

ბიზნის-ინჟინერინგი სოფლის მეურნეობაში

Клеточная селекция растений на устойчивость к болезням

Аникина И.Н., ПГУ им. С.Торайгырова
Красавин В.Ф., КазНИИКО
Токбергенова Ж., КазНИИКО
Исаева К.С., ПГУ им. С.Торайгырова

Summary

One of the most important cell selection tools is the use of pathogens for disease resistance. In the in vitro selection for disease resistance is effective as a cell culturing techniques over a pathogen or its culture filtrates as well as the use of such selective agent as pathotoxins which are usually synthesized by pathogens. Basic procedures of improvement of cultivated plants are interspecific and intergeneric hybridization with wild species - carriers of resistance characteristics. High potential method for resistance selection is the use of immunological and molecular biological techniques to determine the primary products of genes or specific nucleic acids associated with resistance of cultured cell.

Keywords: Pathogens, selection, diseases, toxins, strains.

* * * *

Технологии клеточной инженерии растений имеют огромные перспективы для растениеводства и селекционного процесса. Одним из методов сельскохозяйственной биотехнологии является клеточная селекция, при которой отбор клеточных линий и растений с новыми наследственными признаками производится на уровне культивируемых in vitro клеток [1].

Получение растений из отобранных в селективных условиях мутантных клеток возможно благодаря уникальному свойству растительной клетки – ее тотипотентности. Приемы культивирования растительных клеток и регенерации из них растений, разработанные для многих важных сельскохозяйственных культур, уже сейчас позволяют экспериментально реализовать возможности клеточной селекции, т.е. применять ее для создания новых сортов растений [2].

Одним из важнейших инструментов клеточной селекции является использование патогенов в селекции на устойчивость к болезням. Наиболее простой подход в селекции in vitro на устойчивость к болезням

связан с культивированием клеток непосредственно в присутствии патогенна. Этот подход может быть особенно полезным, когда мало известно о токсических веществах, ответственных за патогенез, или если патоген не продуцирует токсины. Для выбора правильной схемы селекции прежде всего необходимо знание жизненного цикла патогенна. Многие патогены, например, грибы имеют различные стадии жизненного цикла, несколько стадий спороношения, в зависимости от которых могут изменяться выживаемость, рост и эпидемиология; разные стадии отличаются хозяйно- и тканеспецифичностью. Поэтому необходимо учитывать стадию спороношения, существенным для инфицирования могут быть световой и температурный режимы, относительная влажность, pH, наличие или отсутствие питательных веществ, что сказывается на прорастании спор [2].

В некоторых случаях необходимым является наличие кутикулы или определенного типа ткани, вектора или раневой поверхности. Часто стратегия селекции может зависеть от биологии патогена. Например, для инфицирования некротрофами необходим высокий уровень инокулюма, тогда как заражение биотрофами может вызываться отдельными спорами или клетками. Также некротрофы хорошо растут в культуре, а биотрофы плохо, т.к. большинство из них облигатные паразиты [3].

Исследования по культивированию растительных клеток в присутствии патогена были начаты с 1965 года и направлены на изучение корреляции устойчивости / чувствительности к патогену in vivo и in vitro. Данный этап в работе, непосредственно не связанный с селекцией, позволял оценить экспрессию признака устойчивости на клеточном уровне и в целом определить правомерность предлагаемых схем отбора in vitro устойчивых вариантов [4]. Например, для совместного культивирования с разными расами *Phytophthora infestans* использовались суспензионные культуры сортов картофеля, различающиеся по чувствительности к патогену. В строго контролируемых условиях культивирования найдена полная корреляция устойчивости при взаимодействии *Phytophthora para-*

sitica с клетками табака. Удалось увеличить выход устойчивых вариантов сельдерея при высаживании регенерирующих побегов на среду, заселенную *Fusarium oxysporum*. Успешно использовались в качестве эксплантов незрелые соцветия проса, зараженные *Sclerospora graminicola*, для выделения устойчивых к склероспорозу растений [4].

Методы селекции *in vitro* растений, устойчивых к заболеваниям, когда селективным агентом служат сами патогены, могут давать положительные результаты, что зависит от правильного выбора стадии жизненного цикла патогена, подбора соответствующих условий совместного культивирования.

Один из перспективных методов селекции устойчивых к болезням растений основан на использовании в качестве селективного агента патотоксинов, которые обычно синтезируются патогенами. По действию патотоксины делят на три категории [5].

К первой относятся токсины, которые не являются определяющими в заболевании, обладают неспецифическим токсическим действием по отношению к хозяину и токсичны для широкого круга растений. Примером может служить табтоксин, продуцируемый *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, являющийся возбудителем бактериальной рябухи табака. Очищенный токсин не вызывает типичных симптомов болезни и в отличие от грубо очищенного токсина не ингибирует глутаминсинтетазу. Активной формой токсина является табтоксинин β -лактам, представляющий собой продукт гидролиза табтоксина.

Другая категория патотоксинов обладает такой же специфичностью по отношению к растениям, как и патоген, но они также не ответственны за развитие болезни. Сюда относится Т-токсин (*Helminthosporium maydis*) расы Т, патоген, вызывающий гельминтоспориоз кукурузы. Раса О D. *maydis* не продуцирует Т-токсин, но все же обладает патогенным эффектом. Раса Т-патогена образует Т-токсин, который специфичен для растений кукурузы, несущих цитоплазматический ген Tms, ответственный за цитоплазматическую мужскую стерильность (ЦМС). Растения с нормальной цитоплазмой не поражаются токсином.

Третья категория включает патотоксины, которые хозяиноспецифичны и вызывают типичные признаки болезни. Хорошим примером является викторин – токсин *Helminthosporium victoriae* – возбудитель гельминтоспороза овса, вызывающий корневую гниль и пятнистость листьев. Специфичность токсина зависит от присутствия у хозяина гена *Victoria*, отвечающего за устойчивость к *Ruscinia coronata*.

Большинство токсинов имеют единственную мишень в клетках хозяина, и признак устойчивости находится под простым генетическим контролем. Это подтверждает целесообразность схем селекции *in vitro*, используемых при отборе вариантов, устойчивых к

другим антиметаболитам, в частности антибиотикам, применительно и к патотоксинам [5].

Правомерность схем клеточной селекции на устойчивость может непосредственно зависеть от механизмов действия токсинов. Отдельные виды патогенов поражают клетки, а затем выделяют токсин. Другие – сначала выделяют токсины, которые убивают клетки, затем используют продукты их распада для питания. Естественно, в первом случае не будет корреляции между устойчивостью *in vitro* и *in vivo*, проведение селекции на клеточном уровне целесообразно лишь во втором случае.

Возможность отбора *in vitro* растений, устойчивых к болезням, была продемонстрирована при проведении селекции на устойчивость к метионин-сульфоксиму (аналог табтоксина), были получены клеточные линии, а затем растения с повышенной устойчивостью к патогену (Лутова Л.А., 2003).

Культивирование клеток в присутствии Т-токсина как селективного фактора было использовано для получения растений кукурузы, устойчивых к гельминтоспорозу. Эмбрионные каллусные ткани из восприимчивых линий кукурузы пассировали в течение нескольких пассажей в присутствии сублетальных доз Т-токсина. Изолированные клоны сохраняли устойчивость в течение нескольких месяцев при культивировании на неселективных средах.

Два устойчивых к *Helminthosporium oryzae* растения риса получены при селекции каллусной ткани к Н-токсину данного патогена, одно растение обнаружено в контроле. Как показал анализ потомства R1 выделенных растений, устойчивость к болезни, вызываемой *H. oryzae*, наследуется как доминантный признак.

Девять растений, нечувствительных к викторину – токсину *Helminthosporium victoriae* идентифицировано в результате селекции каллусных культур из линий овса, гетерозиготных по доминантной чувствительной аллели Vb. Данная аллель одновременно ответственна за восприимчивость к *H. victoriae* и устойчивость к нескольким расам, вызывающих корончатую ржавчину. Нечувствительность к НВ-токсину у регенерантов наследственна, поскольку все потомство этих растений также было нечувствительно к этому токсину и характеризовалось утратой устойчивости к корончатой ржавчине. Эти данные подтверждают перспективность использования викторина как инструмента для селекции на устойчивость к заболеванию, вызываемому *H. victoriae*.

Наибольший урон сельскохозяйственным культурам наносит фитофтороз, поэтому неудивителен интерес ученых к применению в качестве селективного фактора не только культуральных фильтратов, но и очищенных токсинов *Phytophthora*. Проблема селекции на устойчивость к фитофторозу сортов картофеля осложняется тем, что грибок имеет многочисленное число рас и появляются новые, агрессивные и устойчивые к

пестицидам, поражающие сорта устойчивые к другим расам. Большая работа в этом направлении проведена в РГП «Национальный центр биотехнологии» в Астане Каримовой В.К., Нечай Н.Л., Есимсеитовой А.К. и др. В результате проведенных исследований выделены фитотоксичные и фитопатогенные изоляты Ph 5, Ph 4, были определены оптимальные концентрации КФ в среде, которые и используются в центре для оценки гибридов картофеля на устойчивость к фитофторозу. При тестировании каллусных клеток из дигамплоидов картофеля с разным уровнем полевой устойчивости к фитофторе на способность к росту на среде с токсинами показано следующее. Каллус из исходно устойчивых линий на среде с высокой концентрацией токсинов нарастал вполне нормально, но становился черным, тогда как каллус восприимчивого генотипа давал незначительный прирост массы или погибал. Используя для селекции медленно растущую на среде с токсинами каллусную ткань восприимчивых линий, отбирались отдельные участки каллуса, обладающие нормальной скоростью роста. Регенерирующие из них растения были устойчивыми к начальной стадии инфекции (Лутова Л.А., 2003).

Из *Fusarium* выделяли грубо очищенные экзотоксины. Активность токсинов определяли путем измерения ингибирования активности дыхания клеток суспензионной культуры картофеля. Концентрация токсинов, которая была выше в 100-500 раз по сравнению с используемой для селекции, полностью ингибировала дыхание в течение 30 минут. Селекция проводилась на культуре протопластов с применением стандартных концентраций токсинов, при которых выживали и делились 1-5% протопластов. Из двух дигамплоидных линий картофеля было выделено и регенерировано по 1500 протоклонов, среди которых были ди- и тетраплоиды. В результате повторного тестирования листьев или вторичного каллуса из выделенных растений показано значительное увеличение устойчивости к токсинам. Действие токсинов определялось по приросту каллуса на среде с токсином или по размеру пятен после инокуляции листовых пластинок. Отобранные клоны были размножены и высажены для оценки в полевых испытаниях.

В отношении многих патогенов, для которых патотоксины в чистом виде не выделены или не изучены, для селекции на устойчивость используются культуральные фильтраты. Необходимой предпосылкой их применения являются определение их роли в заболевании, изучение корреляции устойчивости к патогену у растений и культивируемых *in vitro* клеток.

Так, была обнаружена прямая корреляция между устойчивостью *in vivo* к *Fusarium* у гвоздики и устойчивостью на уровне клеток к культуральной жидкости этого патогена. Устойчивые к патогену сорта гвоздики соответственно характеризовались

аккумуляцией фитоалексинов в каллусных тканях при их обработке препаратами клеточной стенки мицелия, играющих роль элиситоров.

Пассируя каллусную ткань дигамплоидных линий картофеля, обладающих высокой регенерационной способностью, на среде с токсической концентрацией культурального фильтрата *Phytophthora infestans* были выделены устойчивые клеточные клоны, давшие начало растениям. При механической инокуляции листьев спорами *Phytophthora* у 3 из 34 выделенных растений обнаруживались очаги поражения, значительно меньше по сравнению с контролем. Данная техника селекции пригодна для получения растений с общей устойчивостью к *P. infestans*.

В клеточной селекции активно используются и другие приемы и технологии для получения *in vitro* устойчивых к болезням растений. В первую очередь – это соматическая изменчивость. Соматическая изменчивость как источник генетического разнообразия растений представляет особый интерес при отсутствии соответствующего селективного агента или когда устойчивость не экспрессируется на клеточном уровне.

Значительный прогресс достигнут в изучении молекулярных механизмов устойчивости растений к болезням, биохимических путей синтеза многих веществ, таких как фитоалексины, которые могут служить биохимическими маркерами устойчивости. Хотя фитоалексины во многих случаях не играют первостепенную роль в защите растительных организмов от болезней, идентификация их специфических элиситоров позволит подойти к более глубокому пониманию устойчивости, наметить пути повышения защиты растений от заболеваний. Фитоалексины или другие биохимические индикаторы устойчивости, биосинтез которых можно индуцировать биотическими или абиотическими элиситорами у культивируемых клеток и даже протопластов, найдут применение в идентификации клеточных линий, растений, дающих положительный ответ.

Перспективным в селекции на устойчивость является использование иммунологических и молекулярно-биологических технологий для определения первичных продуктов генов или специфических нуклеиновых кислот, связанных с устойчивостью культивируемой клетки [5].

Основополагающими в совершенствовании культурных форм растений остаются межвидовая и межродовая гибридизации с дикими видами, носителями признаков устойчивости. Успешный перенос генов устойчивости путем традиционного скрещивания, достигнутый во многих комбинациях видов, получил новое развитие с привлечением метода культуры *in vitro* незрелых зародышей. Часто спасение зародышей в культуре является необходимым элементом технологии получения гибридных растений. В частности, таким образом были созданы сескви- и тетраплоиды томата. Удвоение числа хромосом и

повторяющееся беккроссирование иногда позволяют получать стабильные линии с парой хромосом дикого вида, а рекомбинация при облучении может вести к стабильному включению донорного фрагмента ДНК в геном культурального растения [6].

Соматическая гибридизация культурных растений с близко-родственными дикими видами, устойчивыми к заболеваниям, является альтернативой половой гибридизации. Путем соматической гибридизации был перенесен признак устойчивости к фитофторе и вирусу скручивания листьев из *Solanum brevidens* в картофель. Устойчивость к некоторым вредителям проявлялась у соматических гибридов, полученных в результате слияния протопластов баклажана и устойчивого вида *Solanum sisymbriifolium* (Пахомова В.М., 2014). Перенос генов путем слияния протопластов, как и при половой гибридизации, ведет к переносу многих генов, большая часть которых кодирует нежелательные признаки. Для получения из гибридов форм растений с нужной комбинацией родительских признаков применяют беккроссирование или другие схемы, в которых используется половое скрещивание. При использовании метода «гамма» слияние протопласты одного партнера перед слиянием облучают высокими дозами γ -радиации. Это позволяет осуществлять перенос отдельных ядерных признаков устойчивости в филогенетически отдаленных комбинациях видов, а также цитоплазмы и признаков, кодируемых ее генетическими детерминантами [6].

В конце XX века огромным размахом получили работы по переносу генов, основанные на использовании техники рекомбинантной ДНК. Гены могут быть заимствованы из таких источников, как животные, бактерии, вирусы, а также растения, и введены в культурные виды растений. Данная техника переноса ДНК позволяет использовать существующий природный генофонд и вновь синтезированные молекулы ДНК, осуществлять контролирование тканеспецифичности и уровня экспрессии перенесенных генов. Методами генной инженерии сконструированы растения, в которых показана экспрессия чужеродных генов устойчивости к болезням и вредителям. Значительный прогресс достигнут в разработке мер защиты растений от вирусных инфекций.

В результате совместных исследований КазНИИКО и Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина впервые в Казахстане была проведена трансформация генов растений картофеля на сортах Седов, Луговской, Тамаша бактериальными клонами *Agrobacterium tumefaciens*, несущими смысловую и антисмысловую ДНК к 129-228 положению S-нетранслируемой области РНК У-вируса картофеля. Наличие этих вставок в трансгенных растениях подтверждено методом ПЦР с использованием специфических праймеров, а так же в полевых условиях на провакационном фоне У-вируса картофеля. Методом антисмысловой РНК вируса У были созданы

ряд исходных форм, устойчивых к данному вирусу на уровне иммунитета [7].

На основе клеточной селекции в КазНИИКО были созданы сорта устойчивые к наиболее распространенным в Казахстане патогенам – это Орбита, Орал, Тамаша, Тохтар, Шаруа и другие. Эти сорта широко используются в практике картофелеводства в РК и показывают достаточно высокую устойчивость к фитоинфекциям в полевых условиях [8]. Это доказывает, что работы в этом направлении имеют большую практическую ценность и значимость.

Литература

1. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция / Отв. ред. Глеба Ю.Ю. – Киев: Наук. думка, 1990. – 280 с.
2. Генкель П.А. Физиология устойчивости растительных организмов // Физиология сельскохозяйственных растений. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1967. – Т. 3. – С. 87-325.
3. Каримова В.К., Нечай Н.Л., Есимсеитова А.К. и др. Использование штаммов гриба *Phytophthora infestans* в клеточной селекции картофеля/ Биотехнология, теория и практика, № 4, 2013. С. 36- 41.
4. Гродзинский Д.М. Надежность растительных систем. – Киев: Наук. думка, 1983. – 366 с.
5. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений: Учебник. – СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2003. – 228 с.
6. Пахомова В.М. Бунтукова Е.К. Клеточная селекция. Казань: Изд-во Казанского ГАУ. 2014. - 33 с.
7. Красавин В. Ф. Селекция картофеля на юго-востоке Казахстана. Алматы: Онер, 2009. – 223 с.
8. Айтбаев Т. Е, Швидченко В. К., Токбергенова Ж. А., Хасанов В. Т. Картоп дақылының шығу тарихы // С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің ғылым жаршысы.. – 2010. – № 3. – С. 37-46