

УДК 633.43:581.143.6

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ В КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ МОРКОВИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К АЛЬТЕРНАРИОЗУ

Е.А. КАЛАШНИКОВА, Н.НАМБУДРИ, В.А. РАСКАЛИЕВА

(Кафедра сельскохозяйственной биотехнологии)

Определено токсичное влияние 30-дневного культурального филтрат (КФ) *A.gadiscina* на прорастание семян моркови пяти линий. Оптимальная концентрация КФ, используемая при клеточной селекции моркови на устойчивость к альтернариозу, — 20—25%. Установлено, что выбранные линии обладают разной чувствительностью к КФ. Так, линия 906 — сильночувствительная, 6700 — слабочувствительная, 1268, 805, 225П — среднечувствительные. Отработана методика получения стерильного КФ гриба *A.gadiscina*. Разработана схема клеточной селекции моркови на каллусной и суспензионной культурах. Изучено влияние биологически активных веществ (дикамба, нитрата серебра, кокосовой воды, БАП и НУК) на соматический эмбриогенез суспензионной культуры. Установлено положительное влияние кокосовой воды и дикамбы на соматический эмбриогенез суспензионной культуры моркови.

С развитием биотехнологии растений потенциально возможным стало получение толерантных к болезням генотипов путем селекции на уровне соматических клеток, путем слияния протопластов или переноса генов при использовании техники рекомбинантных молекул ДНК [3—5]. На сегодняшний день для моркови наиболее хорошо разработана

методика получения соматических эмбрионидов и отбора соматических клеток в стрессовых условиях, вызываемых действием абитических факторов.

В настоящее время новым источником генетической изменчивости может по праву считаться соматическая вариабельность, или наследственная гетерогенность фенотипических признаков

регенерантов, возникающая в процессе культивирования тканей растений *in vitro*. Соматональная изменчивость уже сейчас используется для повышения генетического разнообразия и создания новых устойчивых форм сельскохозяйственных культур [6].

Чтобы применить к овощным культурам технологию селекции на уровне соматических клеток *in vitro*, необходимы эффективные клеточные системы, позволяющие проводить отбор клеток и регенерировать целые растения с новыми качествами. Такая клеточная система подразумевает выбор оптимального экспланта, получение и поддержание морфогенной активности тканей, а также реализацию морфогенетического потенциала культивируемых клеток, тканей и органов растений.

Опыты по отбору устойчивых к альтернариозу растений на клеточном уровне были проведены некоторыми отечественными и зарубежными исследователями [7—9]. Как правило, отбор устойчивых клеточных линий осуществляли на уровне каллусов, клеточных суспензий и протопластов. В качестве селективных объектов использовали культуральные фильтраты. Чистые токсины патогенов или их смеси с целлюлозами и пектиназами. Однако у обоих селективных агентов есть определенные недостатки. В случае культуральных фильтратов сложно подобрать необходимые концентрации, при этом большие объемы посторонних питательных веществ снижают эффективность морфогенеза. Применение отдельных токсинов исключает

влияние всего комплекса веществ, выделяемых грибами и действующих на растения. Следовательно, задача состоит в том, чтобы снизить до минимума недостатки данных селективных агентов.

К настоящему времени многие аспекты регенерации растений и отбора клеток на селективных средах с метаболитами грибов *Alternaria* еще недостаточно разработаны. В частности, не выяснено, как влияют состав питательных сред и концентрация гормонов на каллусообразование; какие условия необходимы для максимального эмбриогенеза различных генотипов; как влияют гормоны и их концентрации в каллусогенных и эмбриогенных средах на активность эмбриогенеза; каковы оптимальные условия получения клеточной суспензии и эмбриогенеза в жидких средах; каковы условия получения наиболее токсичных КФ грибов; в каком диапазоне концентраций КФ грибов на культуре каллусов можно провести несколько этапов отбора устойчивых клеток без утраты их способности к регенерации; каким образом можно оценить полученные растения-регенеранты на устойчивость к альтернариозу.

Методика

Исследования проведены на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии Тимирязевской академии. Исходным материалом служили 5 линий моркови (805, 1268, 6700, 225П, 906), а также чистая культура гриба *Alternaria radicina*. Эксплантами для получения каллусов и суспензионной культуры

ры служили черешки 30-дневных проростков. Работа с грибом проводилась по общепринятой методике. Культуральный фильтрат получали, выращивая изоляты в колбах на 250 мл в 100 мл жидкой среде МС, содержащей 2% сахарозы, на качалках при 100 об/мин и температуре 25° С. В каждую колбу вносили по 5 мл суспензии гриба, содержащей 5 · 10⁶ гиф/мл. После 30 сут выращивания проводили фильтрацию через бумажный фильтр, а затем через бактериальный фильтр с порами диаметром 0,45 мкм (фирма «Millipor»). Токсичность культурального фильтрата определяли на проростках моркови на основе методики О.А. Берестецкого [1] и рассчитывали по формуле (1). Действие КФ было изучено в следующих разбавлениях: 0, 25, 50, 75 и 100%.

$$T = 100\% - \left(\frac{\sum l_{\text{КФ}} \cdot 100}{\sum l_{\text{к}}} \cdot 100 \right),$$

где T — токсичность КФ; $l_{\text{КФ}}$ и $l_{\text{к}}$ — суммарная длина проростков моркови соответственно на КФ и воде (контроль).

При проведении работы по клеточной селекции моркови использовали пересадочную калтусную ткань линии 225П. Изучали влияние КФ в разбавлениях: 0, 15, 25, 35 и 45%.

При изучении морфогенетического потенциала суспензионной культуры моркови были испытаны следующие биологически активные вещества: нитрат серебра (10 мг/л), кокосовая вода (10 мл/л), дикамба (1 мг/л), а также сочетание БАП (1 мг/л) и НУК (0,1 мг/л).

Весь растительный материал и суспензию гриба выращивали на свету при температуре 25° С и 70% влажности воздуха.

Результаты

Первоначально гриб *A. radicina* выращивали на агаризованной питательной среде МС, при этом цвет последней изменялся от светло-белого до темно-коричневого к концу выращивания. Это свидетельствует о том, что гриб выделяет токсины в среду. Для проведения клеточной селекции следует иметь такой КФ, который содержал бы в себе все токсичные вещества, выделяемые грибом *A. radicina*.

Для получения необходимого КФ гриб выращивали в жидкой питательной среде; гифы гриба сплетались в «клубки», образуя при этом видимые простым глазом структуры шарообразной формы разных размеров. Цвет питательной среды при этом также становился темно-коричневым. Через 30 дней культивирования получили культуральный фильтрат и провели определение его токсичности. Для этого семена проращивали на воде (контроль), а также на КФ различного разбавления. Действие КФ на проращивание семян оценивали на 14-й день после посадки. Учитывали число проросших семян, а также длину корневой системы и надземной части. Полученные результаты приведены в табл. 1 и на рис. 1.

По чувствительности к КФ были выделены 3 группы линий моркови: высокочувствительная — 906, 2 среднечувствитель-

Проращение семян моркови при разной концентрации КФ гриба

Линия	Средняя длина проростка, %					Количество проросших семян, %				
	Концентрация КФ, %									
	0	25	50	75	100	0	25	50	75	100
906	2,9	1,5	1,2	1,2	0,8	60	51	42	40	34
805	2,6	1,8	1,0	0,8	0,6	59	55	38	35	34
1268	3,3	2,4	1,5	1,2	1,1	63	61	59	51	50
6700	1,6	1,0	0,9	0,6	0,5	53	46	38	33	28
225П	3,5	2,7	1,4	1,4	0,9	67	58	54	25	22

ные — 1268, 225П, 805, низкочувствительная — 6700. Для линии 906 токсичность КФ уже в концентрации 25% составила 57,7, а для низкочувствительной линии 6700 — всего 12,5%, для остальных линий — 24,8—38,9%. Постепенное повышение концентрации КФ до 100% приводило к проявлению токсичности гриба до 71—87,8% для всех испытанных линий.

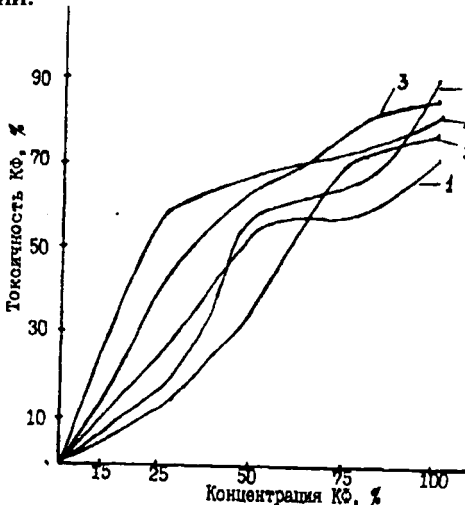


Рис. 1. Зависимость токсичности КФ гриба *A. radicina* от его концентрации.
1 — 1268, 2 — 225П, 3 — 805, 4 — 906, 5 — 6700

Таким образом, для клеточной селекции моркови на устойчивость к КФ гриба *A. radicina* целесообразно использовать КФ в концентрациях 25—50%, обеспечивающих 50% токсичность.

Исходя из того, что линия 906 проявила сильную чувствительность к различным концентрациям КФ, ее приняли за модель для оценки токсичности КФ после автоклавирования. Как следует из рис. 2, КФ не теряет своей токсичности после автоклавирования, что свидетельствует о возможности использования данного способа получения стерильного КФ в работе по клеточной селекции моркови на устойчивость к альтернариозу.

Определенная экспериментально оптимальная концентрация КФ была испытана нами на каллусной культуре. Исходным материалом в этом эксперименте являлась линия 225П, проявившая высокую морфогенетическую активность. Хорошо пролиферирующая каллусная

ры служили черешки 30-дневных проростков. Работа с грибом проводилась по общепринятой методике. Культуральный фильтрат получали, выращивая изоляты в колбах на 250 мл в 100 мл жидкой среде МС, содержащей 2% сахарозы, на качалках при 100 об/мин и температуре 25° С. В каждую колбу вносили по 5 мл суспензии гриба, содержащей $5 \cdot 10$ гиф/мл. После 30 сут выращивания проводили фильтрацию через бумажный фильтр, а затем через бактериальный фильтр с порами диаметром 0,45 мкм (фирма «Millipore»). Токсичность культурального фильтрата определяли на проростках моркови на основе методики О.А. Берестецкого [1] и рассчитывали по формуле (1). Действие КФ было изучено в следующих разбавлениях: 0, 25, 50, 75 и 100%.

$$T = 100\% - \left(\frac{\sum I_{\text{КФ}} \cdot 100}{\sum I_{\text{к}}} \cdot 100 \right),$$

где T — токсичность КФ; $I_{\text{КФ}}$ и $I_{\text{к}}$ — суммарная длина проростков моркови соответственно на КФ и воде (контроль).

При проведении работы по клеточной селекции моркови использовали пересадочную каллусную ткань линии 225П. Изучали влияние КФ в разбавлениях: 0, 15, 25, 35 и 45%.

При изучении морфогенетического потенциала суспензионной культуры моркови были испытаны следующие биологически активные вещества: нитрат серебра (10 мг/л), кокосовая вода (10 мл/л), дикамба (1 мг/л), а также сочетание БАП (1 мг/л) и НУК (0,1 мг/л).

Весь растительный материал и суспензию гриба выращивали на свету при температуре 25° С и 70% влажности воздуха.

Результаты

Первоначально гриб *A. radicina* выращивали на агаризованной питательной среде МС, при этом цвет последней изменялся от светло-белого до темно-коричневого к концу выращивания. Это свидетельствует о том, что гриб выделяет токсины в среду. Для проведения клеточной селекции следует иметь такой КФ, который содержал бы в себе все токсичные вещества, выделяемые грибом *A. radicina*.

Для получения необходимого КФ гриб выращивали в жидкой питательной среде; гифы гриба сплетались в «клубки», образуя при этом видимые простым глазом структуры шарообразной формы разных размеров. Цвет питательной среды при этом также становился темно-коричневым. Через 30 дней культивирования получили культуральный фильтрат и провели определение его токсичности. Для этого семена проращивали на воде (контроль), а также на КФ различного разбавления. Действие КФ на прорастание семян оценивали на 14-й день после посадки. Учитывали число проросших семян, а также длину корневых системы и надземной части. Полученные результаты приведены в табл. 1 и на рис. 1.

По чувствительности к КФ были выделены 3 группы линий моркови: высокочувствительная — 906, 2 среднечувствитель-

Проращение семян моркови при разной концентрации КФ гриба

Линия	Средняя длина проростка, %					Количество проросших семян, %				
	Концентрация КФ, %									
	0	25	50	75	100	0	25	50	75	100
906	2,9	1,5	1,2	1,2	0,8	60	51	42	40	34
805	2,6	1,8	1,0	0,8	0,6	59	55	38	35	34
1268	3,3	2,4	1,5	1,2	1,1	63	61	59	51	50
6700	1,6	1,0	0,9	0,6	0,5	53	46	38	33	28
225П	3,5	2,7	1,4	1,4	0,9	67	58	54	25	22

ные — 1268, 225П, 805, низкочувствительная — 6700. Для линии 906 токсичность КФ уже в концентрации 25% составила 57,7, а для низкочувствительной линии 6700 — всего 12,5%, для остальных линий — 24,8—38,9%. Постепенное повышение концентрации КФ до 100% приводило к проявлению токсичности гриба до 71—87,8% для всех испытанных линий.

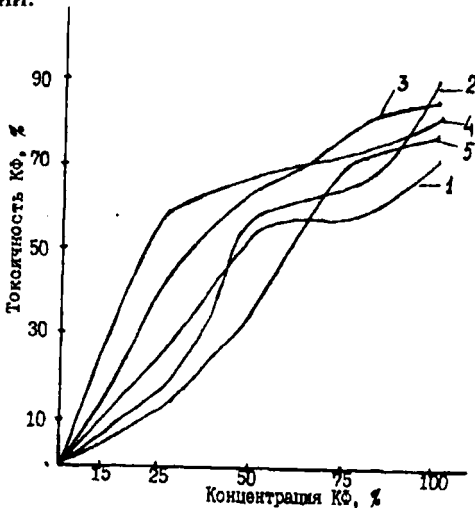


Рис. 1. Зависимость токсичности КФ гриба *A. radicina* от его концентрации.

1 — 1268, 2 — 225П, 3 — 805, 4 — 906, 5 — 6700

Таким образом, для клеточной селекции моркови на устойчивость к КФ гриба *A. radicina* целесообразно использовать КФ в концентрациях 25—50%, обеспечивающих 50% токсичность.

Исходя из того, что линия 906 проявила сильную чувствительность к различным концентрациям КФ, ее приняли за модель для оценки токсичности КФ после автоклавирования. Как следует из рис. 2, КФ не теряет своей токсичности после автоклавирования, что свидетельствует о возможности использования данного способа получения стерильного КФ в работе по клеточной селекции моркови на устойчивость к альтернариозу.

Определенная экспериментально оптимальная концентрация КФ была испытана нами на каллусной культуре. Исходным материалом в этом эксперименте являлась линия 225П, проявившая высокую морфогенетическую активность. Хорошо пролиферирующая каллусная

ткань культивировалась на питательных средах, содержащих КФ

в разбавлениях 15%, 25, 35 и 45% (табл. 2).

Таблица 2

Рост каллусной ткани линии 225П при разных концентрациях КФ гриба

Концентрация КФ, %	Рост каллусной ткани, %	Прирост, число раз	Цвет каллуса
Контроль	100	7—8	Светло-желтый
15	100	5—6	Желто-салатовый
25	100	5	» »
35	0	0	» »
45	0	0	» »

Данные табл. 2, а также визуальные наблюдения свидетельствуют о том, что концентрация КФ 35% является летальной. Через месяц в контроле каллусы моркови линии 225П оказались лучше развитыми, чем в остальных вариантах. При концентрациях КФ гриба 35 и 45% каллусы гиб-

ли, а концентрации 15 и 25% были предельными. Однако визуально можно было определить, что каллусы в вариантах с разбавлением КФ 15 и 25% отличались от контрольных окраской. В этих вариантах каллус имел желто-салатовый оттенок, что указывает на прохождение в них морфогенетических процессов. Последующее культивирование каллусов из перечисленных выше вариантов на средах того же состава привело к полной остановке их роста и изменению окраски от желто-салатового до белого.

Для моркови, по мнению академика РАСХН Р.Г. Бутенко, суспензионная культура способна давать начало соматическому эмбриогенезу лишь в том случае, если полученная первичная каллусная ткань сразу же переносится в жидкую среду, не содержащую 2,4-Д или со значительно сниженной концентрацией этого гормона [2]. Постоянное же культивирование клеток в

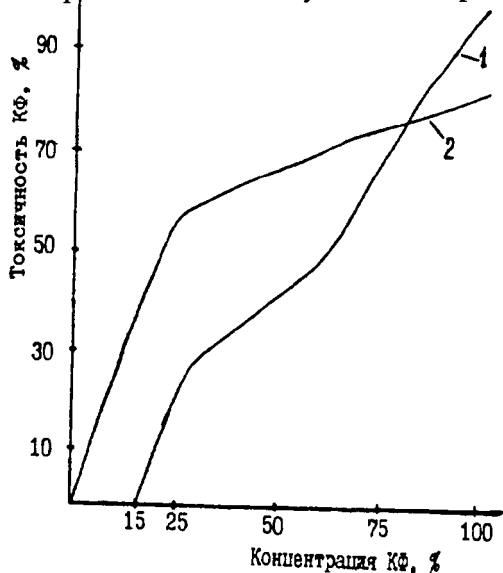


Рис. 2. Зависимость токсичности КФ гриба *A. radicina* от способа получения.
1 — автоклавированный, 2 — неавтоклавированный

среде с повышенным содержанием 2,4-Д никогда не заставит каллусную клетку пойти в своем развитии по пути соматического эмбриогенеза. Это явление было отмечено и нами при работе с суспензионной культурой моркови.

При стимулировании формирования монополярной или биполярной структуры ряд исследователей предпочитают отдавать не ауксинам, а цитокининам или

аминокислотам. Исходя из этого нами была предпринята попытка стимулировать соматический эмбриогенез в долго пассируемой неэмбриогенной суспензионной культуре путем добавления в питательную среду различных биологически активных веществ. В качестве стимуляторов использовали кокосовую воду, дикамбу, нитрат серебра, а также сочетание БАП и НУК (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Соматический эмбриогенез суспензионной культуры моркови (%) при введении в питательную среду биологически активных веществ

Линия	БАП, НУК	Дикамба	Нитрат серебра	Кокосовая вода
225П	0	4,0	0	8,3
1268	93,4	100	90,5	100
906	0	0	0	0
805	0	18,3	0	15,0

Из табл. 3 видно, что морфогенетический потенциал суспензионной культуры зависит от генотипа первичного экспланта, а также от состава питательной среды. Так, линия 1268 оказалась наиболее чувствительной к изменению состава питательной среды, а именно: все испытанные среды стимулировали формирование соматических эмбриондов, которое достигало 90,5—100%. Что касается других линий моркови, то они избирательно реагировали на присутствие в среде различных биологически активных веществ. Следует также отметить, что линия 225П, проявившая на ранних пассажах высокую морфогенетическую активность, в этих условиях выращивания была способна формировать эмбрионды

лишь в 4,0—8,8% случаев. В то же время линия 906, которая была способна формировать первоначально из черешков активно полиферирующую каллусную и суспензионную культуры, на среде для морфогенеза полностью потеряла способность клеток к дедифференцировке. В остальных вариантах клетки оставались живыми, светло-желтого или желто-зеленого цвета. Одновременно с этим визуальные наблюдения показали, что в колбах, где имел место морфогенетический процесс, одновременно были все стадии развития соматических зародышей моркови: неорганизованно растущие клетки, глобулярная, сердцевидная и торпедовидная стадии, сами зародыши. Это свидетельствует о том, что морфогенетические про-

цессы происходят асинхронно и зависят от ряда факторов.

Низкая частота процесса формообразования в популяциях неорганизованно растущих клеток, асинхронность вступления клеток на путь развития позволили нам выдвинуть гипотезу о вероятном характере процесса, который может начаться только при совпадении ряда обстоятельств. Среди них — определяемая генетически высокая или низкая способность к морфогенезу *in vitro*; эпигенетическое состояние клеток, зависящее от характера ткани, из которой культивируемые клетки были получены; способность культивируемой клетки принять сигнал к перестройке программы развития и ответить на него. И, наконец, детерминированная к развитию клетка должна образовывать в результате деления клоны таких же, как она, перестроенных клеток, в результате взаимодействия которых и реализуется программа развития той или иной морфологической структуры.

Заключение

На основании полученных данных можно заключить, что выбранные линии моркови обладают разной чувствительностью к культуральному фильтрату гриба *Alternaria radicina*. Показано, что для проведения клеточной селекции на устойчивость к альтернариозу целесообразно использовать КФ гриба в концентрациях 25—50%, обеспечивающих 50% токсичность. Определено, что морфогенетический потенциал суспензионной культуры зависит от генотипа первичных эксплан-

тов и условий их культивирования. Разработана схема клеточной селекции моркови на устойчивость к грибу *A. radicina* с использованием каллусной и суспензионной культур.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Берестецкий О.А.* Определенные фитотоксической активности культур микроскопических грибов. — В кн.: Методы эксперимент. микологии. Киев: Наукова думка, 1973, с. 165—175. — 2. *Бутенко Р.Г.* Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. 35-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 1975. — 3. *Игнатова С.А., Овсяк Т.Н., Лукьянюк С.Ф., Сечняк Л.К.* Использование культуры тканей люцерны для создания форм, устойчивых к фузариозу. — Тез. докл. Междунар. конфер. «Биология культивируемых клеток и биотехнология». Новосибирск, 1988, т. 1, с. 175—176. — 4. *Лети Джос, Калашикова Е.А.* Влияние гриба *Serotia nodorum* и его метаболитов на прорастание семян пшеницы. — Изв. ТСХА, 1996, вып. 4, с. 150—155. — 5. *Масленников С.Е., Посытанов Г.С., Мезенцев А.В.* Разработка методических подходов для получения форм люцерны, устойчивых к фузариозу, с использованием культуры каллусов и клеток. — Изв. ТСХА, 1994, вып. 3, с. 177—185. — 6. *Плацев В.М., Гусева Н.Н.* Клеточная селекция устойчивых форм. — Защита растений, 1986, № 8, с. 28—29. — 7. *Сидоров В.А.* Биотехнология растений. Клеточная селекция. Киев: Наукова думка, 1990. — 8. *Chibbar R.N., Shyluk J.*

Georges F., Constabel F. — Plant
Physiol., 1987, vol. 84, N 4, Suppl.,
p. 76. — 9. Pelletier J.R., Fry

W.E. — Phytopathology, 1989, vol.
79, N 5, p. 511—517.

Статья поступила 25 июня
1997 г.

SUMMARY

Toxicity of 30-days *A. radicina* cultural filtrate (CF) by germination of 5 carrot lines has been determined. Optimum CF concentration used with cellular selection of carrot for resistance to alternarios is 20—25%. It has been established that the selected lines have different sensitivity to CF. So, line 906 is highly sensitive, line 6700 is slightly sensitive, lines 1268, 805, 225p are middle sensitive. The method for producing sterile *A. radicina* CF developed. The scheme of cellular selection of carrot for resistance to alternarios is worked out on callus and suspension crops. The effect of biologically active substances (dicamba, silver nitrate, coconut water, BAP, NAA) on somatic embryo genesis of suspension culture has been studied. It has been found that coconut water and dicamba have positive effect on somatic embryo genesis of suspension carrot culture.