

УДК: 633.34:578:632.3

К.Р. Уразалиев\*, А.М. Абекова, Т.А. Базылова

ТОО «Казахский Научно Исследовательский Институт Земледелия и Растениеводства, Казахстан, г. Алматы

\*e-mail: kairatu@mail.ru

### **Морфогенез и регенерация линий сои устойчивых к патогенам корневой гнили полученных на основе соматоклональной вариации**

Проведены исследования по изучению влияния культурального фильтрата (КФ) корневой гнили на развитие, морфогенез и регенерацию различных сортов сои. Выявлено, что при 10% концентрации КФ морфогенез был более интенсивный. При 30% концентрации КФ обладал угнетающим действием. Полученные семена потенциально устойчивых к корневой гнили растений-регенерантов сои были переданы селекционерам.

**Ключевые слова:** культурный фильтр, морфогенез, регенерация, корневая гниль.

К.Р. Уразалиев, А.М. Абекова, Т.А. Базылова

#### **Соматоклональді вариация негізінде алынған түбірлік шіріндісінің патогендеріне тұрақты соя линияларының регенерациясы мен морфогенезі**

Сояның әр түрлі сорттарға дамытуға, морфогенезге және қайта өндіруге түбірлік шірік культуралдық фильтрат ықпалымен зерттеулер өткізілген. 10% КФ концентрациясы морфогенезге, көп қарқынды екенін айқындалған. 30% концентрация КФ жаман әсер етті. Сояның өсімдік түбірлік шірікке төзімді алынған тұқымдарын КЕЖӨШҒЗИ селекционерлерге тапсырған еді.

**Түйін сөздер:** культуралдық фильтрат, морфогенез, регенерация, түбірлік шірік.

K.R.Urazaliev, A.M.Abekova, T.A.Bazylova

#### **Morphogenesis and regeneration of soybean lines resistant to root rot pathogens derived from somaclonal variation**

Was studied on the influence of culture filtrate (CF) of the root rot on the development, morphogenesis and regeneration of different soybean varieties. It was revealed that 10% of the concentration of CF morphogenesis was more intense. At 30% concentration of CF had a depressing effect. The seeds obtained potentially resistant to root rot from regenerated plants were transferred to soybean breeders.

**Key words:** culture filtrate, morphogenesis, regeneration, root rot.

В последние годы Казахстан активно наращивает производство одной из ценных конкурентоспособных бобовых культур – сои, использование которой очень многообразно и универсально. Основным регионом возделывания сои является юг и юго-восток Казахстана, где посевные площади ее составляет около 50 тыс. га. Для большого разнообразия почвенно-климатических условий Казахстана требуются сорта, устойчивые к абиотическим и биотическим стрессам, и прежде всего сорта, устойчивые к болезням. Создание форм, сортов и гибридов растений, устойчивых к биотическим факторам является одним из важных направле-

ний селекции. Это обусловлено большими потерями урожая сельскохозяйственных растений, вызванными поражением их грибными, бактериальными и вирусными болезнями и повреждением вредителями.

Создание исходного селекционного материала, устойчивого к экстремальным факторам среды, включая токсины патогенов и другие неблагоприятные воздействия, возможно при использовании методов клеточной селекции [1]. Грибы рода фузариум поражают растения, вызывая у них различные патологические явления — гниль корней, семян, плодов, а также общее угнетение и преждевременное увядание.

Тип проявления болезни зависит с одной стороны от видовой принадлежности патогенов, а с другой от экологических условий, в которых они развивались. К наиболее распространенным фузариозным заболеваниям относятся гниль корней и трахеомикозное сосудистое увядание растений [2].

Целью нашей работы являлось создать линии сои, устойчивые к филтратам патогенов корневой гнили на основе соматоклональной вариации.

Патогенные свойства грибов рода *Fusarium* определяли по методике, разработанной в Украинском институте защиты растений [3].

Токсичность культурального филтратов гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* на семенах сои, определяли на проростках сои по проценту пораженных растений, где поражение перешло на стебель и длине пятна поражения стебля [4].

#### Результаты исследований и обсуждение

Известно, что встречается несколько типов проявления фузариозов: корневая гниль, гибель точки роста, увядание, пятнистость листьев, загнивание бобов и семян. На всходах болезнь проявляется в виде побурения корневой шейки и корня. На семядолях – глубокие бурые язвы, во влажную погоду покрывающиеся бело-розовым мицелием гриба.

Из семян сои были выделены и очищены два вида гриба вызывающие корневую гниль. Выделенные грибы отличались по морфологии. Идентификация показала, что один из них с розовой окраской *Fusarium. heterosporum*, а с белой окраской – *Fusarium solani*.

Цитологический и микробиологический анализ этого гриба был проведен совместно с лабораторией микробиологии КазНИИЗиР к. б. н. Титовой И.А. и с институтом Молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина МОН РК г.Алматы, а также в Казахском Агротехническом Университете им. С. Сейфуллина г. Астана – доктором биологических наук Науановой А.П. Таким образом, из семян и всходов сои выделены 2 вида фузариозных грибов: *F.heterosporum* Nees. – фузарий разноспоровый, *F.solani* (Mart) Appl.et Wr. – фузарий пасленовый.

Для получения чистых культур патогенов корневой гнили, изоляты многократно пересаживались в пробирки с питательной средой Ча-

пека (рисунок 1а). Чистые культуры корневой гнили показаны на рисунке 1 б, в.

Для идентификации патогенов фузариозной гнили (виды рода *Fusarium*) использовались морфологические и культуральные признаки, опубликованные М.А. Литвиновым [5]. У сои идентифицированы 27 генов, контролирующих устойчивость к различным болезням из которых 20 имеют доминантную моно- или дигенную и 7 - рецессивную природу.

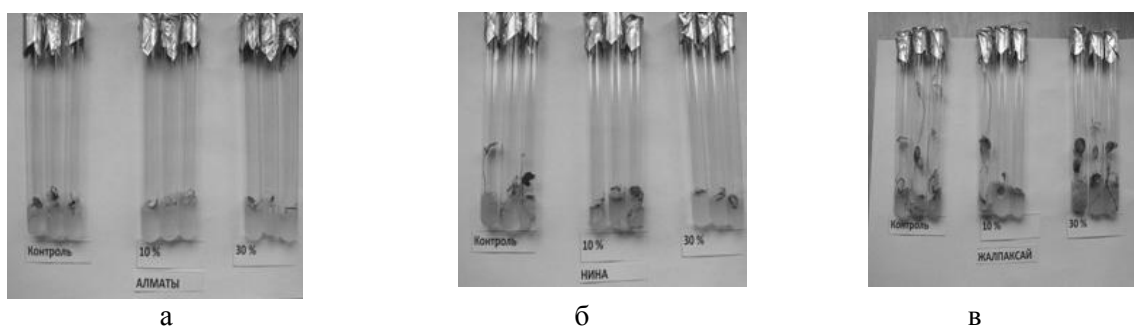
Известно, что устойчивость к возбудителю болезни и толерантность к выделяемому паразитом токсину контролируются разными генами. Следовательно, отбор следует вести на устойчивость к возбудителю и на выносливость к патогену [6].

Из чистой культуры гриба *F.solani* (Mart) Appl.et Wr. был получен культуральный филтрат (КФ), путем культивирования гриба на жидкой синтетической среде Чапека. Выявлено, что накопление биомассы гриба на 12-14 сутки достигает максимума и составляет 1,25-1,37 г на 100 мл культуральной жидкости, при дальнейшем культивировании накопление биомассы не происходит и начиная с 16 дня, этот показатель остается постоянным. Установлено, что оптимальной концентрацией рН среды для накопления биомассы является рН (5,0-6,0) [5].

Были посажены на три питательных среды МС (МС – стандартная среда, МС+10% КФ патогена гриба *F.solani* (Mart) Appl.et Wr., МС+30% КФ патогена гриба *F.solani* (Mart) Appl.et Wr.) по 100 незрелых зародышей, 10 сортов сои. После посадки зародышей на питательные среды через каждые 4 недели проводили пересадку (пассаж) каллусов на новые питательные среды. Экспланты культивировали на рассеянном свете при 16-часовом фотопериоде и температуре 18-20°C. На 20-25 сутки на многих образцах образовывалась каллусная масса зеленоватого цвета. Образование каллусов и регенерация растений зависела от генотипа. В контрольной питательной среде хорошую каллусообразующую способность показали почти все генотипы сои. Однако процесс регенерации почти у всех был низкий. Самой высокой каллусообразующей и регенерирующей способностью в контроле обладал сорт Жалпаксай. На 10 и 30% концентрации КФ *in vitro* влияли на рост и развитие сои, ингибируя эти процессы (рисунок 2 а, б, в). Большим угнетающим действием обладала



**Рисунок 1** – Пересадка (а) и чистые культуры патогенов корневой гнили (б, в)



**Рисунок 2** - Влияние 10 и 30% о концентраций КФ *F. solani* (Mart.) Appel et Wr. на рост и развитие сои в *in vitro*

**Таблица 1** - Морфогенез сортов сои на среде Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением различных концентраций КФ корневой гнили сои

Содержание КФ	Надежда	Нина	Декабик	Жалпаксай	Казахстанская-2309	Алматы	Протина	Мисула
<b>Эмбриогенез, шт.</b>								
0%	52,0	48,0	34,0	57,0	36,0	18,0	69,0	33,0
10%	43,0	58,0	43,0	71,0	11,0	39,0	40,0	16,0
30%	7,0	46,0	22,0	46,0	9,0	44,0	14,0	36,0
<b>Каллусогенез, %</b>								
0%	63,40	81,30	67,60	76,00	86,10	55,60	71,00	57,60
10%	46,50	8,60	39,50	32,40	72,70	5,10	62,50	62,50
30%	42,90	19,60	18,20	41,30	11,10	-	35,70	5,60
<b>Морфогенез %</b>								
0%	36,50	18,80	32,40	34,00	13,90	44,40	29,00	42,40
10%	-	8,60	60,40	15,50	27,30	20,50	37,50	37,50
30%	28,60	8,70	36,30	28,30	-	20,40	21,40	11,10



а



б

Растения – регенеранты рисунок – 1 (а), регенеранты в теплице (б)

### Рисунок 3 – Устойчивые к корневой гнили растения-регенеранты

30% концентрация КФ патогена *Fusarium solani* (Mart.) Appel et Wr.

По морфологическим признакам побеги-регенеранты были неоднородны по структуре, что возможно связано с гетерогенностью каллусов [7]. Размах морфогенетического потенциала на питательной с 10% КФ варьировал от 8,6% до 60,4%; на питательной среде с 30% КФ варьировал от 8,7% до 36,3%. Из таблицы 1 видно, что на среде с 10% КФ каллусообразование варьировало от 5,1% до 72,7% ; с 30% КФ варьировало от 5,6% до 42,9%. Отдельные генотипы сортов Алматы, Протина, Надежда регенерировали и при 30% концентрации КФ, но не все дошли до образования бобов, рисунок 3.

Таким образом, 10 и 30% концентрации КФ *Fusarium solani* (Mart.) Appel et Wr. влия-

ют на рост и развитие растений. При этом 10% концентрации КФ дало больше морфогенных структур. Угнетающим действием обладала 30% концентрация КФ патогена *Fusarium solani* (Mart.) Appel et Wr.

Было получено значительное количество побегов сои, однако не все цветки завязались, полученные семена 166 шт. были переданы селекционерам для дальнейшей работы с ним. 10% концентрация культурального фильтрата (КФ) более благоприятна для проведения клеточной селекции на устойчивость к патогенам. 30% концентрация КФ обладает угнетающим действием и менее пригодна для клеточной селекции. Дальнейшие наши исследования проводятся при 10% концентрации КФ.

### Литература

- 1 Асанов А.М., Омелянюк Л.В. Аспекты селекционно-генетического улучшения сои для условий юга Западной Сибири, //Достижения науки и техники АПК.-2008.- № 12, с. 17-20.
- 2 Какимжанова А.А., Науанова А.П. Биологические особенности гриба *Fusarium graminearum* schwabe и применение его метаболитов в клеточной селекции пшеницы //http://www.kaznu.kz/content/files/pages/folder261/Kakim-janova.doc
- 3 Шендрик К.М. Этиология и патогенез корневых гнилей сои, биологическое обгрунтування мероприятий ограничения их развития в Северной Лесостепи Украины //Автореф. дис... канд. биол. наук: 06.01.11. Нац. аграр. ун-т. укр. - К., 2002, с.19.
- 4 Бородин С. Г., Котлярова И. А., Терещенко Г. А. Методы искусственного заражения подсолнечника грибами рода *Fusarium* //Масличные культуры. Научно-технический бюллетень, ВНИИМК, 2006, Вып. 2. (135).
- 5 Литвинов М.А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов //Ленинград. Изд. : Наука. 359 с.
- 6 Mazarei M., et al. Gene expression profiling of resistant and susceptible soybean lines infected with soybean cyst nematode, 2011, *Theor.Appl.Genet.*, v.123/7, p. 1193-1206.
- 7 Бутенко Р.Г. Клеточные и молекулярные аспекты морфогенеза растений *in vitro* III Чайлахян. чтения. Пушкино: Пушкинский НЦ, 1994. — С. 7-26.

**Reference**

- 1 sanov A.M., Omelyanyuk L.V. Aspekty selektsionno-geneticheskogo uluchsheniya soi dlya usloviy yuga Zapadnoy Sibiri, // Dostizheniya nauki i tehniki APK.-2008.- # 12, s. 17-20.
- 2 Kakimzhanova A.A., Nauanova A.P. Biologicheskie osobennosti griba *Fusarium graminearum* Schwabe i primeneniye ego metabolitov v kletchnoy selektsii pshenitsy // <http://www.kaznu.kz/content/files/pages/folder261/Kakim-janova.doc>
- 3 Shendrik K.M. Etologiya i patogenez kornevykh gniley soi, biologicheskoe obgruntovaniye meropriyatiy ogranicheniya ih razvitiya v Severnoy Lesostepi Ukrainy // Avtoref. dis... kand. biol. nauk: 06.01.11. Nats. agrar. un-t. ukp. - K., 2002, s.19.
- 4 Borodin C. G., Kotlyarova I. A., Tereschenko G. A. Metody iskusstvennogo zarazheniya podsolnechnika gribami roda *Fusarium* // Maslichnyye kultury. Nauchno-tehnicheskyy byulleten, VNIIMK, 2006, Vyip. 2. (135).
- 5 Litvinov M.A. Metody izucheniya pochvennykh mikroskopicheskikh gribov // Leningrad. Izd. : Nauka. 359 s.
- 6 Mazarei M., et al. Gene expression profiling of resistant and susceptible soybean lines infected with soybean cyst nematode, 2011, *Theor.Appl.Genet.*, v.123/7, p. 1193-1206.
- 7 Butenko R.G. Kletchnyye i molekulyarnyye aspekty morfogeneza rasteniy in vitro III Chaylahyan. chteniya. Puschino: Puschinskiy NTs, 1994. — S. 7-26.