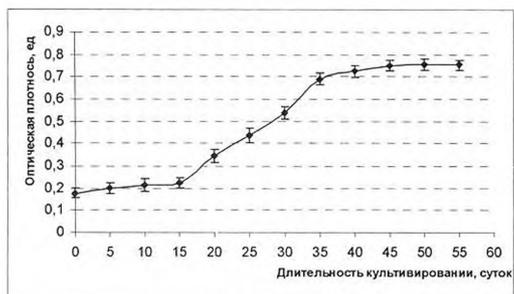


Б

**Рис.1.** Морфогенез каллусной ткани:  
А — образование адвентивных побегов, Б — растения-регенеранты



**Рис. 2.** Зависимость оптической плотности КФ от длины волны



**Рис. 3.** Зависимость оптической плотности КФ от длительности культивирования патогена в питательной среде (при  $\lambda = 320$  нм)

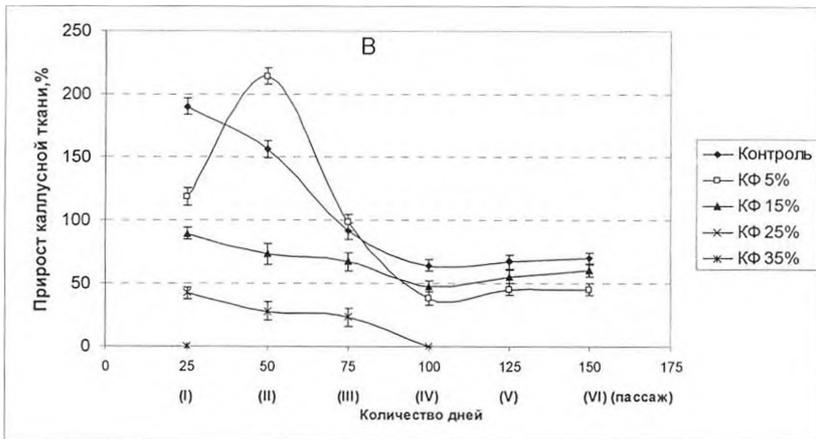
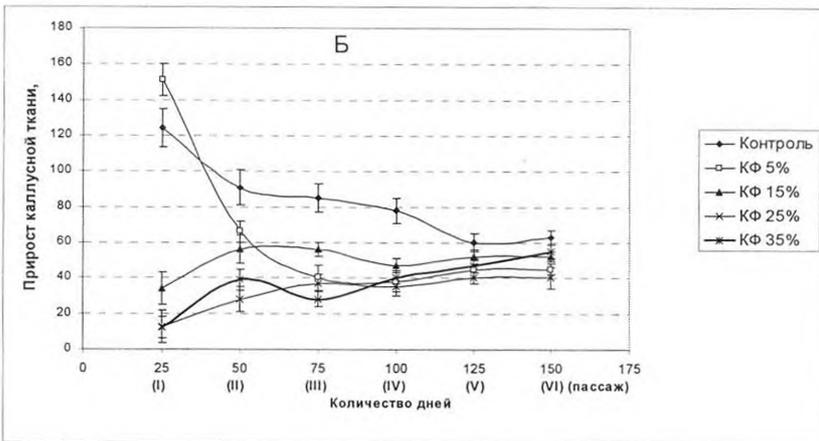
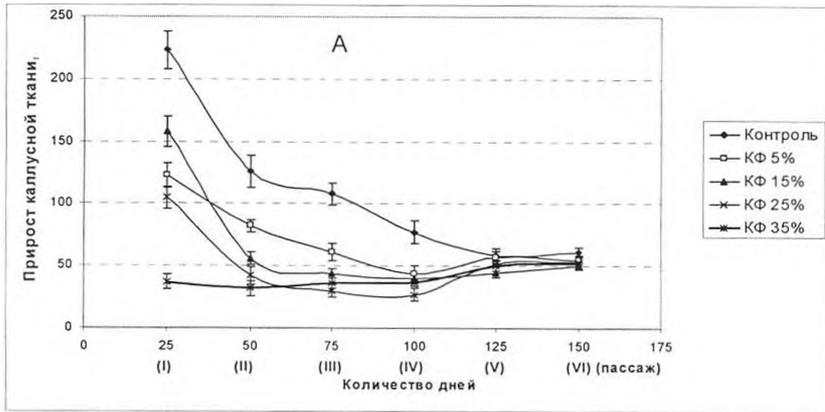
приходится на 20-е сут с начала культивирования патогена. В этом случае оптическая плотность жидкости составила 0,345 ед. При дальнейшем культивировании гриба наблюдалось значительное повышение оптической плотности культуральной жидкости, которое достигло максимума на 45-й день культивирования патогена в среде, и составила 0,750 ед. Однако начиная с 35-х сут повышение оптической плотности существенно не изменялось, что свидетельствует о нецелесообразности дальнейшего культивирования гриба в данных условиях.

Для доказательства фитотоксичности КФ его активность проверяли на различных эксплантах: семенах, гипокотильных сегментах, изолированных с 5-дневных проростков, а также на каллусной культуре. Исследования показали, что КФ гриба *Sclerotinia*

*sclerotiorum* в различных концентрациях оказывает в той или иной степени влияние на прорастание семян подсолнечника, способность гипокотильных сегментов формировать каллусную ткань и ее прирост. Установлено стимулирующее влияние культурального фильтрата патогена в концентрациях 25% для генотипов ВК 580 и Кубанский 93 на прорастание семян и дальнейшее формирование проростков, а также в концентрации 5% КФ для генотипа Кубанский 93 на формирование каллусной ткани из гипокотильных сегментов. При более высоких концентрациях проявляется ингибирующий эффект, который для отдельных генотипов выражается в полной гибели каллусной ткани. Поэтому клеточную селекцию подсолнечника целесообразно проводить в присутствии КФ патогена в концентрации 5~35% от конечного объема питательной среды.

Клеточную селекцию проводили на каллусной ткани, культивируемой на питательной среде с присутствием КФ патогена в концентрации 5%, 15, 25 и 35%. Исследования показали, что для всех изучаемых генотипов характерна общая закономерность в поведении каллусных тканей в стрессовых условиях. Так, с увеличением концентрации КФ в питательной среде уменьшается прирост каллусной ткани. Однако при длительном культивировании каллусной ткани в изучаемых стрессовых условиях прирост биомассы клеток существенно уменьшается к IV пассажу и начиная с V пассажа наблюдается стабилизация в приросте (рис. 4). Полученные данные свидетельствуют об адаптации каллусных культур к действию селективного фактора.

Важным моментом в исследованиях по клеточной селекции на устойчивость к биотическим факторам является изучение изменений в метаболизме фенольных соединений (ФС) в каллусных культурах, подвергшихся стрессовым воздействиям. В связи с тем, что фенольные вещества играют важ-



**Рис. 4.** Прирост каллусной ткани, культивируемой в присутствии КФ гриба *Sclerotinia sclerotiorum*: А — генотип Кубанский 93; Б — генотип ВК 580; В — генотип ВК 653

ную роль в защите клеток от стрессового фактора, нами были проведены исследования по изучению изменений количественного и качественного состава фенольных соединений в каллусной ткани различных генотипов подсолнечника, культивируемой в стандартных и стрессовых условиях.

Исследования показали, что у изучаемых генотипов суммарное содержание растворимых фенольных соединений в первичном экспланте различное. Причем среди всех исследуемых генотипов заметно выделялся сортообразец ВК 580 (15,86 мг/г сырой массы), в клетках которого синтезировалось полифенолов на 30% больше по сравнению с сортообразцами Кубанским 93 и ВК 653. При культивировании каллусной ткани в условиях *in vitro* количество суммарных растворимых ФС у всех генотипов подсолнечника снижается в 2-4 раза по сравнению с его количеством в первичном экспланте.

Ранее было показано, что биосинтез ФС в присутствии стрессового фактора изменяется [5, 6, 9]. Нами также было отмечено, что при культивировании каллусной ткани в стрессовых условиях (присутствие КФ патогена в различных концентрациях) наблюдалось изменение учитываемого показателя, которое проявлялось в увеличении биосинтетической активности каллусной ткани всех изучаемых генотипов (рис. 5). Вероятно, длительное культивирование каллусной ткани подсолнечника в стрессовых условиях способствует повышению программируемой защитной реакции, проявляющейся в увеличении синтеза соединений фенольной природы, что неоднократно отмечали другие авторы [5, 9].

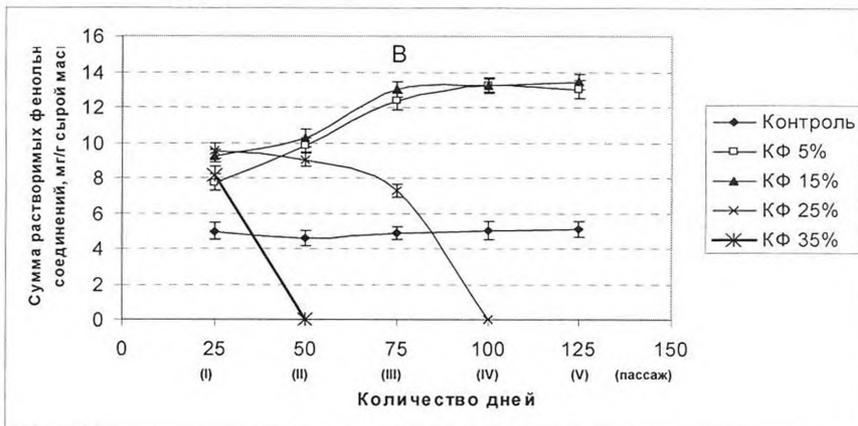
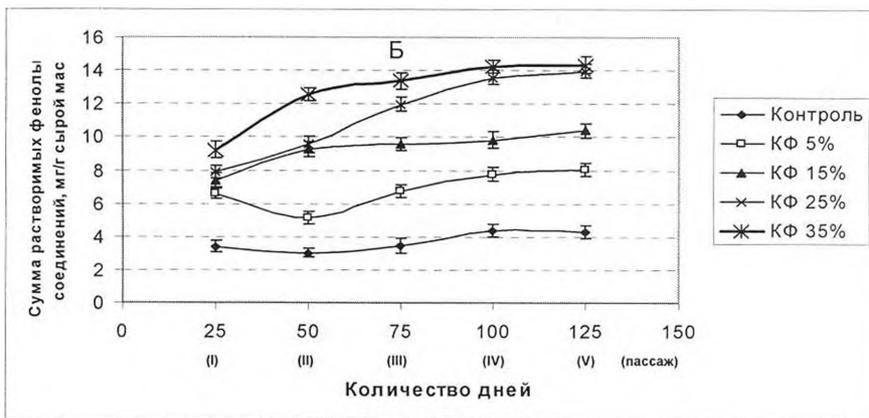
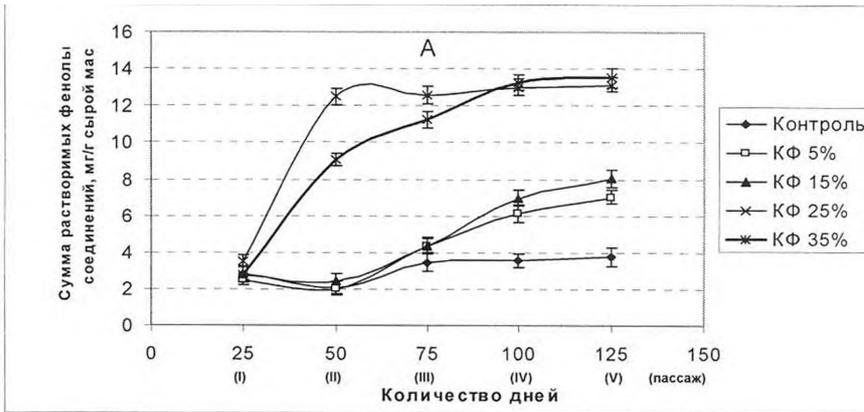
Для понимания процессов изменения биосинтеза растворимых фенольных соединений, происходящих в клетках первичных эксплантов, представлялось важным изучение качественного состава фенольного комплекса. Поэтому в следующей серии экспериментов нами были предприняты биохимические приемы, позволяющие

исследовать этот состав. В результате изучения этанольных экстрактов с использованием одномерной тонкослойной хроматографии нами было установлено, что в гипокотильных сегментах подсолнечника синтезируются как фенилпропаноиды, представленные фенолкарбоновыми кислотами, так и флавоноиды, в т.ч. и флавонолы (рис. 6, I). Причем в клетках гипокотильных сегментов сорта Кубанский 93 фенольный комплекс представлен 5 соединениями, ВК 580 — 6, а ВК 653 — 4 соединениями.

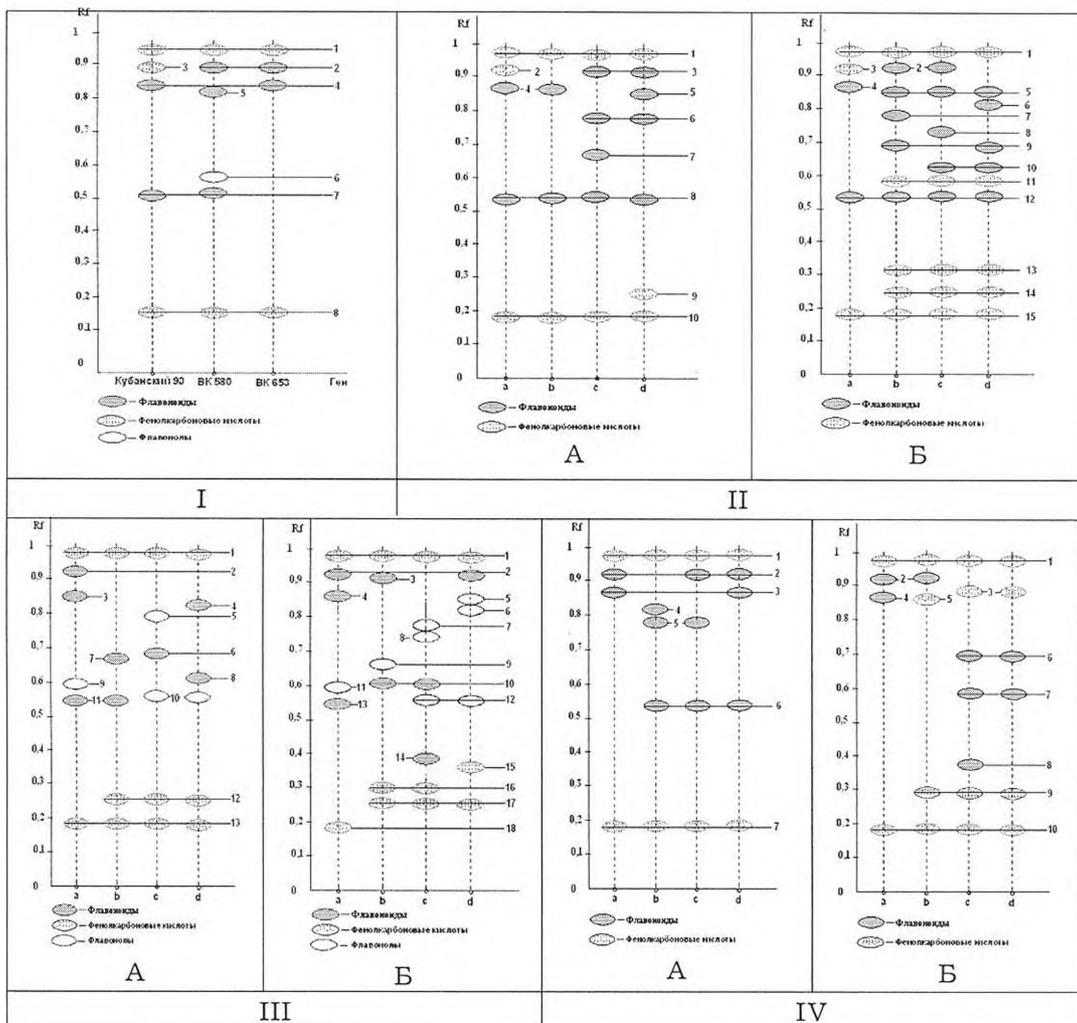
Для более детального изучения процессов изменения биосинтеза растворимых фенольных соединений, происходящих в клетках длительно культивируемых каллусных культур на селективных средах и в контрольном варианте, представлялось важным изучение качественного состава фенольного комплекса в процессе культивирования *in vitro*. Данные исследования проводили на каллусной ткани различных генотипов подсолнечника на I, III и V пассажах цикла клеточной селекции. В качестве селективного фактора был выбран вариант присутствия культурального фильтрата патогена в среде в концентрации 15%. Полученные результаты представлены на рисунке 6.

Как следует из приведенных на рисунках данных, состав фенольного комплекса изменяется в процессе культивирования каллусной ткани опытного и контрольного вариантов. Причем установленные нами изменения характерны для всех изучаемых генотипов.

При культивировании каллусной ткани в стрессовых условиях нами было показано значительное изменение в разнообразии фенольного комплекса. Во всех исследуемых генотипах наблюдалось обогащение спектра синтезируемых веществ фенольной природы за счет биосинтеза *de novo* соединений фенилпропаноидов и флавоноидов. Так, для генотипа Кубанский 93 отмечалось наличие 15 соединений (рис. 6, II), для ВК 580 — 18 соединений (рис. 6, III), а для ВК 653 —



**Рис. 5.** Содержание фенольных соединений в каллусных тканях при длительном культивировании: А — генотип Кубанский 93; Б — генотип ВК 580; В — генотип ВК 653



**Рис. 6.** Схема хроматограммы этанольных экстрактов фенольных соединений:

I — различные гипокотильные сегменты; II — различные ткани подсолнечника генотипа Кубанский 93; III — различные ткани подсолнечника генотипа BK 580; IV — различные ткани подсолнечника генотипа BK 653; А — контроль, Б — присутствие КФ патогена *Sclerotinia sclerotiorum* в питательной среде в концентрации 15% (а — гипокотиль, б — I пассаж, с — III пассаж, д — V пассаж)

10 соединений (рис. 6, IV) фенольной природы.

Из полученных результатов следует, что присутствие КФ патогена в среде приводит к изменению состава фенольных соединений в сторону его увеличения по сравнению с контрольным вариантом, что подтверждают и данные биохимических исследо-

ваний количественного и качественно-го содержания полифенолов.

### Выводы

1. Впервые для подсолнечника разработан метод получения клеточных и тканевых культур, обладающих устойчивостью к действию экзометаболита фитопатогенного гриба *Sclerotinia sclero-*

*tiorum*. Метод основывается на культивировании каллусных тканей на питательных средах, содержащих селективный фактор — культуральный фильтрат патогена (КФ). Впервые разработана технология получения высокотоксичного КФ гриба *Sclerotinia sclerotiorum* в условиях *in vitro*.

2. Выявлено положительное влияние фенольных соединений на адаптацию клеток к действию селективного фактора.

Они в большем количестве накапливаются в клетках, устойчивых к действию селективного фактора, что обусловлено изменением как количественного, так и качественного состава растворимых фенольных соединений.

3. Впервые оптимизированы условия культивирования изолированных эксплантов, обеспечивающие получение растений-регенерантов непосредственно из первичного экспланта или каллусной ткани.

### Библиографический список

- Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985.
- Калашикова Е.А., Кочнева Е.З., Миронова О.Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. М.: КолосС, 2006.
- Комплексная защита подсолнечника от болезней / В.И. Якуткин // Тез. докл. «Современные системы защиты растений от болезней и перспективы использования достижений биотехнологии и геной инженерии». Голицыно., 2003. С. 239-240.
- Лабораторный практикум по сельскохозяйственной биотехнологии: Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Пронина Н.Б. и др. М.: МСХА, 2004.
- Оленченко Н.А., Осипов В.И., Загоскина Н.В. Фенольный комплекс листьев озимой пшеницы и его изменение в процессе низкотемпературной адаптации растений // Физиология растений, 2006. Т. 53. № 4. С. 554-559.
- Раскальева В.А. Использование методов биотехнологии в получении исходных форм моркови, устойчивых к патогенному грибу *Alternaria radicina*: Автореф. канд. дис. М., 2001.
- Сельскохозяйственная биотехнология: Уч., 3-е изд., перераб. и доп / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.З. Кочнева и др. М.: Высшая школа, 2008.
- Смиряев А.В., Кильчевский А.В. Генетика популяций и количественных признаков. М.: КолосС, 2007.
- Сравнение действия биотического и абиологического стресса на каллусные культуры, инициированные из контрастных по устойчивости сортов льна-долгунца / Е.А. Гончарук, М.В. Молунова, Е.А. Калашникова // Материалы докладов, ч. 3. VI съезд общества физиологов растений России: Международная конференция «Современная физиология растений от молекул до экосистем». Сыктывкар., 2007. С. 157-159.
- Nestares G., Mayor M.L., Zorzoli R. et al. Combining ability of sunflower inbred lines for *in vitro* traits // Helia. -Novi Sad., 2001. Vol. 24. № 35. P. 17-23.
- Ozyigit I.I., Bajrovic K., Gozukirmizi N., Semiz B.D. Direct plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of five different sunflower genotypes (*Helianthus annuus L.*) from Turkey // Biotechnol.biotechnol.Equipm., 2002. Vol.16. № 1. P. 8-11.
- Berrios E.F., Gentzbittel L., Serieys H. et al. Influence of genotype and gelling agents on *in vitro* regeneration by organogenesis in sunflower // Plant Cell Tissue Organ Cult., 1999. Vol. 59. № 1. P. 65-69.
- Pajevic S., Vasic D., Sekulic P. Biochemical characteristics and nutrient content of the callus of sunflower inbred lines // Helia. -Novi Sad., 2004. Vol. 27; № 41. P. 143-149.
- Vasic D., Alibert G., Skoric D. In vitro screening of sunflower for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary // Helia. -Novi Sad., 1999. Vol.22. № 31. P. 95-103.

Рецензент — д. б. н. А.А. Соловьев

### SUMMARY

The nutrient medium to obtain calluslike tissues and regeneration shoot of three different sunflower genotypes has been optimized. Cellular and histic sunflower cultures, resistant to white rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) based upon calluslike cells cultivation in the nutrient medium containing cultural fungus filtrate *Sclerotinia sclerotiorum* have been obtained. The effect of phenol compounds on adaptation of cells to selective factor is focussed on.