

стерильности; получены полноценные фертильные и полуфертильные растения из регенерантов, пересаженных в условия *in situ*; получен семенной материал у всех растений, выращенных из регенерантов.

Способ выращивания растений с помощью эмбриокультуры оказался эффективным для межвидовых гибридов, созданных при скрещиваниях пшеницы, с использованием видов – носителей мужской стерильности.

Список литературы

1. Гродницкий Д.Л. Эпигенетическая теория эволюции как возможная основа нового эволюционного синтеза // Журнал общей биологии. – 2001. – Т. 62, № 2. – С. 99-109.
2. Хайленко Н.А. Цитогенетические и цитоэмбриологические закономерности формирования межвидовых и межсортовых гибридов пшеницы и риса: Автореф. дисс.... доктора биол. наук: 03.00.15 и 03.00.05. – Алматы, 2004. – 58 с.
3. Хайленко Н.А. Цитоплазматическая мужская стерильность у некоторых гибридов тетра- и гексаплоидной пшеницы // Вестник КазНУ. Серия биол. – 2008. – № 2 (37). – С. 69-74.

ПРИМЕНЕНИЕ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) С ПАТОГЕННЫМИ ГРИБАМИ В ИССЛЕДОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ ФИТОИММУНИТЕТА

Л.Г. ЯРУЛЛИНА, *доктор биологических наук*;
Н.Б. ТРОШИНА, *доктор биологических наук*;
О.Б. СУРИНА, *кандидат биологических наук*;
И.В. МАКСИМОВ, *доктор биологических наук*

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

Введение

Одной из первоочередных проблем современной биологии является выявление путей формирования устойчивости растений к фитопатогенам. Известно, что устойчивые растения ограничивают распространение фитопатогенов путем формирования зоны некроза, в которой происходит усиление продукции активных форм кислорода [13]. Пути образования активных форм кислорода в растениях многообразны и активно обсуждаются в научной литературе [9, 10]. Так, показано, что накопление перекиси водорода (H_2O_2) в растительных тканях возможно за счет окисления щавелевой кислоты оксалатоксидазой [7] в результате специфического ингибиования каталазы и пероксидазы салициловой кислотой (СК) [8], индукции экспрессии ряда генов окислительных ферментов под воздействием производных хитина.

Удобной моделью для изучения механизмов формирования защитных реакций растений к фитопатогенам могут служить совместные культуры растительных клеток с возбудителями болезней. Такая культура у нас была получена с использованием каллусов пшеницы и спор возбудителя твердой головни *Tilletia caries* Tul., причем обнаружены различия в степени инфицируемости грибом различных участков каллуса: гриб успешно развивался в межклеточном пространстве рыхло расположенных паренхимоподобных клеток и не инфицировал зоны организованного роста каллусов и ризоиды [3]. Нами также были выявлены морфологические различия между каллусами восприимчивого и устойчивого к возбудителю твердой головни образцов пшеницы. Если каллусы восприимчивых образцов характеризовались наличием небольшого количества плотных участков, то в каллусах устойчивых образцов плотных участков было значительно больше. Эти данные навели нас на мысль о сходстве некоторых механизмов

индукции морфогенетических и защитных реакций растительных клеток и об участии в данных процессах перекиси водорода.

Целью настоящего исследования было выявление особенностей влияния известных индукторов устойчивости, таких как салициловая кислота (СК), хитоолигосахариды (ХОС), иммуностимулятор «Бисол 2», системный фунгицид «Байтан», на устойчивость различных клеток каллусов пшеницы к возбудителю твердой головни.

Объекты и методы исследования

В качестве эксплантов для получения каллусов использовали незрелые зародыши пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Жница. Изолированные зародыши высаживали на среду Мурасиге и Скуга (МС) и культивировали при 26°C в темноте. В опытных вариантах каллусы культивировали в присутствии 4-х индукторов устойчивости: СК, ХОС, «Билол 2», «Байтан». На 3 сутки от начала 2 пассажа часть каллусов инфицировали телиоспорами возбудителя твердой головни *Tilletia caries* (DC.) Tul. В качестве контрольных каллусов использовали не подверженные воздействию исследуемых индукторов устойчивости и не инфицированные патогеном каллусы.

Для определения активности оксалатоксидазы каллусы растирали в 10 mM фосфатно-солевом буферном растворе, pH 6.0. Гомогенат центрифугировали (5000 g, 20 мин.) и в супернатанте оценивали активность цитоплазматической фракции оксалатоксидазы. Для выделения из осадка ионно-связанной с клеточными стенками оксалатоксидазы использовали 1 M NaCl. Активность оксалатоксидазы в изучаемых фракциях определяли микрометодом [12]. Генерацию H₂O₂ оценивали по окислению хромогенного субстрата 3,3-диаминобензидина (ДАБ) [6]. После окрашивания каллусы фиксировали в смеси этанолуксусная кислота (3:1). Срезы подкрашивали 1% метиленовым синим.

В каждом варианте фиксировали по 10 идентичных образцов каллуса. В табл. и на рис. представлены средние значения из 3 биологических повторов и ошибка средней.

Результаты и обсуждение

Наблюдения за морфологическими изменениями каллусов пшеницы, растущих на среде МС с добавлением индукторов устойчивости, показали сходство действия исследуемых соединений. Так, если в контроле каллусы характеризовались относительной однородностью клеток и были неморфогенными (гомогенными, без уплотненных участков), то при добавлении в среду культивирования СК, ХОС, «Бисола 2» и «Байтана» каллусы становились рассыпчатыми, мелкоглобулярными, с небольшими плотными участками и ризоидами. При просмотре срезов морфогенных каллусов пшеницы (среда МС) было обнаружено, что основными клетками каллуса были рыхло расположенные паренхимоподобные клетки, среди которых располагались проэмбриогенные клеточные комплексы (ПЭКК), находящиеся на разных стадиях развития (рис. 1). На срезах каллусов были видны и немногочисленные ризоиды. В контроле генерацию H₂O₂ наблюдали только в ризоидах, причем окрашенными оказались 41-47% их поверхностных клеток.

Введение СК в среду культивирования каллусов инициировало увеличение числа плотных участков, что видно на срезах каллусов (рис. 1).

Во всех вариантах опыта мы не наблюдали существенного возрастания числа клеток, окрашенных ДАБ, расположенных по периферии ризоидов. Можно предположить, что наличие большого числа клеток, окрашенных ДАБ, среди периферических клеток ризоидов уже в контроле определяет их устойчивость при инфицировании. Таким образом, неморфогенные каллусы пшеницы, растущие на средах с добавлением индукторов устойчивости, характеризовались появлением структур, присущих морфогенному каллусу за счет уменьшения доли рыхлого каллуса. Влияние изучаемых соединений на морфогенез каллусов пшеницы можно объяснить их способностью воздействовать на гормональный баланс каллусной ткани, так же, как это показано для интактных растений [4, 5].

Инфицированные каллусы отличались от контрольных наличием единичных ризоидов (рис. 2). Это, по-видимому, было связано со способностью возбудителя твердой головни к синтезу и секреции в растительные ткани индолилуксусной кислоты [1]. Интересно, что на инфицированных каллусах, растущих на средах с ХОС, «Бисолом 2» и «Байтаном», число ризоидов возрастало.

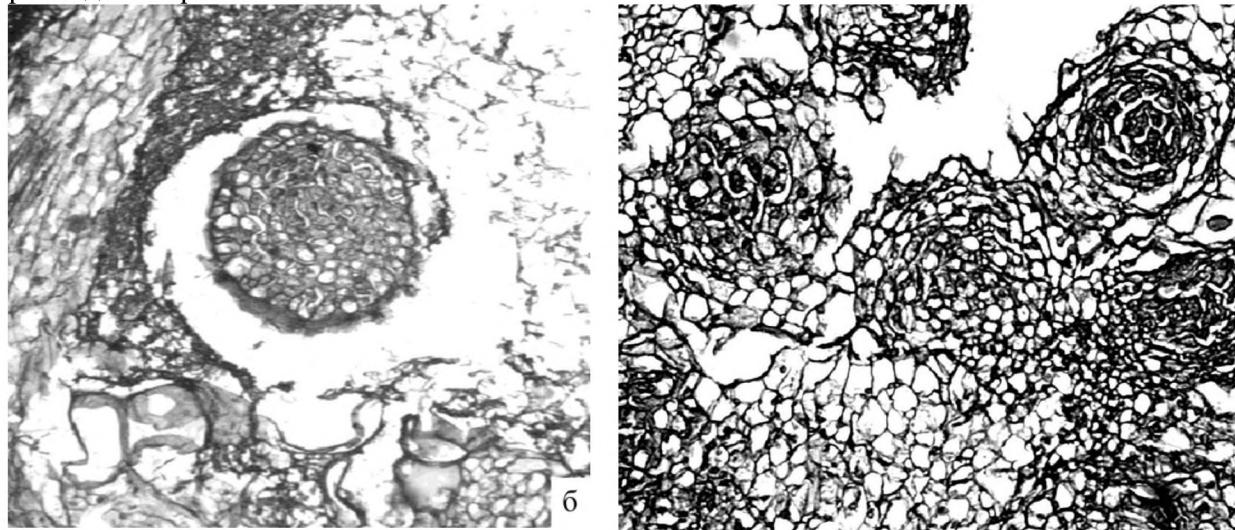


Рис. 1. ПЭКК (слева) и индукция СК меристемоподобных зон в каллусах *T. aestivum* сорта Жница (20 суток культивирования на среде МС+СК x 200)

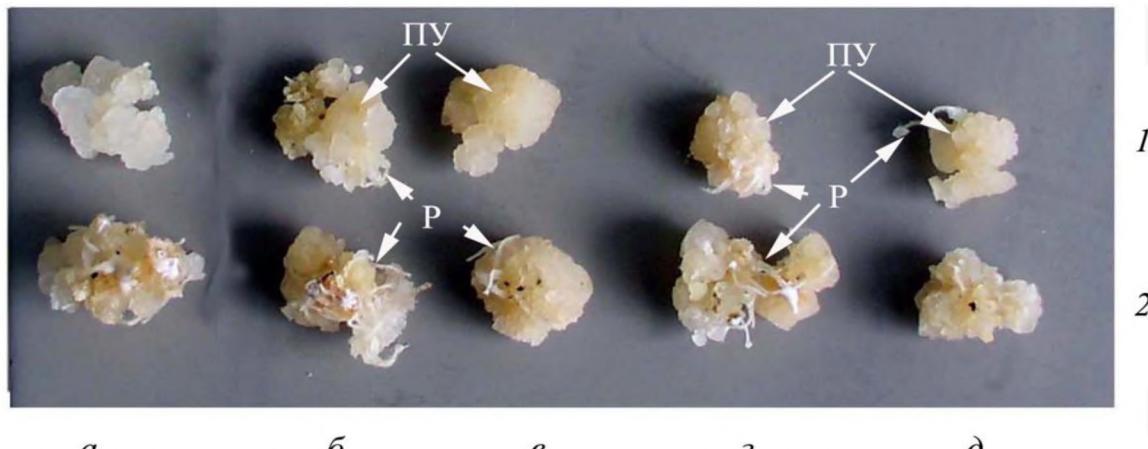


Рис. 2. Неинфицированные (1) и инфицированные *T. caries* (2) каллусы *T. aestivum* сорта Жница: а – на среде МС (контроль); б-д – на среде МС в смеси с «Бисолом 2» в концентрациях 10 мг/л (б) и 100 мг/л (в) или «Байтана» в концентрациях 0.1 мг/л (г) и 1.0 мг/л (д), соответственно

Прорастание спор гриба на каллусах, растущих на среде МС, происходило через 11 сут после их нанесения, а через 20 сут после инокуляции мицелий гриба равномерно покрывал до 25% их поверхности. При введении в среду культивирования индукторов устойчивости гриб распространялся по поверхности каллусов фрагментарно, не заселяя плотные участки и ризоиды. В литературе отмечено медленное проникновение и распространение возбудителей фитофтороза на морфогенном каллусе картофеля и ржавчины на каллусе пшеницы [2] по сравнению с неморфогенным.

В инфицированных каллусах мицелий гриба обнаруживался в межклетниках рыхло расположенных паренхимоподобных клеток и не наблюдался в ризоидах и в меристемоподобных клетках. Инфицирование не влияло на число продуцирующих H_2O_2 клеток ризоидов. Однако в зоне роста гриба, среди паренхимоподобных клеток,

выявлялись клетки (25%), в цитоплазме и на поверхности которых регистрировалась генерация H_2O_2 . В меристемоподобных клетках как неинфицированных, так и инфицированных возбудителем твердой головни каллусов образования H_2O_2 с участием оксалатоксидазы нами не выявлено, что соответствует данным об отсутствии экспрессии генов оксалатоксидазы в меристематических клетках растений [6].

Результаты биохимического анализа показали, что инфицирование каллусов сопровождалось повышением активности оксалатоксидазы в цитоплазматической фракции и снижением активности во фракции, связанной с клеточными стенками. Введение в среду для культивирования инфицированных каллусов индуктора устойчивости ХОС приводило к активации оксалатоксидазы, особенно во фракции, связанной с клеточной стенкой (табл.), что свидетельствует об усилении продукции H_2O_2 клетками каллусов в этих условиях.

Таблица

Влияние ХОС на активность оксалатоксидазы в каллусах пшеницы, инфицированных возбудителем твердой головни *T. caries*

Концентрация ХОС, мг/л	Активность оксалатоксидазы (ед. на 1 г сырой массы) во фракции					
	цитоплазматической			ионно-связанной		
	6 сут	9 сут	12 сут	6 сут	9 сут	12 сут
<i>Каллусы неинфицированные T. caries</i>						
0	10,3±0,8	11,2±0,7	12,7±0,8	0,94±0,06	0,86±0,04	1,05±0,08
0,1	23,0±0,7	26,8±0,8	28,4±0,6	1,52±0,06	1,66±0,08	1,70±0,09
<i>Каллусы инфицированные T. caries</i>						
0	16,7±1,1	15,8±1,0	18,0±1,0	0,73±0,05	0,78±0,04	0,70±0,04
0,1	26,4±1,1	29,8±1,3	30,9±1,6	1,41±0,05	1,68±0,05	1,87±0,05

Таким образом, в результате изучения совместного культивирования каллусов пшеницы с возбудителем твердой головни обнаружено, что защитный ответ паренхимоподобных клеток каллусов мог быть обусловлен генерацией H_2O_2 , в том числе за счет активации оксалатоксидазы. Вместе с тем, образование под влиянием препаратов участков с плотно расположеннымми паренхимоподобными клетками уменьшало долю рыхло расположенных клеток каллуса, то есть снижало число потенциально поражаемых клеток.

Выводы

1. Введение в среду культивирования неморфогенных каллусов пшеницы индукторов устойчивости инициировало образование многочисленных зон организованного роста и ризоидов, не поражаемых возбудителем твердой головни.
2. Устойчивость ризоидов к патогену определялась наличием поверхностных клеток, генерирующих H_2O_2 .
3. Среди рыхло расположенных паренхимоподобных клеток генерация H_2O_2 выявлялась только при инфицировании, в зонах роста гриба.
4. Появление в каллусах плотных участков, усиление ризогенеза под влиянием ХОС было сопряжено с активацией оксалатоксидазы в области клеточной стенки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №08-04-90259-узб.

Список литературы

1. Влияние твердой головни на рост проростков и каллусов пшеницы / Максимов И.В., Трошина Н.Б., Хайруллин Р.М., Сурина О.Б., Ганиев Р.М. // Физиология растений. – 2002. – Т. 49, № 5. – С. 767-772.
2. Смирнова Т.В., Плотникова Ю.М., Молчанова О.И. Влияние физиологического состояния каллусов на развитие ржавчинных грибов // Физиология растений. – 1996. – Т.

43, № 5. – С. 685-691.

3. Развитие возбудителя твердой головни *Tilletia caries* (DC.) Tul. на эмбриогенном каллусе пшеницы / Трошина Н.Б., Максимов И.В., Сурина О.Б., Хайруллин Р.М. // Цитология. – 2000. – Т. 42, № 6. – С. 556-559.

4. Чижова С.И., Павлова В.В., Прусакова Л.Д. Содержание абсцизовой кислоты и рост растений ярового ячменя под действием триазолов // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 1. – С. 108-114.

5. Новые аспекты в изучении механизмов действия индукторов устойчивости пшеницы к твердой головне / Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Исаев Р.Ф., Ганиев Р.М., Хайруллин Р.М. // Агрохимия. – 2001. – Т. 5. – С. 63-66.

6. Caliskan M., Cuming A. C. Spatial specificity of H₂O₂-generating oxalate oxidase gene expression during wheat embryo germination // Plant J. – 1998. – V. 15. – P. 165-171.

7. Dumas B., Freyssinet G., Pallet R.E. Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of barley seedlings // Plant Physiol. – 1995. – V. 107. – P. 1091-1096.

8. Durner J., Klessing D.F. Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalase // J. Biol. Chem. – 1996. – V. 271. – P. 28492-28501.

9. Kawano T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 21. – P. 829-837.

10. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends in Plant Science. – 2002. – V. 7. – P. 405-410.

12. Vuletic M., Sukalovich V.H. Characterization of cell wall oxalate oxidase from maize roots // Plant Sci. – 2000. – V. 157. – P. 257-263.

13. Wang H., Li J., Bostock R.M., Gilchrist D.G. Apoptosis: a functional paradigm for programmed cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development // Plant Cell. – 1996. – V. 8. – P. 375-391.

ПОВРЕЖДАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ НА РАСТИТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЗЕРНОВЫХ ЗЛАКОВ

Н.В. ТЕРЛЕЦКАЯ, кандидат биологических наук

Институт биологии и биотехнологии растений НЦБ РК, Алматы, Казахстан

Введение

Растения в естественных условиях подвержены многочисленным стрессам, что сказывается на их росте, развитии и продуктивности. Устойчивость к стрессам формируется на разных уровнях биологической организации. Для отбора перспективных толерантных форм как правило применяются различные провокационные фоны, эффективность которых возрастает при комплексном подходе. А наибольшая производительность отбора может быть достигнута при проведении оценок на прорастающем зерне, в культуре клеток или при гаметофитном отборе [13].

Способность растений на начальных этапах развития эффективно использовать влагу – важнейший биологический и хозяйственno ценный признак, а ростовая реакция проростков на стрессовые условия – один из наглядных показателей изменения их метаболизма [5]. Культуры *in vitro*, позволяющие манипулировать с большим количеством единичных клеток и клеточных агрегатов, чрезвычайно перспективны и как эффективная модель для изучения, и как система отбора толерантных форм, причем устойчивость в данном случае может наследоваться как проявление доминирующего ядерного гена [9]. А гаметофитная фаза, несмотря на небольшой срок прохождения, играет немаловажную роль в передаче генетической информации. В этой фазе