

**Биотехнология. Культура клеток и тканей**

УДК 633.853.494:57.085.23/.25:632.938

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕГЕНЕРАНТОВ ЯРОВОГО РАПСА  
НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ НИСТАТИН,  
И ОЦЕНКА ИХ УСТОЙЧИВОСТИ К ВРЕДНЫМ НАСЕКОМЫМ**

**В.В. МАЗИН, Т.А. ПОПОВА, Н.В. ХАДЕЕВА, А.Б. БУРГУТИН,  
А.Н. МАЙСУРЯН, П.Н. ХАРЧЕНКО, Е.Ю. ЯКОВЛЕВА**

Разрабатывали регламент отбора регенерантов ярового рапса на селективных питательных средах, содержащих нистатин. Отобранные на селективной среде растения-регенеранты проверяли на устойчивость к нистатину, учитывая укореняемость микрочеренков и частоту каллусообразования. В полевых и лабораторных условиях проводили энтомологическую оценку устойчивости (восприимчивости) полученных растений рапса к вредным насекомым.

Защита сельскохозяйственных культур от вредных насекомых имеет большое экономическое значение. В настоящее время происходит смена парадигм защиты растений от вредных организмов. Согласно существующей парадигме культурные растения окружены множеством вредителей и возбудителей болезней, которых необходимо уничтожать. С этой целью используют агротехнические, биологические и химические средства защиты растений. Последние наиболее опасны как для окружающей среды, так и для сельскохозяйственной продукции и в конечном счете для человека. В соответствии с новой парадигмой необходимо сделать культурное растение, способным к самозащите, то есть устойчивым к вредным организмам. Сделать так, чтобы сельскохозяйственная культура перестала быть растением-хозяином, а значит поражаться теми или иными вредителями и возбудителями болезней. В этом случае отпадает необходимость применения химических средств защиты растений (1). Использование методов биотехнологии и генетической инженерии открывает новые перспективы получения таких растений.

Зависимость насекомых от стеринов растений можно рассматривать как один из видов зависимости паразитов от своего растения-хозяина (2). Стероидные гормоны образуются у насекомых из предшественников, которые они получают из кормовых растений, так как сами неспособны их синтезировать (3). На этом строится селекционная стратегия: создав растения с измененным метаболизмом стероидных соединений их можно сделать непригодными в качестве корма для насекомых, то есть нарушается цепочка превращений у последних, и соответственно понижается плодовитость и численность популяции вредителей.

Идею о создании форм растений, устойчивых к насекомым посредством изменения метаболизма стероидных соединений высказали Инге-Вечтомов с соавт. (4). Работы же по получению штаммов каллусных тканей растений с измененным составом и количеством стеринов проводили с применением полиеновых антибиотиков (ПА) в качестве селективного агента с начала 80-х годов прошлого столетия (5). Присутствие в питательной среде ПА угнетало рост культивируемых клеток. Считается, что ПА (нистатин, амфотерицин-Б и др.) образуют со стеринами мембран клеток прочные комплексы. При этом резко возрастает проницаемость мембран для низкомолекулярных метаболитов, после чего мембрана разрушается и клетка гибнет (6). Селекция на устойчивость к ПА позволяет выделить формы растений с измененным синтезом стеринов (7-10).

Целью настоящей работы была разработка метода отбора *in vitro* растений ярового рапса на селективных питательных средах, содержащих нистатин, и оценка полученных генотипов на устойчивость к вредным насекомым

— капустной белянке (*Pieris brassicae* L.) и персиковой тле (*Myzodes persicae* Sulz.).

**Методика.** Исходным материалом служили 5-суточные проростки семян ярового рапса сорта Ратник. Семена замачивали в воде на 3 ч и стерилизовали в 0,1 % растворе сулемы в течение 12 мин, после чего их высевали в чашки Петри на агаризированную питательную среду В5 (по Гамборгу), содержащую также сахарозу (1 %) и кинетин (0,5 мг/л). У проростков отсекали семядольные листочки и использовали их как первичные экспланты для получения регенерантов на среде с нистатином. Регенерацию побегов de novo получали из первичных эксплантов на модифицированной среде В5, содержащей  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , глутамин, БАП, НУК, сахарозу и агар-агар — соответственно 300, 100, 3, 1 мг/л, 3 и 0,7 % (контроль) (11). При проведении селекции в питательную среду дополнительно вводили нистатин в различных концентрациях (опыт). Для приготовления маточного раствора нистатина в 50 мл 2 % водного раствора ДМСО или в 50 мл 96° этанола растворяли 2500 тыс. ед. антибиотика. Предварительные опыты показали, что при концентрации ДМСО 0,05 % регенерация эксплантов снижалась до 47 %. Поэтому мы создали набор сред с различной концентрацией нистатина, для чего в теплую агаризованную питательную среду для регенерации вводили соответствующее количество раствора нистатина.

Отобранные на селективной среде растения-регенеранты проверяли на устойчивость к нистатину, учитывая укореняемость микрочеренков на среде, содержащей 200 тыс. ед/л нистатина, или частоту каллусообразования (% от исходного числа эксплантов). Отобранные клоны вместе с исходной формой сорта Ратник поддерживали в пробирочной культуре на питательной среде с компонентами по Мурасиге-Скугу, содержащей также сахарозу (1 %) и агар-агар (0,7 %); рН 5,6-5,9 (12). Культуры поддерживали в условиях фитотрона ИФР РАН: фотопериод — 16/8 ч, освещенность 4000 лк (лампы ЛБ 40), температура днем и ночью соответственно 25-26 и 20-22 °С.

Для оценки регенерантов рапса на устойчивость (восприимчивость) к вредным насекомым в природных условиях клоны из пробирок переносили в стаканчики с торфяным субстратом для адаптации. В начале июня адаптированные растения высаживали на опытный участок, где культивировали, согласно надлежащим агротехническим требованиям с поливом. Регистрировали видовой состав вредителей, их основные популяционные показатели, пищевую избирательность насекомых, физиологическое состояние и степень поврежденности растений. Учеты проводили на протяжении всего периода вегетации.

Для оценки численности популяции персиковой тли (*Myzodes persicae* Sulz.) клоны из пробирок также высаживали в стаканчики с торфяным субстратом для адаптации, а затем через 1,5-2 мес — в вазоны в теплице. Заселение регенерантов рапса персиковой тлей и анализ динамики численности вредителя осуществляли по мере роста и развития растений. Статистическую обработку данных проводили методом дисперсионного анализа с использованием статистической программы STRAZ.

**Результаты.** Из исследованных первичных эксплантов (первичный или пассируемый каллус, семядольные листочки, фрагменты листьев и стеблей) лучшие результаты были получены на семядольных листьях проростков рапса. При увеличении концентрации нистатина наблюдалось закономерное уменьшение доли регенерантов (табл. 1).

При концентрации антибиотика 200 и 350 тыс. ед/л выход регенерантов составил соответственно 41,5 и 37,0 %. Эти концентрации были использованы в составе питательных сред как селективные. После отбора на питательной среде, содержащей селективный фактор, регенеранты переносили на среду без антибиотика для укоренения. Далее проводили микрочеренкование, создавая клоновую популяцию генотипов с предположительно измененным метаболизмом сте

**1. Количество регенерантов ярового рапса сорта Ратник при различных концентрациях нистатина в питательной среде (% от исходного количества эксплантов)**

Контроль (0,1 % этанол)	Концентрация нистатина, тыс. ед/л			
	200	350	500	1000
73,0	41,5	37,0	17,7	11,0

Для оценки влияния антибиотика на каллусогенез мы провели специальный эксперимент. При этом учитывали количество каллусных клонов на питательных средах, содержащих нистатин в концентрациях 200 и 500 тыс. ед/л (табл. 2).

**2. Количество каллусных клонов ярового рапса в зависимости от концентрации нистатина в питательной среде (% от исходного количества эксплантов)**

Сорт, № клона	Концентрация нистатина, тыс. ед/л		
	0	200	500
Ратник (контроль)	97	38	5
23	95	72	40
25	100	72	41
32	96	59	25
37	100	63	60
39	88	73	45
42	92	61	32
47	100	75	28

нов составляло 25-60 %, что в 5-12 раз превышало показатель в контроле — 5 %. Устойчивость к нистатину у значительного числа генотипов каждого клона сохранялась на уровне недифференцированных клеток и тканей.

Регенеранты, полученные на селективных средах, имели множество морфофизиологических отклонений от нормы. Мы отбраковывали полностью или частично альбиносные растения, а также с ослабленным ростом и другими нарушениями развития. Клоновые популяции адаптировали к условиям почвенной культуры и переносили в теплицу для доращивания. Оценку на устойчивость к насекомым проводили в условиях открытого и защищенного грунта.

**3. Динамика численности капустной белянки на растениях ярового рапса, выращенных из клонов, при естественном заселении в открытом грунте по датам учетов**

Вариант опыта	Число растений/число насекомых	14 июня (через 7 сут)	25 июня (через 18 сут)	2 июля (через 25 сут)	12 июля (через 35 сут)	30 июля (через 58 сут)
Клон № 37	10/1	1,0±1,0*	0	0	0	0
Клон № 39	2/0	0	0	0	0	0
Контроль (сорт Ратник)	6/1-2	0	1,0±0,8*	0,3±0,3**	0	10,0±6,4*
Капуста брокколи (стандарт)	16/3	4,6±2,8*	2,9±2,0**	2,3±1,6***	0	6,2±3,6*

\* Яйца. \*\* Личинки первого возраста. \*\*\* Личинки третьего-пятого возраста.

В период вегетации на растениях рапса и капусты брокколи (стандарт) были зафиксированы следующие виды насекомых: капустная совка (*Mamestra*

ринов. Эти растения вновь помещали на питательную среду, содержащую 200 тыс. ед/л нистатина для повторного отбора устойчивых растений.

Наряду с описанной системой отбора мутантных регенерантов проводили однократную селекцию на средах, содержащих более высокие концентрации нистатина, которые полностью подавляли регенерацию при последующих пассажах: 500 и 1000 тыс. ед/л.

На среде без нистатина количество каллусных клонов варьировало от 88 до 100 %. В контроле при увеличении концентрации нистатина наблюдалось значительное снижение интенсивности каллусогенеза (с 97 до 38 % при концентрации нистатина 200 тыс. ед/л и до 5 % — 500 тыс. ед/л). Степень каллусогенеза у клонов при концентрации нистатина 200 тыс. ед/л была значительно выше, чем у исходного генотипа: контроль, клоны №№ 42 и 47 — соответственно 38, 61 и 75 %. При концентрации нистатина 500 тыс. ед/л количество каллусных кло-

*brassicae* L.), капустная белянка (*Pieris brassicae* L.), в незначительных количествах капустная моль (*Plutella maculipennis* Curt.) и репная белянка (*Pieris rapae* L.), а также капустная тля (*Brevicoryne brassicae* L.) и персиковая тля (*Myzodes persicae* Sulz.).

Наибольшее количество личинок капустной белянки было отмечено нами на растениях капусты брокколи (стандарт) (табл. 3). Из 16 растений в эксперименте насекомыми были заселены три, причем обнаружены как яйца, так и личинки различного возраста. В контроле насекомые встречались на одном-двух образцах из шести, участвующих в эксперименте, причем появились они на 11 сут позже, чем на растениях капусты брокколи. Капустная белянка за 58 сут ни разу не была зафиксирована на экспериментальных растениях клона 39. Слабая степень поражения отмечена у образцов клона 37: из 10 лишь на одном на 7-е сут была зафиксирована небольшая кладка вредителя (10 яиц); позже на растениях этого клона насекомые выявлены не были.

При создании новых растений с нужными свойствами очень важно уже на первых этапах выделить наиболее перспективные образцы. Желательно проводить тестирование в максимально сжатые сроки и с минимальными затратами труда. Оценивая различные тест-объекты мы пришли к выводу, что в наибольшей степени этому требованию могут отвечать различные виды тлей, питающихся на растениях рапса: персиковая и капустная (табл. 4).

#### 4. Численность персиковой тли на растениях ярового рапса, выращенных из клонов в теплице

Сорт, клон	Время учета, сут					
	7-е		14-е		26-е	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Ратник (контроль)	273,0	100	456,3	100	202,6	100
23	0*	0	114,3*	25,0	100,7*	49,7
25	104,0	38,1	189,3*	41,5	85,7*	42,3
29	302,3	110,7	546,0	119,7	152,3	75,1
48	131,7	48,2	212,7*	46,6	126,0*	62,2
НСР <sub>05</sub>	182,9		163,0		75,9	
F <sub>φ</sub>	4,64		13,01		3,69	
F <sub>05</sub>	3,48					

\* Достоверность различий при НСР<sub>05</sub>.

Численность персиковой тли (количество особей на одно растение) на растениях ярового рапса сорта Ратник (контроль) на 7, 14 и 26-е сут учета составляла соответственно  $273,0 \pm 106,95$ ;  $456,3 \pm 23,86$  и  $202,6 \pm 23,70$  особей, то есть максимум приходился на 14-е сут. Численность тли на растениях-регенерантах, прошедших отбор на селективных питательных средах, в ряде случаев существенно отличалась от таковой в контроле. Рассмотрим сначала клон № 29, у растений которого динамика численности персиковой тли была такой же, как в контроле — максимум на 14-е сут. Однако аналогичные по динамике показатели этого образца заметно различались по количественным характеристикам. Показатели клона № 29 практически повторяли таковые в контроле, лишь ненамного отличаясь: на 7, 14 и 26-е сут — соответственно 110,7; 119,7 и 75,1 %. Растения, выращенные из клонов №№ 25 и 48, характеризовались гораздо более низкой степенью заселенности особями этого вредителя (см. табл. 4). На растениях клона № 23 на 7-е сут насекомые отсутствовали, а далее наблюдалось постепенное увеличение их численности, которое, однако, было существенно и достоверно ниже контроля. Следовательно, растения, выращенные из клона № 23 характеризуются повышенной устойчивостью к заселению вредными насекомыми.

Таким образом, нами показано, что введение в питательную среду нистатина (антибиотик полиеновой природы) ингибирует рост каллусной ткани *in vitro*, а также вызывает снижение регенерационной способности у экс-

плантов семядолей ярового рапса. Ингибирование роста каллусной ткани при внесении в питательную среду нистатина дает основания полагать, что изменения метаболизма происходят на уровне клеток и недифференцированной ткани и могут быть связаны с нарушением обмена стерина. Клоны ярового рапса, отобранные на селективных питательных средах, содержащих нистатин, характеризуются повышенной устойчивостью к капустной белянке (*Pieris brassicae* L.) и варьированием показателей (как в сторону увеличения, так и снижения) иммунитета к персиковой тле (*Myzodes persicae* Sulz.). Последнее обстоятельство дает основание для проведения отбора измененных генотипов с повышенной устойчивостью к вредным насекомым, а также свидетельствует о ненаправленном действии нистатина.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. М а з и н В.В., Х и т р о в а Л.М., Самозащита растений, или смена парадигм. С.-х. биол., 2001, 3: 37-42.
2. Т а р л а к о в с к и й С.А. Стерины: их метаболизм, функции и роль во взаимоотношениях растений с вредными организмами. В сб.: Биохимические аспекты проблем защиты растений от болезней, вредителей и сорняков, 1977, 52: 53-65.
3. F o g l e m a n J., D u r e g g e t S., K i r c h e r H. The role of phytosterols in host plant utilization by cactophilic drosophila. *Lipids*, 1986, 21, 1: 92-96.
4. И н г е - В е ч т о м о в С.Г., Л у ч н и к о в а Е.М. Почему лисички не червивеют, или некоторые проблемы экологической генетики. *Природа*, 1992, 5: 26-32.
5. C h i u P.L., B o t t i n o P.J., P a t t e r s o n G.W. Sterol composition of nystatin and amphotericin-B resistant tobacco calluses. *Lipids*, 1980, 15: 50-54.
6. C a s t a n h o M., C o u t i n h o A., P r i e t o M. Absorption and fluorescence spectra of polyene antibiotics in the presence of cholesterol. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 1: 204-209.
7. Л у т о в а Л.А., Л е в а ш и н а Е.А., Б о н д а р е н к о Л.В. и др. Мутанты высших растений по биосинтезу стерина. *Генетика*, 1992, 28, 2: 129-137.
8. Х о д ж а й о в а Л.Т., У с о л ь ц е в а Е.А., А с е е в а Е.А. и др. Клеточная селекция растений картофеля, устойчивых к фитофторозу, с использованием веществ, нарушающих метаболизм стерина. *Физиол. раст.*, 1998, 45, 2: 283-288.
9. И н г е - В е ч т о м о в С.Г., Л у т о в а Л.А., У с о л ь ц е в а Е.А. и др. Способ получения растений с комплексной устойчивостью к фито-стеринзависимым вредителям. Патент РФ № 2141196 А 01 н 4/00 от 14.12.99.
10. А н д р е е в а Е.А., Б о г о м а з Д.И., Ш у м и л и н а Г.М. и др. Использование методов клеточной селекции для получения растений, устойчивых к патогенам рода *Phytophthora*. VIII International Conference «The biology of plant cells in vitro and biotechnology». Saratov, 2003: 25.
11. М а з и н В.В., И в а ш у т а С.И. Регенерация озимого рапса in vitro для проведения генетической трансформации. *Физиол. раст.*, 1994, 41, 3: 440-442.
12. М и г а ш и г е Т., С к о о г Ф. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 1962, 15, 3: 473-497.

Всероссийский НИИ сельскохозяйственной  
биотехнологии, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42

Поступила в редакцию  
4 мая 2005 года

#### ISOLATION OF SUMMER RAPE REGENERANTS ON SELECTIVE MEDIA WITH NYSTATIN AND ESTIMATION THEIR RESISTANCE TO INJURIOUS INSECTS

V.V. Mazin, T.A. Popova, N.V. Khadeeva, A.B. Burgutin,  
A.N. Maisuryan, P.N. Kharchenko, E.Yu. Yakovleva

#### S u m m a r y

The order was developed for selection of summer rape regenerants on selective nutrient media with nystatin. Isolated plants-regenerants were tested on resistance to nystatin taking into account microcutting's striking root and frequency of callusogenesis. In the field and laboratory conditions the entomological estimation of tolerance of isolated rape plants to injurious insects — *Pieris brassicae* L. and *Myzodes persicae* Sulz. — was made. It was shown that nystatin resistance in substantial number of clones remains at level of undifferentiated cells and tissues. It was established that clones isolated on selective nutrient media with nystatin have increased resistance to *Pieris brassicae* L. Obtained results suggest about undirected action of nystatin.

